<u>แก้คำผิด</u>

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 4449 (พ.ศ.2555) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง ยกเลิกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป

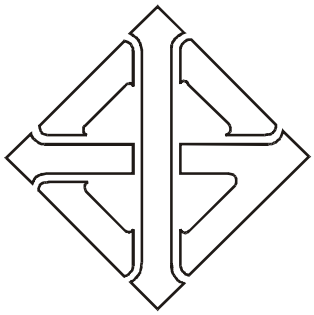
เล่ม 129 ตอนพิเศษ 169 ง ลงวันที่ 7 พฤศจิกายน 2555

หน้า 6 บรรทัดที่ 17 คำว่า “มาตรฐานเลขที่ มอก.1298-<u>2554</u>”

ให้แก้เป็น “มาตรฐานเลขที่ มอก.1298-<u>2555</u>”

ประกาศในราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 130 ตอนพิเศษ 24 ง

ลงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ พุทธศักราช 2556



มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก. 1298 - 2555

ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต

STERILE PLASTIC CONTAINERS FOR HUMAN BLOOD AND BLOOD COMPONENTS

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 11.040.20 ISBN 978-616-231-286-1

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิต และส่วนประกอบของโลหิต

มอก. 1298 - 2555

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 129 ตอนพิเศษ 169ง
วันที่ 7 พฤศจิกายน พุทธศักราช 2555

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 366
มาตรฐานขวดยาพลาสติก

ประธานกรรมการ

นางศิริลักษณ์ กุลวิทิต	สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
นายทวีทรัพย์ ชัยสมบูรณ์พันธ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรรมการ

นางสุภัทรา ผ่องศรี	สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
นางสาวสิริวรรณ ลี้ศิริสรรพ์	กรมวิทยาศาสตร์บริการ
นางสาวยุวพร ศรีน้อย	องค์การเภสัชกรรม
นางฉันทนา บุญรอด	โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
นางสาวจิราภรณ์ เชี่ยววิทย์	โรงพยาบาลราชวิถี
นางพิณทิรา ตันเถียร	ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
นายอาภรณ์ เวชประสิทธิ์	บริษัท ไทยโอซูก้า จำกัด
นางโศรดา หวังเมธีกุล	บริษัท เยเนอรัล ฮอสปิตัล โปรดัคส์ จำกัด (มหาชน)
นายสุเมธ ศิริพรพิทักษ์	บริษัท ฟาร์ม่า อินโนวา จำกัด

กรรมการและเลขานุการ

นางสุภัทรา อดิสร	สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต นี้ได้ประกาศใช้ครั้งแรกเป็นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต มาตรฐานเลขที่ มอก.1298-2538 ในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 112 ตอนที่ 78ง วันที่ 28 กันยายน พุทธศักราช 2538 ต่อมาได้พิจารณาเห็นสมควรแก้ไขปรับปรุงในสาระสำคัญทางวิชาการ โดยแก้ไขปรับปรุงคุณลักษณะที่ต้องการและวิธีทดสอบ เพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตในปัจจุบัน จึงได้แก้ไขปรับปรุงโดยยกเลิกมาตรฐานเดิมและกำหนดมาตรฐานนี้ขึ้นใหม่

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนดขึ้นโดยใช้ข้อมูลจากผู้ทำ ผู้ใช้ และเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

ISO 3826-1:2003	Plastics collapsible containers for human blood and blood components-Part 1 : Conventional containers
European Pharmacopoeia 6th edition, volume l,2008	
The United States Pharmacopeia, 32 revision, 2009	
WHO Geneva 1974	Plastic containers for pharmaceuticals testing and control
ISO 6401 : 2008	Plastics-Poly (vinyl chloride)-Determination of residual vinyl chloride monomer-Gas-chromatographic method
ISO 10993-5 : 2009	Biological evaluation of medical devices-Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity
มอก.720-2546	ชุดให้เลือดใช้ครั้งเดียว
มอก.1398-2551	เข็มฉีดยาปราศจากเชื้อชนิดใช้ครั้งเดียว
ภาคผนวก ก.	ASTM F 756-93 Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตามมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 4449 (พ.ศ. 2555)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง ยกเลิกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต

และกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต มาตรฐานเลขที่ มอก.1298-2538

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศยกเลิกประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2073 (พ.ศ.2538) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ.2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ถุงพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต ลงวันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2538 และออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต มาตรฐานเลขที่ มอก.1298-2554 ขึ้นใหม่ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ให้มีผลตั้งแต่วันที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2555

หม่อมราชวงศ์พงษ์สวัสดิ์ สวัสดิวัตน์

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อที่ทำจากพอลิโอเลฟินหรือพอลิไวนิลคลอไรด์ สำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต และภาชนะพลาสติกที่บรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต และ/หรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิต

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

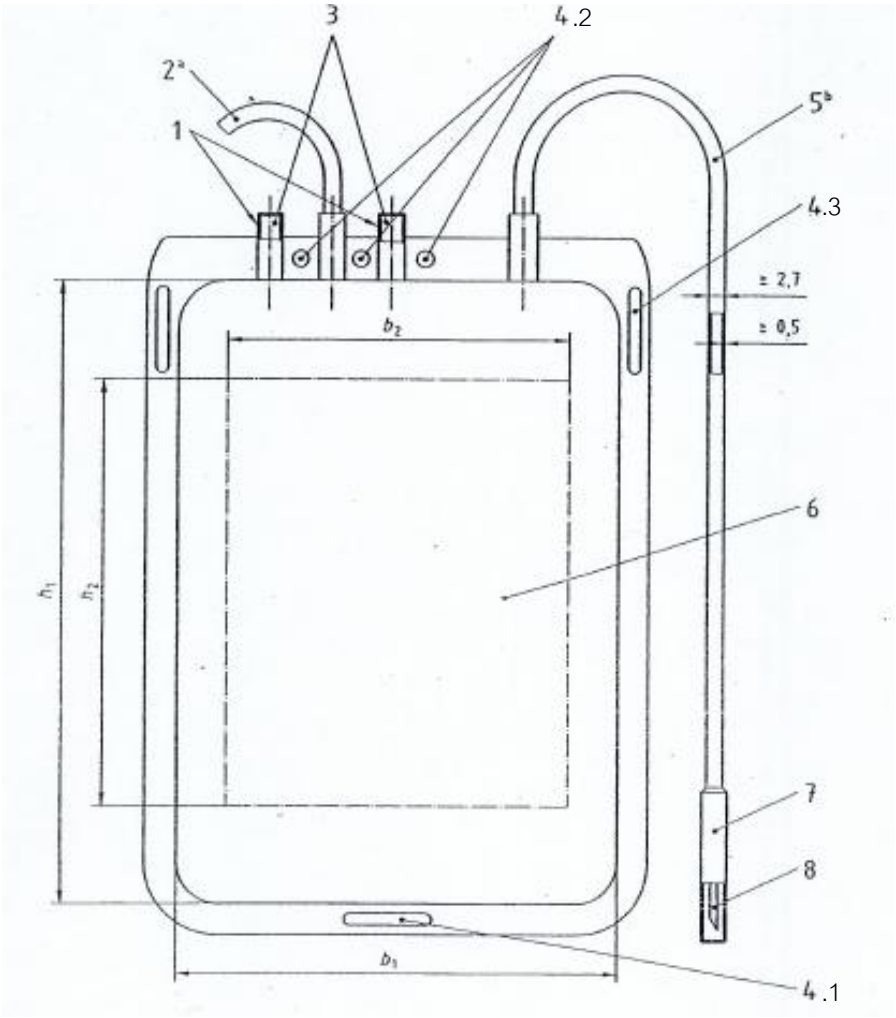
2.1 ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า “ถุงบรรจุโลหิต” หมายถึง ภาชนะพลาสติกที่ใช้บรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต อาจบรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต และ/หรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตด้วยก็ได้ มีส่วนประกอบโดยทั่วไปตามรูปที่ 1

2.2 ส่วนประกอบของโลหิต หมายถึง สิ่งที่แยกได้จากโลหิต เช่น เม็ดโลหิตแดง พลาสมา เกล็ดโลหิต

2.3 ถุงชุด หมายถึง ถุงบรรจุโลหิตตั้งแต่ 2 ถุงขึ้นไป เชื่อมต่อกันด้วยสายส่ง

3. รูปร่างและมิติ

3.1 รูปร่างโดยทั่วไปของถุงบรรจุโลหิตให้เป็นไปตามรูปที่ 1



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

1 ฝาหรือปลอกหุ้ม (protector)
2 สายส่ง (transfer tube) และที่ปิด (ถ้ามี)
3 ทางออก (outlet port)
4.1 หูหรือรูแขวนสำหรับกรณีให้โลหิตและส่วนประกอบของโลหิต (eyelet)
4.2 รูแขวนสำหรับกรณีแยกส่วนประกอบของโลหิต
4.3 รูเสียบหลอดโลหิตตัวอย่าง (ถ้ามี)
5 สายเข้า (collection tube)
6 บริเวณแสดงเครื่องหมายและฉลาก (label area)
7 ปลอกหุ้มเข็ม (protective cap)
8 เข็มแทงเข้าเส้นโลหิต (blood-taking needle)

รูปที่ 1 รูปร่างโดยทั่วไปของถุงบรรจุโลหิต
(ข้อ 2.1 ข้อ 3.1 และข้อ 4.5)

4. ส่วนประกอบ

4.1 สายเข้าและสายส่ง

4.1.1 ต้องไม่มีข้อบกพร่องใด ๆ เช่น ปริ แฟบ บิด พับ พับไขว้
การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.1.2 สายเข้าต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.7 mm (มิลลิเมตร) ผนังท่อหนาไม่น้อยกว่า 0.5 mm และยาวไม่น้อยกว่า 800 mm

4.1.3 สายส่งต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.7 mm ผนังท่อหนาไม่น้อยกว่า 0.5 mm และยาวไม่น้อยกว่า 200 mm

4.1.4 สายเข้าและสายส่งของแต่ละชุด ต้องมีหมายเลขเดียวกัน ติดถาวร โดยมีระยะห่างกันแต่ละช่วงไม่เกิน 7 cm (เซนติเมตร)
การทดสอบให้ใช้เครื่องวัดละเอียด 0.01 mm

4.2 ทางออก

4.2.1 ต้องมีทางออกอย่างน้อย 1 ทาง เพื่อเป็นทางให้โลหิตและส่วนประกอบของโลหิตไหลออกไปยังชุดสำหรับให้โลหิต

