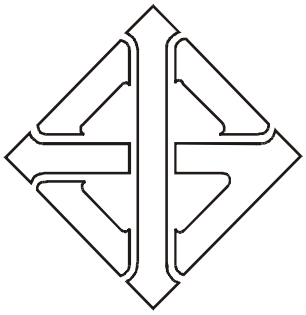


มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก.2384 – 2551

ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์

THREE - WAY STOPCOCK FOR MEDICAL USE

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 11.040.20

ISBN 978-974-292-566-6

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์

มอก.2384 –2551

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 126 ตอนพิเศษ 11ง
วันที่ 26 มกราคม พุทธศักราช 2552

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 440
มาตรฐานอุปกรณ์ส่งผ่านของเหลวใช้ในการแพทย์

ประธานกรรมการ

รศ.วรรณา ศรีโรจนกุล	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (ภาควิชาวิสัญญีวิทยา)

กรรมการ

นางนวพร อนันตสินกุล	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสุพรรณี เทพอรุณรัตน์	กรมวิทยาศาสตร์บริการ
นางสาวสุฮวง ฐิติสัตยากร	สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
-	กระทรวงสาธารณสุข
-	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พันเอกหญิง เพ็ญศรี ธงภักดี	โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า
นายนิพนธ์ ผลอวยพร	โรงพยาบาลพญาไท
นางวิภาวดี จิตต์อารี	บริษัท คาวาซูมิ ลาบอราทอรี่ (ประเทศไทย) จำกัด
นางสาวสมลักษณ์ จันทนลัญจกร	บริษัท เอ็ม.อี.เมดิเทค จำกัด
นายพิทยา วงศ์ใหญ่	บริษัท แซลเลนจ์ เมดิคอล โปรดักส์

กรรมการและเลขานุการ

นางนฤมล วาณิชย์เจริญ	สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ปัจจุบันข้อต่อสามทางเป็นอุปกรณ์ประกอบการให้เลือดและสารละลายทางหลอดเลือด ซึ่งทำได้เองภายในประเทศ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้และส่งเสริมการทำภายในประเทศ จึงกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์ขึ้น

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนดขึ้นโดยใช้ข้อมูลจากผู้ทำ ผู้ใช้ และเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

ISO 8536-10:2004	Infusion equipment for medical use – Part 10: Accessories for fluid lines for use with pressure infusion equipment
ISO 10993-5:1999	Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
ASTM F 756-00	Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials
มอก.1396-2540	เข็มฉีดยาปราศจากเชื้อชนิดใช้ครั้งเดียว
มอก.1387	ข้อต่อรูปกรวยความเรียวร้อยละ 6 (ลูเออร์) สำหรับกระบอกฉีดยา เข็มฉีดยา และเครื่องมือแพทย์บางชนิด
เล่ม 1-2539	คุณลักษณะทั่วไป
เล่ม 2-2539	ข้อต่อล็อก

The United States Pharmacopeia, 30 Revision, 2007

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตามมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 3855 (พ.ศ. 2551)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์ มาตรฐานเลขที่ มอก.2384-2551 ไว้ ดังมีรายการละเอียดต่อท้าย ประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2551

สุวิทย์ คุณกิตติ

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมเฉพาะข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์ซึ่งใช้งานครั้งเดียว

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

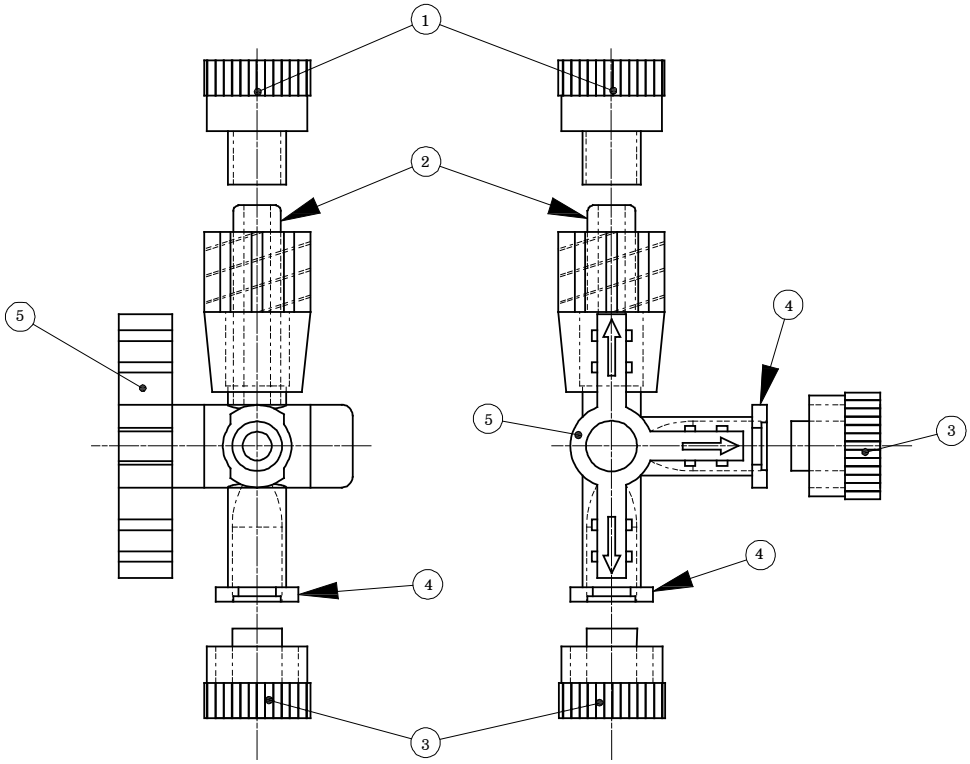
2.1 ข้อต่อสามทางใช้ในการแพทย์ ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า “ข้อต่อสามทาง” หมายถึง อุปกรณ์ที่มีข้อต่อ 3 ด้าน โดยทั่วไปมีข้อต่อใน 1 ด้าน และข้อต่อนอก 2 ด้าน ใช้ต่อกับอุปกรณ์อื่นเพื่อนำผลิตภัณฑ์เภสัช หรือส่วนประกอบของเลือดเข้าสู่ร่างกายทางหลอดเลือด หรือนำเลือดเข้าสู่ร่างกายหรือออกจากร่างกาย ดังตัวอย่างในรูปที่ 1

