ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ ๔๖๗๗ (พ.ศ. ๒๕๕๘)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. ๒๕๑๑

เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ มาตรฐานเลขที่ มอก. 531 - 2546

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๕ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. ๒๕๑๑ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศยกเลิกประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ ๓๒๔๗ (พ.ศ. ๒๕๔๗) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. ๒๕๑๑ เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ ลงวันที่ ๒ เมษายน พ.ศ. ๒๕๔๗ และออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ มาตรฐานเลขที่ มอก. 531 – 2558 ขึ้นใหม่ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ให้มีผลตั้งแต่พระราชกฤษฎีกาว่าด้วยการกำหนดให้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ ต้องเป็นไปตามมาตรฐานเลขที่ มอก. 531 - 2558 ใช้บังคับเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๑๖ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๕๘

จักรมณฑ์ ผาสุกวนิช

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมเฉพาะภาชนะพลาสติกที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อที่เป็นของเหลวสำหรับฉีดเข้าสู่ร่างกาย โดยไม่รวมถึงอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ ซึ่งต่อไปในมาตรฐานนี้จะเรียกว่า “ภาชนะพลาสติก”

1.2 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ไม่ครอบคลุมกระบอกฉีดยาพลาสติกที่บรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อพร้อมใช้

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 ผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ (sterile pharmaceutical products) หมายถึง ของเหลวที่ผ่านกรรมวิธีการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ที่ใช้ฉีดเข้าสู่ร่างกายเพื่อการวินิจฉัย บำบัด บรรเทา รักษา หรือป้องกันโรคหรือความเจ็บป่วยของมนุษย์และสัตว์หรือเพื่อให้เกิดผลแก่สุขภาพ โครงสร้าง หรือการกระทำหน้าที่ใด ๆ ของร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์

2.2 พลาสติกหลายชั้น (multilayer plastic) หมายถึง พลาสติกที่ประกอบด้วยแผ่นพลาสติกตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไปอัดประกบกัน และส่วนประกอบแต่ละชนิดต้องไม่ละลายเข้าด้วยกัน

3. ชนิด

3.1 ภาชนะพลาสติก แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ

3.1.1 พอลิเอทิลีน

3.1.2 พอลิโพรพิลีน

3.1.3 พอลิไวนิลคลอไรด์

3.1.4 พลาสติกหลายชั้น ซึ่งต้องไม่มีพอลิไวนิลคลอไรด์เป็นส่วนประกอบ

4. วัสดุ

4.1 การทดสอบชนิดของภาชนะพลาสติกให้ใช้เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR) หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

4.2 กรณีภาชนะพลาสติกชนิดพลาสติกหลายชั้น ให้ทดสอบชนิดเฉพาะชั้นที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์เท่านั้น

4.3 กรณีภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์

4.3.1 ต้องประกอบด้วยพอลิไวนิลคลอไรด์เรซินไม่น้อยกว่า 55% โดยมวล
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.1

4.3.2 ต้องมีปริมาณได (2-เอทิลเฮกซิล)แทเลต (DEHP) ที่สกัดได้ ไม่เกิน 40% โดยมวล
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.2

4.3.3 ต้องมีปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.3

5. คุณลักษณะที่ต้องการ

5.1 ลักษณะทั่วไป

5.1.1 ต้องไม่มีสี โปร่งแสง และมองเห็นผลิตภัณฑ์เภสัชที่บรรจุอยู่ภายในได้ชัด

5.1.2 พื้นผิวภายในของภาชนะพลาสติกต้องสะอาด เรียบ ยกเว้นตะเข็บที่เกิดจากแบบ (mould) และไม่มีตำหนิซึ่งอาจเป็นผลเสียต่อการใช้งาน

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

5.2 คุณลักษณะทางฟิสิกส์

5.2.1 รูรั่ว
ต้องไม่มีรูรั่ว
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.4

5.2.2 ความทนต่อการตกกระแทก (ยกเว้นภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)
ต้องไม่รั่วหรือแตก
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.5

5.2.3 ความสม่ำเสมอของความหนา (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)
ผลต่างของความหนาค่าสูงสุดกับค่าต่ำสุด ต้องไม่เกิน 0.05 mm
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.6

5.2.4 ความทนความดัน (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)
ต้องไม่รั่วซึม
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.7

5.2.5 ความยืดหยุ่น (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)

สารละลายต้องไหลออกได้หมดโดยไม่มีอากาศไหลเข้าไปแทนที่ขณะไหล

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.8

5.2.6 การซึมผ่านของไอน้ำ

มวลของน้ำที่หายไปต้องไม่เกิน 0.20%

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.9

5.2.7 ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา

ต้องไม่เกิน 0.10%

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.10

5.2.8 ปริมาณอนุภาคปนเปื้อน

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 10 μm ต้องไม่เกิน 25 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 25 μm ต้องไม่เกิน 3 อนุภาคต่อมิลลิลิตร

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.11

5.3 คุณลักษณะทางเคมี

5.3.1 คุณลักษณะของสารละลายที่สกัดได้

5.3.1.1 ต้องใส ไม่มีสี

5.3.1.2 ฟองที่เกิดขึ้นต้องหายไปภายใน 3 min

5.3.1.3 ความเป็นกรด-ด่าง

ผลต่างค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่สกัดได้เมื่อเทียบกับสารละลายแบลงก์ ต้องไม่เกิน 1.5

5.3.1.4 ปริมาตรโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนตที่ใช้ทำปฏิกิริยา

ต้องไม่เกิน 1.0 ml

5.3.1.5 ปริมาณกากที่ไม่ระเหย

ต้องไม่เกิน 1.0 mg

5.3.1.6 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

(1) ต้องไม่เกิน 0.08 ที่ช่วงความยาวคลื่น 220 nm ถึง 240 nm

(2) ต้องไม่เกิน 0.05 ที่ช่วงความยาวคลื่น 241 nm ถึง 350 nm

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.12

5.3.2 ปริมาณโลหะหนัก

5.3.2.1 ปริมาณโลหะหนัก (คำนวณเป็นตะกั่ว) ต้องไม่เกิน 20 μg /g

5.3.2.2 ตะกั่ว ต้องไม่เกิน 10 μg /g

5.3.2.3 แคดเมียม ต้องไม่เกิน 1 μg /g

5.3.2.4 ดีบุก ต้องไม่เกิน 5 μg /g

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.13

5.4 คุณลักษณะทางชีวภาพ

5.4.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.14

5.4.2 สารไพโรเจน

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.15 แล้ว ปริมาณแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซิน ต้องไม่เกิน 20.0 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อภาชนะพลาสติกตัวอย่าง

5.4.3 การซึมผ่านของจุลินทรีย์

ต้องไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 8.16

5.4.4 การทำลายเม็ดเลือด

ต้องไม่มีการทำลายเม็ดเลือด

การทดสอบให้ปฏิบัติตามภาคผนวก ก.

