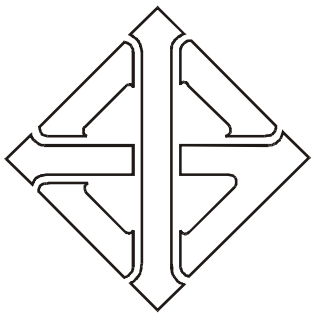


มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก. 2517– 2553

หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ

OVER-NEEDLE PERIPHERAL CATHETERS

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 11.040.20

ISBN 978-616-231-112-3

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ

มอก. 2517–2553

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 128 ตอนพิเศษ 99ง
วันที่ 1 กันยายน พุทธศักราช 2554

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 แซลแลนจ์ เมดิคอล โปรดักส์ จำกัด

กรรมการและเลขานุการ

นางนฤมล วาณิชย์เจริญ	สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ปัจจุบันหลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำเป็นอุปกรณ์ประกอบในการให้เลือด และสารละลายทางหลอดเลือด ซึ่งทำได้เองภายในประเทศ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้และส่งเสริมการทำภายในประเทศ จึงกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำขึ้น

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนดขึ้นโดยใช้ข้อมูลจากผู้ทำ ผู้ใช้ และเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

ISO 10555-1:1995	Sterile, single-use intravascular catheters - Part 1 : General requirements
Amd. 1 : 1999	
Amd. 2 : 2004	
ISO 10555-5:1996	Sterile, single-use intravascular catheters - Part 5 : Over-needle
Cor. 1 : 2002	peripheral catheters
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.1387	ข้อต่อรูปกรวยความเรียวร้อยละ 6 (ลูเออร์) สำหรับกระบอกฉีดยา เข็มฉีดยา และเครื่องมือแพทย์บางชนิด
เล่ม 1-2539	คุณลักษณะทั่วไป
เล่ม 2-2539	ข้อต่อล็อก

The United States Pharmacopeia, 32 Revisions, 2009

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตามมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 4329 (พ.ศ. 2554)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ มาตรฐานเลขที่ มอก.2517-2553 ไว้ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ตั้งแต่วันประกาศในราชกิจจานุเบกษา เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2554

ชัยวุฒิ บรรณวัฒน์

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมหลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำสำหรับการใช้งานครั้งเดียว

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

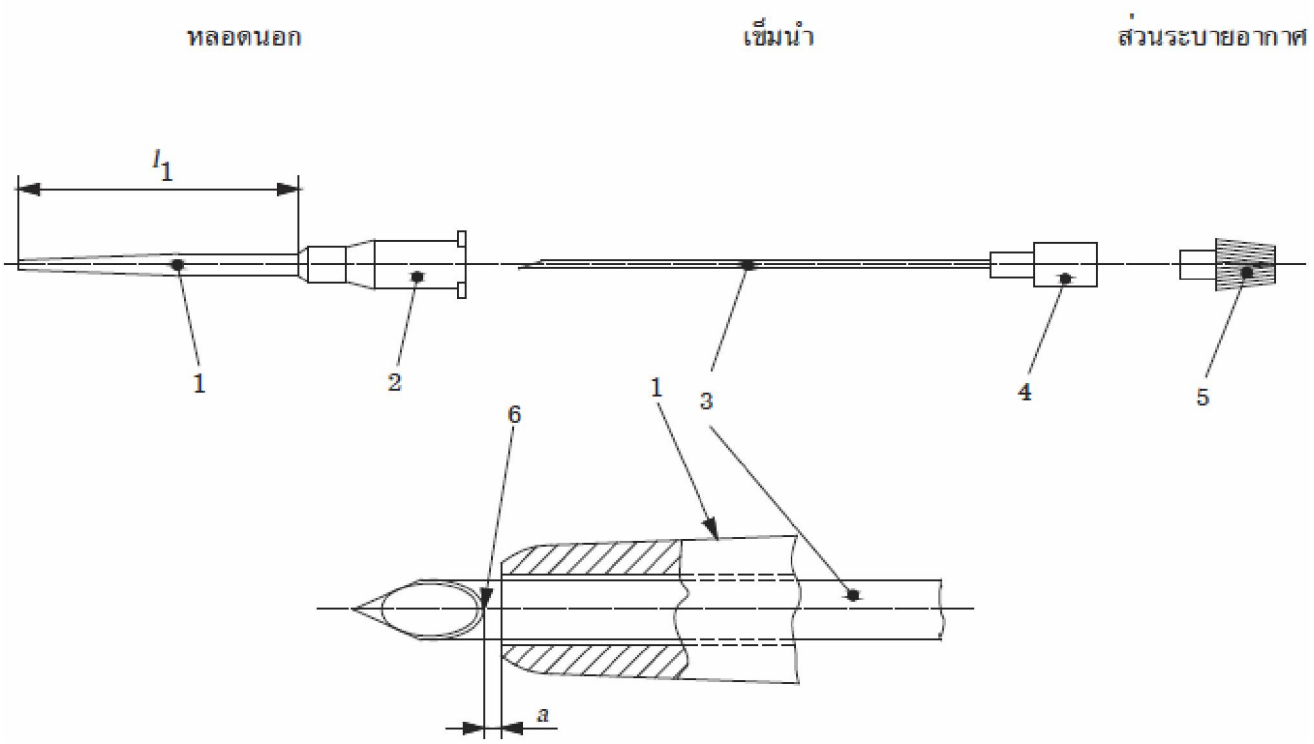
2.1 หลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า “หลอดให้สารละลาย” หมายถึง อุปกรณ์ที่ประกอบด้วยหลอดนอก เข็มนำ และส่วนระบายอากาศ (vent fitting) สวมเข้าด้วยกัน ตัวอย่างตามรูปที่ 1 ใช้ร่วมกับอุปกรณ์อื่น เช่น ชุดให้สารละลายทางหลอดเลือด ชุดให้เลือด ข้อต่อสามทาง กระบอกฉีดยา เพื่อนำผลิตภัณฑ์เภสัชหรือส่วนประกอบของเลือดเข้าสู่ร่างกายทางหลอดเลือด หรือนำเลือดเข้าสู่ร่างกาย