4.2.2 ทางออกนี้ก่อนใช้ต้องมีฝาหรือปลอกผนึกปิดอยู่เพื่อป้องกันการสัมผัส ภายในมีไดอะแฟรมที่เมื่อเจาะแล้วจะเสียไป ใช้ใหม่อีกไม่ได้ เพื่อรักษาสภาพปราศจากเชื้อภายในไว้ และต้องมีขนาดพอเหมาะกับเข็มเจาะของชุดสำหรับให้โลหิต เมื่อเสียบเข็มเข้าไปแล้วต้องอุดทางออกก่อนที่ปลายเข็มจะเจาะไดอะแฟรม
การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.3 การเชื่อมต่อระหว่างสายกับตัวถุง
สายเข้าและสายส่งต้องเชื่อมต่อเข้ากับตัวถุงได้แน่นสนิท ไม่รั่วซึม
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.1

4.4 เข็มแทงเข้าเส้นโลหิต

4.4.1 ต้องมีมิติ ความทนการกัดกร่อน ความแข็งตึง และความทนการแตกหัก เป็นไปตามมอก.1398
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม มอก.1398

4.4.2 ต้องติดกับปลายสายเข้า มีปลอกหุ้มเข็มที่รักษาสภาพปราศจากเชื้อได้ ไม่รั่วซึม ถอดออกได้ง่าย มีการป้องกันการสัมผัสกับตัวเข็ม ในกรณีที่ต้องทำลายผนึกก่อนถอดออก เมื่อทำลายผนึกแล้วต้องผนึกกลับเข้าไปใหม่ไม่ได้
เมื่อให้แรงดึง 20 N (นิวตัน) ทางสายเข้า เป็นเวลา 15 s (วินาที) เข็มแทงเข้าเส้นโลหิตต้องไม่หลุดออกจากปลายสายเข้า

4.4.3 อาจมีอุปกรณ์ป้องกันเข็มแทงผู้ปฏิบัติการหรือถุงบรรจุ
การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.5 หูหรือรูแขวน

ต้องมีหูหรือรูสำหรับแขวนและเสียบหลอดเก็บตัวอย่างโลหิตที่ไม่เป็นอุปสรรคในการใช้ถุงบรรจุโลหิตในกรณีต่าง ๆ เช่น เจาะ แยก เก็บ และใช้โลหิต เมื่อให้แรงดึง 20 N ในแนวตรงข้ามกับตำแหน่ง 4.1 (รูปที่ 1) เป็นเวลา 60 min (นาที) ที่อุณหภูมิ (23 ± 5) ^{o}C (องศาเซลเซียส) แล้วต้องไม่ฉีกขาด

5. คุณลักษณะที่ต้องการ

5.1 ลักษณะทั่วไป

5.1.1 ต้องโปร่งแสง ไม่มีสีหรือสีออกเหลืองเล็กน้อย มีความนิ่มหยุ่นตัว และไม่เหนียวเยิ้ม

5.1.2 ต้องไม่ทำให้น้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตเกิดความผิดปกติ เช่น ขุ่น ตกตะกอน

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

5.2 คุณลักษณะในการใช้งาน

5.2.1 ปริมาณอากาศ

ปริมาณอากาศทั้งหมดในแต่ละชุด เมื่อหารด้วยจำนวนถุงในชุดนั้น ต้องไม่เกิน 15 ml (มิลลิลิตร)

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.2

5.2.2 ระยะเวลาการถ่ายออกภายใต้ความดัน

น้ำต้องไหลออกจากถุงบรรจุโลหิตหมดภายในเวลา 2 min โดยไม่รั่วซึม

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.3

5.2.3 ระยะเวลาการบรรจุโลหิต

ต้องบรรจุของเหลวทดสอบได้เท่ากับปริมาตรที่ระบุไว้ที่ฉลากภายในเวลาน้อยกว่า 8 min

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.4

5.3 คุณลักษณะทางฟิสิกส์

5.3.1 ความโปร่งแสง

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.5 แล้ว ต้องสังเกตเห็นความเหลือบแสง (opalescence) ของสารแขวนลอยในถุงบรรจุโลหิต

5.3.2 ความคงสภาพต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.6 แล้ว ถุงบรรจุโลหิตยังคงเป็นไปตามข้อ 4.3 ข้อ 4.5 ข้อ 5.3.4 และข้อ 5.3.5

5.3.3 การซึมผ่านของไอน้ำ

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.7 แล้ว มวลที่หายไปต้องไม่เกินร้อยละ 2

5.3.4 ความทนต่อการหมุนเหวี่ยง

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.8 แล้ว ถุงบรรจุโลหิตต้องไม่รั่วซึมและเสียรูปอย่างถาวร

5.3.5 การรั่วซึม

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.9 แล้ว ต้องไม่รั่วซึม

5.3.6 อนุภาคปนเปื้อน

เมื่อตรวจพินิจแล้ว ต้องไม่พบอนุภาคใด ๆ กรณีที่มีน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต ต้องได้มาตรฐานตามที่ได้รับอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

5.3.7 ความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

เมื่อทดสอบตามข้อ 9.10 แล้ว ฉลากต้องติดแน่นอยู่กับถุงบรรจุโลหิต และเครื่องหมายหรือข้อความใด ๆ ที่ฉลากหรือที่ถุงบรรจุโลหิตต้องอ่านได้ชัดเจน

5.4 คุณลักษณะทางเคมี

5.4.1 คุณลักษณะของวัสดุที่ใช้ทำถุงบรรจุโลหิต

5.4.1.1 กรณีที่เป็นพอลิโอเลฟิน กากที่เหลือจากการเผา ต้องไม่เกิน 0.5 mg/g (มิลลิกรัมต่อกรัม)

5.4.1.2 กรณีที่เป็นพอลิไวนิลคลอไรด์ (ที่มีการใช้สารเติมแต่ง) กากที่เหลือจากการเผา ต้องไม่เกิน 1 mg/g

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.11

5.4.2 คุณลักษณะของสารละลายที่สกัดได้

5.4.2.1 ปริมาณสารที่ถูกออกซิไดส์ได้

ต้องไม่มากกว่าแบลงก์เกิน 1.5 ml

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.12

5.4.2.2 ปริมาณแอมโมเนีย

ต้องไม่เกิน 0.8 mg/l (มิลลิกรัมต่อลิตร)

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.13

5.4.2.3 ปริมาณคลอไรด์ไอออน

ต้องไม่เกิน 4 mg/l

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.14

5.4.2.4 ปริมาณโลหะ

(1) แบเรียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว แต่ละตัว ต้องไม่เกิน 1 mg/l

(2) ดีบุก แคดเมียม แต่ละตัว ต้องไม่เกิน 0.1 mg/l

(3) อะลูมิเนียม ต้องไม่เกิน 0.05 mg/l

การทดสอบให้ใช้อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรเมทรีหรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

5.4.2.5 ความเป็นกรด-ด่าง

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 mol/l (โมลต่อลิตร) ต้องไม่เกิน 0.4 ml หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 mol/l ต้องไม่เกิน 0.8 ml

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.15

5.4.2.6 ปริมาณกากที่ไม่ระเหย

ต้องไม่เกิน 5 mg (มิลลิกรัม)

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.16

5.4.2.7 ความเหลือบแสง

เหลือบแสงได้เล็กน้อย แต่ต้องไม่มากกว่าสารแขวนลอยอ้างอิง 2

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.17

5.4.2.8 สีของสารละลาย

ต้องไม่มีสี

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.18

5.4.2.9 การดูดกลืนแสง

ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 230 nm (นาโนเมตร) ถึง 360 nm

(1) ต้องไม่เกิน 0.25 สำหรับถุงบรรจุโลหิตที่มีความจุระบุไม่เกิน 100 ml

(2) ต้องไม่เกิน 0.2 สำหรับถุงบรรจุโลหิตที่มีความจุระบุเกิน 100 ml

การทดสอบให้ใช้สเปกโทรโฟโตเมทรี

5.4.2.10 ปริมาณได (2-เอทิลเฮกซิล) แทเลต (DEHP) ที่สกัดได้ (เฉพาะพอลิไวนิลคลอไรด์ที่เติม DEHP)

ต้องไม่เกิน 15 mg ต่อสารละลายสกัด 100 ml

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.19

5.4.2.11 ปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์

ต้องไม่เกิน 1 mg/kg

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม ISO 6401

5.5 คุณลักษณะทางชีวภาพ

5.5.1 ความปราศจากเชื้อ

ต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม USP หรือ EP หัวข้อ sterility tests

5.5.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ระดับความเป็นพิษต้องไม่มากกว่าระดับ 2

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.20

5.5.3 เอ็นโดท็อกซิน

ต้องไม่เกิน 20.0 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อชุด

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.21

5.5.4 การซึมผ่านของจุลินทรีย์

ต้องไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.22

5.5.5 การทำลายเม็ดโลหิต

ต้องไม่มีการทำลายเม็ดโลหิต

การทดสอบให้ปฏิบัติตามภาคผนวก ก.

