

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ ๔๓๗๒ (พ.ศ. ๒๕๕๔)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. ๒๕๑๑

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบใช้ความดัน

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๕ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. ๒๕๑๑ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบใช้ความดัน มาตรฐานเลขที่ มอก. 2526 - 2554 ไว้ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ตั้งแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๗ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๔

ชัยวุฒิ บรรณวัฒน์

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบใช้ความดัน

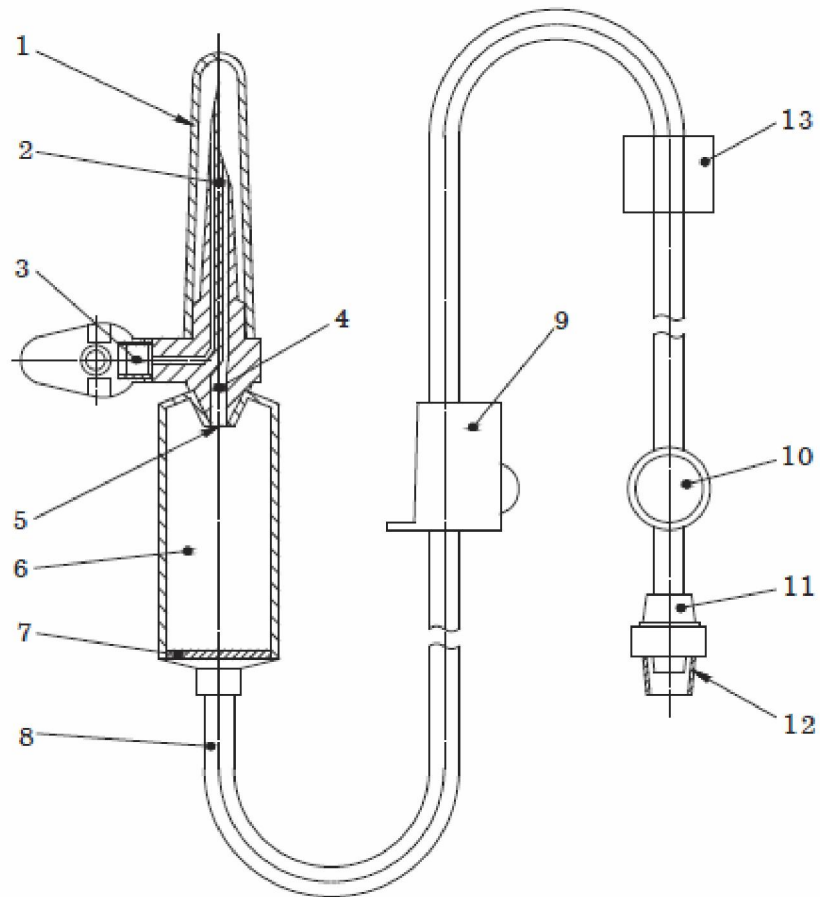
1. ขอบข่าย

- 1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ ครอบคลุมเฉพาะชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดที่ใช้กับเครื่องให้ความดัน สำหรับการใช้งานครั้งเดียว

2. บทนิยาม

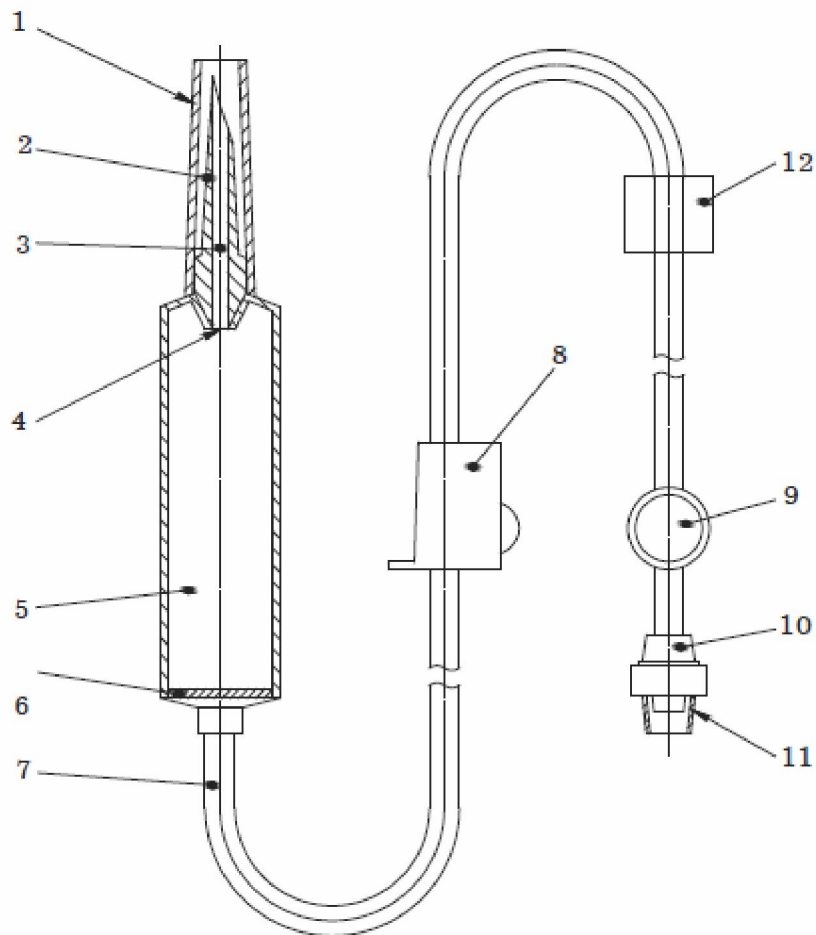
ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

- 2.1 ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบใช้ความดัน ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า “ชุดให้สารละลาย” หมายถึง อุปกรณ์ที่นำสารละลายผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อจากภาชนะบรรจุเข้าสู่ร่างกายทางเส้นเลือด โดยอาศัยความดันจากเครื่องให้ความดัน ตัวอย่างตามรูปที่ 1 และรูปที่ 2 และอาจมีอุปกรณ์ให้อากาศเข้าตามรูปที่ 3 ด้วยหรือไม่ก็ได้
- 2.2 ผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ (sterile pharmaceutical product) หมายถึง สารที่ผ่านกรรมวิธีทำให้ปราศจากเชื้อ ให้นำเข้าสู่ร่างกายเพื่อการวินิจฉัย บำบัด บรรเทา รักษา ป้องกันโรคหรือความเจ็บป่วยของมนุษย์ หรือสัตว์ หรือเพื่อให้เกิดผลแก่สุขภาพ โครงสร้าง หรือการกระทำหน้าที่ใด ๆ ของร่างกายมนุษย์หรือสัตว์
- 2.3 อุปกรณ์ให้อากาศเข้า (air-inlet device) หมายถึง อุปกรณ์สำหรับให้อากาศเข้าไปในภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ มีตัวกรองอากาศเพื่อกรองจุลินทรีย์ อาจเป็นส่วนเดียว (built-in) กับชุดให้สารละลายหรือไม่ก็ได้