2.2 หลอดนอก หมายถึง หลอดที่มีเข็มนำอยู่ภายใน ประกอบด้วยตัวหลอด (catheter tube) และฐานหลอด (catheter hub)

2.3 เข็มนำ หมายถึง เข็มที่สอดอยู่ในหลอดนอก ทำหน้าที่เป็นตัวนำหลอดนอกเข้าสู่หลอดเลือดประกอบด้วยตัวเข็ม (needle tube) และฐานเข็ม (needle hub)

2.4 ส่วนระบายอากาศ หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้ต่อกับฐานเข็มเพื่อทำให้เห็นเลือดที่ไหลเข้าสู่ฐานเข็มได้ และเพื่อกันไม่ให้เลือดไหลออก

2.5 ความยาวใช้งาน (effective length) หมายถึง ความยาวของตัวหลอดส่วนที่สามารถสอดเข้าในหลอดเลือด



a ระยะห่างระหว่างขอบล่างของหน้าตัดเข็มกับปลายหลอดนอก

l_1 ความยาวใช้งาน

1 ตัวหลอด

2 ฐานหลอด

3 ตัวเข็ม

4 ฐานเข็ม

5 ส่วนระบายอากาศ

6 ขอบล่างของหน้าตัดเข็ม (heel of bevel)

หมายเหตุ อาจมีส่วนประกอบอื่น เช่น ปีก บริเวณสำหรับฉีดผลิตภัณฑ์เภสัช

รูปที่ 1 ตัวอย่างหลอดให้สารละลายทางหลอดเลือดแบบมีเข็มนำ

(ข้อ 2.1)

3. ขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน

3.1 ขนาดระบุ เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก และรหัสสีของหลอดนอก ให้เป็นไปตามตารางที่ 1
การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจและวัดด้วยเครื่องวัดที่วัดได้ละเอียดไม่น้อยกว่า 0.001 มิลลิเมตร

ตารางที่ 1 ขนาดระบุ เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก และรหัสสีของหลอดนอก
(ข้อ 3.1)

ขนาดระบุ		เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกของตัวหลอด mm		รหัสสีของฐานหลอด
mm	G	ต่ำสุด	สูงสุด	
0.6	26	0.550	0.649	ม่วง
0.7	24	0.650	0.749	เหลือง
0.8 0.9	22	0.750	0.949	น้ำเงิน
1.0 1.1	20	0.950	1.149	ชมพู
1.2 1.3	18	1.150	1.349	เขียว
1.4 1.5	17	1.350	1.549	ขาว
1.6 1.7 1.8	16	1.550	1.849	เทา
1.9 2.0 2.1 2.2	14	1.850	2.249	ส้ม
2.3 2.4 2.5	13	2.250	2.549	แดง
2.6 2.7 2.8	12	2.550	2.849	ฟ้า
3.3 3.4	10	3.250	3.549	น้ำตาล