5.5 ความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

เมื่อทดสอบตามข้อ 8.17 แล้ว ฉลากต้องยังคงติดอยู่ที่ภาชนะพลาสติกตำแหน่งเดิม และเครื่องหมายหรือข้อความใดๆ ที่ฉลากหรือที่ภาชนะพลาสติกต้องอ่านได้ชัดเจน

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ภาชนะพลาสติกที่ทำจากพอลิเอทิลีนหรือพอลิโพรพิลีน หรือทั้งสองอย่าง

ในเนื้อภาชนะพลาสติกทุกใบ อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน ถาวร

(1) ชนิด

(2) ความจุ เป็นมิลลิลิตร พร้อมขีดบอกปริมาตร

(3) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

6.2 ภาชนะพลาสติกที่ทำจากพอลิไวนิลคลอไรด์หรือพลาสติกหลายชั้น

ที่ภาชนะพลาสติกทุกใบ อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็น ได้ง่าย ชัดเจน

(1) ชนิด

(2) ความจุ เป็นมิลลิลิตร

(3) คำเตือนว่าใช้ DEHP เป็นสารเติมแต่ง

(4) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

6.3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

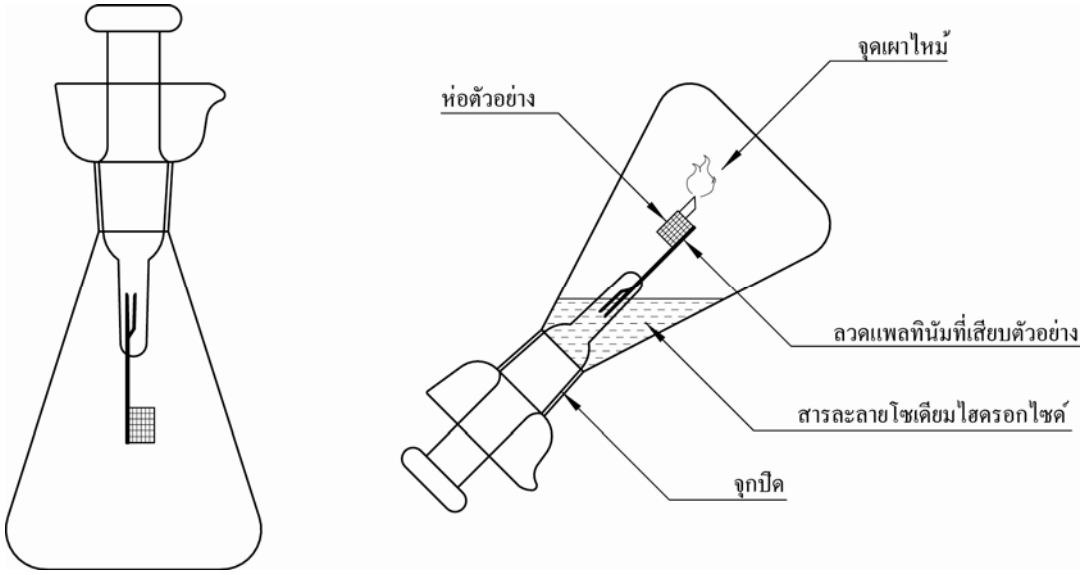
7.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินให้เป็นไปตามภาคผนวก ข.

8. การทดสอบ

8.1 ปริมาณพอลิไวนิลคลอไรด์เรซิน

8.1.1 เครื่องมือ

อุปกรณ์สำหรับวิธีออกซิเจนฟลาสก์คอมบัสชัน (oxygen flask combustion) ประกอบด้วยขวดแก้วบอโรซิลิเกต รูปกรวย ขนาดประมาณ 500 ml ปิดด้วยจุกแก้ว ที่ยึดกับที่เสียบตัวอย่างทำจากลวดแพลทินัมสานเป็นตาข่าย ขนาดประมาณ 1.5 cm x 2 cm (ดังรูปที่ 1)



รูปที่ 1 อุปกรณ์สำหรับวิธีออกซิเจนฟลาสก์คอมบัสชัน

(ข้อ 8.1.1)

8.1.2 สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

8.1.2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 M

8.1.2.2 ไดบิวทิลแทเลต

8.1.2.3 กรดไนทริกเข้มข้น (ความหนาแน่น 1.40 g/ml) 65% โดยมวล

8.1.2.4 สารละลายเฟอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟต
ละลายเฟอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟต 100 g ในน้ำกลั่น 1 L

8.1.2.5 สารละลายซิลเวอร์ไนเทรต 0.1 M

8.1.2.6 สารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต 0.05 M

8.1.3 วิธีวิเคราะห์

8.1.3.1 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 ml ลงในคอมบัสชันฟลาสก์

8.1.3.2 ชั่งตัวอย่าง 50.0 mg ห่อด้วยกระดาษกรองขนาด 30 mm x 40 mm พับให้ได้ขนาด 10 mm x 30 mm สอดห่อตัวอย่างเข้าไปในที่เสียบตัวอย่างที่ทำจากลวดแพลทินัม

8.1.3.3 เผาห่อตัวอย่าง แล้วใส่เข้าไปในขวดแก้วรูปกรวย ปิดจุกแก้ว

8.1.3.4 เมื่อการเผาไหม้สมบูรณ์แล้ว แกว่งขวดแก้ว เพื่อให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ดูดซึมไอของสารประกอบคลอไรด์ที่เกิดจากการเผาตัวอย่าง

8.1.3.5 นำจุกแก้วและห่อตัวอย่างออก แล้วเติมไดบิวทิลแทเลต 1 ml กรดไนทริก 2.5 ml สารละลายเฟอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟต 5 ml สารละลายซิลเวอร์ไนเทรต 10.0 ml ลงในขวดแก้วรูปกรวย

8.1.3.6 นำสารละลายที่ได้ไทเทรตกับสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต จนได้สารละลายสีเหลืองแดง สารละลายซิลเวอร์ไนเทรต 0.1 M 1 ml สมมูลกับพอลิไวนิลคลอไรด์ 6.25 mg
หาปริมาณพอลิไวนิลคลอไรด์เรซิน จากสูตร