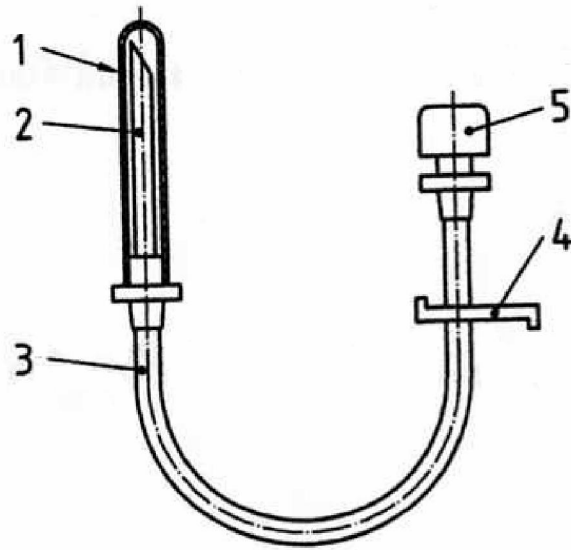
- 1 ปกคลุมเข็มเจาะภาชนะบรรจุ (protective cap of closure-piercing device)
- 2 เข็มเจาะภาชนะบรรจุ (closure-piercing device)
- 3 อุปกรณ์ให้อากาศเข้าพร้อมตัวกรองอากาศ (air-inlet with air filter)
(อาจมีฝาปิดหรือไม่ก็ได้)
- 4 รูเข็มเจาะภาชนะบรรจุ (fluid channel)
- 5 ท่อหยด (drip tube)
- 6 กระเปาะหยด (drip chamber)
- 7 ตัวกรอง (fluid filter) (อาจมีหรือไม่ก็ได้ และอยู่ตำแหน่งใดก็ได้)
- 8 สายส่ง (tubing)
- 9 ตัวควบคุมการไหล (flow regulator)
- 10 บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์แก๊ส (injection site) (อาจมีหรือไม่ก็ได้)
- 11 ข้อต่อใน (male conical fitting)
- 12 ปกคลุมข้อต่อใน (protective cap of male conical fitting)
- 13 บริเวณที่ใส่เข้ากับเครื่องให้ความดัน (flow element) (กำหนดโดยผู้ทำ)

รูปที่ 1 ตัวอย่างชุดให้สารละลายที่อุปกรณ์ให้อากาศเข้ารวมเป็นส่วนเดียวกับชุดให้สารละลาย
(ข้อ 2.1)



- 1 ปลอกหุ้มเข็มเจาะภาชนะบรรจุ
- 2 เข็มเจาะภาชนะบรรจุ
- 3 รูเข็มเจาะภาชนะบรรจุ
- 4 ท่อหยุด
- 5 กระเปาะหยุด
- 6 ตัวกรอง (อาจมีหรือไม่ก็ได้ และอยู่ตำแหน่งใดก็ได้)
- 7 สายส่ง
- 8 ตัวควบคุมการไหล
- 9 บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์แก๊ส (อาจมีหรือไม่ก็ได้)
- 10 ข้อต่อใน
- 11 ปลอกหุ้มข้อต่อใน
- 12 บริเวณที่ใส่เข้ากับเครื่องให้ความดัน (กำหนดโดยผู้ทำ)

รูปที่ 2 ตัวอย่างชุดให้สารละลายที่อุปกรณ์ให้อากาศเข้าแยกจากชุดให้สารละลาย
(ข้อ 2.1)



- 1 ปลอกหุ้มเข็มอากาศ
- 2 เข็มอากาศ
- 3 ท่ออากาศ
- 4 ที่ยึดท่ออากาศ
- 5 ตัวกรองอากาศ

รูปที่ 3 ตัวอย่างอุปกรณ์ให้อากาศเข้า
(ข้อ 2.1)

3. คุณสมบัติที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป

- 3.1.1 ต้องสะอาดและไม่มีตำหนิที่อาจเป็นผลเสียต่อการใช้งาน
- 3.1.2 เข็มเจาะภาชนะบรรจุต้องทำด้วยพลาสติก มีปลอกหุ้มเข็มเจาะภาชนะบรรจุที่หุ้มได้ตลอดความยาวของตัวเข็ม สวมได้พอดีกับฐานเข็ม และถอดออกได้ง่าย
- 3.1.3 สายส่งต้องทำด้วยวัสดุที่ยืดหยุ่น (flexible) มีสีตามธรรมชาติของวัสดุที่ใช้ทำ โปรงใสหรือโปรงแสงเพียงพอที่จะมองเห็นฟองอากาศที่อาจเกิดในผลิตภัณฑ์แก๊สชปราคาจากเชื้อที่อยู่ภายในได้
- 3.1.4 กระจเปาะหยดต้องมีสีตามธรรมชาติของวัสดุที่ใช้ทำ และเป็นแบบหรือรูปร่างที่สามารถสังเกตเห็นการหยดของผลิตภัณฑ์แก๊สได้ชัด
- 3.1.5 กรณีไม่มีเข็มแทงเข้าเส้นเลือด หรือมีเข็มแทงเข้าเส้นเลือดแต่ไม่ได้ต่อกับข้อต่อใน ต้องมีปลอกหุ้มข้อต่อในซึ่งสวมได้พอดี และถอดออกได้ง่าย

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

3.2 คุณลักษณะทางฟิสิกส์

3.2.1 อนุภาคปนเปื้อน

เมื่อทดสอบตาม ISO 8536-4 clause A.1 แล้ว ดัชนีการปนเปื้อน (contamination index) ต้องไม่เกิน 90

3.2.2 การรื้อซึม

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.3 แล้ว ต้องไม่รื้อซึม

3.2.3 รอยต่อเชื่อมภายในชุดให้สารละลาย

เมื่อทดสอบด้วยแรงดึงสถิต 15 นิวตัน ตามแนวยาว เป็นเวลา 15 วินาที แล้ว รอยต่อเชื่อมภายในชุดให้สารละลายทุกตำแหน่งต้องไม่หลุด

3.2.4 เช็มเจาะภาชนะบรรจุ

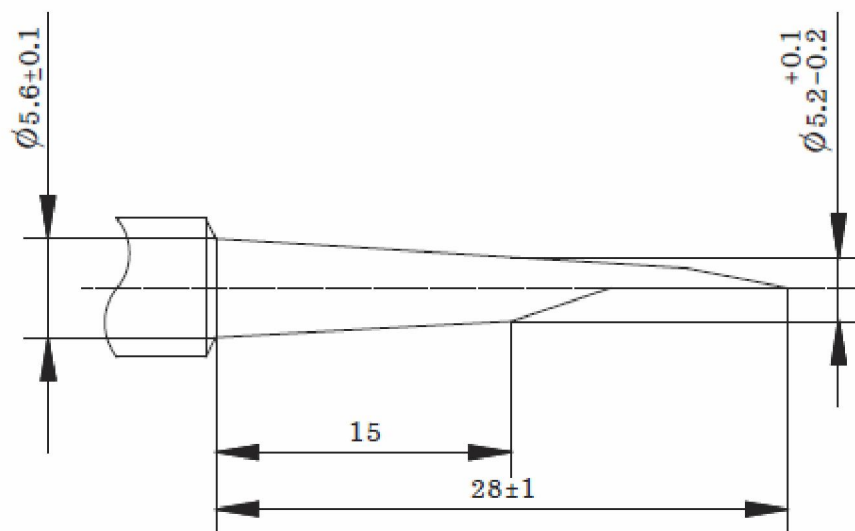
3.2.4.1 ความทนแรงกด

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.4 แล้ว เช็มเจาะภาชนะบรรจุต้องไม่หัก ไม่แตก ไม่ร้าว

3.2.4.2 ความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก

ให้เป็นไปตามรูปที่ 4

การทดสอบให้วัดด้วยเครื่องวัดที่ละเอียดถึง 0.01 มิลลิเมตร



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 4 ตัวอย่างเช็มเจาะภาชนะบรรจุ
(ข้อ 3.2.4.2)

3.2.5 อุปกรณ์ให้อากาศเข้า (ถ้ามี)

3.2.5.1 อุปกรณ์ให้อากาศเข้าชนิดแยกจากชุดให้สารละลาย

เข็มอากาศต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 0.75 มิลลิเมตร และที่ปลายเปิดด้านสัมผัสกับอากาศต้องมีตัวกรองอากาศ

การทดสอบให้ตรวจพินิจและวัดด้วยเครื่องวัดที่เหมาะสม

3.2.5.2 อุปกรณ์ให้อากาศเข้าชนิดรวมเป็นส่วนเดียวกับชุดให้สารละลาย

ต้องมีตัวกรองอากาศที่ปลายเปิดด้านสัมผัสกับอากาศ

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

3.2.5.3 อัตราการไหลของน้ำเมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวกรองอากาศ

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.5 แล้ว อัตราการไหลของน้ำเมื่อมีตัวกรองอากาศจะลดลงได้ไม่เกินร้อยละ 20 ของอัตราการไหลของน้ำเมื่อไม่มีตัวกรองอากาศ