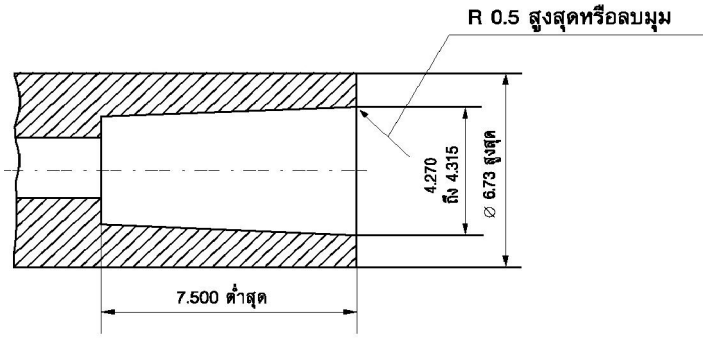
หมายเหตุ G คือ gauge size

3.2 ระยะห่างระหว่างขอบล่างของหน้าตัดเข็มนำกับปลายหลอดนอก (*a*) (ดูรูปที่ 1)
ระยะห่างระหว่างขอบล่างของหน้าตัดเข็มนำกับปลายหลอดนอก ต้องอยู่ในช่วง 0 มิลลิเมตร ถึง 1 มิลลิเมตร เมื่อสอดเข็มนำเข้าในหลอดนอกจนสุด
การทดสอบให้ใช้เครื่องวัดที่วัดได้ละเอียดไม่น้อยกว่า 0.1 มิลลิเมตร

3.3 ฐานหลอด
เป็นข้อต่อนอกรูปกรวยมี 2 แบบ คือ

3.3.1 แบบธรรมดา มิติเป็นไปตามรูปที่ 2
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม มอก.1387 เล่ม 1

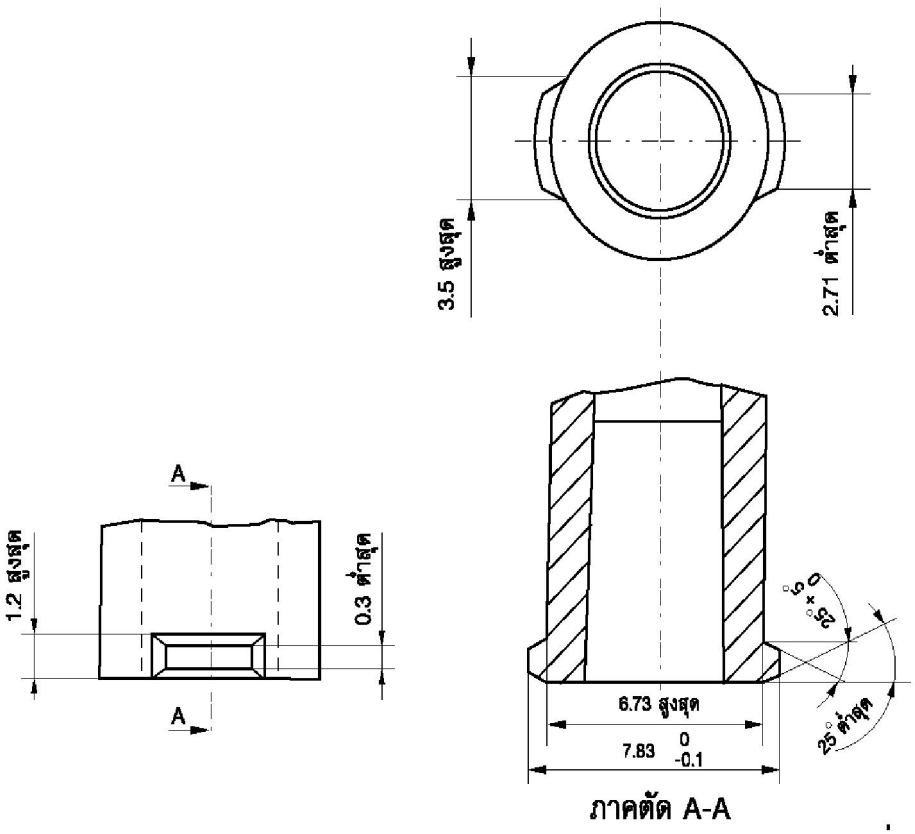
3.3.2 แบบล็อก มิติเป็นไปตามรูปที่ 3
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม มอก.1387 เล่ม 2



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 2 ข้อต่อนอกรูปกรวยแบบธรรมดา

(ข้อ 3.3.1)



หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 3 ข้อต่อนอกรูปกรวยแบบล็อก

(ข้อ 3.3.2)

4. คุณลักษณะที่ต้องการ

4.1 ลักษณะทั่วไป

4.1.1 หลอดให้สารละลายต้องมีปลอกหุ้มตลอดความยาวของตัวหลอดและตัวเข็ม ไม่หลุดออกก่อนใช้งาน และถอดออกได้ง่าย

4.1.2 ปลายหลอดนอกต้องเรียว มน และเรียบ เพื่อให้สอดเข้าหลอดเลือดได้ง่าย และต้องแนบสนิทกับตัวเข็มเมื่อสอดเข็มนำเข้าในหลอดนอกจนสุด

4.1.3 ฐานเข็มหรือส่วนระบายอากาศต้องออกแบบให้มองเห็นเลือดที่ไหลย้อนเข้ามาในเข็มนำได้