ปริมาณพอลิไวนิลคอลไรด์เรเซิน เป็นมิลลิกรัม

$$= \left(10 - \left(\frac{M_{NH_4SCN} \times V_{NH_4SCN}}{M_{AgNO_3}}\right)\right) \times 6.25 \times \frac{M_{AgNO_3}}{0.1}$$

เมื่อ M_{NH_4SCN} คือ ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต เป็นโมลาร์

V_{NH_4SCN} คือ ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต เป็นมิลลิลิตร

M_{AgNO_3} คือ ความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเทรต เป็นโมลาร์

8.2 ปริมาณ DEHP

8.2.1 เครื่องมือ

8.2.1.1 อุปกรณ์สำหรับทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ประกอบด้วย แผ่นแก้วที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลจีเอฟ 254 ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า แผ่นรงคเลข

8.2.1.2 ตู้โครมาโทกราฟี

8.2.1.3 เครื่องให้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm

8.2.1.4 เครื่องอังน้ำ

8.2.1.5 เครื่องสกัดรีฟลักซ์คอนเดนเซอร์

8.2.2 สารเคมีและสารละลาย

8.2.2.1 โทลูอีน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

8.2.2.2 อีเทอร์

8.2.2.3 สารละลายอ้างอิง

ละลาย DEHP ในโทลูอีน 0.1 mg/ml

8.2.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

8.2.3.1 ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างให้ได้ขนาดไม่เกิน 1 cm นำชิ้นตัวอย่างมา 2.0 g เติมอีเทอร์ที่ปราศจากเพอร์ออกไซด์ 200 ml ให้ความร้อนภายใต้รีฟลักซ์คอนเดนเซอร์ เป็นเวลา 12 h

8.2.3.2 แยกกากและสารละลายออกจากกัน

8.2.3.3 นำสารละลายไประเหยจนแห้งโดยการลดความดันด้วยเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 30 °C

8.2.3.4 ละลายกากที่เหลืออยู่ด้วยโทลูอีน 10 ml

8.2.4 วิธีวิเคราะห์

8.2.4.1 หยอดสารละลายตัวอย่าง 0.5 ml บนแผ่นรงคเลขให้ได้แถบขนาด 30 mm x 3 mm และหยดสารละลายอ้างอิง 5 µl บนแผ่นรงคเลข ให้แยกออกจากกัน วางในตู้โครมาโทกราฟี ที่อิ่มตัวด้วยโทลูอีน ให้โทลูอีนซึมผ่านสารเคลือบขึ้นไปเหนือเส้นที่หยอดสารละลายตัวอย่าง (solvent front) เป็นระยะ 15 cm

8.2.4.2 นำแผ่นรงคเลขออกจากตู้โครมาโทกราฟี ปล่อยให้แห้งในอากาศ นำไปตรวจภายใต้แสงอัตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 nm ระบุตำแหน่งของตัวอย่างที่สอดคล้องกับสารละลายอ้างอิง

8.2.4.3 ขูดซิลิกาเจลบริเวณที่สอดคล้องกับสารละลายอ้างอิง ไปเขย่ากับอีเทอร์ 40 ml เป็นเวลา 1 min

8.2.4.4 กรอง ล้างด้วยอีเทอร์ 10 ml 2 ครั้ง นำอีเทอร์ที่ได้ทั้งหมดไประเหยให้แห้ง กากที่ได้ต้องหนักไม่เกิน 40 mg

8.3 ปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์

8.3.1 เครื่องมือ

8.3.1.1 เฮดสเปซก๊าซโครมาโทกราฟี

8.3.1.2 เครื่องอังน้ำ ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ (60±1) °C

8.3.1.3 เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

8.3.2 สารเคมี

8.3.2.1 ไดเมทิลอะเซตาไมด์

8.3.2.2 อีเทอร์

8.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน

ใช้ไมโครไซริงค์ดูดอีเทอร์ 10 µl จุ่มปลายเข็มลงในไดเมทิลอะเซตาไมด์ 20.0 ml แล้วฉีดอีเทอร์ลงในสารละลาย เจือจางสารละลายด้วยไดเมทิลอะเซตาไมด์ให้เจือจางลง 1 000 เท่า ทันทีก่อนใช้

8.3.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ชั่งตัวอย่าง 1.000 g ใส่ลงในไวแอลแก้วขนาด 50 ml เติมสารละลายมาตรฐานภายใน 10.0 ml ปิดจุกไวแอลแก้วให้สนิท เขย่า หลีกเลี่ยงไม่ให้ของเหลวภายในสัมผัสกับจุกปิด วางไวแอลแก้วในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ (60±1) °C เป็นเวลา 2 h

8.3.5 การเตรียมสารละลายปฐมภูมิไวนิลคลอไรด์

ต้องเตรียมสารละลายนี้ในตู้อากาศไหลเวียน (ventilated hood)

8.3.5.1 ใช้ปิเปตต์ดูดไดเมทิลอะเซตาไมด์ 50.0 ml ใส่ลงในไวแอลแก้วขนาด 50 ml ปิดจุกไวแอลแก้วให้สนิท แล้วชั่งให้มีความละเอียดถึง 0.1 mg

8.3.5.2 ใช้กระบอกฉีดยาที่ทำด้วยพอลิเอทิลีนหรือพอลิโพรพิลีนขนาดความจุ 50 ml ดูดก๊าซไวนิลคลอไรด์ 50 ml ให้ก๊าซคงอยู่ในกระบอกฉีดยานานประมาณ 3 min แล้วดันก้านฉีดไล่ก๊าซออก

8.3.5.3 ดูดก๊าซไวนิลคลอไรด์ 50 ml อีกครั้งหนึ่ง ต่อเข็มฉีดยาเข้ากับกระบอกฉีดยา แล้วลดปริมาตรก๊าซในกระบอกฉีดยาจาก 50 ml ลงเหลือ 25 ml

8.3.5.4 ฉีดก๊าซไวนิลคลอไรด์ที่เหลือเข้าในไวแอลแก้วอย่างช้าๆ เขย่าเบาๆ หลีกเลี่ยงไม่ให้ของเหลวภายในสัมผัสกับเข็มฉีดยา

8.3.5.5 ชั่งมวลไวแอลแก้วอีกครั้งหนึ่ง มวลที่เพิ่มขึ้นจะได้ประมาณ 60 mg (สารละลายที่ได้ 1 µl มีไวนิลคลอไรด์ประมาณ 1.2 µg) ตั้งไว้ 2 h เก็บสารละลายนี้ในตู้เย็น