3.2.6 ท่อหยด (ดูรูปที่ 5)

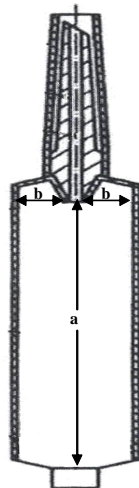
ต้องมีลักษณะดังนี้

3.2.6.1 ระยะห่างระหว่างปลายท่อหยดถึงปากทางออกของกระเปาะหยด (a) ต้องไม่น้อยกว่า 40 มิลลิเมตร

การทดสอบให้วัดด้วยเครื่องวัดที่ละเอียดถึง 0.5 มิลลิเมตร

3.2.6.2 ระยะห่างระหว่างผนังด้านนอกของส่วนปลายท่อหยดถึงผนังด้านในของกระเปาะหยด (b) ต้องไม่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร

การทดสอบให้วัดด้วยเครื่องวัดที่ละเอียดถึง 0.05 มิลลิเมตร



a = ระยะห่างระหว่างปลายท่อหยดถึงปากทางออกของกระเปาะหยด

b = ระยะห่างระหว่างผนังด้านนอกของส่วนปลายท่อหยดกับผนังด้านในของกระเปาะหยด

รูปที่ 5 ตัวอย่างท่อหยดและกระเปาะหยด

(ข้อ 3.2.6.1 และข้อ 3.2.6.2)

3.2.6.3 จำนวนหยดต่อ 1 มิลลิลิตร

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.6 แล้ว น้ำกลั่นที่ไหลผ่านท่อหยดตามจำนวนหยดที่ระบุไว้ที่ฉลาก ได้แก่ 15 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร 20 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร และ 60 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร ต้องมีปริมาณ (1 ± 0.1) มิลลิลิตร หรือ (1 ± 0.1) กรัม

3.2.7 สายส่ง

ความยาวจากปลายข้อต่อในถึงกระเปาะหยดต้องไม่น้อยกว่า 150 เซนติเมตร
การทดสอบให้วัดด้วยเครื่องวัดที่วัดได้ละเอียดถึง 1 มิลลิเมตร

3.2.8 ตัวควบคุมการไหล

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.7 แล้ว ต้องหยุดการไหลได้สนิทเมื่ออยู่ในตำแหน่งปิด และไม่ทำให้สายส่งเสียหาย เช่น รั่ว หรือตีบ

3.2.9 อัตราการไหล

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.7 แล้ว ระยะเวลาที่น้ำกลั่นไหลผ่านชุดให้สารละลายครบ 1 000 มิลลิลิตร ต้องไม่เกิน 10 นาที

3.2.10 บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัช (เฉพาะกรณีที่ใช้แทงด้วยเข็มฉีดยา)

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.8 แล้ว ยอมให้น้ำซึมออกมาได้ไม่เกิน 1 หยด

3.2.11 ข้อต่อใน

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.9 แล้ว ต้องไม่มีน้ำรั่วซึมบริเวณข้อต่อใน

3.3 คุณลักษณะทางเคมี

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.10 แล้ว สารละลายที่สกัดได้ต้องมีสมบัติดังนี้

3.3.1 ลักษณะทั่วไป

ใสไม่มีสี

3.3.2 สารรีดิวซ์ (reducing or oxidizable matter)

ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 โมลต่อลิตร ที่ใช้ทำปฏิกิริยาต้องไม่เกิน 2.0 มิลลิลิตร

3.3.3 โลหะหนัก

ปริมาณแบเรียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว และดีบุก รวมกัน ต้องไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร

ปริมาณแคดเมียมต้องไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อสารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร

3.3.4 ความเป็นกรดหรือความเป็นด่าง

ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต เพื่อให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเทา ต้องไม่เกิน 1 มิลลิลิตร

3.3.5 กากที่ไม่ระเหย (non-volatile residue)

ต้องไม่เกิน 5 มิลลิกรัม

3.3.6 การดูดกลืนแสง

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใด ๆ ระหว่าง 250 นาโนเมตร กับ 320 นาโนเมตร ต้องไม่เกิน 0.1

3.4 คุณลักษณะทางชีวภาพ

3.4.1 ความปราศจากเชื้อ

เมื่อทดสอบตาม USP หัวข้อ Sterility Tests แล้ว ต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์

3.4.2 สารไพโรเจน

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่มีสารไพโรเจน หรือ

(2) ระดับชีวพิษภายในตัว (endotoxins) ต้องไม่เกิน 20.0 หน่วยต่อชุด

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 7.11

3.4.3 การทำลายเม็ดเลือด

เมื่อทดสอบตามข้อ 7.12 แล้ว เม็ดเลือดต้องไม่แตกตัว

3.4.4 ความเป็นพิษ

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง หรือ

(2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบให้ปฏิบัติตามภาคผนวก ข.

4. การบรรจุ

- 4.1 ให้บรรจุชุดให้สารละลายแต่ละชุดในภาชนะหุ้มห่อที่ผนึกเรียบร้อย สามารถรักษาสภาพปราศจากเชื้อได้ตลอดระยะเวลาการเก็บ และผลิตภัณฑ์ต้องไม่หักพับ หรือบิดงอ

5. เครื่องหมายและฉลาก

- 5.1 ที่ภาชนะหุ้มห่อชุดให้สารละลายทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน
- (1) ชื่อผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้หรือชื่ออื่นที่สื่อความหมายว่าเป็นผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้
 - (2) คำว่า “ปราศจากเชื้อ” “ปราศจากสารไพโรเจน” และ “ใช้ได้ครั้งเดียว”
 - (3) ขนาดระบุและความยาวของเข็มแทงเข้าเส้นเลือด (ถ้ามี) เป็น G และมิลลิเมตร ตามลำดับ
 - (4) จำนวนหยดต่อ 1 มิลลิลิตร ได้แก่ 15 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร 20 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร 60 หยดต่อ 1 มิลลิลิตร
 - (5) วิธีทำให้ปราศจากเชื้อ
 - (6) รหัสรุ่นที่ทำ
 - (7) เดือน ปีที่หมดอายุ
 - (8) วิธีใช้
 - (9) คำเตือนหรือข้อควรระวังในการใช้และการทำลาย เช่น ห้ามใช้เมื่อภาชนะหุ้มห่อชำรุด
 - (10) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

- 5.2 ที่กล่องบรรจุชุดให้สารละลายทุกกล่อง อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจกจ่ายละเอียดตามข้อ 5.1(1) ข้อ 5.1(2) ข้อ 5.1(5) ข้อ 5.1(6) ข้อ 5.1(9) ข้อ 5.1(10) จำนวนเป็นชุด และวิธีเก็บรักษาให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน
- 5.3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วย ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดข้างต้น

6. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

- 6.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน ให้เป็นไปตามภาคผนวก ก.