6. การบรรจุ

6.1 ถุงบรรจุโลหิตต้องบรรจุในภาชนะบรรจุที่มีลักษณะดังนี้

6.1.1 ต้องแข็งแรงเพียงพอที่จะป้องกันความเสียหายต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับถุงบรรจุโลหิตในขณะเก็บรักษาและก่อนเปิดใช้งาน

6.1.2 ภาชนะบรรจุต้องไม่ก่อให้เกิดความเสียหายใด ๆ กับถุงบรรจุโลหิต และต้องป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราภายในภาชนะบรรจุนั้นได้ ในกรณีที่ใช้สารเคมีฆ่าเชื้อรา ต้องแสดงหลักฐานรับรองจากสถาบันที่เชื่อถือได้ว่าสารเคมีจะไม่แทรกซึมหรือซึมผ่านมาสัมผัสถุงบรรจุโลหิตและน้ำยาที่บรรจุอยู่ภายในถุงบรรจุโลหิต

6.1.3 ต้องปิดผนึกในลักษณะที่ทำให้ทราบได้ว่าภาชนะบรรจุนั้นถูกเปิดมาก่อนหรือไม่ (tamperproof)

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

6.2 ถุงบรรจุโลหิตและส่วนประกอบต้องเรียงอยู่ในภาชนะบรรจุอย่างเหมาะสม ในลักษณะที่สายเข้าและสายส่งไม่เสียหาย เช่น บิด พับ พับไขว้

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ ในกรณีที่เป็นภาชนะบรรจุทึบ ให้ตัดรอบ ๆ ภาชนะบรรจุโดยพยายามรักษาสภาพเดิมของการบรรจุไว้ให้มากที่สุด

7. เครื่องหมายและฉลาก

7.1 ข้อกำหนดเกี่ยวกับฉลาก

(1) ฉลากต้องมีขนาดพอสมควร หรือข้อความที่พิมพ์ที่ถุงบรรจุโลหิต ต้องมองเห็นสิ่งบรรจุภายในได้

(2) ฉลากต้องมีขนาดพอสำหรับเขียนหมู่โลหิตหรือข้อความสำคัญอื่น ๆ และเขียนด้วยปากกาและดินสอได้

(3) หมึกพิมพ์ข้อความต้องไม่ซึมเข้าไปในเนื้อพลาสติก

(4) กรณีที่ใช้กาวติดฉลาก กาวต้องไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และต้องไม่มีผลเสียต่อถุงบรรจุโลหิตหรือสิ่งบรรจุ

หมายเหตุ ต้องแสดงเอกสาร (material safety data sheet) รับรองว่าหมึกและกาวที่ใช้ไม่เป็นพิษ

7.2 ที่ฉลากหรือที่ถุงบรรจุโลหิตทุกชุด อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน ไม่ลบเลือนง่าย

(1) ข้อความที่แสดงว่าเป็นถุงเดี่ยวหรือถุงชุด

(2) ชื่อและปริมาตร เป็นมิลลิลิตร ของน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิต และสูตรส่วนประกอบของน้ำยานั้น

(3) ปริมาณโลหิตที่จะบรรจุ เป็นมิลลิลิตรหรือกรัม

(4) คำว่า “ผ่านการฆ่าเชื้อ”

(5) รหัสรุ่นที่ทำ

(6) วันที่ทำและวันหมดอายุของถุงบรรจุโลหิต

(7) คำเตือนที่แสดงว่า ห้ามใช้ถ้าน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตมีลักษณะผิดปกติ ห้ามอากาศเข้า(do not vent) ใช้ได้ครั้งเดียว

(8) คำแนะนำในการใช้ และภาวะการเก็บเมื่อบรรจุโลหิตแล้ว

(9) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

หมายเหตุ การกำหนดอายุการเก็บหรือวันหมดอายุของถุงบรรจุโลหิตต้องอาศัยข้อมูลความคงสภาพประกอบ ถ้าบรรจุน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต หรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตกำหนดวันหมดอายุต้องไม่นานกว่าเวลาที่ปริมาณน้ำยาในถุงหายไปเท่ากับร้อยละ 5

7.3 ที่ภาชนะบรรจุถุงบรรจุโลหิต (over-package) ทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) ชื่อผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้หรือชื่ออื่นที่สื่อความหมายว่าเป็นผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้

(2) ข้อความที่แสดงว่าเป็นถุงเดี่ยวหรือถุงชุด

(3) วันหมดอายุของถุงบรรจุโลหิต

(4) คำเตือนที่แสดงว่าห้ามใช้ถ้าภาชนะบรรจุชำรุดหรือเปิดแล้วเกิน 10 วัน

(5) รหัสรุ่นที่ทำ

(6) วิธีเก็บรักษา

(7) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

7.4 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วยต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

8. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

8.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินให้เป็นไปตามภาคผนวก ข.

9. การทดสอบ

9.1 การเชื่อมต่อระหว่างสายกับตัวถุง

9.1.1 เครื่องมือ

9.1.1.1 อุปกรณ์ให้แรง 20 N

9.1.1.2 กระดาษลิตมัสสีน้ำเงินหรืออินดิเคเตอร์อื่นที่เหมาะสม

9.1.2 วิธีทดสอบ

9.1.2.1 บรรจุน้ำใส่ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนถึงปริมาตรบรรจุที่ระบุ ปิดผนึกให้แน่น

9.1.2.2 ให้แรงดึง 20 N ทางสายเข้า เป็นเวลา 15 s ที่อุณหภูมิ (23 $\pm$ 5) $^{\circ}$C

9.1.2.3 พันกระดาษลิตมัสสีน้ำเงินรอบบริเวณรอยต่อ สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษลิตมัส

9.1.2.4 ทดสอบการเชื่อมต่อระหว่างสายส่งกับตัวถุงตามข้อ 9.1.2.1 ถึงข้อ 9.1.2.3 อีกครั้งหนึ่ง

หมายเหตุ ถ้าถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างบรรจุสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างออกไป ให้เลือกใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม แล้วทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน

9.2 ปริมาณอากาศ

9.2.1 เครื่องมือ

กระบอกฉีดยาขนาด 20 ml พร้อมเข็มฉีดยา

9.2.2 วิธีทดสอบ

9.2.2.1 วางถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างบนโต๊ะ ใช้ฝ่ามือรีดเพื่อไล่อากาศไปรวมกันที่มุมใดมุมหนึ่งของถุงบรรจุโลหิต (กรณีที่มีน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิต ให้ไล่น้ำยาไปอยู่ในสายเข้าหรือสายส่ง)

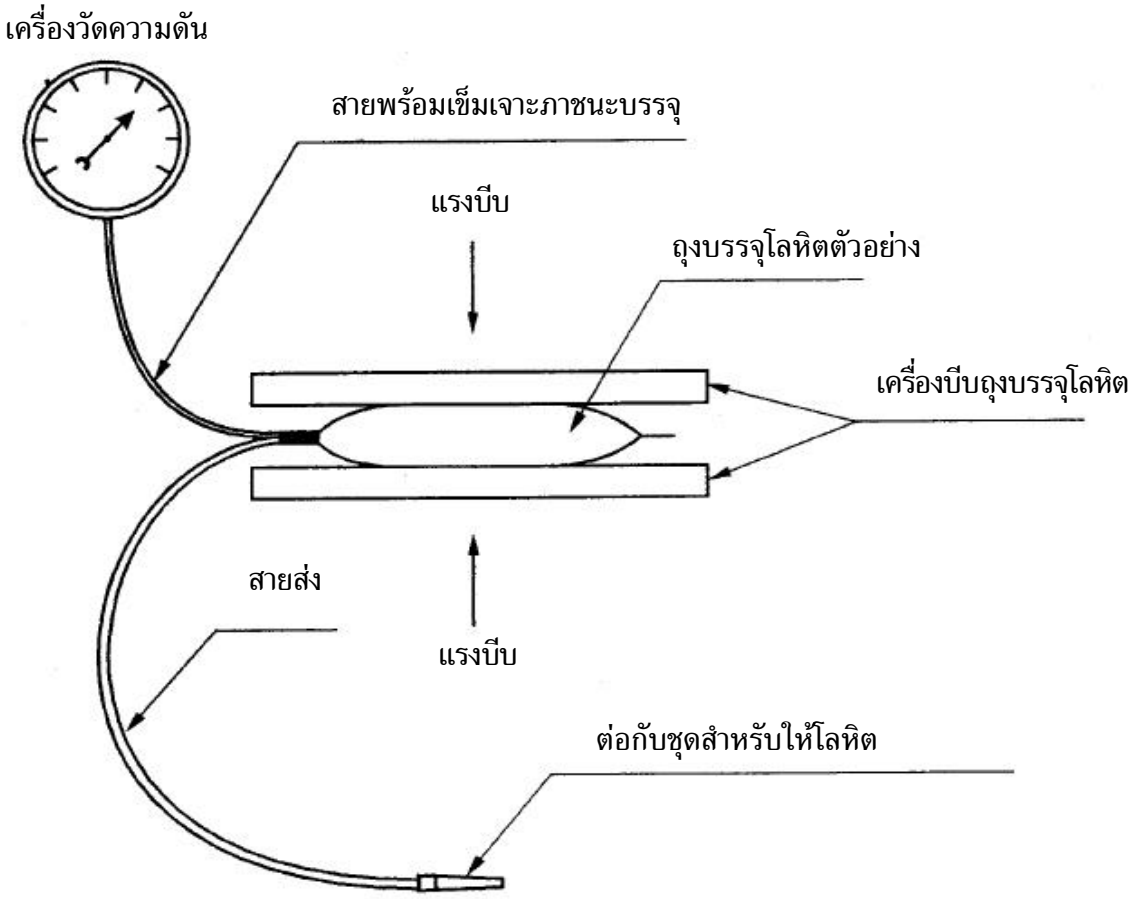
9.2.2.2 ค่อย ๆ แทงเข็มฉีดยาให้ทะลุถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง ดึงลูกสูบให้อากาศเข้าไปในกระบอกฉีดยาอย่างช้า ๆ ระวังอย่าให้มีสารละลายติดออกมา เมื่อสูบอากาศออกหมดแล้ว ดึงเข็มฉีดยาออก อ่านปริมาตรอากาศจากกระบอกฉีดยา รวมปริมาตรอากาศจากทุกถุง หารด้วยจำนวนถุง

9.3 ระยะเวลาการถ่ายออกภายใต้ความดัน

9.3.1 เครื่องมือ

9.3.1.1 ชุดสำหรับให้โลหิตตาม มอก.720

9.3.1.2 เครื่องบีบถุงบรรจุโลหิตประกอบด้วยแผ่นโลหะเรียบ 2 แผ่น ต่อกับเครื่องวัดความดันจนได้ความดันภายใน 50 kPa (กิโลพาสคัล) (ดูรูปที่ 2)



รูปที่ 2 การทดสอบระยะเวลาการถ่ายออกภายใต้ความดัน
(ข้อ 9.3.1.2)

9.3.2 วิธีทดสอบ

บรรจุน้ำที่มีอุณหภูมิ (23 ± 5) °C ใส่ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนถึงปริมาตรบรรจุที่ระบุ นำไปต่อกับชุดสำหรับให้โลหิตในลักษณะใช้งานจริง นำถุงบรรจุโลหิตวางระหว่างแผ่นโลหะเรียบ ใช้เครื่องบีบถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนได้ความดันภายใน 50 kPa บันทึกเวลาที่น้ำเริ่มไหลออกจากถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนหมด

9.4 ระยะเวลาการบรรจุโลหิต

9.4.1 เครื่องมือ

เครื่องทดสอบระยะเวลาการบรรจุโลหิต ประกอบด้วยภาชนะเก็บของเหลวขนาด 500 ml บรรจุของเหลวที่มีความหนืด 3.4×10^{-6} m^2/s (ตารางเมตรต่อวินาที) ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ความดัน 9.3 kPa