2.2 ฝาปิด (cover) หมายถึง ส่วนประกอบที่ใช้ปิดข้อต่อนอกของข้อต่อสามทาง

2.3 ข้อต่อนอก (female conical fitting) หมายถึง ข้อต่อรูปกรวยที่ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยา ข้อต่อในของชุดให้เลือด ชุดให้สายละลายทางหลอดเลือด หรือข้อต่อสามทาง

2.4 ข้อต่อใน (male conical fitting) หมายถึง ข้อต่อที่ต่อเข้ากับเข็มฉีดยา ชุดปีกผีเสื้อ ข้อต่อนอกของข้อต่อสามทาง หลอดหุ้มเข็มฉีดยา (over-needle peripheral catheter) หรืออุปกรณ์อื่นในลักษณะเดียวกัน

2.5 จุกหมุน (stopcock) หมายถึง ส่วนประกอบที่ใช้หมุนเพื่อเปลี่ยนทิศทางการไหลของสารละลายในข้อต่อสามทาง และมีสัญลักษณ์แสดงทิศทางการไหล



① ปลอกหุ้มข้อต่อใน
② ข้อต่อใน
③ ฝาปิด
④ ข้อต่อนอก
⑤ จุกหมุนที่มีสัญลักษณ์แสดงทิศทางการไหล

รูปที่ 1 ตัวอย่างข้อต่อสามทาง
(ข้อ 2.1)

3. ขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน

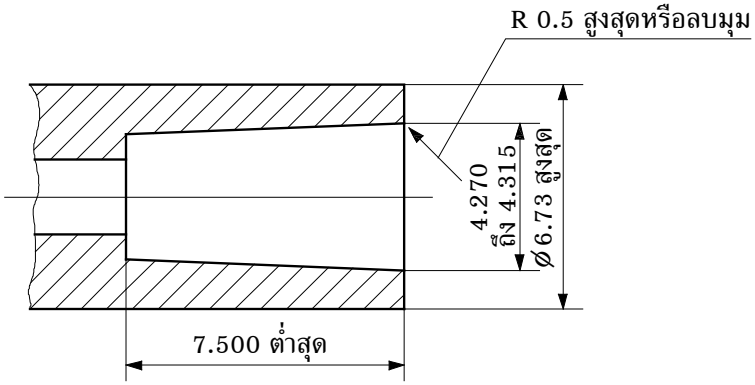
3.1 ข้อต่อนอก

มี 2 แบบ คือ

3.1.1 แบบธรรมดา มิติเป็นไปตามรูปที่ 2

3.1.2 แบบล็อก มิติเป็นไปตามรูปที่ 3

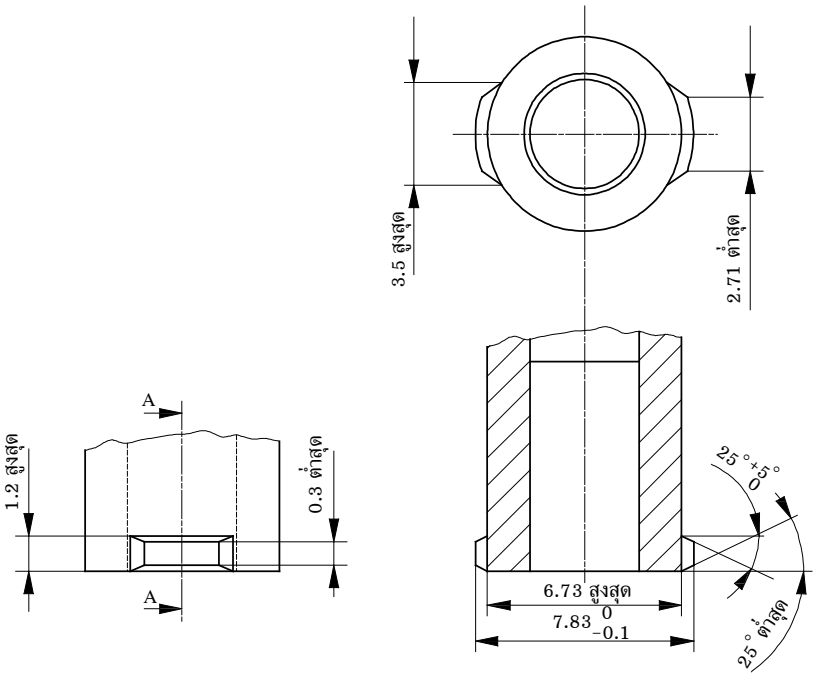
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม มอก.1387 เล่ม 1 หรือเล่ม 2



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 2 ข้อต่อนอกรูปกรวยแบบธรรมดา

(ข้อ 3.1)



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 3 ข้อต่อนอกรูปกรวยแบบล็อก

(ข้อ 3.1)

3.2 ข้อต่อใน

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.3 แล้ว ปลายด้านเล็กของข้อต่อในต้องอยู่ระหว่างระนาบ A กับระนาบ B ของเครื่องมือวัด

4. คุณลักษณะที่ต้องการ

4.1 ลักษณะทั่วไป

4.1.1 ต้องทำจากวัสดุคงรูป (rigid) ที่ทนแรงบิดได้ ไม่แตกหัก

4.1.2 ต้องสะอาดและไม่มีตำหนิที่อาจเป็นผลเสียต่อการใช้งาน

4.1.3 ส่วนที่ให้ผลิตภัณฑ์เภสัชหรือสารละลายไหลผ่านต้องทำจากวัสดุใส ไม่มีสีอื่นใดนอกจากสีตามธรรมชาติของวัสดุ และต้องเห็นฟองอากาศในของเหลวที่อยู่ภายในได้ชัดเจนขณะใช้งาน