7. การทดสอบ

- 7.1 ให้ใช้วิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้หรือวิธีอื่นใดที่ให้ผลเทียบเท่า ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้เป็นวิธีตัดสิน
- 7.2 หากมิได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น น้ำกลั่นและสารเคมีที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
- 7.3 การทดสอบการรั่วซึม
- 7.3.1 เครื่องมือ
- 7.3.1.1 เครื่องอัดอากาศ ที่อัดอากาศให้ได้ความดันเกจไม่น้อยกว่า 200 กิโลพาสคัล
- 7.3.1.2 เครื่องดูดสุญญากาศ ที่ให้ความดันเกจได้ถึง - 20 กิโลพาสคัล
- 7.3.1.3 อ่างน้ำ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (40 ± 1) องศาเซลเซียส
- 7.3.1.4 อุปกรณ์สำหรับปิดข้อต่อในที่เหมาะสม
- 7.3.2 วิธีทดสอบ
- 7.3.2.1 ต่อปลายด้านเข็มเจาะภาชนะบรรจุของชุดให้สารละลายตัวอย่าง เข้ากับเครื่องอัดอากาศ ปิดปลายอีกด้านหนึ่งไว้ แล้วแช่ทั้งชุดในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส) อัดอากาศเข้าในชุดให้สารละลายตัวอย่างจนความดันเกจเป็น 50 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 วินาที ตรวจสอบการรั่วซึมของอากาศภายใต้ น้ำ
- 7.3.2.2 ทดสอบซ้ำตามข้อ 7.3.2.1 โดยทดสอบที่อุณหภูมิ (40 ± 1) องศาเซลเซียส
- 7.3.2.3 บรรจุน้ำกลั่นที่ไล่อากาศออกแล้วที่อุณหภูมิห้อง (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส) เข้าชุดให้สารละลายตัวอย่างจนเต็ม ต่อปลายด้านเข็มเจาะภาชนะบรรจุเข้ากับเครื่องดูดสุญญากาศ ปิดปลายอีกด้านหนึ่งไว้ ดูดอากาศออกจากชุดให้สารละลายตัวอย่างจนความดันเกจเป็น - 20 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 วินาที ตรวจสอบการรั่วซึมของน้ำกลั่นที่บรรจุในชุดให้สารละลายตัวอย่าง
- 7.3.2.4 นำชุดให้สารละลายตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำควบคุมที่อุณหภูมิ (40 ± 1) องศาเซลเซียส บรรจุน้ำกลั่นที่ไล่อากาศออกแล้วที่อุณหภูมิ (40 ± 1) องศาเซลเซียส เข้าชุดให้สารละลายตัวอย่างจนเต็ม ต่อปลายด้านเข็มเจาะภาชนะบรรจุเข้ากับเครื่องดูดสุญญากาศ ปิดปลายอีกด้านหนึ่งไว้ ดูดอากาศออกจากชุดให้สารละลายตัวอย่างทันทีจนความดันเกจเป็น - 20 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 วินาที ตรวจสอบการรั่วซึมของน้ำกลั่นที่บรรจุในชุดให้สารละลายตัวอย่าง

7.3.2.5 ต่อปลายด้านเข็มเจาะภาชนะบรรจุของชุดให้สารละลายตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นจนเต็มเข้ากับเครื่องอัดอากาศ ปิดปลายด้านข้อต่อในไว้ อัดอากาศเข้าในชุดให้สารละลายตัวอย่างจนความดันภายในเท่ากับความดันสูงสุดที่กำหนดไว้ที่ฉลาก หากไม่กำหนดไว้หรือกำหนดสูงกว่า 200 กิโลพาสคัล ให้ทดสอบที่ความดันเกจเป็น 200 กิโลพาสคัล เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบพินิจการรั่วซึมบนสายส่งตั้งแต่บริเวณที่ใส่เข้ากับเครื่องให้ความดัน จนถึงข้อต่อใน

7.4 การทดสอบความทนแรงกด

ยึดเข็มเจาะภาชนะบรรจุให้แน่นในแนวตั้ง กดด้วยแรง 30 นิวตัน เป็นเวลา 15 วินาที แล้วตรวจพินิจ

7.5 การทดสอบอัตราการไหลของน้ำเมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวกรองอากาศ

7.5.1 ภาวะทดสอบ

ให้ทดสอบที่อุณหภูมิ (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส)

7.5.2 เครื่องมือ

7.5.2.1 ขวดแก้วบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชขนาด 1 000 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

7.5.2.2 กระจกตวง

7.5.2.3 เข็มฉีดยา ขนาดระบุ 21 G

7.5.2.4 นาฬิกาจับเวลา

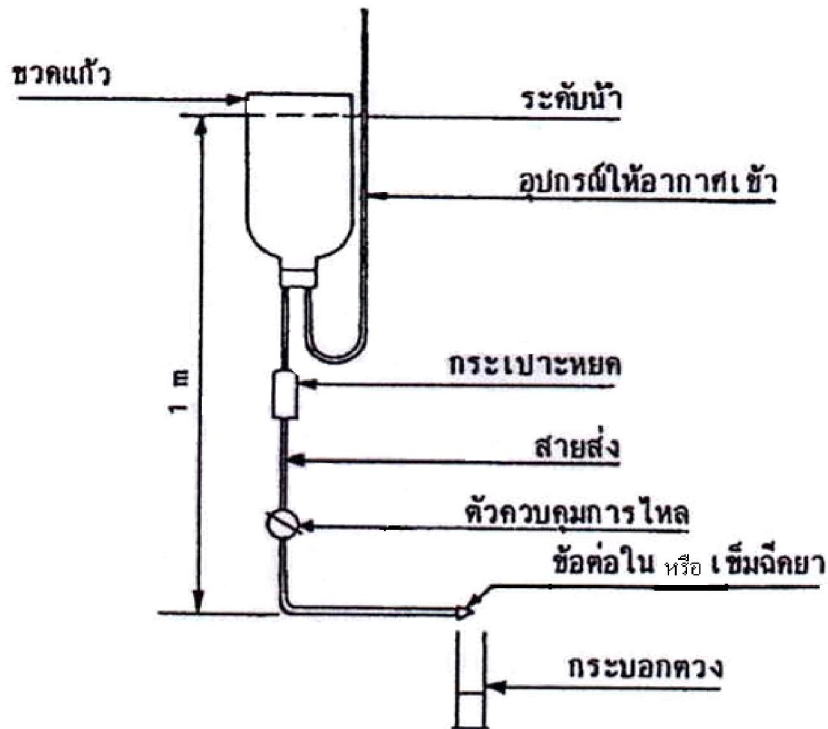
7.5.3 วิธีทดสอบ

7.5.3.1 เติมน้ำกลั่นใส่ขวดแก้วจนถึงขีดปริมาตร ติดตั้งชุดทดสอบตามรูปที่ 6 ปรับตัวควบคุมการไหลให้อยู่ในภาวะปิด ส่วนปลายด้านข้อต่อในต่อกับเข็มฉีดยา ปรับระดับน้ำกลั่นให้อยู่สูงกว่าปลายเข็ม 1 เมตร นำกระจกตวงวางรองใต้ปลายเข็ม จากนั้นปรับตัวควบคุมการไหลให้เปิดเต็มที่ ปลอ่ยให้น้ำกลั่นไหลลงโดยอิสระ จับเวลาที่น้ำกลั่นไหลลงในกระจกตวงจนครบ 500 มิลลิลิตร แล้วคำนวณอัตราการไหลของน้ำกลั่น จากสูตร

$$v = \frac{500}{t}$$

เมื่อ v คือ อัตราการไหลของน้ำกลั่น เป็นมิลลิลิตรต่อนาที

t คือ เวลาที่น้ำกลั่นไหลผ่านชุดให้สารละลายตัวอย่างจนครบ 500 มิลลิลิตร เป็นนาที



รูปที่ 6 การติดตั้งชุดทดสอบสำหรับการทดสอบอัตราการไหลของน้ำเมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวกรองอากาศ การทดสอบตัวควบคุมการไหล และการทดสอบอัตราการไหล (ข้อ 7.5.3.1 ข้อ 7.7.2.1 และข้อ 7.7.2.2)

7.5.3.2 ปฏิบัติตามข้อ 7.5.3.1 อีกครั้งหนึ่ง โดยนำตัวกรองอากาศออกจากอุปกรณ์ให้อากาศเข้า

7.5.4 การรายงานผล

รายงานอัตราการไหลเมื่อมีตัวกรองอากาศเทียบกับเมื่อไม่มีตัวกรองอากาศ เป็นร้อยละ

7.6 การทดสอบปริมาณน้ำกลั่นที่ไหลผ่านท่อหยด

7.6.1 ภาวะทดสอบ

ให้ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส)

7.6.2 เครื่องมือ

7.6.2.1 ขวดแก้วสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัช ขนาด 1 000 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

7.6.2.2 อุปกรณ์ให้อากาศเข้า

ให้ใช้อุปกรณ์ให้อากาศเข้าที่มีมาพร้อมกับชุดให้สารละลายตัวอย่าง ในกรณีที่ไม่มีมาพร้อมกับตัวอย่าง ให้จัดหาอุปกรณ์ให้อากาศเข้าอื่นแทน โดยต้องมีเข็มอากาศขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 0.75 มิลลิเมตร และท่ออากาศขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.7 มิลลิเมตร ความยาวไม่น้อยกว่า 250 มิลลิเมตร