8.3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไวนิลคลอไรด์

อัตราส่วนสารละลายปฐมภูมิไวนิลคลอไรด์ : ไดเมทิลอะเซตาไมด์ เป็น 1:3 โดยปริมาตร

8.3.7 การเตรียมสารละลายอ้างอิง

8.3.7.1 ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานภายใน 10.0 ml ลงในไวแอลแก้วขนาด 50 ml จำนวน 6 ขวด ปิดจุกไวแอลแก้วให้สนิท

8.3.7.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานไวนิลคลอไรด์ปริมาตร 1 µl 2 µl 3 µl 5 µl และ 10 µl ลงในไวแอลแก้ว 5 ขวด จะได้ไวแอลแก้วที่มีปริมาณไวนิลคลอไรด์ประมาณ 0.3 µg 0.6 µg 0.9 µg 1.5 µg และ 3 µg ตามลำดับ เขย่า หลีกเลี่ยงไม่ให้ของเหลวภายในสัมผัสกับจุกปิด วางไวแอลแก้วในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ (60±1) °C เป็นเวลา 2 h

8.3.8 วิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณไวนิลคลอไรด์ในสารละลายทดสอบ โดยใช้เฮดสเปซก๊าซโครมาโทกราฟี ที่มีภาวะเครื่องดังนี้

1) คอลัมน์

1.1) ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 mm ยาว 3 m

1.2) วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ประกอบด้วยไซเลไนส์ไดอาโตมาเชียสเอิร์ธ (silanised diatomaceous earth) ชั้นคุณภาพโครมาโทกราฟี ทำให้เอิบชุ่ม (impregnate) ด้วยสารละลายผสมของไดเมทิลสเตียริลเอไมด์ 5% เศษส่วนโดยมวล และมาโครกอล 400 ความเข้มข้น 5% เศษส่วนโดยมวล

2) ก๊าซตัวพา : ไนโตรเจน

3) อัตราการไหล : 30 ml/min

4) อุณหภูมิ :

- คอลัมน์ : 45 °C
- ช่องที่ฉีดเข้า : 100 °C
- ตัวตรวจจับ : 150 °C

5) การตรวจจับ : เฟลมไอออไนเซชัน

6) การฉีด : เฮดสเปซ 1 ml

หลังจากได้โครมาโตแกรมแล้ว คำนวณหาปริมาณไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์

8.4 รูรั่ว

8.4.1 เครื่องมือ

เครื่องอัดอากาศที่มีมาตรความดันวัดได้ตั้งแต่ 0 kPa ถึง 5 kPa

8.4.2 วิธีทดสอบ

8.4.2.1 อัดอากาศเข้าไปในภาชนะพลาสติกตัวอย่างด้วยเครื่องอัดอากาศจนความดันภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่างมีค่า (1.5±0.15) kPa

8.4.2.2 จุ่มภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่อัดอากาศแล้วลงในน้ำ ให้ส่วนบนสุดของภาชนะพลาสติกตัวอย่างอยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ (20±2) cm เป็นเวลา (1.5±0.5) min สังเกตฟองอากาศ หากมีฟองอากาศปุดขึ้นมาแสดงว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างมีรูรั่ว

8.5 ความทนต่อการตกกระแทก (ยกเว้นภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)

ใส่น้ำลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างเท่าความจุที่ระบุไว้ ปิดให้สนิท ปล่อยภาชนะพลาสติกตัวอย่างจากระดับความสูงตามตารางที่ 1 ให้ตกอย่างอิสระลงบนพื้นแข็งเรียบที่อุณหภูมิ 20 °C ถึง 30 °C แล้วตรวจพินิจภาชนะพลาสติกตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ความจุระบุของภาชนะพลาสติกตัวอย่างและระดับความสูงที่ปล่อยภาชนะพลาสติกตัวอย่าง

(ข้อ 8.5)

ความจุระบุ ml	ระดับความสูงที่ปล่อย ภาชนะพลาสติกตัวอย่าง m
น้อยกว่า 750	1.00
750 ถึง 1 499	0.75
1 500 ถึง 2 499	0.50
ตั้งแต่ 2 500	0.25

8.6 ความสม่ำเสมอของความหนา (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)

8.6.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดความหนาที่วัดได้ละเอียด 0.001 mm

8.6.2 วิธีวัด

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่าง แล้ววัดความหนาของภาชนะพลาสติกที่ตำแหน่งต่างๆ กัน 5 ตำแหน่ง (ยกเว้นส่วนที่เป็นตะเข็บหรือรอยนูน) แต่ละตำแหน่งให้ห่างกันพอสมควร แล้วรายงานผลต่างระหว่างความหนาสูงสุดกับความหนาต่ำสุดที่วัดได้

8.7 ความทนความดัน (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)

8.7.1 เครื่องมือ

เครื่องอัดความดัน

8.7.2 สารละลาย

สารละลายฟลูออเรสซีนโซเดียมในน้ำ (1 g ในน้ำ 1 000 ml)

8.7.3 วิธีทดสอบ

ใส่สารละลายฟลูออเรสซีนโซเดียมลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างจนเต็ม ปิดด้วยจุกที่ต่อกับเครื่องอัดความดัน แล้วหุ้มให้ทั่วและสนิทด้วยกระดาษกรองสีขาว อัดความดันใส่ภาชนะพลาสติกตัวอย่างให้ได้ 6.9 N (0.7 kg)/cm^2 ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 10 min แล้วตรวจพินิจ

8.8 ความยืดหยุ่น (เฉพาะภาชนะพลาสติกชนิดพอลิไวนิลคลอไรด์)

แทงเข็มเจาะ (spike needle) เข้าทางจุกยางของภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบในข้อ 8.7 แล้วสังเกตการไหลของสารละลาย

หมายเหตุ *เข็มเจาะ หมายถึง เข็มเจาะภาชนะบรรจุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 5.0 mm - 5.3 mm ยาว 27 mm - 29 mm ของชุดให้สารละลายทางหลอดเลือดใช้ครั้งเดียว*

8.9 การซึมผ่านของไอน้ำ

8.9.1 เครื่องมือ

8.9.1.1 ตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (25±2) °C ความชื้นสัมพัทธ์ (65±5)%

8.9.1.2 เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

8.9.2 วิธีทดสอบ

8.9.2.1 ชั่งภาชนะพลาสติกตัวอย่างพร้อมฝาปิด ให้ทราบมวลแน่นอน เป็น m_1

8.9.2.2 บรรจุน้ำกลั่นลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างให้ได้ปริมาตรเท่ากับความจุที่ระบุไว้ ปิดฝาให้สนิทชั่งมวล เป็น m_2