หมายเหตุ ของเหลวที่เหมาะสมคือ สารละลายกลูโคสในน้ำ 400 g/l *(กรัมต่อลิตร)*

9.4.2 วิธีทดสอบ

บรรจุของเหลวใส่ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนถึงปริมาตรบรรจุที่ระบุ ที่อุณหภูมิ (23 ± 5) °C ผ่านทางเข็มแทงเข้าเส้นโลหิตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.4 mm โดยจัดให้เข็มกับส่วนบนของถุงบรรจุโลหิตมีแรงดันไฮโดรสแตติกเท่ากัน บันทึกเวลา

9.5 ความโปร่งแสง

9.5.1 เครื่องมือ

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ช่วงความยาวคลื่น 640 nm และเซลล์ขนาด 1 cm

9.5.2 สารละลายและวิธีเตรียม

9.5.2.1 สารละลายไฮดราซีนซัลเฟต

ละลายไฮดราซีนซัลเฟต 1 g (กรัม) ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 h (ชั่วโมง)ถึง 6 h

9.5.2.2 สารละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน

ละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน 2.5 g ในน้ำกลั่น 25 ml ในขวดแก้วรูปกรวยที่มีจุกแก้วขนาด 100 ml

9.5.2.3 สารแขวนลอยเหลือบแสงปฐมภูมิ

เติมสารละลายไฮดราซีนซัลเฟต 25 ml ลงในสารละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 24 h สารแขวนลอยนี้จะคงสภาพได้นาน 60 วัน เมื่อเก็บไว้ในภาชนะแก้วที่ไม่มีตำหนิที่ผิว สารแขวนลอยนี้ต้องไม่เกาะติดผิวแก้ว และต้องเขย่าให้เข้ากันก่อนใช้

9.5.3 วิธีทดสอบ

เจือจางสารแขวนลอยเหลือบแสงปฐมภูมิจนมีค่าการดูดกลืนแสง 0.37 ถึง 0.43 ที่ความยาวคลื่น 640 nm (อัตราส่วนการเจือจางประมาณ 1:16) โดยวัดในเซลล์ขนาด 1 cm บรรจุสารแขวนลอยเหลือบแสงปฐมภูมิที่เจือจางแล้วในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนถึงปริมาตรบรรจุที่ระบุ ตรวจพินิจความโปร่งแสงของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง โดยสังเกตความเหลือบแสงของสารแขวนลอย เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นที่บรรจุในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างรุ่นและแบบเดียวกัน

9.6 การทดสอบความคงสภาพต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

9.6.1 เครื่องมือ

9.6.1.1 ตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิได้ถึง (–80 ± 2) °C

9.6.1.2 เครื่องอังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 2) °C

9.6.2 วิธีทดสอบ

บรรจุน้ำกลั่นลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างให้ได้ครึ่งหนึ่งของปริมาตรบรรจุ ทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ จนถึงอุณหภูมิ –80 °C และคงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 24 h หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิที่ (37±2) °C เป็นเวลา 60 min นำขึ้น แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างไปทดสอบตามข้อ 4.5 ข้อ 9.1 ข้อ 9.8 และข้อ 9.9 ตามลำดับ

หมายเหตุ ถ้าใช้สารทำความเย็นแทนตู้แช่แข็ง ต้องบรรจุถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างในถุงป้องกัน เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างสัมผัสกับสารทำความเย็น

9.7 การซึมผ่านของไอน้ำ

9.7.1 เครื่องมือ

9.7.1.1 ตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (4 ± 2) °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ (55 ± 5)

9.7.1.2 เครื่องชั่งละเอียด 0.005 g

9.7.2 วิธีทดสอบ

9.7.2.1 ชั่งถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างให้ละเอียดถึง 0.01 g (m_1) (ถ้ามีน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิตหรือน้ำยาเก็บรักษาสภาพส่วนประกอบของโลหิตให้ถ่ายออกก่อน)

9.7.2.2 บรรจุน้ำกลั่นเท่ากับปริมาตรบรรจุของถุงบรรจุโลหิต ปิดผนึกและปิดฉลากพร้อมใช้งาน ซับผิวภายนอกให้แห้ง ชั่งให้ละเอียดถึง 0.01 g (m_2)

9.7.2.3 นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างไปเก็บในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (4 ± 2) °C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ (55 ± 5) เป็นเวลา 42 วัน เมื่อครบกำหนดแล้ว ชั่งให้ละเอียดถึง 0.01 g (m_3)

คำนวณหามวลที่หายไป จากสูตร

$$\text{มวลที่หายไป เป็นร้อยละ} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

เมื่อ m_1 คือ มวลของถุงบรรจุโลหิตเปล่า เป็นกรัม

m_2 คือ มวลของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นก่อนทดสอบ เป็นกรัม

m_3 คือ มวลของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นหลังทดสอบ เป็นกรัม

9.8 ความทนต่อการหมุนเหวี่ยง

9.8.1 เครื่องมือ

9.8.1.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง ที่มีอัตราเร่งหนีศูนย์ 5 000 g (จี)

9.8.1.2 กระดาษโบรโมฟีนอลบลูหรืออินดิเคเตอร์อื่นที่เหมาะสม

9.8.2 วิธีทดสอบ

บรรจุน้ำกลั่นลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจนเท่ากับปริมาตรบรรจุ ซับผิวภายนอกให้แห้ง แล้วหุ้มถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างด้วยกระดาษโบรโมฟีนอลบลู นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร่งหนีศูนย์ 5 000 g ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 min สังเกตการรั่วซึมโดยดูที่กระดาษโบรโมฟีนอลบลู ถ้ารั่วซึม กระดาษโบรโมฟีนอลบลูจะเป็นสีชมพู สำหรับถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่ทำจากพอลิไวนิลคลอไรด์ (ที่มีการใช้สารเติมแต่ง) ต้องทดสอบซ้ำที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วย

หมายเหตุ ถ้าถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างบรรจุสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างออกไปให้เลือกใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม แล้วทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน

9.9 การรั่วซึม

9.9.1 เครื่องมือ

9.9.1.1 เครื่องบีบถุงบรรจุโลหิตที่ต่อกับเครื่องวัดความดัน ให้ความดันได้ถึง 50 kPa

9.9.1.2 กระดาษโบรโมฟีนอลบลูหรืออินดิเคเตอร์อื่นที่เหมาะสม

9.9.2 วิธีทดสอบ

นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่ทดสอบตามข้อ 9.8 แล้ว ไปบีบด้วยเครื่องบีบถุงบรรจุโลหิตให้ได้ความดันภายใน 50 kPa ที่อุณหภูมิ (23 ± 5) °C เป็นเวลา 10 min สังเกตการรั่วซึมโดยดูที่กระดาษโบรโมฟีนอลบลู ถ้ารั่วซึมกระดาษโบรโมฟีนอลบลูจะเป็นสีชมพู สำหรับถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่ทำจากพอลิไวนิลคลอไรด์ (ที่มีการใช้สารเติมแต่ง) ต้องทดสอบซ้ำที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วย

หมายเหตุ ถ้าถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างบรรจุสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างออกไปให้เลือกใช้อินดิเคเตอร์ที่เหมาะสม แล้วทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน

9.10 ความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นจนถึงปริมาตรบรรจุและปิดผนึกเรียบร้อยเก็บที่อุณหภูมิ (4 ± 2) °C เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ (-30 ± 5) °C เป็นเวลา 24 h แล้วนำไปแช่น้ำที่มีอุณหภูมิ (37 ± 2) °C เป็นเวลา 1 h แล้วตรวจพินิจสภาพของเครื่องหมายและฉลากบนถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง

9.11 กากที่เหลือจากการเผา

9.11.1 เครื่องมือ

9.11.1.1 เครื่องชั่งละเอียด 0.001 g

9.11.1.2 ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105 ± 5) °C

9.11.1.3 เตาเผาไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (550 ± 25) °C

9.11.1.4 ครูซิเบิล (ที่เผาที่อุณหภูมิ (550 ± 25) °C จนได้มวลคงที่แล้ว)

9.11.1.5 เดซิกเคเตอร์

9.11.2 วิธีทดสอบ

9.11.2.1 ตัดถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ กัน เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งมา 1.00 g ถึง 2.00 g ใส่ลงในครูซิเบิล และชั่งที่อุณหภูมิห้องจนได้มวลคงที่แล้ว

9.11.2.2 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ถึง 105 °C เป็นเวลา 1 h แล้วเผาต่อในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ (550 ± 25) °C จนได้มวลคงที่ คำนวณปริมาณกากที่เหลือจากการเผา

9.12 ปริมาณสารที่ถูกออกซิไดส์ได้

9.12.1 สารเคมี และสารละลาย

9.12.1.1 สารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 mol/l

9.12.1.2 สารละลายกรดซัลฟิวริก 1 mol/l

9.12.1.3 สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 mol/l

9.12.1.4 น้ำแป้งที่เตรียมใหม่ ๆ

9.12.1.5 โพแทสเซียมไอโอไดด์

9.12.2 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์

9.12.2.1 เครื่องมือ

หม้อนึ่งอัดที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (121 ± 2) °C

9.12.3 วิธีเตรียม

9.12.3.1 บรรจุน้ำกลั่นลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง จนเท่ากับปริมาตรบรรจุ เขย่าประมาณ 1 min เทน้ำกลั่นออก ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วบรรจุน้ำกลั่นลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง จนเท่ากับปริมาตรบรรจุอีกครั้งหนึ่ง ไล่อากาศออก แล้วปิดผนึกให้เรียบร้อย

9.12.3.2 นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121±2) °C เป็นเวลา 30 min อาจเลือกใช้ภาวะใดภาวะหนึ่งต่อไปนี้คือ ที่อุณหภูมิ (100±2) °C เป็นเวลา 2 h หรือที่อุณหภูมิ (70±2) °C เป็นเวลา (24±2) h โดยอุณหภูมิที่เลือกใช้ต้องไม่ต่ำกว่าอุณหภูมิใช้งาน

9.12.3.3 เตรียมสารละลายแบลงก์โดยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลายที่สกัดได้โดยใช้น้ำกลั่น 250 ml แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