7.6.3 วิธีทดสอบ

เติมน้ำกลั่นใส่ขวดแก้วจนถึงขีดปริมาตร จัดเครื่องมือตามลักษณะการใช้งานจริง ปรับการไหลของน้ำกลั่นให้ไหลออกมาเป็นหยดที่พอดี นับจำนวนหยดที่พอดี เมื่อครบจำนวนหยดต่อ 1 มิลลิลิตรตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก ให้นำน้ำกลั่นที่ไหลออกมาไปวัดปริมาตรหรือชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าที่ได้แล้วทดสอบเช่นเดียวกันนี้จนครบ 5 ครั้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ยเป็นมิลลิลิตร

7.7 การทดสอบตัวควบคุมการไหลและอัตราการไหล

7.7.1 เครื่องมือ

7.7.1.1 ขวดแก้วสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชขนาด 1 000 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

7.7.1.2 อุปกรณ์ให้อากาศเข้า

ให้ใช้อุปกรณ์ให้อากาศเข้าที่มีมาพร้อมกับชุดให้สารละลายตัวอย่าง ในกรณีที่ไม่มีมาพร้อมกับตัวอย่าง ให้จัดหาอุปกรณ์ให้อากาศเข้าอื่นแทน โดยต้องมีเข็มอากาศขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 0.75 มิลลิเมตร และท่ออากาศขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 2.7 มิลลิเมตร ความยาวไม่น้อยกว่า 250 มิลลิเมตร

7.7.1.3 กระจกตวง

7.7.1.4 นาฬิกาจับเวลา

7.7.2 วิธีทดสอบ

7.7.2.1 ตัวควบคุมการไหล

เติมน้ำกลั่นใส่ขวดแก้วจนถึงขีดปริมาตร ติดตั้งชุดทดสอบตามรูปที่ 6 ทำเครื่องหมายบนสายส่งที่ตำแหน่งหัวและท้ายของตัวควบคุมการไหล เปิดตัวควบคุมการไหลให้น้ำกลั่นไหลผ่านชุดให้สารละลายตัวอย่าง ปิดตัวควบคุมการไหลแล้วต้องหยุดการไหลได้สนิท เลื่อนตัวควบคุมการไหลตรวจพินิจสายส่งบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้

7.7.2.2 อัตราการไหล

เติมน้ำกลั่นใส่ขวดแก้วจนถึงขีดปริมาตร ติดตั้งชุดทดสอบตามรูปที่ 6 และปลดเข็มแทงเข้าเส้นเลือดหรือปลอกหุ้มข้อต่อในออก ปรับตัวควบคุมการไหลให้อยู่ในภาวะปิด ปรับระดับน้ำกลั่นให้อยู่สูงกว่าปลายข้อต่อในที่ตั้งอยู่ในแนวระดับ 1 เมตร นำกระจกตวงวางรองใต้ข้อต่อใน จากนั้นปรับตัวควบคุมการไหลให้เปิดเต็มที่ ปลดปล่อยให้น้ำกลั่นไหลลงโดยอิสระ จับเวลาที่น้ำกลั่นไหลลงในกระจกตวงจนครบ 1 000 มิลลิลิตร

7.8 การทดสอบบริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัช (เฉพาะกรณีที่ใช้แทงด้วยเข็มฉีดยา)

7.8.1 เครื่องมือ

7.8.1.1 เข็มฉีดยา ขนาดระบุ 21 G

7.8.1.2 เครื่องอัดอากาศที่สามารถอัดอากาศให้ได้ความดันเกจไม่น้อยกว่า 200 กิโลพาสคัล

7.8.2 วิธีทดสอบ

บรรจุน้ำกลั่นจนเต็มชุดให้สารละลายตัวอย่างโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้ววางบนโต๊ะ จัดให้บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัชอยู่ในแนวระนาบ ปิดปลายข้อต่อในให้สนิท อัดอากาศเข้าทางเข็มเจาะภาชนะบรรจุด้วยความดันเกจ 200 กิโลพาสคัล แทะเข็มฉีดยาเข้าที่บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัชที่เป็นยางของชุดให้สารละลายตัวอย่าง แล้วคาไว้เป็นเวลา 15 วินาที จึงดึงเข็มออก ชับบริเวณนั้นให้แห้งสนิททันที แล้วสังเกตการรั่วซึมตรงบริเวณที่ทะเข็มฉีดยาภายในเวลา 1 นาที

7.9 การทดสอบข้อต่อใน

7.9.1 เครื่องมือ

7.9.1.1 ข้อต่อรูปกรวยตัวเมียอ้างอิงที่มีมิติตาม มอก.1387 เล่ม 2 รูปที่ 7

7.9.1.2 เครื่องอัดอากาศที่สามารถอัดอากาศให้ได้ความดันเกจไม่น้อยกว่า 200 กิโลพาสคัล

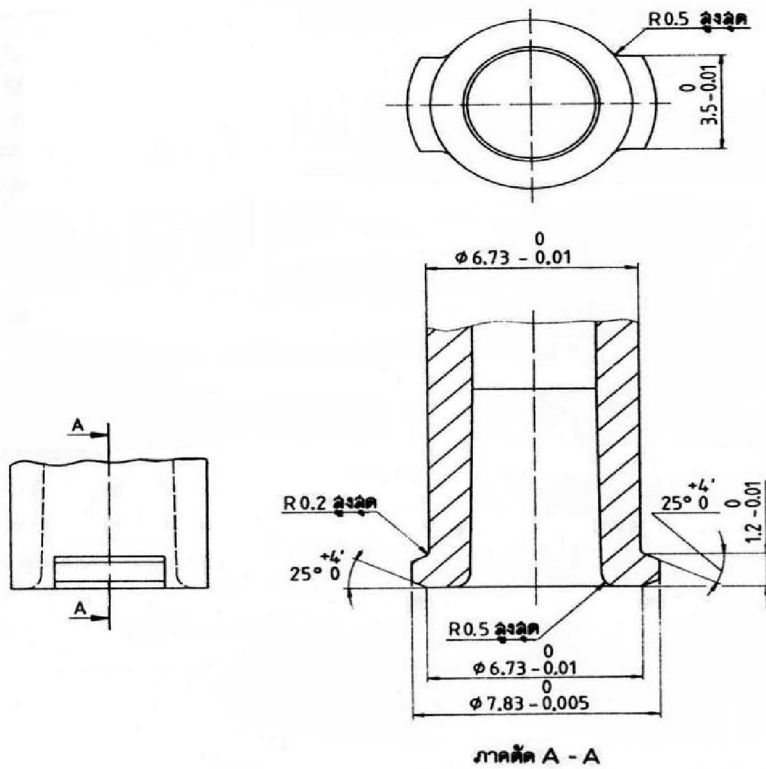
7.9.2 วิธีทดสอบ

7.9.2.1 เก็บชุดให้สารละลายตัวอย่างและน้ำกลั่นที่ใช้ในการทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส) ก่อนทดสอบ

7.9.2.2 ปิดปลายข้อต่อในของชุดให้สารละลายตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นจนเต็มแล้วด้วยข้อต่อรูปกรวยตัวเมียอ้างอิงโดยใช้แรงในแนวแกนไม่เกิน 27.5 นิวตัน และโมเมนต์บิดไม่เกิน 0.12 นิวตันเมตร ปลายอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับเครื่องอัดอากาศ

7.9.2.3 อัดอากาศเข้าชุดให้สารละลายตัวอย่างด้วยความดันเกจ 200 กิโลพาสคัล ที่อุณหภูมิห้อง (23 องศาเซลเซียส ถึง 27 องศาเซลเซียส) ตรวจพินิจการรั่วซึมของน้ำ