8.9.2.3 นำไปเก็บในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (25±2) °C ความชื้นสัมพัทธ์ (65±5)% เป็นเวลา (336±1) h เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำไปชั่งมวล เป็น m_3

คำนวณหาน้ำที่หายไป จากสูตร

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

เมื่อ m_1 คือ มวลของภาชนะพลาสติกตัวอย่างพร้อมฝาปิด เป็นกรัม

m_2 คือ มวลของภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นก่อนทดสอบ เป็นกรัม

m_3 คือ มวลของภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นหลังทดสอบ เป็นกรัม

8.10 ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา

8.10.1 เครื่องมือ

8.10.1.1 เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

8.10.1.2 เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (550±50) °C

8.10.1.3 ครูซิเบิลแพลทินัม ควอตซ์ หรือกระเบื้องเคลือบ ที่เผาที่อุณหภูมิ (550±50) °C และชั่งที่อุณหภูมิห้องจนได้มวลคงที่ เป็น m_1

8.10.1.4 เดซิกเคเตอร์

8.10.2 สารเคมี

กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ความหนาแน่น 1.84 g/ml

8.10.3 วิธีทดสอบ

8.10.3.1 ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ กัน แต่ละใบให้มีพื้นที่เท่าๆ กัน นำมารวมกันตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ผสมรวมกัน แบ่งมาประมาณ 5 g ชั่งให้ทราบมวลแน่นอน เป็น m_2 ใส่ลงในครูซิเบิล

8.10.3.2 หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 หยดถึง 3 หยด ลงในครูซิเบิล เผาด้วยไฟอ่อนๆ จนพลาสติกกลายเป็นถ่าน (carbonize) ทิ้งไว้ให้เย็น หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปอีกเล็กน้อย เผาต่อด้วยไฟอ่อนๆจนหมดควัน แล้วเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ (550±50) °C เป็นเวลา 1 h นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่ง แล้วเผาซ้ำครั้งละ 30 min จนได้มวลคงที่เป็น m_3

คำนวณปริมาณกากที่เหลือจากการเผา จากสูตร

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

เมื่อ m_1 คือ มวลของครูซิเบิล เป็นกรัม

m_2 คือ มวลของภาชนะพลาสติกตัวอย่าง เป็นกรัม

m_3 คือ มวลของครูซิเบิลและกากที่เหลือจากการเผา เป็นกรัม

8.11 ปริมาณอนุภาคปนเปื้อน

8.11.1 ภาวะทดสอบ

ทำในที่ที่ปราศจากฝุ่น อุปกรณ์และเครื่องมือต้องสะอาด

8.11.2 เครื่องมือ

8.11.2.1 เครื่องนับจำนวนอนุภาคที่ทำงานด้วยวิธีการกั้นแสง (light blockage method)

8.11.2.2 น้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีด (water for injection) ที่กรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 μm แล้ว

8.11.3 วิธีวิเคราะห์

ใส่น้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีด ที่กรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 μm แล้ว ลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างเท่าความจุที่ระบุไว้ นำไปผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ เก็บไว้อย่างน้อย 12 h นำสารละลายที่ได้ไปนับจำนวนอนุภาค โดยเปรียบเทียบกับสารละลายแบลงก์

หมายเหตุ *สารละลายแบลงก์ คือน้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดที่กรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 μm*

8.12 คุณลักษณะของสารละลายที่สกัดได้

8.12.1 การเตรียมตัวอย่างรวม

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบตรงบริเวณที่มีความหนาสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุด ให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่าๆ กัน นำมารวมกันให้พื้นที่ผิวทั้งสองด้านรวมกันได้ 1 200 cm^2 สำหรับพลาสติกที่มีความหนาไม่เกิน 0.5 mm และ 600 cm^2 สำหรับพลาสติกที่มีความหนาเกิน 0.5 mm

8.12.2 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์

8.12.2.1 เครื่องมือ

(1) หม้อนึ่งอัด ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (121±2) °C

(2) ตู้อบ ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70±2) °C

(3) ภาชนะแก้วบอโรซิลิเกตขนาด 300 ml พร้อมฝาที่ปิดได้สนิท

8.12.2.2 วิธีเตรียม

(1) สารละลายที่สกัดได้

ตัดชิ้นพลาสติกตามข้อ 8.12.1 ออกเป็นชิ้นย่อย ขนาดกว้างประมาณ 0.5 cm และยาวประมาณ 1 cm ถึง 5 cm ล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องในที่สามารถป้องกันการ

ปนเปื้อนได้ แล้วใส่ลงในภาชนะแก้วบอโรซิลิเกต เติมน้ำกลั่นลงไป 200.0 ml ปิดฝาให้สนิท นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121±2) °C เป็นเวลา 1 h ปล่อยไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง สำหรับภาชนะพลาสติกที่ทำจากพลาสติกหลายชั้น ให้เติมน้ำกลั่นลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างตามความจุที่ระบุไว้ บันทึกปริมาตรน้ำกลั่นและพื้นที่ภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่าง ปิดให้สนิท นำไปใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121±2) °C เป็นเวลา 1 h

ถ้าภาชนะพลาสติกเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่อุณหภูมิ (121±2) °C ให้เตรียมสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงสุดที่ภาชนะพลาสติกไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเลือกใช้ภาวะใดภาวะหนึ่งต่อไปนี้ คือ ที่อุณหภูมิ (100±2) °C เป็นเวลา (2±0.2) h หรือที่อุณหภูมิ(70±2) °C เป็นเวลา (24±2) h หรือที่อุณหภูมิ (50±2) °C เป็นเวลา (72±2) h หรือที่อุณหภูมิ(37±2) °C เป็นเวลา (72±2) h

(2) สารละลายแบลงก์

ให้เตรียมโดยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลายที่สกัดได้ แต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

8.12.2.3 ให้นำสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์ไปทำการทดสอบตามข้อ 8.12.3 ต่อไป

8.12.3 วิธีทดสอบ

8.12.3.1 ลักษณะสารละลาย

ต้องใส ไม่มีสี จึงจะวิเคราะห์รายการอื่นๆ ต่อไป

8.12.3.2 การเกิดฟอง

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 5 ml ใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 15 mm ยาว 200 mm ปิดฝาให้สนิท เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 3 min สังเกตฟองที่เกิดขึ้นพร้อมจับเวลา