4.1.4 ข้อต่อนอกต้องสวมได้สนิทกับอุปกรณ์อื่นที่ใช้ประกอบเข้าด้วยกัน เช่น กระบอกฉีดยา ชุดให้เลือด ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด สายต่อ มีฝาปิดได้สนิท ไม่หลุดออกก่อนใช้งาน ถอดออกได้ง่าย

4.1.5 ข้อต่อในต้องสวมได้สนิทกับอุปกรณ์อื่นที่ใช้ประกอบเข้าด้วยกัน มีปลอกหุ้มสวมได้พอดี ไม่หลุดออกก่อนใช้งาน และถอดออกได้ง่าย

4.1.6 จุกหมุนต้องทำจากวัสดุคงรูป หมุนเปลี่ยนทิศทางการไหลของสารละลายได้ง่าย และหมุนให้สารละลายไหลผ่านได้พร้อมกันทั้ง 3 ทาง

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.2 คุณลักษณะทางฟิสิกส์

4.2.1 การเปลี่ยนทิศทางการไหล

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.4 แล้ว ต้องสามารถเปลี่ยนทิศทางและปิดกั้นการไหลของสารละลายได้ตามสัญลักษณ์ที่แสดงไว้

4.2.2 การรั่วซึม

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.5 แล้ว ต้องไม่รั่วซึม

4.3 คุณลักษณะทางเคมี

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.6 แล้ว สารละลายที่สกัดได้ต้องมีสมบัติดังนี้

4.3.1 ลักษณะทั่วไป

ใสไม่มีสี

4.3.2 สารรีดิวส์ (reducing or oxidizable matter)

ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 โมลต่อลิตร ที่ใช้ทำปฏิกิริยาต้องไม่เกิน 2.0 มิลลิลิตร

4.3.3 โลหะหนัก

ปริมาณแบเรียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว และดีบุก รวมกัน ต้องไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร

ปริมาณแคดเมียมต้องไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร

4.3.4 ความเป็นกรด-ด่าง

ผลต่างระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายที่สกัดได้กับสารละลายแบลงก์ ต้องน้อยกว่า 2

4.3.5 กากที่ไม่ระเหย (non-volatile residue)

ต้องไม่เกิน 5 มิลลิกรัม

4.3.6 การดูดกลืนแสง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใด ๆ ระหว่าง 250 นาโนเมตร กับ 320 นาโนเมตร ต้องไม่เกิน 0.1

4.4 คุณลักษณะทางชีวภาพ

4.4.1 ความปราศจากเชื้อ

เมื่อทดสอบตาม USP หัวข้อ ⟨71⟩ Sterility Tests แล้ว ต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์

4.4.2 สารไพโรเจน

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่มีสารไพโรเจน หรือ

(2) เมื่อระดับชีวพิษภายในตัว (endotoxin) ไม่เกิน 20.0 หน่วยต่อชุด ถือว่าไม่มีสารไพโรเจน

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม USP หัวข้อ ⟨151⟩ Pyrogen Test หรือ ⟨85⟩ Bacterial Endotoxins Test

4.4.3 การทำลายเม็ดเลือด

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.7 แล้ว เม็ดเลือดต้องไม่แตกตัว

4.4.4 ความเป็นพิษ

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง หรือ

(2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบให้ปฏิบัติตามภาคผนวก ข.

5. การบรรจุ

5.1 ให้บรรจุข้อต่อสามทางแต่ละชุดในภาชนะหุ้มห่อที่ผนึกเรียบร้อย สามารถรักษาสภาพปราศจากเชื้อได้ตลอดระยะเวลาการเก็บ ปลอกหุ้มข้อต่อในและฝาปิดข้อต่อนอกต้องไม่หลุดออกก่อนใช้งาน

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ที่ภาชนะหุ้มห่อข้อต่อสามทางทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) ชื่อผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้

(2) คำว่า “ปราศจากเชื้อ” และ “ปราศจากสารไพโรเจน” และ “ใช้ได้ครั้งเดียว”

(3) ระบุวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ เช่น EtO gas

(4) รหัสรุ่นที่ทำ

(5) เดือน ปีที่หมดอายุ

(6) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

(7) วิธีใช้

(8) คำเตือนหรือข้อควรระวังในการใช้และการทำลาย เช่น ห้ามใช้เมื่อภาชนะหุ้มห่อชำรุด ควรแยกทำลายแบบขยะติดเชื้อ

หมายเหตุ *ข้อ (7) และข้อ (8) อาจทำเป็นใบแทรกไว้ในภาชนะบรรจุก็ได้*

6.2 ที่กล่องบรรจุข้อต่อสามทางทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดตามข้อ 6.1(1) ข้อ 6.1(2) ข้อ 6.1(3) ข้อ 6.1(4) ข้อ 6.1(5) ข้อ 6.1(6) จำนวนเป็นชุด และวิธีเก็บรักษาให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

6.3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน ให้เป็นไปตามภาคผนวก ก.

8. การทดสอบ

8.1 ให้ใช้วิธีวิเคราะห์ที่กำหนดในมาตรฐานนี้หรือวิธีอื่นใดที่ให้ผลเทียบเท่า ในกรณีที่มีข้อโต้แย้ง ให้ใช้วิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้เป็นวิธีตัดสิน

8.2 หากมิได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น น้ำกลั่นและสารเคมีที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