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.2 เข็มนำ

4.2.1 ตัวเข็มต้องทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมออสเทไนต์ และมีสมบัติดังนี้

(1) ความทนการกัดกร่อน

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.3 แล้ว ต้องไม่มีร่องรอยการกัดกร่อน

(2) ความแข็งแรงของรอยต่อเชื่อมระหว่างตัวเข็มกับฐานเข็ม (strength of union of needle hub and needle tube)

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.4 แล้ว ตัวเข็มและฐานเข็มต้องไม่หลุดออกจากกัน

4.2.2 ปลายเข็มต้องคม ปราศจากเสี้ยน ขอบ หรือตำหนิอื่น ๆ

การทดสอบให้ใช้แว่นที่มีกำลังขยาย 2.5 เท่า

4.3 อัตราการไหล

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.5 แล้ว อัตราการไหลของน้ำกลั่นต้องเป็นดังนี้

(1) หลอดให้สารละลายที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกระบุน้อยกว่า 1.0 มิลลิเมตร อัตราการไหลต้องอยู่ระหว่างร้อยละ 80 ถึงร้อยละ 125 ของอัตราการไหลที่ระบุไว้ที่ฉลาก

(2) หลอดให้สารละลายที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกระบุตั้งแต่ 1.0 มิลลิเมตร ขึ้นไป อัตราการไหลต้องอยู่ระหว่างร้อยละ 90 ถึงร้อยละ 115 ของอัตราการไหลที่ระบุไว้ที่ฉลาก

4.4 การรั่วซึมของอุปกรณ์ระบายอากาศ

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.6 แล้ว สารละลายทดสอบต้องไม่รั่วซึมออกจากส่วนระบายอากาศภายในเวลา 15 วินาที

4.5 คุณลักษณะทางชีวภาพ

4.5.1 ความปราศจากเชื้อ

เมื่อทดสอบตาม USP หัวข้อ Sterility Tests แล้ว ต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์

4.5.2 สารไพโรเจน

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่มีสารไพโรเจน หรือ

(2) ระดับชีวพิษภายในตัว (endotoxins) ต้องไม่เกิน 20.0 หน่วยต่อชุด

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม USP หัวข้อ Pyrogen Test หรือ Bacterial Endotoxins Test

4.5.3 การทำลายเม็ดเลือด

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.7 แล้ว เม็ดเลือดต้องไม่แตกตัว

4.5.4 ความเป็นพิษ

ต้องเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้

(1) ไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง หรือ

(2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ

การทดสอบให้ปฏิบัติตามภาคผนวก ข.

5. การบรรจุ

5.1 ให้บรรจุหลอดให้สารละลายแต่ละหน่วยในภาชนะหุ้มห่อที่ผนึกเรียบร้อย สามารถรักษาสภาพปราศจากเชื้อได้ตลอดระยะเวลาการเก็บ

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ที่ภาชนะหุ้มห่อหลอดให้สารละลายทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) ชื่อผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้หรือชื่ออื่นที่สื่อความหมายว่าเป็นผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้

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

(3) ขนาดระบุของหลอดนอก เป็นมิลลิเมตร

(4) ความยาวใช้งาน เป็นมิลลิเมตร

(5) อัตราการไหล เป็นมิลลิลิตรต่อนาที

(6) วิธีทำให้ปราศจากเชื้อ

(7) รหัสรุ่นที่ทำ

(8) เดือน ปีที่หมดอายุ

(9) วิธีใช้

(10) คำเตือนหรือข้อควรระวังในการใช้และการทำลาย เช่น ห้ามใช้เมื่อภาชนะหุ้มห่อชำรุด ควรแยกทำลายแบบขยะติดเชื้อ

(11) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

หมายเหตุ ข้อ (9) และข้อ (10) อาจทำเป็นใบแทรกไว้ในกล่องบรรจุก็ได้

6.2 ที่กล่องบรรจุหลอดให้สารละลายทุกกล่อง อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดตามข้อ 6.1(1) ข้อ 6.1(2) ข้อ 6.1(6) ข้อ 6.1(7) ข้อ 6.1(8) ข้อ 6.1 (11) จำนวนเป็นหน่วย และวิธีเก็บรักษาให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

6.3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วย ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน ให้เป็นไปตามภาคผนวก ก.