7.9.2.4 ทดสอบซ้ำตามข้อ 7.9.2.2 ถึงข้อ 7.9.2.3 โดยทดสอบที่อุณหภูมิ (40 ± 1) องศาเซลเซียส



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

หมายเหตุ ขอบนอกทั้งหมด (ถ้าไม่ได้กำหนดไว้) ของปีกยื่นหรือเกลียวต้องมีรัศมีระหว่าง 0.15 มิลลิเมตร ถึง 0.2 มิลลิเมตร

รูปที่ 7 ข้อต่อรูปกรวยตัวเมียอ้างอิง

(ข้อ 7.9.1.1)

7.10 การทดสอบคุณลักษณะทางเคมี

7.10.1 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแปลงกั

7.10.1.1 เครื่องมือ

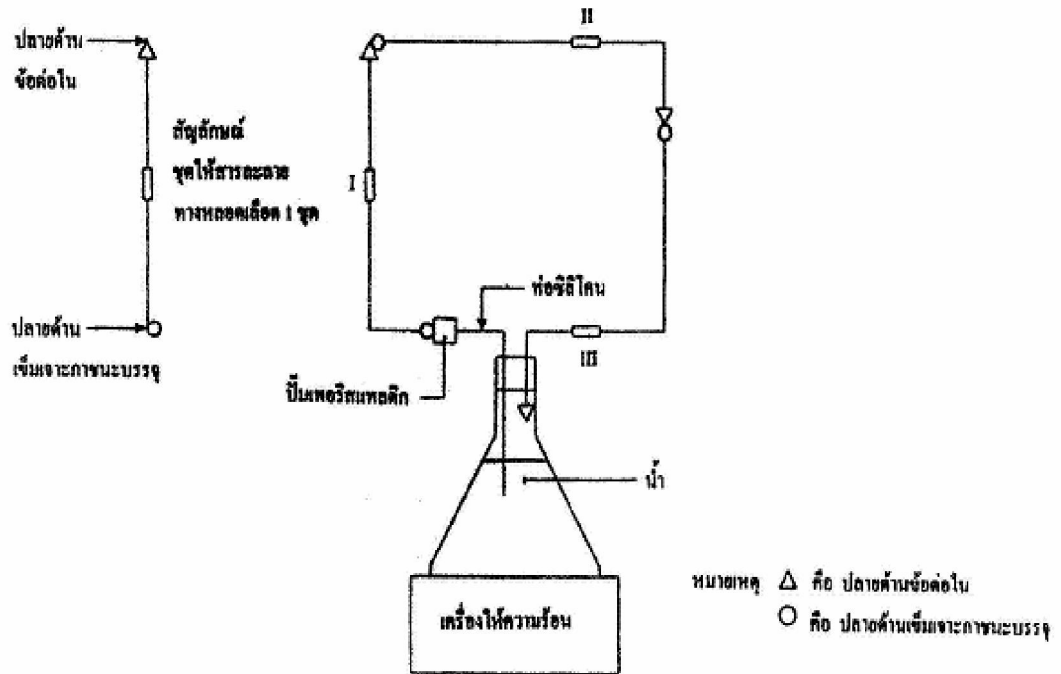
- (1) ขวดแก้วบอโรซิลิเกต ขนาด 300 มิลลิลิตร
- (2) ปัมเปอร์สแทลติก (peristaltic pump) หรือปัมป์อื่นที่เทียบเท่า
- (3) ท่อซิลิโคน
- (4) เครื่องให้ความร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 1) องศาเซลเซียส

7.10.1.2 สารละลาย

น้ำชั้นคุณภาพ 1 หรือชั้นคุณภาพ 2 ตาม มอก.1287

7.10.1.3 วิธีเตรียมสารละลายที่สกัดได้

- (1) ใส่ น้ำ 250 มิลลิลิตร ในขวดแก้วบอโรซิลิเกต แล้วต่อขวดแก้ว ท่อซิลิโคน ปัมพ์เพอริสแทลติก และชุดให้สารละลายตัวอย่าง 3 ชุด เพื่อให้เป็นระบบปิด ดังรูปที่ 8 โดยใช้ท่อซิลิโคนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้



I II และ III คือ ชุดให้สารละลายตัวอย่างชุดที่ 1 ชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ตามลำดับ

รูปที่ 8 เครื่องมือสำหรับเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์
(ข้อ 7.10.1.3(1))

- (2) ควบคุมอุณหภูมิของน้ำ ในขวดแก้วบอโรซิลิเกตไว้ที่ (37 ± 1) องศาเซลเซียสตลอดการทดสอบ
- (3) ปลอ่ยให้น้ำไหลเวียนในระบบด้วยอัตราการไหล 1 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเริ่มจากขวดแก้วไปที่ปั๊มเพอริสแทลติก ผ่านชุดให้สารละลายตัวอย่างที่ต่อกันทั้ง 3 ชุด แล้วกลับเข้าสู่ขวดแก้วบอโรซิลิเกต
- (4) เก็บสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดในระบบไว้ในขวดแก้วบอโรซิลิเกต แล้วปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง

7.10.1.4 วิธีเตรียมสารละลายแบลงก์

ปฏิบัติตามข้อ 7.10.1.3 อีกครั้งหนึ่งโดยไม่ต้องผ่านชุดให้สารละลายตัวอย่าง

7.10.2 วิธีทดสอบ

7.10.2.1 ลักษณะทั่วไป

ตรวจพินิจสารละลายที่สกัดได้

7.10.2.2 สารรีดิวิซ์

(1) เครื่องมือ

ขวดแก้วรูปกรวย ขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมจุก

(2) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(2.1) สารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 โมลต่อลิตร

ละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 31.6 กรัม ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยในขวดแก้ว ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

(2.2) สารละลายกรดซัลฟิวริก 1 โมลต่อลิตร

(2.3) โพแทสเซียมไอโอไดด์

(2.4) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.005 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 1.3 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่และปล่อยให้เย็นแล้ว ปริมาตรเล็กน้อยในขวดแก้ว ปริมาตรขนาด 1 000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่และปล่อยให้เย็นแล้ว จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

(2.5) น้ำแป้งที่เตรียมใหม่

ละลายแป้ง 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในน้ำเดือด 200 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ พร้อมกับคนอย่างสม่ำเสมอ ต้มให้เดือดจนกระทั่งสารละลายมีลักษณะ โปร่งแสง ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายตกตะกอน เก็บสารละลายส่วนใสไว้

(3) วิธีวิเคราะห์

(3.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ ที่เตรียมไว้ไม่เกิน 4 ชั่วโมง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปกรวย เติมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 10 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่า ปล่อยให้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.1 กรัม แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต จนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 หยด แล้วไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินจางหายไป บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต

(3.2) ปฏิบัติตามข้อ (3.1) อีกครั้งหนึ่งโดยใช้สารละลายแบลنگก์ 10 มิลลิลิตร แทนสารละลายที่สกัดได้

(3.3) การคำนวณ

คำนวณหาปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนตที่ใช้ทำปฏิกิริยาได้จากผลต่างระหว่างการไทเทรตข้อ (3.1) กับข้อ (3.2)

7.10.2.3 โลหะหนัก

นำสารละลายที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณแบเรียม โครเมียม ทองแดง ตะกั่ว ดีบุก และแคดเมียม โดยใช้อะตอมิกแอบซอร์ปสเปกโทรโฟโตมิเตอร์หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

7.10.2.4 ความเป็นกรดหรือความเป็นด่าง

(1) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(1.1) ทาซิโรอินดิเคเตอร์

ละลายเมทิลเรด 0.2 กรัม และเมทิลีนบลู 0.1 กรัม ในเอทานอล (ร้อยละ 95 โดยปริมาตร) และเจือจางด้วยเอทานอลจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

(1.2) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลต่อลิตร

(1.3) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลต่อลิตร

(2) วิธีวิเคราะห์

(2.1) ใส่สารละลายที่สกัดได้ 20 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วสำหรับไทเทรต เติมทาซิโรอินดิเคเตอร์ 0.1 มิลลิลิตร