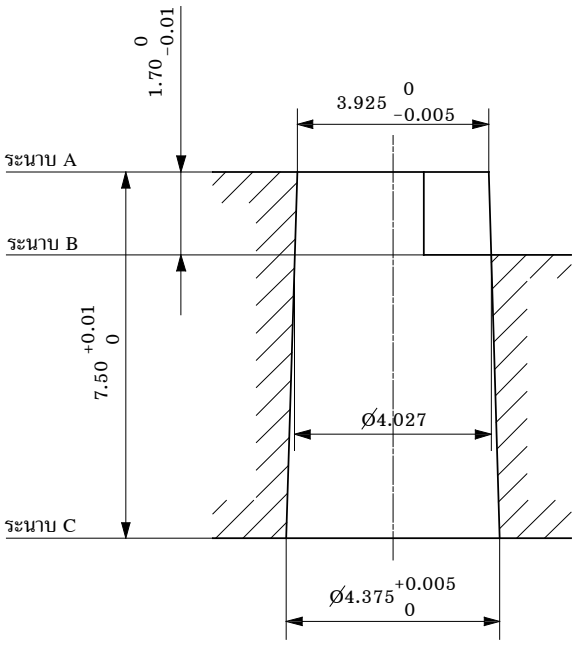
8.3 การทดสอบข้อต่อใน

8.3.1 เครื่องมือ

8.3.1.1 เครื่องมือวัดรูปกรวย ความเรียว 0.06: 1 ดังรูปที่ 4

8.3.2 วิธีทดสอบ

สวมข้อต่อในของข้อต่อสามทางตัวอย่างเข้ากับเครื่องมือวัดรูปกรวย ด้วยแรงในแนวแกน 5 นิวตัน โดยไม่ต้องบิด แล้วตรวจตำแหน่งของปลายด้านเล็กของข้อต่อใน



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 4 มิติเครื่องมือวัดรูปกรวย ความเรียว 0.06 : 1

(ข้อ 8.3.1.1)

8.4 การทดสอบการเปลี่ยนทิศทางการไหล

8.4.1 เครื่องมือ

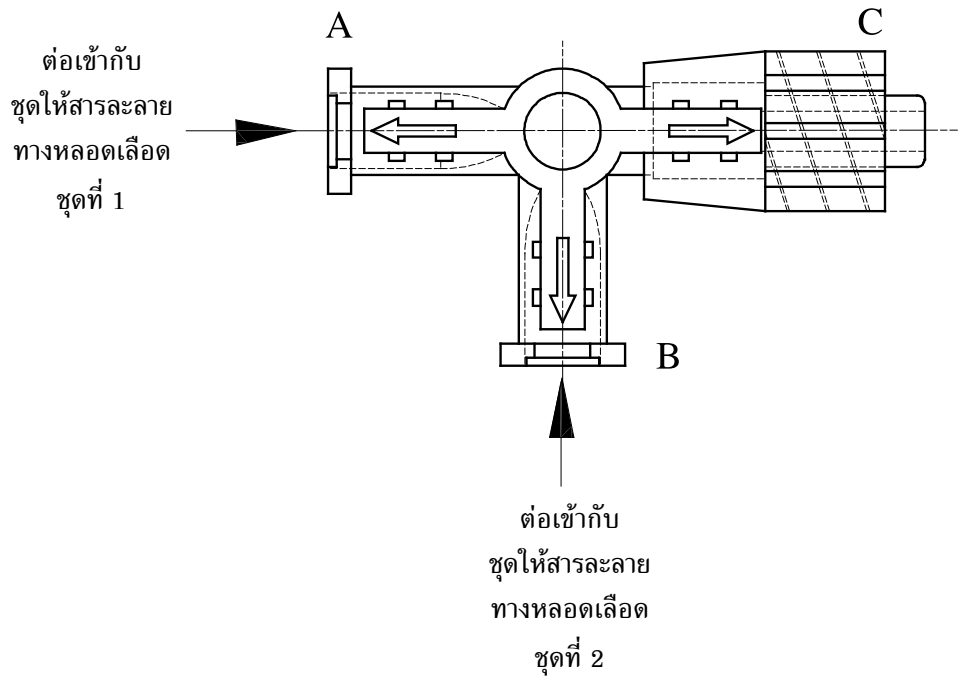
8.4.1.1 ขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น ขนาด 1 000 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

8.4.1.2 ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ซึ่งข้อต่อในเป็นไปตาม มอก.1387 เล่ม 1 หรือเล่ม 2

8.4.2 วิธีทดสอบ

8.4.2.1 จัดการทดสอบตามลักษณะการใช้งาน โดยต่อชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดกับขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น ปล่อยน้ำกลั่นเข้าชุดสารละลายทางหลอดเลือดจนเต็ม ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดให้สนิท

8.4.2.2 สวมข้อต่อในของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด เข้ากับข้อต่อสามทางตัวอย่างทางข้อต่อนอก ด้าน A (ดูรูปที่ 5) โดยปรับระยะให้ระดับน้ำกลั่นอยู่สูงจากข้อต่อสามทางตัวอย่างประมาณ 1 เมตร



รูปที่ 5 แสดงด้าน A B C ในการทดสอบการเปลี่ยนทิศทางการไหล
(ข้อ 8.4.2)

8.4.2.3 บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างให้ปิดด้าน B เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดให้น้ำกลั่นไหลจากด้าน A ไปด้าน C ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วตรวจสอบดังนี้

(1) ต้องไม่มีน้ำรั่วซึมบริเวณจุกหมุน

(2) ต้องมีน้ำกลั่นไหลออกทางด้าน C

(3) ต้องไม่มีน้ำกลั่นไหลออกทางด้าน B

8.4.2.4 บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างให้ปิดด้าน C เปิดตัวควบคุมการไหลให้น้ำกลั่นไหลจากด้าน A ไปด้าน B ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วตรวจสอบดังนี้

(1) ต้องไม่มีน้ำรั่วซึมบริเวณจุกหมุน

(2) ต้องมีน้ำกลั่นไหลออกทางด้าน B

(3) ต้องไม่มีน้ำกลั่นไหลออกทางด้าน C

8.4.2.5 บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างให้ปิดด้าน A เปิดตัวควบคุมการไหลทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วตรวจสอบดังนี้

(1) ต้องไม่มีน้ำรั่วซึมบริเวณจุกหมุน

(2) ต้องไม่มีน้ำกลั่นไหลออกทางด้าน B และด้าน C

8.4.2.6 ต่อชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดกับขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่นอีก 1 ชุด ปล่อยน้ำกลั่นเข้าชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดชุดที่ 2 จนเต็ม ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดให้สนิททั้ง 2 ชุด ปรับระยะให้น้ำกลั่นทั้งสองขวดอยู่ในระดับเดียวกัน โดยอยู่สูงจากข้อต่อสามทางตัวอย่างประมาณ 1 เมตร