8. การทดสอบ

8.1 ให้ใช้วิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้หรือวิธีอื่นใดที่ให้ผลเทียบเท่า ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีที่กำหนดในมาตรฐานนี้เป็นวิธีตัดสิน

8.2 หากมิได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น น้ำกลั่นและสารเคมีที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

8.3 การทดสอบความทนการกัดกร่อนของตัวเข็ม

8.3.1 สารเคมี

8.3.1.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลต่อลิตร

8.3.2 วิธีทดสอบ

ใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีอุณหภูมิ (27 ± 2) องศาเซลเซียส ลงในภาชนะแก้วบอโรซิลิเคต ให้มีปริมาณเพียงพอที่จะแช่เข็มนำของหลอดให้สารละลายตัวอย่างลงได้ประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวตัวเข็ม แช่ตัวเข็มเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ± 5 นาที โดยรักษาอุณหภูมิของสารละลายไว้ที่ (27 ± 2) องศาเซลเซียส นำขึ้นมาเช็ดให้แห้ง แล้วเปรียบเทียบร่องรอยการกัดกร่อนบนตัวเข็มส่วนที่แช่กับส่วนที่ไม่ได้แช่

8.4 การทดสอบความแข็งแรงของรอยต่อเชื่อมระหว่างตัวเข็มกับฐานเข็ม

8.4.1 เครื่องมือ

8.4.1.1 เครื่องทดสอบแรงดึง (tensile-testing apparatus) ที่ให้แรงได้ไม่น้อยกว่า 20 นิวตัน มีความแม่น ± ร้อยละ 1

8.4.2 วิธีทดสอบ

8.4.2.1 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกของเข็มนำของหลอดให้สารละลายตัวอย่าง

8.4.2.2 จับยึดตัวเข็มและฐานเข็มด้วยอุปกรณ์จับยึดของเครื่องทดสอบแรงดึง เดินเครื่องให้เกิดแรงดึงเข็มนำด้วยอัตราเร็ว 100 มิลลิเมตรต่อนาที จนได้แรง 10 นิวตัน สำหรับเข็มนำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกน้อยกว่า 0.6 มิลลิเมตร และ 20 นิวตัน สำหรับเข็มนำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกตั้งแต่ 0.6 มิลลิเมตร ขึ้นไป แล้วตรวจพินิจ

8.4.2.3 เดินเครื่องให้เกิดแรงกดกับเข็มนำด้วยอัตราเร็ว 100 มิลลิเมตรต่อนาที จนได้แรง 10 นิวตัน สำหรับเข็มนำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกน้อยกว่า 0.6 มิลลิเมตร และ 20 นิวตัน สำหรับเข็มนำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกตั้งแต่ 0.6 มิลลิเมตร ขึ้นไป แล้วตรวจพินิจ

8.5 การทดสอบอัตราการไหล

8.5.1 อุปกรณ์

8.5.1.1 ชุดทดสอบ ประกอบด้วยภาชนะบรรจุน้ำกลั่นที่รักษาระดับน้ำให้คงที่ ต่อกับสายส่งและข้อต่อในที่เป็นไปตาม มอก.1387 สามารถให้น้ำกลั่นไหลได้ในอัตรา (525 ± 25) มิลลิลิตรต่อนาที (ดูรูปที่ 4)

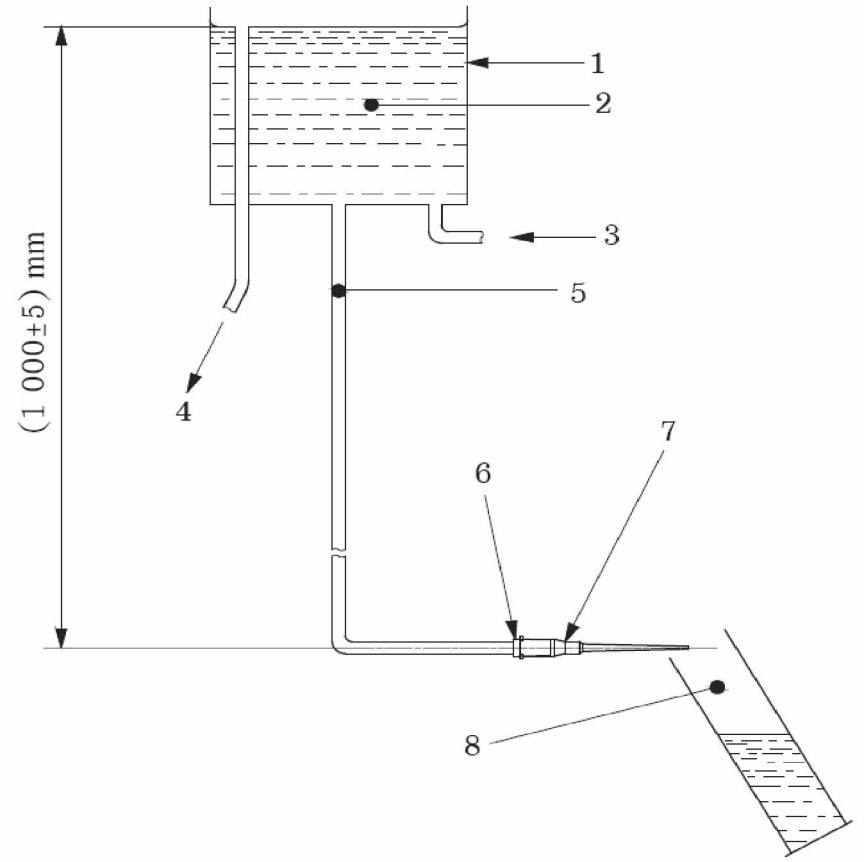
8.5.1.2 กระบอกตวง ที่มีความแม่น ± ร้อยละ 1