(2.2) ถ้าสารละลายเป็นสีม่วง ให้ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และถ้าสารละลายเป็นสีเขียว ให้ไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจนสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเทา บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

7.10.2.5 กากที่ไม่ระเหย

(1) เครื่องมือ

(1.1) เครื่องชั่งที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

(1.2) ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105 ± 2) องศาเซลเซียส

(1.3) ครุชีเบล ทำจากควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ที่อบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 2 ใบ

(1.4) เครื่องอังไอน้ำ

(1.5) เดซิกเคเตอร์

(2) วิธีวิเคราะห์

(2.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในครุชีเบลใบที่หนึ่ง และสารละลายแบลنگก์ปริมาตรเท่ากันใส่ลงในครุชีเบลใบที่สอง นำไปประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ

(2.2) อบครุชีเบลทั้ง 2 ใบ ในตู้อบที่อุณหภูมิ (105 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งแล้วอบซ้ำเป็นเวลาครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ ผลต่างของน้ำหนักกากในครุชีเบลใบที่หนึ่งและใบที่สองคือกากที่ไม่ระเหย

7.10.2.6 การดูดกลืนแสง

(1) เครื่องมือ

(1.1) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 250 นาโนเมตร ถึง 320 นาโนเมตร

(1.2) แผ่นกรอง ขนาดรูเปิด 0.45 ไมโครเมตร

(2) วิธีวิเคราะห์

กรองสารละลายที่สกัดได้ผ่านแผ่นกรอง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ถึง 320 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายแปลงกั ทั้งนี้ให้วัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 5 ชั่วโมง หลังจากกรองผ่านแผ่นกรองแล้ว

7.11 การทดสอบสารไพโรเจน

7.11.1 การเตรียมสารละลายทดสอบ

บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อและสารไพโรเจน ร้อยละ 0.9 ที่มีอุณหภูมิระหว่าง 37 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส ให้เต็มชุดให้สารละลายตัวอย่าง จำนวน 10 ชุด ทั้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปล่อยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ไหลออกมาด้วยอัตราเร็วไม่เกิน 10 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ไหลออกมาชุดละ 40 มิลลิลิตร รวมกันเพื่อใช้เป็นสารละลายทดสอบ

7.11.2 วิธีทดสอบ

ให้ปฏิบัติตาม USP หัวข้อ Pyrogen Test หรือ Bacterial Endotoxins Test

7.12 การทดสอบการทำลายเม็ดเลือด

7.12.1 เครื่องมือ

(1) ตู้บ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

(2) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(4) หม้อนึ่งอัด

(5) ตู้บเพาะเชื้อ (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ± 1) องศาเซลเซียส

7.12.2 สารละลาย สารเคมี และวิธีเตรียม

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ ร้อยละ 0.9

(2) สารมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน (haemoglobin reference standard) 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(3) สารละลายแดรบกิน (Drabkin's solution)

ละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1 กรัม โพแทสเซียมไฮยาไนด์ 0.05 กรัม และโพแทสเซียมเพอร์ริชยาไนด์ 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 มิลลิลิตร

7.12.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

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

7.12.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

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

7.12.5 วิธีทดสอบ

7.12.5.1 การเตรียมกราฟสอบเทียบ

- (1) เตรียมสารละลายสอบเทียบ โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน 10 มิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้ว ปริมาตรขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลาย แดรบคินจนถึงขีดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
- (2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สารละลายแดรบคิน เป็นแบล็ก
- (3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืน

7.12.5.2 การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

- (1) นำเลือดกระต่ายในแต่ละภาชนะบรรจุ ตามข้อ 7.12.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แยกใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงและนำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับด้วยแรง 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 15 นาที
- (2) ดูดส่วนใสด้านบน (พลาสมา) 100 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบล็ก
- (3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมา ของเลือดกระต่ายแต่ละตัว เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- (4) ถ้าเลือดกระต่ายตัวใดมีปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาเกิน 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่นำเลือดกระต่ายตัวนั้นมาใช้ในการทดสอบต่อไป และต้องใช้เลือดกระต่ายในการทดสอบ 3 ตัว

7.12.5.3 การเจือจางเลือด

- (1) นำเลือดกระต่ายแต่ละตัวที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาแล้ว 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายแดรบคิน 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
- (2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแดรบคิน เป็นแบล็ก นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบิน

- (3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (25.0 ± 2.5) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าฮีโมโกลบินปรากฏ (haemoglobin present)

7.12.5.4 การทดสอบตัวอย่าง

- (1) นำเลือดกระต่ายที่ได้จากข้อ 7.12.5.3(3) มาตัวละ 5.0 มิลลิลิตร เติมสารละลายทดสอบ 4.0 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- (2) นำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับ ด้วยแรง 100 G ถึง 200 G เป็นเวลา 15 นาที
- (3) ดูดส่วนใสด้านบนออก ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงหลอดใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสในหลอดแก้วหลอดใหม่ แล้วนำไปหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

7.12.5.5 การหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

- (1) นำส่วนใสจากข้อ 7.12.5.4(3) 1.0 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายแตรบคิน 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที
- (2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายแตรบคินเป็นแบล็ก นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินเป็นค่าฮีโมโกลบินปลดปล่อย (haemoglobin released)
- (3) คำนวณค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือดจากสูตร

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

- (4) คำนวณค่าเฉลี่ยของดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด แล้วเทียบหาระดับการแตกตัวของเม็ดเลือดตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด
(ข้อ 7.12.5.5(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 6.1)

- ก.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ชุดให้สารละลายที่ทำจากวัสดุอย่างเดียวกัน มีส่วนประกอบเหมือนกัน และทำให้ปราศจากเชื้อในคราวเดียวกัน
- ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้
- ก.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สายส่ง การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก
- ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.1 นำไปตรวจสอบการบรรจุ เครื่องหมายและฉลาก และลักษณะทั่วไปก่อน แล้วจึงทดสอบสายส่ง
- ก.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 3.1 ข้อ 3.2.7 ข้อ 4. และข้อ 5. ในแต่ละรายการ ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.1 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สายส่ง

การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 35 000	5	0
35 001 ขึ้นไป	13	1

- ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบอนุภาคปนเปื้อน
- ก.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 5 ชุด
- ก.2.2.2 ตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.2.1 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบการรั่วซึม เข็มเจาะภาชนะบรรจุ และข้อต่อใน
- ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 15 ชุด เพื่อทดสอบรายการละ 5 ชุด
- ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.2.2 ข้อ 3.2.4 และข้อ 3.2.11 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับการทดสอบรอยต่อเชื่อมภายในชุดให้สารละลาย ตัวควบคุมการไหล และอัตราการไหล

- ก.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 11 ชุด นำไปทดสอบบรอยต่อเชื่อมภายในชุดให้สารละลาย จำนวน 5 ชุด และทดสอบตัวควบคุมการไหลและอัตราการไหล จำนวนรายการละ 3 ชุด
- ก.2.4.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.2.3 ข้อ 3.2.8 และข้อ 3.2.9 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.5 การชักตัวอย่างและการยอมรับการทดสอบอุปกรณ์ให้อากาศเข้า (ถ้ามี) กระเปาะหยด และบริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัช (เฉพาะกรณีที่ใช้แทงด้วยเข็มฉีดยา)
 - ก.2.5.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 10 ชุด นำไปทดสอบกระเปาะหยดตามข้อ 3.2.6.3 บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัช และอุปกรณ์ให้อากาศเข้าก่อน แล้วจึงทดสอบกระเปาะหยดตามข้อ 3.2.6.1 และข้อ 3.2.6.2
 - ก.2.5.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.2.5 ข้อ 3.2.6 และข้อ 3.2.10 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.6 การชักตัวอย่างและการยอมรับการทดสอบคุณลักษณะทางเคมี
 - ก.2.6.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 3 ชุด
 - ก.2.6.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.3 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.7 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบความปราศจากเชื้อ
 - ก.2.7.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 20 ชุด เพื่อใช้ทดสอบ 10 ชุด และสำรองไว้เพื่อการทดสอบซ้ำ 10 ชุด
 - ก.2.7.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.4.1 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.8 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบสารไพโรเจน
 - ก.2.8.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 10 ชุด
 - ก.2.8.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.4.2 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.2.9 การชักตัวอย่างและการยอมรับการทดสอบการทำลายเม็ดเลือดและความเป็นพิษ
 - ก.2.9.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 4 ชุด เพื่อใช้ทดสอบการทำลายเม็ดเลือด 3 ชุด และทดสอบความเป็นพิษ 1 ชุด
 - ก.2.9.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.4.3 และข้อ 3.4.4 จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ก.3 เกณฑ์ตัดสิน
 - ตัวอย่างชุดให้สารละลายต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 ข้อ ก.2.3.2 ข้อ ก.2.4.2 ข้อ ก.2.5.2 ข้อ ก.2.6.2 ข้อ ก.2.7.2 ข้อ ก.2.8.2 และข้อ ก.2.9.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

ภาคผนวก ข.