8.4.2.7 ต่อข้อต่อในของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดชุดที่ 2 เข้ากับข้อต่อสามทางตัวอย่างทางด้าน B (ด้าน A ต่ออยู่กับข้อต่อในของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดชุดที่ 1)

8.4.2.8 บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างในทิศทางเปิดทั้ง 3 ด้าน เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดทั้ง 2 ชุดแล้วตรวจสอบดังนี้

(1) ต้องมีน้ำไหลออกทางด้าน C โดยน้ำกลั่นต้องไหลมาจากขวดบรรจุน้ำกลั่นทั้งสองขวด โดยสังเกตจากกระเปาะหยดของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ต้องมีน้ำไหลลงมาทั้ง 2 ชุด

(2) ต้องไม่มีน้ำรั่วซึมบริเวณจุกหมุน

8.5 การทดสอบการรั่วซึม

8.5.1 เครื่องมือ

8.5.1.1 ขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น ขนาด 1 000 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

8.5.1.2 ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ซึ่งข้อต่อในเป็นไปตาม มอก.1387 เล่ม 1 หรือเล่ม 2

8.5.1.3 เข็มฉีดยา ซึ่งขนาดของฐานเข็มเป็นไปตาม มอก.1387 เล่ม 1 หรือเล่ม 2

8.5.1.4 จุกยางหรืออุปกรณ์สำหรับอุดปลายเข็มฉีดยา

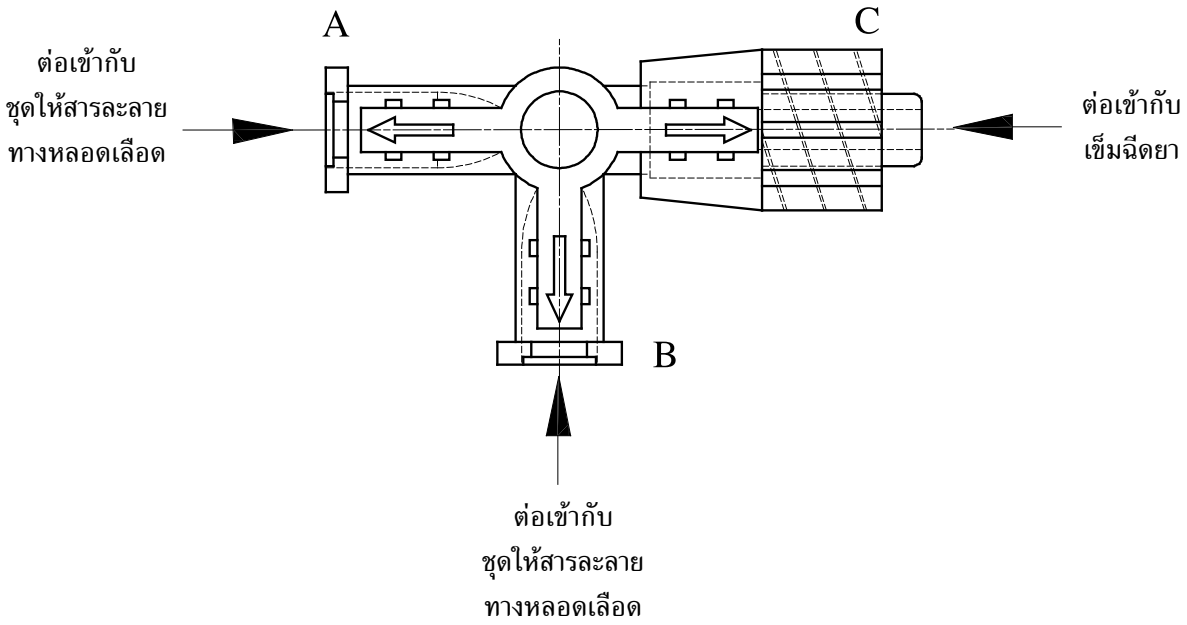
8.5.2 วิธีทดสอบ

8.5.2.1 จัดการทดสอบตามลักษณะการใช้งาน โดยต่อชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดกับขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น ปล่อยน้ำกลั่นเข้าชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดจนเต็ม ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดตัวควบคุมการไหลให้สนิท

8.5.2.2 สวมข้อต่อในของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด เข้ากับข้อต่อสามทางตัวอย่างทางข้อต่อนอกด้าน A (ดูรูปที่ 6) โดยปรับระยะให้ระดับน้ำกลั่นอยู่สูงจากข้อต่อสามทางตัวอย่างประมาณ 1 เมตร

8.5.2.3 ต่อข้อต่อสามทางตัวอย่างด้าน C เข้ากับเข็มฉีดยา บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างให้ปิดด้าน B เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดให้น้ำไหลออกทางเข็มฉีดยาอุดปลายเข็มให้สนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ต้องไม่พบการรั่วซึมของน้ำกลั่นบริเวณข้อต่อด้าน C และข้อต่อด้าน A

8.5.2.4 ปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ปลดชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดออกจากข้อต่อด้าน A แล้วนำมาต่อเข้ากับด้าน B บิดจุกหมุนของข้อต่อสามทางตัวอย่างให้ปิดด้าน A เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ต้องไม่พบการรั่วซึมของน้ำกลั่นบริเวณข้อต่อด้าน B



รูปที่ 6 แสดงด้าน A B C ในการทดสอบการรั่วซึม

(ข้อ 8.5.2)

8.6 การทดสอบคุณลักษณะทางเคมี

8.6.1 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์

8.6.1.1 สารละลายที่สกัดได้

นำข้อต่อสามทางตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 3 ชุด ไม่รวมฝาปิดและปลอกหุ้มข้อต่อใน นำมารวมกัน ชั่งให้ได้น้ำหนักไม่น้อยกว่า 15 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเดิม

8.6.1.2 สารละลายแบลงก์

ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 8.6.1.1 แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

8.6.2 วิธีทดสอบ

8.6.2.1 ลักษณะทั่วไป

ตรวจพินิจสารละลายที่สกัดได้

8.6.2.2 สารรีดิวส์

(1) เครื่องมือ

ขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมจุก

(2) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(2.1) สารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 โมลต่อลิตร

ละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 31.6 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย ในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

(2.2) สารละลายกรดซัลฟิวริก 1 โมลต่อลิตร

(2.3) โพแทสเซียมไอโอไดด์

(2.4) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.005 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 1.3 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่และปล่อยให้เย็นแล้ว ปริมาตรเล็กน้อย ในขวดแก้วปริมาตร ขนาด 1 000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่และปล่อยให้เย็นแล้ว จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

(2.5) น้ำแป้งที่เตรียมใหม่

ละลายแป้ง 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในน้ำเดือด 200 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ พร้อมกับคนอย่างสม่ำเสมอ ต้มให้เดือดจนกระทั่งสารละลายมีลักษณะใส ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วเก็บส่วนใสไว้

(3) วิธีวิเคราะห์

(3.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย เติมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 10 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่า ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.1 กรัม แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 หยด แล้วไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต

(3.2) ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ (3.1) อีกครั้งหนึ่งโดยใช้สารละลายแบลงก์ 10 มิลลิลิตร แทนสารละลายที่สกัดได้

(3.3) การคำนวณ

คำนวณหาปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต ที่ใช้ทำปฏิกิริยาได้จากผลต่างระหว่างการไทเทรตข้อ (3.1) กับข้อ (3.2)

8.6.2.3 โลหะหนัก

นำสารละลายที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณแบเรียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ดีบุก และแคดเมียม โดยใช้อะทอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิเตอร์หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

8.6.2.4 ความเป็นกรด-ด่าง

(1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์ อย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร อย่างละใบ

(2) เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร ลงในบีกเกอร์ทั้ง 2 ใบ ใบละ 1 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายในบีกเกอร์แต่ละใบด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

(3) เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่สกัดได้กับสารละลายแบลงก์

8.6.2.5 กากที่ไม่ระเหย

(1) เครื่องมือ

(1.1) เครื่องชั่ง ละเอียด 0.1 มิลลิกรัม

(1.2) ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105 ± 2) องศาเซลเซียส

(1.3) ครูซิเบิลทำจากควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ที่อบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 2 ใบ

(1.4) เครื่องอังไอน้ำ

(1.5) เดซิกเคเตอร์

(2) วิธีวิเคราะห์

(2.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่หนึ่ง และสารละลายแบลงก์ปริมาตรเท่ากัน ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่สอง นำไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ

(2.2) อบครูซิเบิลทั้ง 2 ใบ ในตู้อบที่อุณหภูมิ (105 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง แล้วอบซ้ำเป็นเวลา ครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ ผลต่างของน้ำหนักกากในครูซิเบิลใบที่หนึ่งและใบที่สองคือปริมาณกากที่ไม่ระเหย

8.6.2.6 การดูดกลืนแสง

(1) เครื่องมือ

(1.1) สเปกโทรมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 250 นาโนเมตร กับ 320 นาโนเมตร

(1.2) แผ่นกรอง ขนาดรูเปิด 0.45 ไมโครเมตร

(2) วิธีวิเคราะห์

กรองสารละลายที่สกัดได้ผ่านแผ่นกรอง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร กับ 320 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายแบลงก์ ทั้งนี้ให้วัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 5 ชั่วโมง หลังจากการเตรียมสารละลายที่สกัดได้

8.7 การทดสอบการทำลายเม็ดเลือด

8.7.1 เครื่องมือ

8.7.1.1 ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

8.7.1.2 สเปกโทรมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

8.7.1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง

8.7.1.4 หม้อนึ่งอัด

8.7.1.5 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 1) องศาเซลเซียส

8.7.2 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

8.7.2.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ ร้อยละ 0.9

8.7.2.2 สารมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน (haemoglobin reference standard) 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

8.7.2.3 สารละลายแดรบคิน (Drabkin's solution)

ละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1 กรัม โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 กรัม และโพแทสเซียมเฟร์ริไซยาไนด์ 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 มิลลิลิตร

8.7.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

เจาะเลือดกระต่ายอย่างน้อย 3 ตัว ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น แอซิดซิเทรตเดกซ์-โทรส (acid citrate dextrose, ACD) ซิทริกฟอสเฟตเดกซ์โทรส (citric phosphate dextrose, CPD) แยกเก็บในภาชนะเก็บเลือดของกระต่ายแต่ละตัวที่อุณหภูมิ (4 ± 2) องศาเซลเซียส และควรนำมาทำการทดสอบภายใน 96 ชั่วโมง

8.7.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ตัดข้อต่อสามทางตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด ให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเท่า ๆ กันโดยประมาณ นำมารวมกันและชั่งให้ได้น้ำหนักรวม 5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิลิตร อบในตู้อบที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง

8.7.5 วิธีทดสอบ

8.7.5.1 การเตรียมกราฟสอบเทียบ

(1) เตรียมสารละลายสอบเทียบ โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน 10 มิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลายเดรบคินจนถึงขีดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้น ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเดรนคินเป็นแบลงก์

(3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสง

8.7.5.2 การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

(1) นำเลือดกระต่ายในแต่ละภาชนะบรรจุ ตามข้อ 8.7.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แยกใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงและนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 15 นาที

(2) ดูดส่วนใสด้านบน (พลาสมา) 100 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเดรบคินเป็นแบลงก์

(3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาของเลือดกระต่ายแต่ละตัว เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(4) ถ้าเลือดกระต่ายตัวใดมีปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาเกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่นำเลือดกระต่ายตัวนั้นมาใช้ในการทดสอบต่อไป และต้องใช้เลือดกระต่ายในการทดสอบ 3 ตัว