8.12.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง

(1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้และสารละลายแบลงก์อย่างละ 20 ml ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 25 ml อย่างละใบ

(2) เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 1 g/l ลงในบีกเกอร์ทั้ง 2 ใบๆ ละ 1 ml วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายในบีกเกอร์แต่ละใบด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

8.12.3.4 ปริมาตรโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนตที่ใช้ทำปฏิกิริยา

(1) เครื่องมือ

ขวดแก้วรูปกรวยขนาด 100 ml พร้อมจุกแก้ว จำนวน 2 ใบ

(2) สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(2.1) สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 0.002 mol/l

ละลายโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 31.6 mg ด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อยในขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 ml เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

(2.2) สารละลายกรดซัลฟิวริก 5.7% โดยปริมาตร

(2.3) สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.01 mol/l

ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 2.6 g และโซเดียมคาร์บอเนต 20 mg ด้วยน้ำกลั่นที่เพิ่งต้มเดือดและปล่อยไว้ให้เย็นจำนวนเล็กน้อยในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1 000 ml เติมน้ำกลั่นที่เพิ่งต้มเดือดและปล่อยไว้ให้เย็นแล้วจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

(2.4) อินดิเคเตอร์แป้งที่เตรียมใหม่ๆ

ละลายแป้ง (soluble starch) 1 g ด้วยน้ำเย็น 10 ml เทลงในน้ำเดือด 200 ml อย่างช้าๆ และคนอย่างสม่ำเสมอ ต้มสารละลายที่ได้ให้เดือดจนกระทั่งมีลักษณะโปร่งใส

(2.5) โพแทสเซียมไอโอไดด์

(3) วิธีวิเคราะห์

(3.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 20 ml ใส่ในขวดแก้วรูปกรวยใบที่หนึ่ง เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 20 ml และสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 ml แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 min ปล่อยไว้ให้เย็น เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.10 g ปิดจุกให้แน่น เขย่า ปล่อยไว้เป็นเวลา 10 min เติมอินดิเคเตอร์แป้ง 5 หยด แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

(3.2) ทดลองตามข้อ (3.1) โดยใช้สารละลายแบลงก์ 20 ml แทนสารละลายตัวอย่าง

8.12.3.5 ปริมาณกากที่ไม่ระเหย

(1) เครื่องมือ

(1.1) เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

(1.2) ตู้อบแบบอากาศหมุนเวียนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (105±2) °C

(1.3) ครูซิเบิลควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ที่อบจนมวลคงที่แล้ว 2 ใบ

(1.4) เครื่องอังไอน้ำ

(1.5) เดซิกเคเตอร์

(2) วิธีวิเคราะห์

(2.1) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่สกัดได้ 20 ml ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่หนึ่ง และสารละลายแบลงก์ปริมาตรเท่ากัน ใส่ลงในครูซิเบิลใบที่สอง นำไปประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ

(2.2) อบครูซิเบิลทั้ง 2 ใบในตู้อบที่อุณหภูมิ (105±2) °C เป็นเวลา 1 h นำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งแล้วอบซ้ำเป็นเวลาครั้งละ 1 h จนได้มวลคงที่ ผลต่างของมวลของกากในครูซิเบิลใบที่หนึ่งและใบที่สองต้องไม่เกิน 1.0 mg

8.12.3.6 การดูดกลืนแสง

(1) เครื่องมือ

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 220 nm ถึง 350 nm

(2) วิธีวิเคราะห์

นำสารละลายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 220 nm ถึง 240 nm และในช่วงความยาวคลื่น 241 nm ถึง 350 nm โดยเปรียบเทียบกับสารละลายแบลงก์

8.13 ปริมาณโลหะหนัก

8.13.1 ปริมาณโลหะหนัก (คำนวณเป็นตะกั่ว)

8.13.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบตรงบริเวณที่มีความหนาสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุด ให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่าๆ กัน นำมารวมกันให้ได้มวลประมาณ 10 g ล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

8.13.1.2 เครื่องมือ

(1) เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

(2) ครูซิเบิลควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ พร้อมฝาปิด

(3) เตาเผาไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 500 °C ถึง 600 °C

(4) เครื่องอังน้ำ

(5) หลอดเทียบสี ขนาด 50 ml จำนวน 2 หลอด

8.13.1.3 สารเคมี สารละลายและวิธีเตรียม

(1) กรดไนทริก ความหนาแน่น 1.42 g/ml

(2) กรดซัลฟิวริก ความหนาแน่น 1.84 g/ml

(3) กรดไฮโดรคลอริก ความหนาแน่น 1.18 g/ml

(4) สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 g ในเอทานอล 100 ml

(5) สารละลายแอมโมเนีย

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายแอมโมเนีย 0.908 g/ml ปริมาตร 400 ml เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml

(6) สารละลายกรดแอซีติกเจือจาง

เจือจางกรดแอซีติก 6 g ด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml

(7) สารละลายโซเดียมซัลไฟด์

ละลายโซเดียมซัลไฟด์ 1 g ในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 10 ml เตรียมสารละลายนี้ใหม่ๆ ก่อนใช้

(8) สารละลายกรดไนทริกเจือจาง

เจือจางกรดไนทริก (ความหนาแน่น 1.42 g/ml) ปริมาตร 10.5 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml

(9) สารละลายมาตรฐานตะกั่ว

ชั่งตะกั่ว (II) ไนเทรต 159.8 mg ให้ทราบมวลแน่นอน ละลายในกรดไนทริกเจือจาง 10 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml ในขวดแก้วปริมาตร เตรียมและเก็บสารละลายนี้ในภาชนะแก้วที่ปราศจากเกลือของตะกั่วที่ละลายได้

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 10.0 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml ในขวดแก้วปริมาตร สารละลายนี้ 1 ml มีตะกั่ว 0.01 mg

ต้องเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

8.13.1.4 วิธีวิเคราะห์

(1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

(1.1) ชั่งชิ้นตัวอย่าง 1.0 กรัม ใส่ในครูซิเบิลควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ปิดฝาครูซิเบิล ไม่ต้องปิดฝาสนิท เผาด้วยไฟอ่อนๆ จนเป็นถ่าน ปล่อยไว้ให้เย็น

(1.2) เติมกรดไนทริก 2 ml และกรดซัลฟิวริก 5 หยด เผาต่ออย่างระมัดระวังจนกระทั่งควันสีขาวหมดไป แล้วเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 500 °C ถึง 600 °C จนเป็นเถ้า ปล่อยไว้ให้เย็น