9.12.4 วิธีทดสอบ

9.12.4.1 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 20.0 ml ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย เติมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 20.0 ml สารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 ml ต้มสารละลายเป็นเวลา 3 min เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1.0 g แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต จนได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 หยด แล้วไทเทรตต่อจนสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี

9.12.4.2 ทดลองซ้ำตามข้อ 9.12.4.1 โดยใช้สารละลายแบลงก์ 20.0 ml

9.12.4.3 เปรียบเทียบปริมาตรสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้กับสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์

9.13 ปริมาณแอมโมเนีย

9.13.1 สารละลาย

9.13.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/l

9.13.1.2 เนสเลอร์รีเอเจนต์

9.13.1.3 สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 1 mg/l

9.13.2 วิธีทดสอบ

9.13.2.1 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 10 ml เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 15 ml แล้วเติมเนสเลอร์รีเอเจนต์ 0.3 ml

9.13.2.2 เตรียมสารละลายเปรียบเทียบโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 8 ml แทนสารละลายที่สกัดได้ แล้วทำตามข้อ 9.13.2.1

9.13.2.3 ตั้งไว้เป็นเวลา 30 s สารละลายในข้อ 9.13.2.1 หรือสารละลายที่เตรียมโดยใช้สารละลายที่สกัดได้ต้องมีสีเหลืองไม่เข้มกว่าสารละลายเปรียบเทียบ

9.14 ปริมาณคลอไรด์ไอออน

9.14.1 สารละลาย

9.14.1.1 สารละลายซิลเวอร์ไนเทรต 0.1 mol/l

9.14.1.2 สารละลายกรดไนทริกเจือจาง

9.14.1.3 สารละลายมาตรฐานคลอไรด์ (คลอไรด์ไอออน 5 mg/l)

9.14.2 วิธีทดสอบ

9.14.2.1 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายซิลเวอร์ไนเทรต 0.3 ml ใส่ในสารละลายกรดไนทริกเจือจาง 0.15 ml แล้วเติมลงในสารละลายที่สกัดได้ 15 ml

9.14.2.2 เตรียมสารละลายอ้างอิงโดยใช้สารละลายมาตรฐานคลอไรด์ 12 ml และน้ำกลั่น 3 ml แล้วทำตามข้อ 9.14.2.1

9.14.2.3 เขย่าสารละลายทั้ง 2 ข้อ เป็นเวลา 2 min สารละลายที่เตรียมโดยใช้สารละลายที่สกัดได้ต้องไม่ขุ่นกว่าสารละลายอ้างอิง ระวังอย่าให้สารละลายถูกแสง

9.15 ความเป็นกรด-ด่าง

9.15.1 สารเคมี และสารละลาย

9.15.1.1 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

9.15.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 mol/l

9.15.1.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 mol/l

9.15.1.4 สารละลายเมทิลเรด

9.15.2 วิธีทดสอบ

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 10 ml เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2 หยด สารละลายต้องไม่เป็นสีแดง เมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์น้อยกว่า 0.4 ml ต้องได้สารละลายสีแดง และเมื่อเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.8 ml สีแดงจะหายไป แล้วเติมสารละลายเมทิลเรด 5 หยด สารละลายต้องเปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม

9.16 ปริมาณกากที่ไม่ระเหย

9.16.1 เครื่องมือ

9.16.1.1 เครื่องอังน้ำ

9.16.1.2 ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105 $\pm$ 2) $^{\circ}$C

9.16.2 วิธีทดสอบ

ระเหยสารละลายที่สกัดได้ 100 ml บนเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 105 $^{\circ}$C แล้วอบในตู้อบจนได้มวลคงที่

9.17 ความเหลือบแสง

9.17.1 สารละลายและวิธีเตรียม

9.17.1.1 สารละลายไฮดราซีนซัลเฟต

ละลายไฮดราซีนซัลเฟต 1 g ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml ตั้งไว้เป็นเวลา 4 h ถึง 6 h

9.17.1.2 สารละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน

ละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน 2.5 g ในน้ำกลั่น 25 ml ในขวดแก้วรูปกรวยที่มีจุกแก้ว

9.17.1.3 สารแขวนลอยเหลือบแสงปฐมภูมิ

เติมสารละลายไฮดราซีนซัลเฟต 25 ml ลงในสารละลายเฮกซะเมทิลีนเททระมีน ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 h

สารแขวนลอยนี้จะคงสภาพได้นาน 60 วัน โดยเก็บไว้ในภาชนะแก้วที่ไม่มีตำหนิที่ผิว และต้องเขย่าก่อนใช้ ถ้าสารแขวนลอยเกาะติดผิวแก้ว ใช้ไม่ได้

9.17.1.4 สารแขวนลอยเหลือบแสงมาตรฐาน

เจือจางสารแขวนลอยเหลือบแสงปฐมภูมิ 15 ml ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 000 ml สารแขวนลอยนี้ต้องเตรียมเสร็จใหม่ ๆ และเก็บไว้ได้นาน 24 h

9.17.2 วิธีทดสอบ

9.17.2.1 เตรียมสารแขวนลอยอ้างอิงตามตารางที่ 1 ผสมแล้วเขย่า

ตารางที่ 1 สารแขวนลอยอ้างอิง

(ข้อ 9.17.2.1)

หน่วยเป็นมิลลิลิตร

สารแขวนลอยอ้างอิง	1	2	3	4
สารแขวนลอยเหลือบแสงมาตรฐาน	5	10	30	50
น้ำกลั่น	95	90	70	50

9.17.2.2 เปรียบเทียบความเหลือบแสงของสารละลายตัวอย่างกับสารแขวนลอยเหลือบแสงมาตรฐาน

9.17.3 การรายงานผล

9.17.3.1 ความเหลือบแสงไม่เกินสารแขวนลอยอ้างอิง 1 แสดงว่า สารละลายใส

9.17.3.2 ความเหลือบแสงที่มากกว่าสารแขวนลอยอ้างอิง 1 แต่ไม่เกินสารแขวนลอยอ้างอิง 2 แสดงว่า สารละลายเหลือบแสงเล็กน้อย

9.17.3.3 ความเหลือบแสงที่มากกว่าสารแขวนลอยอ้างอิง 2 แต่ไม่เกินสารแขวนลอยอ้างอิง 3 แสดงว่า สารละลายเหลือบแสง

9.17.3.4 ความเหลือบแสงที่มากกว่าสารแขวนลอยอ้างอิง 3 แต่ไม่เกินสารแขวนลอยอ้างอิง 4 แสดงว่า สารละลายเหลือบแสงมาก

9.18 สีของสารละลาย

9.18.1 เครื่องมือ

หลอดเทียบสีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 12 mm

9.18.2 วิธีทดสอบ

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 2 ml ใส่ในหลอดเทียบสีหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ใส่น้ำกลั่น เปรียบเทียบสีในแนวระดับภายใต้แสงปกติ โดยใช้ฉากสีขาว

9.19 ปริมาณ DEHP ที่สกัดได้

9.19.1 เครื่องมือ

9.19.1.1 พิกโนมิเตอร์ (pycnometer)

9.19.1.2 เครื่องอังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ (37 ± 1) °C

9.19.1.3 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 272 nm

9.19.2 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

9.19.2.1 เอทานอล (ร้อยละ 95.1 ถึงร้อยละ 96.6 โดยปริมาตร) ความหนาแน่น 0.805 0 g/ml ถึง 0.812 3 g/ml

9.19.2.2 ตัวทำละลายสกัด

เอทานอล : น้ำกลั่น ในอัตราส่วนที่ให้สารละลายมีความหนาแน่น 0.937 3 g/ml ถึง 0.937 8 g/ml ตรวจสอบด้วยพิกโนมิเตอร์

9.19.2.3 DEHP

9.19.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

9.19.3.1 สารละลาย 1

ละลาย DEHP 1 g ในเอทานอล แล้วเจือจางจนมีปริมาตร 100 ml ด้วยเอทานอล

9.19.3.2 สารละลาย 2

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลาย 1 ปริมาตร 10 ml แล้วเจือจางจนมีปริมาตร 100 ml ด้วยเอทานอล

9.19.3.3 สารละลายมาตรฐานเอถึงสารละลายมาตรฐานอี

(1) สารละลายมาตรฐานเอ (DEHP 20 mg/100 ml)

เจือจางสารละลาย 2 ปริมาตร 20 ml จนมีปริมาตร 100 ml ด้วยตัวทำละลายสกัด (ข้อ 9.19.2.2)

(2) สารละลายมาตรฐานบี (DEHP 10 mg/100 ml)

เจือจางสารละลาย 2 ปริมาตร 10 ml จนมีปริมาตร 100 ml ด้วยตัวทำละลายสกัด (ข้อ 9.19.2.2)

(3) สารละลายมาตรฐานซี (DEHP 5 mg/100 ml)

เจือจางสารละลาย 2 ปริมาตร 5 ml จนมีปริมาตร 100 ml ด้วยตัวทำละลายสกัด (ข้อ 9.19.2.2)

(4) สารละลายมาตรฐานดี (DEHP 2 mg/100 ml)
เจือจางสารละลาย 2 ปริมาตร 2 ml จนมีปริมาตร 100 ml ด้วยตัวทำละลายสกัด (ข้อ 9.19.2.2)

(5) สารละลายมาตรฐานอี (DEHP 1 mg/100 ml)
เจือจางสารละลาย 2 ปริมาตร 1 ml จนมีปริมาตร 100 ml ด้วยตัวทำละลายสกัด (ข้อ 9.19.2.2)

9.19.4 การทำกราฟสอบเทียบ

วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเอถึงสารละลายมาตรฐานอี ที่ความยาวคลื่น 272 nm โดยใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นสารละลายอ้างอิง แล้วเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ DEHP

9.19.5 วิธีทดสอบ

9.19.5.1 บรรจุตัวทำละลายสกัดที่มีอุณหภูมิ 37 °C ลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง ทางสายเข้าจนได้ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรบรรจุ อบที่อุณหภูมิ 37 °C ไล่อากาศออกแล้วปิดสายเข้าให้สนิท

9.19.5.2 แช่ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างตามแนวนอนในเครื่องอังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ (37 ± 1) °C เป็นเวลา (60 ± 1) min โดยไม่ต้องเขย่า

9.19.5.3 นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างขึ้นจากน้ำ กลับขึ้นกลับลงค่อย ๆ 10 ครั้ง แล้วถ่ายสารละลายลงในขวดแก้วรูปกรวย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 272 nm โดยใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นสารละลายอ้างอิง