8.7.5.3 การเจือจางเลือด

(1) นำเลือดกระต่ายแต่ละตัวที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาแล้ว 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

(2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบหาปริมาณฮีโมโกลบิน

(3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (25.0 ± 2.5) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าฮีโมโกลบินปรากฏ (haemoglobin present)

8.7.5.4 การทดสอบตัวอย่าง

(1) นำเลือดกระต่ายที่ได้จากข้อ 8.7.5.3(3) มาตัวละ 5.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายทดสอบ 4.0 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

(2) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 100 G ถึง 200 G เป็นเวลา 15 นาที

(3) ดูดส่วนใสด้านบนออก ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงหลอดใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดแก้วหลอดใหม่ แล้วนำไปหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

8.7.5.5 การหาดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(1) นำส่วนใสจากข้อ 8.7.5.4(3) 1.0 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที

(2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินเป็นค่าฮีโมโกลบินปลดปล่อย (haemoglobin released)

(3) คำนวณค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือดจากสูตร

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

(4) คำนวณค่าเฉลี่ยของดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด แล้วเทียบหาระดับการแตกตัวของเม็ดเลือดตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด

(ข้อ 8.7.5.5(4))

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

ภาคผนวก ก.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 7.1)

ก.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ข้อต่อสามทางที่ทำจากวัสดุอย่างเดียวกัน มีส่วนประกอบเหมือนกัน และทำให้ปราศจากเชื้อในคราวเดียวกัน

ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ก.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.1 นำไปตรวจสอบการบรรจุและเครื่องหมายและฉลากที่กล่องบรรจุก่อน แล้วชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากแต่ละกล่องบรรจุกล่องละ 1 ชุด นำไปทดสอบเครื่องหมายและฉลากที่ภาชนะหุ้มห่อ ลักษณะทั่วไป และขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ตามลำดับ

ก.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 3.1 ข้อ 3.2 ข้อ 4.1 ข้อ 5. และข้อ 6. ในแต่ละรายการต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.1 จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

ขนาดรุ่น กล่อง	ขนาดตัวอย่าง กล่อง	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 35 000	5	0
35 001 ขึ้นไป	20	1

ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางฟิสิกส์

ก.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 10 ชุด เพื่อใช้ทดสอบรายการละ 5 ชุด

ก.2.2.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.2.1 และข้อ 4.2.2 จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางเคมี

ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 15 ชุด

ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.3 จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบความปราศจากเชื้อ

ก.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 20 ชุด เพื่อใช้ทดสอบ 10 ชุด และสำรองไว้เพื่อการทดสอบซ้ำ 10 ชุด

ก.2.4.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.4.1 จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.5 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบสารไพโรเจน การทำลายเม็ดเลือด และความเป็นพิษ

ก.2.5.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 30 ชุด เพื่อใช้ทดสอบรายการละ 10 ชุด

ก.2.5.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.4.2 ข้อ 4.4.3 และข้อ 4.4.4 จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างข้อต่อสามทางต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 ข้อ ก.2.3.2 ข้อ ก.2.4.2 และข้อ ก.2.5.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

ภาคผนวก ข.

การทดสอบความเป็นพิษ

(ข้อ 4.4.4)

ข.1 การทดสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.1.1 เครื่องมือ

ข.1.1.1 ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

ข.1.2 สารละลาย

ข.1.2.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ ร้อยละ 0.9

ข.1.3 การเตรียมสารละลายทดสอบและสารละลายแบลงก์

ข.1.3.1 ตัดข้อต่อสามทางตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด ให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเท่า ๆ กันโดยประมาณ นำมารวมกันและชั่งให้ได้น้ำหนักรวม 5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิลิตร อบในตู้อบที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง

ข.1.3.2 ให้ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นสารละลายแบลงก์

ข.1.4 วิธีทดสอบ

ข.1.4.1 แบ่งหนูทดสอบที่มีสุขภาพดีและไม่เคยใช้ทดสอบมาก่อน มีน้ำหนักระหว่าง 17 กรัม ถึง 23 กรัม จำนวน 10 ตัว ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว

ข.1.4.2 ฉีดสารละลายทดสอบและสารละลายแบลงก์เข้าทางเส้นเลือดดำของหนูทดสอบกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ ตัวละ 1.0 มิลลิลิตร แล้วปล่อยไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ข.1.4.3 สังเกตอาการของหนูแต่ละกลุ่ม หลังฉีดทันที ที่ 24 ชั่วโมง 48 ชั่งโมง และ 72 ชั่วโมง หลังฉีด

ข.1.5 เกณฑ์ตัดสิน

ข.1.5.1 ถ้าหนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบทั้ง 5 ตัว ไม่ตายและตัวใดตัวหนึ่งไม่มีอาการป่วยมากกว่าที่ฉีดด้วยสารละลายแบลงก์ ให้ถือว่าข้อต่อสามทางตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.1.5.2 ถ้าหนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบแสดงอาการป่วยมากกว่า 1 ตัว หรือมีหนูทดสอบตัวใดตัวหนึ่งตาย ให้ทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยใช้หนูทดสอบที่มีสมบัติตามข้อ ข.1.4.1 แต่มีน้ำหนัก (20 ± 1) กรัม กลุ่มละ 10 ตัว หนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบทั้ง 10 ตัว ต้องไม่ตายและไม่แสดงอาการป่วยหรือแสดงอาการป่วยที่ไม่มากกว่าที่ฉีดด้วยสารละลายแบลงก์ จึงจะถือว่าข้อต่อสามทางตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity testing)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้หรืออาจใช้วิธีทดสอบอื่นที่เทียบเท่าตามที่กำหนดใน ISO 10993-5 ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้เป็นวิธีตัดสิน

ข.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ข.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ (laminar airflow hood) ตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer)

ข.2.1.2 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ ได้แก่ หม้อนึ่งอัด ตู้อบ