การทดสอบความเป็นพิษ

(ข้อ 3.4.4)

ข.1 การทดสอบความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.1.1 เครื่องมือ

ข.1.1.1 ตู้บ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

ข.1.2 สารละลาย

ข.1.2.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อร้อยละ 0.9

ข.1.3 การเตรียมสารละลายทดสอบและสารละลายแปลง

ข.1.3.1 ตัดชุดให้สารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด ให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเท่า ๆ กันโดยประมาณ นำมารวมกันและชั่งให้ได้น้ำหนักรวม 5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 25 มิลลิลิตร ออบในตู้บที่อุณหภูมิ (70 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จนถึงอุณหภูมิห้อง

ข.1.3.2 ให้ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นสารละลายแปลง

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 ฉีดสารละลายทดสอบและสารละลายแปลงเข้าทางเส้นเลือดดำของหนูทดสอบกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ ตัวละ 1.0 มิลลิลิตร แล้วปล่อยไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

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

ข.1.5 เกณฑ์ตัดสิน

ข.1.5.1 ถ้าหนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบทั้ง 5 ตัว ไม่ตายและตัวใดตัวหนึ่งไม่มีอาการป่วยมากกว่าที่ฉีดด้วยสารละลายแปลง ให้ถือว่าชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.1.5.2 ถ้าหนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบแสดงอาการป่วยมากกว่า 1 ตัว หรือมีหนูทดสอบตัวใดตัวหนึ่งตาย ให้ทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยใช้หนูทดสอบที่มีสมบัติตามข้อ ข.1.4.1 แต่มีน้ำหนัก (20 ± 1) กรัม กลุ่มละ 10 ตัว หนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบทั้ง 10 ตัว ต้องไม่ตายและไม่แสดงอาการป่วย หรือแสดงอาการป่วยที่ไม่มากกว่าที่ฉีดด้วยสารละลายแปลง จึงจะถือว่าชุดให้สารละลายตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

- ข.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ (cytotoxicity testing)
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ ให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้หรืออาจใช้วิธีทดสอบอื่นที่เทียบเท่าตามที่กำหนดใน ISO 10993-5 ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้เป็นวิธีตัดสิน
- ข.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์
- ข.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ (laminar airflow hood) ตู้บเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ 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 และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.22 ไมโครเมตร
- ข.2.2.2 สารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนตปราศจากเชื้อ 100 กรัมต่อลิตร
- ข.2.2.3 สารละลายทริปซิน (trypsin) ปราศจากเชื้อ 0.5 กรัมต่อลิตร
- ข.2.2.4 สารละลายกลูตามีน (glutamine) ปราศจากเชื้อ 29.2 กรัมต่อลิตร
- ข.2.2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มเอ็ม (Eagle's MEM)
- ข.2.2.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตและอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง
เติมสารละลายกลูตามีน 1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมโบคาร์บอเนต 1.2 มิลลิลิตร เซรั่มฟิวส์โบลไวน์ (fetal bovine serum) 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มเอ็ม 100 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ถึง 8 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์
- ข.2.2.7 สารละลายฟอรัมาลิน-คริสตัลไวโอเลต (formalin-crystal violet)
ละลายคริสตัลไวโอเลต 500 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายฟอรัมาลดีไฮด์ (BP) 10 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- ข.2.2.8 สีย้อมทริปแฟนบลู (trypan blue stain) 4.0 กรัมต่อลิตร
- ข.2.2.9 สารละลายซิงก์แอสซีเตต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ละลายซิงก์แอสซีเตต 20.14 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.9 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.22 ไมโครเมตร

ข.2.2.10 การควบคุมเชิงบวก

- สารเคมีควบคุมเชิงบวก (positive chemical control)
เจือจางสารละลายซิงก์แอสซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ให้ได้ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร
- วัสดุควบคุมเชิงบวก (positive material control)
แผ่นพลาสติกที่มีซิงก์ไดเอทิลไดโทโอคาร์บาเมต ร้อยละ 0.1

ข.2.2.11 การควบคุมเชิงลบ

- สารเคมีควบคุมเชิงลบ (negative chemical control)
เจือจางสารละลายซิงก์แอสซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- วัสดุควบคุมเชิงลบ (negative material control)
พลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน หรือแผ่นยาง ที่ปราศจากสารเติมแต่ง

ข.2.3 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อ

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 แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนลอย โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด เจือจางสารแขวนลอยของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร

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

ข.2.4 วิธีทดสอบ

ข.2.4.1 การเตรียมสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุม

(1) การเตรียมสารละลายทดสอบ

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

(2) การเตรียมสารละลายควบคุม เลือกข้อใดข้อหนึ่งดังนี้

(2.1) เตรียมสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกและสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ โดยสกัดวัสดุควบคุมเชิงบวกและวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ ข.2.4.1(1)

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

ข.2.4.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

ข.2.4.3 เติมหสารละลายทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ และสารละลายควบคุม ดังต่อไปนี้ ลงสัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหลุมละ 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมชนิดละ 3 หลุม

(1) สารละลายทดสอบความเข้มข้นร้อยละ 100 ร้อยละ 66 ร้อยละ 44 ร้อยละ 30 และร้อยละ 20 ตามลำดับ

(2) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกหรือสารเคมีควบคุมเชิงบวก

(3) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบหรือสารเคมีควบคุมเชิงลบ

(4) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบล็ก

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

ข.2.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อในภาตเลี้ยงเซลล์สัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายควบคุม และแบล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แล้ว ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผล ตามตารางที่ ข.1 หลังจากบันทึกผลที่ 48 ชั่วโมงแล้ว ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ติดภาตเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสตัลไวโอเลต เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบ

ตารางที่ ข.1 การประเมินระดับความเป็นพิษของเซลล์เนื้อเยื่อ
(ข้อ ข.2.5)

ระดับ	ปฏิกิริยา	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
0	ไม่เป็นพิษ	พบเซลล์แผ่เป็นชั้นเดียว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิค (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ตามปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	เป็นพิษน้อยมาก	พบเซลล์มีลักษณะกลม ใกล้เคียงหลุดออกจากพื้นผิวไม่เกินร้อยละ 20 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย	พบเซลล์มีลักษณะกลมไม่เกินร้อยละ 50 อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ แต่ไม่รุนแรงและไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดียว
3	เป็นพิษปานกลาง	พบเซลล์มีลักษณะกลมหรือพบการแตกทำลายของเซลล์ไม่เกินร้อยละ 70
4	เป็นพิษอย่างรุนแรง	พบการทำลายของเซลล์ชั้นเดียวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

ข.2.6 การแปลผล

ข.2.6.1 การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ต่อเมื่อ

- (1) แบลงก์ และสารเคมีควบคุมเชิงลบหรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)
- (2) สารเคมีควบคุมเชิงบวกหรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

ข.2.7 เกณฑ์ตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ เมื่อเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่ง ดังนี้

- (1) สารละลายทดสอบร้อยละ 100 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2
- (2) สารละลายทดสอบร้อยละ 44 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ 0