(1.3) เติมกรดไฮโดรคลอริก 2 ml ระเหยให้แห้งในเครื่องอังน้ำ

(1.4) ทำให้ชื้นด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 3 หยด เติมน้ำร้อน 10 ml อุ่นเป็นเวลา 2 min

(1.5) เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดงอ่อนๆ

(1.6) เติมสารละลายกรดแอซีติกเจือจาง 2 ml กรอง (ถ้าจำเป็น) ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 ml ถ่ายสารละลายที่กรองได้และน้ำที่ใช้ล้างลงในหลอดเทียบสี เติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 50 ml

(2) การเตรียมสารละลายควบคุม

(2.1) เติมกรดไนทริก 2 ml กรดซัลฟิวริก 5 หยด และกรดไฮโดรคลอริก 2 ml ลงในครูซิเบิลควอตซ์หรือกระเบื้องเคลือบ ระเหยในเครื่องอังน้ำ แล้วระเหยให้แห้งในอ่างทราย

(2.2) ทำให้ชื้นด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 หยด เติมน้ำร้อน 10 ml อุ่นเป็นเวลา 2 min

(2.3) เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยดแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียทีละหยด จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีแดงอ่อนๆ

(2.4) เติมสารละลายกรดแอซีติกเจือจาง 2 ml กรอง (ถ้าจำเป็น) ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 ml ถ่ายสารละลายที่กรองได้และน้ำที่ใช้ล้างลงในหลอดเทียบสี

(2.5) ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายมาตรฐานตะกั่ว 2.0 ml ใส่ลงในหลอดเทียบสี แล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 50 ml

(3) เติมสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ลงในหลอดสารละลายตัวอย่างและสารละลายควบคุมหลอดละ 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 5 min เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้น โดยตั้งหลอดเทียบสีบนพื้นขาว แล้วมองตรงจากด้านบนลงมา สีของสารละลายตัวอย่างต้องไม่เข้มกว่าสีของสารละลายควบคุม

8.13.2 ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และดีบุก

8.13.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างทุกใบให้ได้ขนาดประมาณกว้าง x ยาว เป็น 5 mm x 5 mm นำมารวมกันให้ได้น้ำหนักประมาณ 500 mg

8.13.2.2 เครื่องมือ

(1) เครื่องชั่งละเอียด 0.1 mg

(2) เครื่องย่อยสลายสารด้วยคลื่นไมโครเวฟพร้อมภาชนะใส่ตัวอย่าง

(3) อะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรมิเตอร์หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

8.13.2.3 สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

(1) กรดไนทริกเข้มข้น (ความหนาแน่น 1.40 g/ml) 65% โดยมวล

(2) กรดไฮโดรคลอริก (ความหนาแน่น 1.18 g/ml) 37% โดยมวล

(3) กรดไนทริกเจือจาง

ละลายกรดไนทริก 1 ส่วนในน้ำกลั่น 3 ส่วน

(4) กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง

ละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 ส่วนในน้ำกลั่น 5 ส่วน

(5) สารละลายมาตรฐานตะกั่ว 10 μg /ml

ชั่งตะกั่ว (II) ไนเทรต 159.8 mg ให้ทราบมวลแน่นอน ละลายในกรดไนทริกเจือจาง 10 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml ในขวดแก้วปริมาตร เตรียมและเก็บสารละลายนี้ในภาชนะแก้วที่ปราศจากเกลือของตะกั่วที่ละลายได้

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 10.0 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml ในขวดแก้วปริมาตร ต้องเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

(6) สารละลายมาตรฐานแคดเมียม 1 µg /ml

ชั่งแคดเมียมบริสุทธิ์ 1.000 g ให้ทราบมวลแน่นอน ละลายในกรดไนทริกเจือจาง 100 ml ให้ความร้อนอ่อนๆ ทำให้เย็น แล้วเจือจางด้วยกรดไนทริกเจือจางจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml ในขวดแก้วปริมาตร

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 10 ml แล้วเจือจางด้วยกรดไนทริกเจือจางจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml ในขวดแก้วปริมาตร ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 10 ml แล้วเจือจางด้วยกรดไนทริกเจือจางจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml ในขวดแก้วปริมาตร

(7) สารละลายมาตรฐานดีบุก 5 µg /ml

ชั่งดีบุก 0.250 g ให้ทราบมวลแน่นอน ละลายในกรดซัลฟิวริก 10 ml ให้ความร้อน ทำให้เย็น ถ่ายสารละลายนี้กับกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 400 ml ลงในขวดแก้วปริมาตร แล้วเจือจางด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง จนสารละลายมีปริมาตร 500 ml

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่ได้ 10 ml เจือจางด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางจนสารละลายมีปริมาตร 1 000 ml ในขวดแก้วปริมาตร

(8) สารละลายแบลงก์ของสารละลายมาตรฐาน (Standard blank)

8.13.2.4 วิธีเตรียมสารละลายตัวอย่าง

(1) ชั่งตัวอย่าง 200 mg ใส่ภาชนะใส่ตัวอย่าง เติมกรดไนทริก 5 ml ปิดฝา แล้วใส่ในเครื่องย่อยสลายสารด้วยคลื่นไมโครเวฟ เตรียมรีเอเจนต์แบลงก์โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

(2) ย่อยตัวอย่างตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ตามคู่มือของเครื่อง แล้วปล่อยให้เย็น

(3) ถ่ายสารละลายที่ได้ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml เติมน้ำปราศจากไอออนให้ถึงขีดวัดปริมาตร

(4) นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะตอมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ หรือเครื่องมืออื่นที่เทียบเท่า

8.13.2.5 วิธีวิเคราะห์

(1) การเตรียมกราฟมาตรฐานสอบเทียบ

(1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานตะกั่ว สารละลายมาตรฐานแคดเมียม และสารละลายมาตรฐานดีบุก ให้ครอบคลุมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

(1.2) เตรียมสารละลายแบลงก์ของสารละลายมาตรฐาน

(1.3) วัดค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว สารละลายมาตรฐานแคดเมียม และสารละลายมาตรฐานดีบุก แต่ละความเข้มข้นเทียบกับสารละลายแบลงก์ของสารละลายมาตรฐาน

(1.4) สร้างกราฟมาตรฐานสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของแต่ละธาตุกับค่าการดูดกลืนแสง