8.5.1.3 นาฬิกาจับเวลา

8.5.2 วิธีทดสอบ

8.5.2.1 เติมน้ำกลั่นลงในภาชนะบรรจุน้ำของชุดทดสอบ (ข้อ 8.5.1.1) ปรับระดับน้ำกลั่นให้อยู่สูงจากข้อต่อใน (1 000 ± 5) มิลลิเมตร ตรวจสอบอัตราการไหล ให้เป็นไปตามที่กำหนด (ข้อ 8.5.1.1) ต่อหลอดนอกตัวอย่างเข้ากับชุดทดสอบ

8.5.2.2 ปล่อยให้น้ำกลั่นไหลผ่านหลอดนอกตัวอย่าง เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 วินาที รองรับน้ำที่ไหลผ่านหลอดนอกตัวอย่างด้วยกระบอกตวง ชั่งน้ำหนักหรือวัดปริมาตรน้ำที่ไหลออกมาทดสอบเช่นเดียวกันนี้จนครบ 3 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยเป็นมิลลิลิตรต่อนาที



1 ภาชนะบรรจุน้ำกลั่น
2 น้ำกลั่น
3 ทางเข้าของน้ำกลั่น
4 ทางน้ำล้น
5 สายส่ง
6 ข้อต่อใน ความเรียว ร้อยละ 6
7 หลอดนอกตัวอย่าง
8 กระบอกตวง

หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 4 การทดสอบอัตราการไหล

(ข้อ 8.5.1.1)

8.6 การทดสอบการรั่วซึมของส่วนระบายอากาศ

8.6.1 อุปกรณ์

8.6.1.1 ชุดทดสอบ ประกอบด้วยภาชนะบรรจุสารละลายทดสอบที่รักษาระดับของเหลวให้คงที่ต่อกับสายส่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในไม่น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร มีตัวควบคุมการไหล ปิดปลายสายด้วยฝายางหรือวัสดุอื่นที่เหมาะสม

8.6.1.2 นาฬิกาจับเวลา

8.6.2 สารละลายและวิธีเตรียม

8.6.2.1 สารละลายและวิธีเตรียม

(1) สารละลายทดสอบ

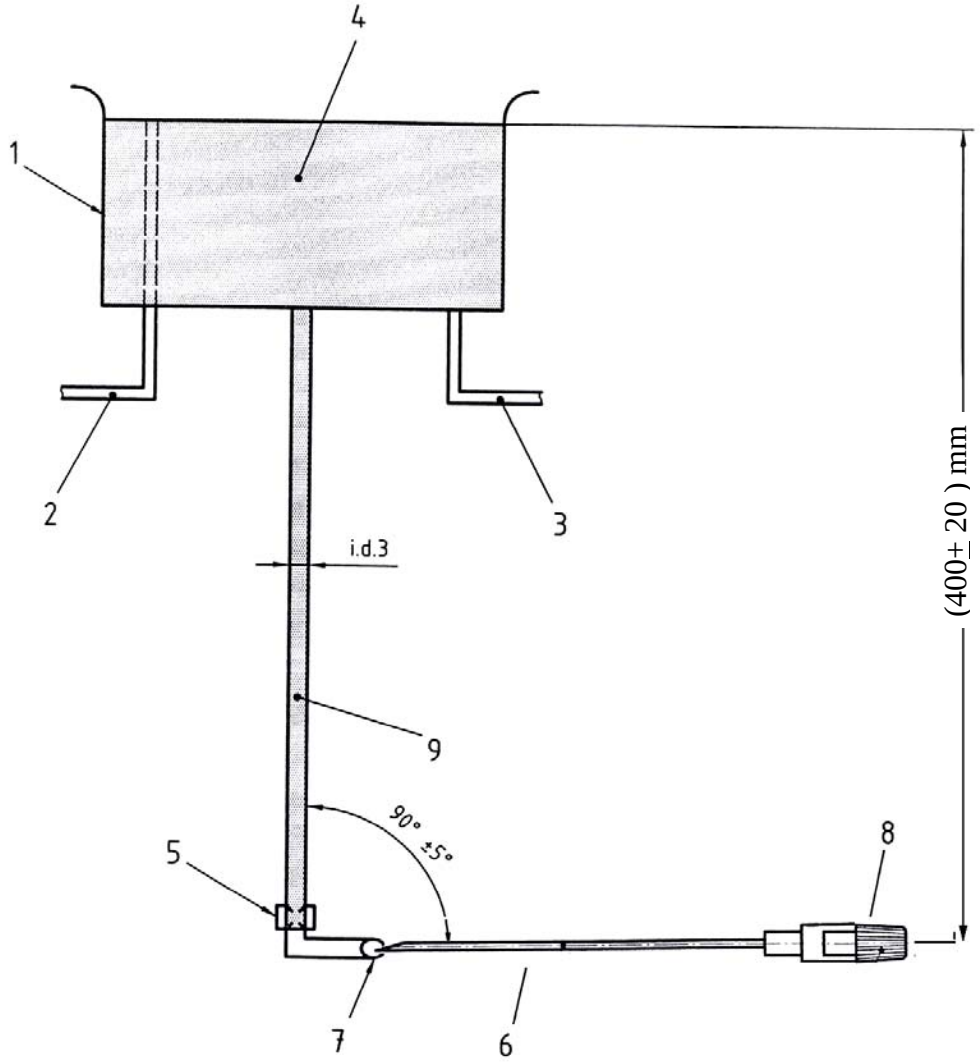
ผสมกลีเซอรอล ชั้นคุณภาพไม่ด้อยกว่าชั้นคุณภาพ USP 450 มิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมต่อลิตร 550 มิลลิลิตร