9.19.5.4 หาปริมาณ DEHP ที่สกัดได้จากกราฟสอบเทียบ

9.20 ความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

9.20.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

9.20.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ ตู้อบชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์เทด (inverted microscope) เครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer)

9.20.1.2 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ ได้แก่ หม้อนึ่งอัด ตู้อบร้อน (hot air oven)

9.20.1.3 ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

9.20.1.4 ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเตรียมตัวอย่าง

9.20.1.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ (tissue culture flask) ขนาดพื้นที่ 75 cm^2

9.20.2 สารละลายและวิธีเตรียม

9.20.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ
ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 g โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 g โซเดียมคลอไรด์ 8.0 g และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 1.15 g ในน้ำกลั่นและเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) °C เป็นเวลา 15 min หรือกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 μm

9.20.2.2 สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 100 g/l ที่ปราศจากเชื้อ

9.20.2.3 สารละลายทริปซิน (trypsin) 0.5 g/l ถึง 5.0 g/l ที่ปราศจากเชื้อ

9.20.2.4 สารละลายกลูทามีน (glutamine) 29.2 g/l ที่ปราศจากเชื้อ

9.20.2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม (Eagle's MEM)

9.20.2.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต และอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง
เติมสารละลายกลูทามีน 1 ml สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.2 ml และเซรุ่มฟีทัลโบไวน์ (fetal bovine serum) 5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม 100 ml โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 8 °C เก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

9.20.2.7 สารละลายฟอร์มาลิน–คริสทัลไวโอเลต (formalin–crystal violet)
ละลายคริสทัลไวโอเลต 500 mg ด้วยสารละลายฟอร์แมลดีไฮด์ 10 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9.20.2.8 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue stain) 4.0 g/l
เตรียมโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9

9.20.2.9 การควบคุมเชิงบวก (เลือกใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง)

(1) สารเคมีควบคุมเชิงบวก (positive chemical control) เช่น สารละลายซิงก์แอซีเทต 8 mg/l

(2) วัสดุควบคุมเชิงบวก (positive material control) เช่น แผ่นพอลิไวนิลคลอไรด์ที่มีซิงก์ไดเอทิลไดไทโอคาร์บาเมต ร้อยละ 0.1 แผ่นยูเอสพีพอซิทิฟไบโอรีแอกชันอาร์เอส (USP Positive Bioreaction RS)

9.20.2.10 การควบคุมเชิงลบ (เลือกให้สอดคล้องกับข้อ 9.20.2.9)

(1) ในกรณีที่เลือกใช้ข้อ 9.20.2.9 (1) สารเคมีควบคุมเชิงลบ (negative chemical control) เช่น สารละลายซิงก์แอซีเทต 2 mg/l

(2) ในกรณีที่เลือกใช้ข้อ 9.20.2.9 (2) วัสดุควบคุมเชิงลบ (negative material control) เช่น แผ่นพลาสติกมาตรฐานพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง

9.20.3 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

9.20.3.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์เนื้อเยื่อ (cell suspension)
นำเซลล์เนื้อเยื่อ L–929 (ATCC cell line CCL 1, NCTC clone 929) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดพื้นที่ 75 cm^2 มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เติมสารละลายทริปซิน 1 ml และอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลา 3 min ถึง 5 min เคาะขวดเบา ๆ จนเซลล์หลุดร่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 5 ml ลงในขวด เขย่าขวดให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนลอยที่ได้นี้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์ โดยดูดสารแขวนลอยของเซลล์ 0.1 ml มาผสมกับสีย้อมทริปแพนบลู 0.1 ml ทิ้งไว้ 1 min แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนลอยโดยใช้เครื่องนับเม็ดโลหิต เจือจางสารแขวนลอยของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น $2x10^5$ เซลล์ต่อ 1 ml

9.20.3.2 นำเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 ml เติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม หลุมละ 0.75 ml แล้วนำไปอบในตู้อบชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ $(37 \pm 1)\ ^{\circ}C$ เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

9.20.4 วิธีทดสอบ

9.20.4.1 การเตรียมสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุม

(1) การเตรียมสารละลายทดสอบ

ตัดส่วนต่าง ๆ ของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดกว้างประมาณ 0.1 cm ถึง 0.3 cm และยาวประมาณ 1 cm ถึง 5 cm ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างปริมาตร 5 ml/g ของชิ้นตัวอย่าง นำไปอบในตู้อบชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ $(37 \pm 1)\ ^{\circ}C$ เป็นเวลา (24 ± 1) h สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลายทดสอบ

(2) การเตรียมสารละลายควบคุม

(2.1) เตรียมสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกและสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ โดยสกัดวัสดุควบคุมเชิงบวกและวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ 9.20.4.1(1) หรือ

(2.2) เตรียมสารเคมีควบคุมเชิงบวกและสารเคมีควบคุมเชิงลบโดยเตรียมสารละลายซิงก์แอซีเทต ในอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้น 8 mg/l และ 2 mg/l ตามลำดับ

9.20.4.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

9.20.4.3 เติมสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุมต่อไปนี้สัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหลุมละ 0.75 ml โดยเติม

(1) สารละลายทดสอบ 3 หลุม

(2) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวก และ/หรือสารละลายซิงก์แอซีเทต 8 mg/l 3 หลุม

(3) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ และ/หรือสารละลายซิงก์แอซีเทต 2 mg/l 3 หลุม

(4) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงก์ 3 หลุม

9.20.4.4 นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ $(37 \pm 1)\ ^{\circ}C$ เมื่อครบระยะเวลา 24 h และ 48 h ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ 9.20.5

9.20.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์สัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายควบคุม และแบลงก์เป็นเวลา 24 h และ 48 h ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์เทต บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผลตามตารางที่ 2

หลังจากบันทึกผลที่ 48 h แล้วให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ติดบนถาดเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบ

ตารางที่ 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

(ข้อ 9.20.5)

ระดับความเป็นพิษ	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (conditions of cell culture)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	พบเซลล์แผ่เป็นชั้นเดี่ยว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ตามปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	เป็นพิษน้อยมาก (slight)	พบเซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิว ไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย (mild)	พบเซลล์มีลักษณะกลม ไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดี่ยว
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	พบเซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ ไม่เกินร้อยละ 70
4	เป็นพิษอย่างรุนแรง (severe)	พบการทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

9.20.6 การแปลผล

การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ต่อเมื่อ

(1) แบลงก์ สารละลายซิงก์แอซีเทต 2 mg/l หรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)

(2) สารละลายซิงก์แอซีเทต 8 mg/l หรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

9.21 เอ็นโดท็อกซิน

ให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้ ซึ่งปฏิบัติตามหลักการใน USP หัวข้อ Bacterial Endotoxins′ Test โดยมีวิธีการทดสอบ 2 วิธี คือ เจลคล็อตเทคนิก (gel-clot technic) และโฟโตเมทริกเทคนิก (photometric technic) สามารถเลือกทดสอบด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง

9.21.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ทุกชนิดต้องไม่ทำให้เกิดไพโรเจนิกรีแอกชัน (pyrogenic reaction) สำหรับอุปกรณ์ที่ทนความร้อนให้อบด้วยความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) ในกรณีอุปกรณ์ที่เป็นพลาสติกหรือไม่สามารถทนความร้อนสูงได้ ต้องเลือกใช้เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ระบุว่าเป็นนอนไพโรเจนิก (non-pyrogenic)

9.21.1.1 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $(37 \pm 1)\ ^{o}C$

9.21.1.2 ลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเซตรีเอเจนต์ (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Reagent)

9.21.1.3 สารมาตรฐานเอ็นโดท็อกซิน

9.21.1.4 แอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ เอ็นโดท็อกซินไม่เกิน 0.005 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร หรือน้อยกว่าความไวของแอลเอแอลรีเอเจนต์ที่ใช้

9.21.1.5 น้ำกลั่นสำหรับฉีดที่ได้ผ่านการตรวจแล้ว

9.21.1.6 หลอดแก้วขนาด 10 mm × 75 mm เป็นหลอดทำปฏิกิริยา (reaction tube) สำหรับเจลคล็อตเทคนิก

9.21.1.7 หลอดแก้วขนาด 16 mm × 125 mm หรือ 13 mm × 100 mm เป็นหลอดสำหรับเจือจาง (dilution tube)

9.21.1.8 ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ชนิดพอลิสไตรีน ซึ่งต้องปราศจากเชื้อและเป็นนอนไพโรเจนิก (สำหรับโฟโตเมทริกเทคนิก)

9.21.1.9 ไมโครปิเปตต์และทิป

9.21.1.10 เครื่องผสม (vortex mixer)

9.21.1.11 นาฬิกาจับเวลา

9.21.1.12 เตาหลุมไฟฟ้า (สำหรับเจลคล็อตเทคนิก)

9.21.1.13 เครื่องอ่านผลวิเคราะห์จากถาดเลี้ยงเซลล์ พร้อมโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน (สำหรับโฟโทเมทริกเทคนิก)

9.21.2 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ใช้ถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างจำนวน 3 ชุด ถึง 10 ชุด สำหรับการทดสอบในแต่ละครั้ง ปฏิบัติตาม USP หัวข้อ Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices

9.21.3 การคำนวณค่าการเจือจางใช้ได้สูงสุด (maximum valid dilution, MVD)

(1) คำนวณปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน (Endotoxin limit)

$$\text{ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซินของสารละลายทดสอบ} = \frac{K \times N}{V}$$

เมื่อ K คือ ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซินของอุปกรณ์การแพทย์ตามมาตรฐาน USP เท่ากับ 20 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่ออุปกรณ์

N คือ จำนวนชิ้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

V คือ ปริมาตรรวมของสารละลายทดสอบ เป็นมิลลิลิตร

(2) คำนวณค่าการเจือจางใช้ได้สูงสุด

$$\text{MVD} = \frac{\text{ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน [จากข้อ 9.21.3 (1)]}}{\lambda}$$

เมื่อ λ คือ ความไวของแอลเอแอลรีเอเจนต์

9.21.4 สารละลายและวิธีเตรียม

สารละลายที่เตรียมต่อไปนี้ ต้องทำการเตรียมในวันที่ทำการทดสอบ และไม่ควรนำสารละลายที่เหลือหลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบแล้วกลับมาใช้อีก ยกเว้นสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซินเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 8 °C ได้ไม่เกิน 4 สัปดาห์