ข.2.1.3 ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

ข.2.1.4 ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง

ข.2.1.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ (tissue culture flask) ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร

ข.2.2 สารละลายและวิธีเตรียม

ข.2.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปราศจากเชื้อ

ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 8.0 กรัม และแอนไฮดรัสไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.22 ไมโครเมตร

ข.2.2.2 สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตปราศจากเชื้อ 100 กรัมต่อลิตร

ข.2.2.3 สารละลายทริปซิน (trypsin) ปราศจากเชื้อ 0.5 กรัมต่อลิตร

ข.2.2.4 สารละลายกลูทามีน (glutamine) ปราศจากเชื้อ 29.2 กรัมต่อลิตร

ข.2.2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลล์เอ็มอีเอ็ม (Eagle's MEM)

ข.2.2.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตและอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง

เติมสารละลายกลูทามีน 1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.2 มิลลิลิตร เซรุ่มฟีทัลโบไวน์ (fetal bovine serum) 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลล์เอ็มอีเอ็ม 100 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

ข.2.2.7 สารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต (formalin-crystal violet)

ละลายคริสทัลไวโอเลต 500 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (BP) 10 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข.2.2.8 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue stain) 4.0 กรัมต่อลิตร

ข.2.2.9 สารละลายซิงก์แอซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายซิงก์แอซีเทต 20.14 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.22 ไมโครเมตร

ข.2.2.10 การควบคุมเชิงบวก

- สารเคมีควบคุมเชิงบวก (positive chemical control)

  เจือจางสารละลายซิงก์แอซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ให้ได้ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

- วัสดุควบคุมเชิงบวก (positive material control)

  แผ่นพลาสติกที่มีซิงก์ไดเอทิลไดไทโอคาร์บาเมต ร้อยละ 0.1

ข.2.2.11 การควบคุมเชิงลบ

- สารเคมีควบคุมเชิงลบ (negative chemical control)
  เจือจางสารละลายซิงก์แอซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- วัสดุควบคุมเชิงลบ (negative material control)
  พลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน หรือแผ่นยาง ที่ปราศจากสารเติมแต่ง

ข.2.3 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ข.2.3.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์เนื้อเยื่อ (cell suspension)

นำเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 (ATCC cell line CCL 1, NCTC clone 929) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เติมสารละลายทริปซิน 1 มิลลิลิตร และอบในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ถึง 5 นาที เคาะขวดเบา ๆ จนเซลล์หลุดร่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 3 มิลลิลิตร ถึง 5 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าขวดให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนลอยที่ได้นี้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์ โดยดูดสารแขวนลอยของเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับสีย้อมทริปแพนบลู 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนลอยโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด เจือจางสารแขวนลอยของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร

ข.2.3.2 นำเซลล์เนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร เติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 24 หลุม หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

ข.2.4 วิธีทดสอบ

ข.2.4.1 การเตรียมสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุม

(1) การเตรียมสารละลายทดสอบ

ตัดส่วนต่าง ๆ ของข้อต่อสามทางตัวอย่างที่ล้างและนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดแล้ว ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม นำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (24 ± 1) ชั่วโมง เขย่าขวดเป็นระยะ สารละลายที่ได้เป็นสารละลายทดสอบร้อยละ 100 เตรียมสารละลายทดสอบร้อยละ 66 ร้อยละ 44 ร้อยละ 30 และร้อยละ 20 จากสารละลายทดสอบร้อยละ 100 โดยเจือจางเป็นอนุกรม (serial dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างในอัตราส่วน 2 : 1 ตามลำดับ

(2) การเตรียมสารละลายควบคุม เลือกข้อใดข้อหนึ่งดังนี้

(2.1) เตรียมสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกและสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบโดยสกัดวัสดุควบคุมเชิงบวกและวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ ข.2.4.1(1)

(2.2) เตรียมสารเคมีควบคุมเชิงบวกและสารเคมีควบคุมเชิงลบ ตามข้อ ข.2.2.10 และข้อ ข.2.2.11 ตามลำดับ

ข.2.4.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

ข.2.4.3 เติมสารละลายทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ และสารละลายควบคุม ดังต่อไปนี้ ลงสัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมชนิดละ 3 หลุม

(1) สารละลายทดสอบ ความเข้มข้นร้อยละ 100 ร้อยละ 66 ร้อยละ 44 ร้อยละ 30 และร้อยละ 20 ตามลำดับ

(2) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกหรือสารเคมีควบคุมเชิงบวก

(3) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบหรือสารเคมีควบคุมเชิงลบ

(4) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงก์

ข.2.4.4 นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ ข.2.5

ข.2.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อในถาดเลี้ยงเซลล์ สัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายควบคุม และแบลงก์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แล้ว ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผลตามตารางที่ ข.1หลังจากบันทึกผลที่ 48 ชั่วโมงแล้ว ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ติดถาดเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบ

ตารางที่ ข.1 การประเมินระดับความเป็นพิษของเซลล์

(ข้อ ข.2.5)

ระดับ	ปฏิกิริยา	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ
0	ไม่เป็นพิษ	พบเซลล์แผ่เป็นชั้นเดี่ยว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ตามปกติ
1	เป็นพิษน้อยมาก	พบเซลล์มีลักษณะกลม ใกล้หลุดออกจากพื้นผิวไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย	พบเซลล์มีลักษณะกลมไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ แต่ไม่รุนแรงและไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดี่ยว
3	เป็นพิษปานกลาง	พบเซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ไม่เกินร้อยละ 70
4	เป็นพิษอย่างรุนแรง	พบการทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

ข.2.6 การแปลผล

ข.2.6.1 การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ต่อเมื่อ

(1) แบลงก์ และสารเคมีควบคุมเชิงลบหรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)

(2) สารเคมีควบคุมเชิงบวกหรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

ข.2.7 เกณฑ์ตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่ง ดังนี้

(1) สารละลายทดสอบร้อยละ 100 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2

(2) สารละลายทดสอบร้อยละ 44 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ 0