8.6.3 วิธีทดสอบ

8.6.3.1 จัดชุดทดสอบตามรูปที่ 5 เติมสารละลายทดสอบอุณหภูมิ (27 ± 2) องศาเซลเซียส ลงในภาชนะบรรจุของเหลว เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดทดสอบให้สารละลายไหลผ่านสายส่งจนเต็ม ไล่ฟองอากาศออกจากสายให้หมด ปิดตัวควบคุมการไหลพร้อมทั้งปิดฝายาง ที่ปลายสายให้สนิท เช็ดให้แห้ง

8.6.3.2 ดึงเข็มนำพร้อมส่วนระบายอากาศออกจากหลอดให้สารละลายตัวอย่าง นำไปแทงเข้าในฝายางของชุดทดสอบ ปรับให้ระดับสารละลายอยู่สูงกว่าเข็มนำตัวอย่าง (400 ± 20) มิลลิเมตร โดยให้เข็มนำพร้อมส่วนระบายอากาศอยู่ในแนวระนาบเบี่ยงเบนได้ไม่เกิน 5 องศา

8.6.3.3 เปิดตัวควบคุมการไหลของชุดทดสอบ เริ่มจับเวลาที่สารละลายทดสอบไหลเข้าในเข็มนำตัวอย่าง บันทึกเวลาที่สารละลายทดสอบหยดแรกซึมออกมาจากส่วนระบายอากาศ หรือเวลาที่สารละลายทดสอบไหลเข้ามาจนเต็มส่วนระบายอากาศ



1 ภาชนะบรรจุสารละลายทดสอบ
2 ทางน้ำล้น
3 ทางเข้าของสารละลายทดสอบ
4 สารละลายทดสอบ
5 ตัวควบคุมการไหล
6 เข็มนำของหลอดให้สารละลายตัวอย่าง
7 ฝายาง
8 ส่วนระบายอากาศของหลอดให้สารละลายตัวอย่าง
9 สายส่ง

หน่วยเป็นมิลลิเมตร

รูปที่ 5 การทดสอบการรั่วซึมของส่วนระบายอากาศ

(ข้อ 8.6.3.1)

8.7 การทดสอบการทำลายเม็ดเลือด

8.7.1 เครื่องมือ

(1) ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) องศาเซลเซียส

(2) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(4) หม้อนึ่งอัด

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

8.7.2 สารละลาย สารเคมี และวิธีเตรียม

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ ร้อยละ 0.9

(2) สารมาตรฐานอ้างอิงฮีโมโกลบิน (haemoglobin reference standard) 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(3) สารละลายแดรบคิน (Drabkin′s solution)

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

8.7.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

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

8.7.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ตัดหลอดให้สารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด ให้ได้ชิ้นตัวอย่างที่มีขนาดเท่า ๆ กัน โดยประมาณ 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 ใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลายแดรบคินจนถึงขีดปริมาตร สารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐาน เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืน

8.7.5.2 การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

(1) นำเลือดกระต่ายในแต่ละภาชนะบรรจุ ตามข้อ 8.7.3 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 โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(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 โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบิน

(3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (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) นำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับ ด้วยแรง 100 G ถึง 200 G เป็นเวลา 15 นาที

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

8.7.5.5 การหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(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 2

ตารางที่ 2 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 หลอดให้สารละลายที่ทำจากวัสดุอย่างเดียวกัน มีส่วนประกอบเหมือนกัน และทำให้ปราศจากเชื้อในคราวเดียวกัน

ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ก.2.1 การชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ก.1 นำไปตรวจสอบการบรรจุ เครื่องหมายและฉลาก และลักษณะทั่วไปก่อน แล้วจึงทดสอบขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน

ก.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 3. ข้อ 4.1 ข้อ 5. และข้อ 6. ในแต่ละรายการ ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.1 จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายรุ่นนั้น เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบขนาดและเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน ลักษณะทั่วไป การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

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

ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบเข็มนำ อัตราการไหล และการรั่วซึมของอุปกรณ์ระบายอากาศ

ก.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 15 ชุด เพื่อใช้ทดสอบความทนการกัดกร่อนของตัวเข็ม ความแข็งแรงของรอยต่อเชื่อมระหว่างตัวเข็มกับฐานเข็ม ปลายเข็ม อัตราการไหล และการรั่วซึมของอุปกรณ์ระบายอากาศ รายการละ 3 ชุด

ก.2.2.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.2.1(1) ข้อ 4.2.1(2) ข้อ 4.2.2 ข้อ 4.3 และข้อ 4.4 จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบความปราศจากเชื้อ

ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 10 ชุด เพื่อใช้ทดสอบ 5 ชุด และสำรองไว้เพื่อการทดสอบซ้ำ 5 ชุด

ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.5.1 จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบสารไพโรเจน การทำลายเม็ดเลือด และความเป็นพิษ

ก.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 15 ชุด เพื่อใช้ทดสอบรายการละ 5 ชุด

ก.2.4.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.5.2 ข้อ 4.5.3 และข้อ 4.5.4 จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างหลอดให้สารละลายต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 ข้อ ก.2.3.2 และข้อ ก.2.4.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

ภาคผนวก ข.

การทดสอบความเป็นพิษ

(ข้อ 4.5.4)

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 ตัดหลอดให้สารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 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 ให้ถือว่าหลอดให้สารละลายตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

ข.1.5.2 ถ้าหนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบแสดงอาการป่วยมากกว่า 1 ตัว หรือมีหนูทดสอบตัวใดตัวหนึ่งตาย ให้ทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้หนูทดสอบที่มีสมบัติตามข้อ ข.1.4.1 แต่มีน้ำหนัก (20 ± 1) กรัม กลุ่มละ 10 ตัว หนูทดสอบกลุ่มที่ฉีดด้วยสารละลายทดสอบทั้ง 10 ตัว ต้องไม่ตายและไม่แสดงอาการป่วย หรือแสดงอาการป่วยที่ไม่มากกว่าที่ฉีดด้วยสารละลายแบลงก์ จึงจะถือว่าหลอดให้สารละลายตัวอย่างไม่เป็นพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลอง

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) 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 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ

ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 8.0 กรัม และแอนไฮดรัสไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม ในน้ำกลั่นและเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 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 อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม (Eagle′s MEM)

ข.2.2.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตและอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง

เติมสารละลายกลูทามีน 1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.2 มิลลิลิตร เซรุ่มฟีทัลโบไวน์ (fetal bovine serum) 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลส์เอ็มอีเอ็ม 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 และทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.22 ไมโครเมตร

ข.2.2.10 การควบคุมเชิงบวก

- สารเคมีควบคุมเชิงบวก (positive chemical control)

เจือจางสารละลายซิงก์แอซีเทต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัด

ตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 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 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 แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนลอย โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด เจือจางสารแขวนลอยของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร

ข.2.3.2 นำเซลล์เนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้น 3×10^5 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร เติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 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 ของหลอดให้สารละลายตัวอย่างที่ล้างและนึ่งฆ่าเชื้อ ในหม้อนึ่งอัดแล้วใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม นำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เป็นเวลา (24 ± 1) ชั่วโมง เขย่าขวดเป็นระยะ สารละลายที่ได้เป็นสารละลายทดสอบร้อยละ 100 เตรียมสารละลายทดสอบ ร้อยละ 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 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 นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ ข.2.5

ข.2.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ สัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายควบคุม และแบลงก์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง แล้ว ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผลตามตารางที่ ข.1

หลังจากบันทึกผลที่ 48 ชั่วโมงแล้ว ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ติดถาดเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน–คริสทัลไวโอเลต เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบ

ตารางที่ ข.1 การประเมินระดับความเป็นพิษของเซลล์เนื้อเยื่อ

(ข้อ ข.2.5)

ระดับ	ปฏิกิริยา	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
0	ไม่เป็นพิษ	พบเซลล์แผ่เป็นชั้นเดี่ยว มีเม็ดอินทราไซโทพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ตามปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
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

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ เมื่อเป็นไปตามข้อใดข้อหนึ่ง ดังนี้

(1) สารละลายทดสอบร้อยละ 100 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2

(2) สารละลายทดสอบร้อยละ 44 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับ 0