9.21.4.1 สารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซิน

ใช้ปิเปตต์ดูดแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ตามปริมาตรที่ระบุโดยผู้ทำ ลงในผงแห้งของสารมาตรฐานเอ็นโดท็อกซิน และผสมโดยใช้เครื่องผสม เป็นเวลา 30 min จะได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินมีความแรงตามที่ระบุในใบรับรองของผู้ทำ

9.21.4.2 สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินสำหรับวิธีเจลคล็อตเทคนิก

นำสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซินมาเจือจางด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ให้ได้ความแรงเท่ากับ 2 เท่าของความไวของแอลเอแอลรีเอเจนต์ (2λ) หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

9.21.4.3 สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีโฟโตเมทริก

นำสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซิน มาเจือจางด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ให้ได้ความแรงเท่ากับ 1λ $10\ \lambda$ $100\ \lambda$ และ $1\ 000\lambda$ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

9.21.5 วิธีทดสอบ

สารละลายทดสอบต้องผ่านการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา (Inhibition/Enhancement test) ตามหลักการที่ระบุใน USP ถ้าพบว่าสารละลายทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้ง หรือกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาให้เจือจางสารละลายทดสอบด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ก่อนนำมาทำการทดสอบโดยค่าการเจือจางต้องไม่เกินค่า MVD

9.21.5.1 วิธีเจลคล็อตเทคนิก

(1) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายทดสอบต่อไปนี้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลอด ชนิดละ 2 หลอด

(1.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ (negative control) ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(1.2) สารละลายควบคุมเชิงบวก (positive control) ให้เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 2λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(1.3) สารละลายทดสอบ (sample tested) ให้เติมสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง

(1.4) สารละลายทดสอบเชิงบวก (positive product control) ให้เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 2λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมโดยการเจือจางในสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง

(2) นำหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดไปอุ่นในเตาหลุมไฟฟ้าที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(3) เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ลงในผงแห้งของแอลเอแอลรีเอเจนต์ ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลากหรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ผสมเบา ๆ จนผงแห้งของแอลเอแอลรีเอเจนต์ละลายหมดจะได้สารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ที่มีความไวตามที่ระบุในใบรับรองของผู้ทำ สารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ในแต่ละรุ่นการทำที่นำมาใช้ในการทดสอบต้องผ่านการทดสอบ ยืนยันความไวของสารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ (lysate sensitivity test) ตามหลักการที่ระบุใน USP

(4) เติมสารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทำปฏิกิริยาแต่ละหลอด แกว่งหลอดทำปฏิกิริยาเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง เริ่มทำการจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ลงในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดแรกเสร็จ

(5) บ่มหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดในเตาหลุมไฟฟ้าที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลา (60 ± 2) min

(6) ดูผลการเกิดเจลในหลอดทำปฏิกิริยา โดยกลับหลอดคว่ำลง 180 ° (องศา) ถ้าเจลที่เกิดขึ้นคงสภาพ โดยไม่ไหลลงมาจากก้นหลอดให้บันทึกเป็นผลบวก แต่ถ้าไม่เกิดเจลหรือเจลเสียสภาพไหลลงมา ให้บันทึกเป็นผลลบ การยกหลอดขึ้นดูผลต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะเจลที่เกิดขึ้นค่อนข้างเปราะและแตกง่าย

9.22.5.2 วิธีโฟโตเมทริกเทคนิก

ประกอบด้วยวิธีเทอร์บิไดเมทริก (turbidimetric) และโครโมเจนิก (chromogenic) ซึ่งน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบจะมีรายละเอียดบางส่วนของวิธีการทดสอบที่แตกต่างกันไปตามบริษัทผู้ทำกำหนด ผู้วิเคราะห์สามารถปรับขั้นตอนการวิเคราะห์บางส่วนให้ได้ตามความเหมาะสมกับน้ำยาที่ใช้ วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้เป็นไปตามขั้นตอนพื้นฐานที่ระบุใน USP

(1) ป้อนข้อมูลของน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ และกำหนดตำแหน่งของสารละลายควบคุมและสารละลายทดสอบในแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์ (microplate template) ลงในโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(2) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายทดสอบต่อไปนี้ ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม (ยกเว้นสารละลายทดสอบเชิงบวก เตรียมตามข้อ 9.21.5.2(2.4) ชนิดละ 3 หลุม ตามตำแหน่งที่กำหนดในแผ่นแถบถาดเลี้ยงเซลล์

(2.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(2.2) สารละลายควบคุมเชิงบวก เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซิน ที่มีความแรง 1λ 10λ 100λ และ 1 000λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร ความแรงละ 3 หลุม เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

(2.3) สารละลายทดสอบ เติมสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง

(2.4) สารละลายทดสอบเชิงบวก เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่ความแรง 100λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 µl ลงในก้นหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมสารละลายทดสอบ หรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมเดียวกัน

(3) เติมสารละลายข้างต้นครบตามแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์แล้ว ให้นำถาดเลี้ยงเซลล์อุ่นที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลา 10 min

(4) เติมแอลเอแอลรีคอนสติติวชั่นบัฟเฟอร์ (LAL Reconstitution Buffer) หรือตัวทำละลายที่ผู้ทำกำหนด ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลาก หรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ผสมเบา ๆ จนผงแห้งของแอลเอแอลรีเอเจนต์ละลายหมด จะได้สารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ที่มีความไว ตามที่ระบุไว้ในใบรับรองของผู้ทำ สารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ในแต่ละรุ่นการทำที่นำมาใช้ในการทดสอบต้องผ่านการทดสอบยืนยันความไวของสารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ตามหลักการที่ระบุใน USP

(5) เติมสารละลายแอลเอแอลรีเอเจนต์ ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมทำปฏิกิริยาทุกหลุมจนครบถ้วน แล้วจึงเริ่มการทำงานของโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(6) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ โปรแกรมจะทำการสร้างกราฟมาตรฐาน และแสดงปริมาณสารเอ็นโดท็อกซินที่ตรวจพบในตัวอย่าง พร้อมทั้งคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ และร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) ของสารละลายทดสอบเชิงบวก

9.21.6 การประเมินผล

9.21.6.1 การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้เมื่อ

(1) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงลบได้ผลลบ

(2) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงบวกได้ผลบวก

(3) ผลการทดสอบของสารละลายทดสอบเชิงบวกสำหรับวิธีเจลคล็อตเทคนิกได้ผลบวก และสำหรับวิธีโฟโตเมทริกค่าร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 200

9.21.6.2 เกณฑ์การตัดสิน

ผลทดสอบจะถือว่าตัวอย่างเข้ามาตรฐาน ถ้ามีปริมาณสารเอ็นโดท็อกซินน้อยกว่าปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน

9.22 การซึมผ่านของจุลินทรีย์

9.22.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ใช้เชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* ATCC 6633 (*Bacillus subtillis* ATCC 6633) และเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส ATCC 10708 (*Salmonella* Choleraesuis ATCC 10708)

9.23.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

(1) ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม

แอล-ซีสทีน	0.5	g
โซเดียมคลอไรด์	2.5	g
เดกซ์โทรส	5.5	g
อะการ์	0.75	g
ยีสต์เอกซ์แทรกต์	5.0	g
เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatic digest of casein)	15.0	g

โซเดียมไทโอไกลโคเลต		
(หรือกรดไทโอไกลโคลิก 0.3 ml)	0.5	g
สารละลายเรซาซูรินโซเดียม (resazurin sodium solution)		
ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรที่เตรียมขึ้นใหม่	1.0	ml
น้ำกลั่น	1	l

นำแอล-ซีสทีน โซเดียมคลอไรด์ เดกซ์โทรส อะการ์ ยีสต์เอกซ์แทรกต์ และเคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน มาผสมรวมกันในโกร่งและบดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย คนให้เข้ากัน แล้วเทสารละลายที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ ล้างโกร่งด้วยน้ำกลั่นจำนวนที่เหลือ เทรวมกันในบีกเกอร์ นำไปทำให้ร้อนเติมโซเดียมไทโอไกลโคเลตหรือกรดไทโอไกลโคลิกลงไป ปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่า (7.1 ± 0.2) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/l (ถ้าจำเป็นต้องกรองให้นำสารละลายที่ได้มาทำให้ร้อนแต่ไม่ให้เดือด แล้วกรองในขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่เปียกชื้น) เติมสารละลายเรซาซูรินโซเดียม ผสมให้เข้ากันแล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว [100 kPa (กิโลพาสคล)] เป็นเวลา 15 min

(2) ซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม

เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน	17.0	g
ซอยบีนมีลที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน		
(papaic digest soybean meal)	3.0	g
โซเดียมคลอไรด์	5.0	g
ไดเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	g
เดกซ์โทรส	2.5	g
น้ำกลั่น	1	l

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ต้มให้ละลาย แล้วปล่อยไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น (7.3 ± 0.2) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/l กรองแล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (100 kPa) เป็นเวลา 15 min

9.22.3 การเตรียมเชื้อเผื่อใช้ (stock culture)

(1) การเตรียมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส*

ให้เพาะลงบนอะการ์ผิวเอียงของซอยบีนเคซีนไดเจสต์อะการ์ นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 24 h แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 8 °C

(2) การเตรียมเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส

ให้เพาะลงบนอะการ์ผิวเอียงของซอยบีนเคซีนไดเจสต์อะการ์ นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 4 °C

9.22.4 การเตรียมเชื้อทดสอบ (inoculum)

(1) ถ่ายเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 9.22.3) ลงในขวดเพาะเชื้อที่มีฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม 20 ml

(2) ถ่ายเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 9.22.3) ลงในขวดเพาะเชื้อที่มีซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม 20 ml

(3) นำขวดเพาะเชื้อในข้อ (1) และข้อ (2) ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 24 h

9.22.5 วิธีวิเคราะห์

(1) ใส่ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม และซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม ลงในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 2 ให้ได้ปริมาณเท่ากับความจุที่ระบุไว้ของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างนั้น แล้วปิดให้สนิท

(2) วางถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างตามข้อ (1) ลงในภาชนะที่เหมาะสม (เช่น บีกเกอร์ขนาดใหญ่ อ่างแก้ว) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับที่มีอยู่ในถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง โดยให้พื้นที่ผิวภายนอกของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างแต่ละใบจมอยู่ใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่น้อยกว่าร้อยละ 60

(3) เติมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* ที่ใช้ทดสอบลงในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ ที่บรรจุฟลูอิดไทโอไกลโครเลตมีเดียม 20 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 l ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

(4) เติมเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส ที่ใช้ทดสอบลงในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ที่บรรจุซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม 20 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 l ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

(5) นำภาชนะในข้อ (3) และข้อ (4) ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 7 วัน

(6) เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างทั้งหมดออกมาเขย่า ล้างด้านนอกโดยรอบด้วยน้ำ แล้วนำไปแช่ในสารละลายโพรพานอลร้อยละ 60 โดยปริมาตร เป็นเวลา 120 s และล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

(7) ใช้แท่งแก้วร้อนแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 mm เจาะผนังถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง (ข้อ(6)) บริเวณเหนือผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายในทันทีแล้วใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาที่ปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างแต่ละใบตามปริมาณในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 4

(8) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดเอาไว้จากถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างแต่ละใบ (ข้อ (7)) ใส่ลงในขวดเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันขวดละ 10.0 ml ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 3 สดมภ์ที่ 5 นำขวดเพาะเชื้อทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด สังเกตดูว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ในขวดเพาะเชื้อแต่ละใบหรือไม่

9.22.6 การประเมินผล

ให้ถือว่าถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์ เมื่อขวดเพาะเชื้อทุกใบไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

ตารางที่ 3 การทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์

(ข้อ 9.22.5)

ความจุของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่าง ml	จำนวนถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ		ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดจากถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างแต่ละใบ	จำนวนขวดเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ ใบ
	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดละ ใบ	รวม ใบ		
ไม่เกิน 100	5	10	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ แต่ต้องไม่น้อยกว่า 0.1 ml	1
101 ถึง 500	3	6	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ	2
501 ขึ้นไป	1	2	ร้อยละ 1 โดยปริมาตรของความจุ แต่ไม่เกิน 25 ml	5

ภาคผนวก ก.

การทำลายเม็ดโลหิต

(ข้อ 5.5.5)

ก.1 การทำลายเม็ดโลหิต

ก.1.1 เครื่องมือ

(1) ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) °C

(2) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 540 nm

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(4) หม้อนึ่งอัด

(5) ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 1) °C

ก.1.2 สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.9 โดยมวล ที่ปราศจากเชื้อ

(2) สารมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน (hemoglobin reference standard) 6 mg/ml

(3) สารละลายแดรบคิน (Drabkin's solution)

ละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1 g โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 g และโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ 0.2 g ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 ml

ก.1.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

เจาะเลือดกระต่ายอย่างน้อย 3 ตัว ผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของโลหิต เช่น น้ำยาเอซีดี (anticoagulant citrate dextrose solution, ACD) น้ำยาซีพีดี (anticoagulant citrate phosphate dextrose solution, CPD) ถ้าไม่นำมาใช้ทันที ให้แยกเก็บในภาชนะเก็บเลือดของกระต่ายแต่ละตัวที่อุณหภูมิ (4 ± 2) °C แต่ต้องนำมาใช้ทำการทดสอบภายในเวลา 96 h

ก.1.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

(1) ตัดส่วนต่าง ๆ ของถุงบรรจุโลหิตตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดกว้างประมาณ 0.1 cm ถึง 0.3 cm และยาวประมาณ 1 cm ถึง 5 cm ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง เติมสารละลายปราศจากเชื้อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.9 ปริมาตร 5 ml/กรัมของตัวอย่าง

(2) ทำแบลงก์เปรียบเทียบโดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

(3) นำภาชนะสำหรับสกัดทั้ง 2 ใบ ใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) °C เป็นเวลา 1 h หรือใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ (70 ± 2) °C เป็นเวลา 24 h หรือที่อุณหภูมิ(50 ± 2) °C เป็นเวลา 72 h แล้วนำออกมาปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง(20 °C ถึง 30 °C) เขย่าอย่างแรงเป็นเวลาอย่างน้อย 5 min แล้วเทสารละลายสกัดที่ได้ และแบลงก์ในแต่ละภาชนะลงในภาชนะที่สะอาดแห้ง และปราศจากเชื้อทันที นำไปเก็บไว้ในที่ซึ่งมีอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 20 °C ถึง 30 °C และต้องนำไปทดสอบต่อไปภายในเวลา 24 h หลังจากที่เตรียมได้

ก.1.5 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมกราฟสอบเทียบ

(1.1) เตรียมสารละลายสอบเทียบ โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน 10 ml 5 ml 2 ml 1 ml และ 0.5 ml ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 ml จำนวน 5 ใบตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลายแดรบคินจนถึงขีดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.6 mg/ml 0.3 mg/ml 0.12 mg/ml 0.06 mg/ml และ 0.03 mg/ml ตามลำดับ

(1.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(1.3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสง

(2) การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

(2.1) นำเลือดกระต่ายแต่ละภาชนะบรรจุ ตามข้อ ก.1.3 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง และนำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับด้วยอัตราเร็ว 700 g ถึง 800 g นาน 15 min

(2.2) ดูดส่วนใสด้านบน (พลาสมา) 100 µl เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 ml ตั้งทิ้งไว้ 15 min แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(2.3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาของเลือดกระต่ายแต่ละตัว เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(2.4) ถ้าเลือดกระต่ายตัวใดมีปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาเกิน 1.0 mg/ml จะไม่นำเลือดกระต่ายตัวนั้นมาใช้ในการทดสอบต่อไป และต้องใช้เลือดกระต่าย 3 ตัว ในการทดสอบ

(3) การเจือจางเลือด

(3.1) นำเลือดกระต่ายแต่ละตัวที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาแล้ว 20 µl เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 ml ตั้งทิ้งไว้ 15 min

(3.2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด

(3.3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (25.0 ± 2.5) mg/ml เป็นค่าฮีโมโกลบินปรากฏ (hemoglobin present)

(4) การทดสอบตัวอย่าง

(4.1) นำเลือดที่ได้จากข้อ ก.1.5 (3.3) มาตัวละ 5.0 ml เติมสารละลายทดสอบ 4.0 ml นำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C นาน 4 h

(4.2) นำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับ ด้วยอัตราเร็ว 100 g ถึง 200 g เป็นเวลา 15 min

(4.3) ดูดส่วนใสด้านบน ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงหลอดใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 700 g ถึง 800 g เป็นเวลา 5 min ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดแก้วใหม่ แล้วนำไปหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(5) การหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(5.1) นำส่วนใสจากข้อ ก.1.5 (4.3) มา 1.0 ml เติมลงในสารละลายแดรบคิน 3.0 ml ทิ้งไว้ 15 min

(5.2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินเป็นค่าฮีโมโกลบินปลดปล่อย (hemoglobin released)

(5.3) คำนวณค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือดจากสูตร

$$\text{ดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด} = \frac{\text{ฮีโมโกลบินปลดปล่อย}}{\text{ฮีโมโกลบินปรากฏ}} \times 100$$

(5.4) คำนวณค่าเฉลี่ยของดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด แล้วเทียบหาระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด

(ข้อ ก.1.5(5.4))

ดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด	ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด
0 ถึง น้อยกว่า 2	ไม่มีการแตกตัว
2 ถึง น้อยกว่า 10	มีการแตกตัวเล็กน้อย
10 ถึง น้อยกว่า 20	มีการแตกตัวปานกลาง
20 ถึง น้อยกว่า 40	มีการแตกตัวอย่างเห็นได้ชัด
40 ขึ้นไป	มีการแตกตัวอย่างรุนแรง

ภาคผนวก ข.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 8.1)

ข.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ถุงบรรจุโลหิตที่ทำจากวัสดุชนิดเดียวกัน มีส่วนประกอบเหมือนกัน มีจำนวนถุงในชุดและอื่น ๆ เหมือนกัน และทำให้ปราศจากเชื้อโดยวิธีเดียวกัน

ข.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ข.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบรูปร่างและมิติ ส่วนประกอบ และคุณลักษณะในการใช้งาน

ข.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.1

ข.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 3. ข้อ 4. และข้อ 5.2 ในแต่ละรายการ ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ข.1 จึงจะถือว่าถุงบรรจุโลหิตรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบรูปร่างและมิติ ส่วนประกอบและคุณลักษณะในการใช้งาน

(ข้อ ข.2.1)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 1 200	13	1
1 201 ถึง 10 000	20	2
เกิน 10 000	32	3

ข.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ข.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.2

ข.2.2.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 5.1 ข้อ 6. และข้อ 7. ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่

กำหนดในตารางที่ ข.2 จึงจะถือว่าถุงบรรจุโลหิตรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข.2 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ข.2.2)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 1 200	13	2
1 201 ถึง 10 000	20	3
เกิน 10 000	32	5

ข.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางฟิสิกส์

ข.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 35 หน่วย เพื่อใช้ทดสอบรายการละ 5 หน่วย

ข.2.3.2 ตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5.3.1 ข้อ 5.3.2 ข้อ 5.3.3 ข้อ 5.3.4 ข้อ 5.3.5 ข้อ 5.3.6 และข้อ 5.3.7 จึงจะถือว่าถุงบรรจุโลหิตรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ข.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางเคมีและคุณลักษณะทางชีวภาพ

ข.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 20 หน่วย

ข.2.4.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5.4 และข้อ 5.5 ทุกรายการ จึงจะถือว่าถุงบรรจุโลหิตรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ข.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างถุงบรรจุโลหิตต้องเป็นไปตามข้อ ข.2.1.2 ข้อ ข.2.2.2 ข้อ ข.2.3.2 และข้อ ข.2.4.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าถุงบรรจุโลหิตรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

ภาคผนวก ค.

มิติของถุงบรรจุโลหิต

(แนะนำ)

ตารางที่ ค.1 มิติของถุงบรรจุโลหิต

(รูปที่ 1)

หน่วยเป็นมิลลิเมตร

ความจุระบุ	ความกว้างภายใน	ความสูงภายใน	มิติของบริเวณแสดงเครื่องหมายและฉลาก	
ml	b_1	h_1	$b_2 \pm 5$	$h_2 \pm 5$
100	75	120	60	85
250	120	130	90	85
400	120	170	105	105
500	120	185	105	105