(2) การวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายรีเอเจนต์แบลงก์และสารละลายตัวอย่าง แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของตะกั่ว แคดเมียม และดีบุกจากกราฟมาตรฐานสอบเทียบเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

8.13.2.6 การคำนวณ

ปริมาณตะกั่ว แคดเมียม หรือดีบุก เป็นไมโครกรัมต่อกรัม = $\frac{A_1 - A_2}{m} \times V$

เมื่อ A_1 คือ ความเข้มข้นของตะกั่ว แคดเมียม หรือดีบุกในสารละลายตัวอย่าง เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

A_2 คือ ความเข้มข้นของตะกั่ว แคดเมียม หรือดีบุกในรีเอเจนต์แบลงก์ เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

V คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง เป็นมิลลิลิตร

m คือ มวลของตัวอย่าง เป็นกรัม

8.14 ความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

8.14.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

8.14.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ลามินาร์แอร์โฟลว์ ตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่สามารถควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ (5±1)% กล้องจุลทรรศน์ ชนิดอินเวอเตด (inverted microscope)

8.14.1.2 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ ได้แก่ หม้อนึ่งอัด ตู้อบร้อน (hot air oven)

8.14.1.3 ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม

8.14.1.4 ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเตรียมตัวอย่าง

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

8.14.2 สารละลายและวิธีเตรียม

8.14.2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ

ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 g โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 g โซเดียมคลอไรด์ 8.0 g และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 1.15 g ในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 000 ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121±2) ºC เป็นเวลา 15 min หรือกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 µm

8.14.2.2 สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 100 g/l ที่ปราศจากเชื้อ

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

8.14.2.4 สารละลายกลูทามีน (glutamine) 29.2 g/l ที่ปราศจากเชื้อ

8.14.2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลล์เอ็มอีเอ็ม (Eagle's MEM)

8.14.2.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต และอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง

เติมสารละลายกลูทามีน 1 ml สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 1.2 ml และเซรุ่มฟีทัลโบไวน์ (fetal bovine serum) 5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อีเกิลล์เอ็มอีเอ็ม 100 ml โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 2 ºC ถึง 8 ºC เก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

8.14.2.7 สารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต (formalin-crystal violet)

ละลายคริสทัลไวโอเลต 500 mg ด้วยสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 10 ml และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8.14.2.8 สีย้อมทริปแพนบลู (trypan blue stain) 4.0 g/l

เตรียมโดยละลายทริปแพนบลูในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9%

8.14.2.9 การควบคุมเชิงบวก

วัสดุควบคุมเชิงบวก (positive material control) เช่น แผ่นพอลิไวนิลคลอไรด์ที่มีซิงก์ไดเอทิลไดไทโอคาร์บาเมต 0.1% หรือแผ่นยูเอสพีโพสิทีฟไบโอรีแอกชั่นอาร์เอส (USP Positive Bioreaction RS)

8.14.2.10 การควบคุมเชิงลบ

วัสดุควบคุมเชิงลบ (negative material control) เช่น แผ่นพลาสติกมาตรฐานพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (USP high density polyethylene RS)

8.14.3 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

8.14.3.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์เนื้อเยื่อ (cell suspension)

นำเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 (ATCC cell line CCL 1, NCTC clone 929) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 cm^2 มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เติมสารละลายทริปซิน 1 ml และอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลา 3 min ถึง 5 min เคาะขวดเบาๆ จนเซลล์หลุดร่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต 5 ml ลงในขวด เขย่าขวดให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนลอยที่ได้นี้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์ โดยดูดสารแขวนลอยของเซลล์ 0.1 ml มาผสมกับสีย้อมทริปแพนบลู 0.1 ml ทิ้งไว้ 1 min แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนลอยโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือด เจือจางสารแขวนลอยของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตให้ได้ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 ml

8.14.3.2 นำเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อ 1 ml เติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม หลุมละ 3 ml แล้วนำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) ºC เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อย 80% ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

8.14.4 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมชิ้นพลาสติกตัวอย่างและวัสดุควบคุม

(1.1) การเตรียมชิ้นพลาสติกตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างอย่างน้อย 2 ชิ้น ให้มีพื้นที่ผิวชิ้นละไม่น้อยกว่า 100 mm^2 ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ล้างและนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด หรือโดยวิธีอื่นที่ไม่ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพ

(1.2) การเตรียมวัสดุควบคุม

เตรียมวัสดุควบคุมเชิงบวกและวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ 8.14.4 (1.1)

(2) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

(3) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต หลุมละ 0.8 ml

(3.1) วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุมๆ ละ 1 ชิ้น

(3.2) วางวัสดุควบคุมเชิงบวก 2 หลุมๆ ละ 1 ชิ้น

(3.3) วางวัสดุควบคุมเชิงลบ 1 หลุมๆ ละ 1 ชิ้น

(3.4) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตเพื่อใช้เป็นแบลงก์ 1 หลุม

(4) นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37 $\pm$ 1) °C เมื่อครบระยะเวลา 24 h ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ 8.14.5

8.14.5 การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์สัมผัสกับชิ้นพลาสติกตัวอย่าง ชิ้นวัสดุควบคุมและแบลงก์ เป็นเวลา 24 h ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอเตด บันทึกการตายของเซลล์โดยดูลักษณะของเซลล์และวงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา แล้วประเมินผลตามตารางที่ 2 หลังจากบันทึกผลที่ 24 h แล้ว ถ้าต้องการเก็บเซลล์บนถาดเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลานาน ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ติดบนถาดเลี้ยงเซลล์ ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบ

ตารางที่ 2 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

(ข้อ 8.14.5)

ระดับ (grade)	ปฏิกิริยา (reactivity)	ลักษณะของวงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา (description of reactivity zone)
0	ไม่มีพิษ (none)	ไม่พบวงรอบๆ หรือภายใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
1	เป็นพิษน้อยมาก (slight)	พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติภายใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
2	เป็นพิษน้อย (mild)	มีเซลล์ตายเป็นวงจำกัดอยู่ในพื้นที่ใต้ชิ้นพลาสติกตัวอย่าง
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	มีเซลล์ตายเป็นวงแผ่ขยายออกจากชิ้นพลาสติกตัวอย่าง ไม่เกิน 1.0 cm
4	เป็นพิษรุนแรง (severe)	มีเซลล์ตายเป็นวงแผ่ขยายออกจากชิ้นพลาสติกตัวอย่าง มากกว่า 1.0 cm

8.14.6 การแปลผล

(1) การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ต่อเมื่อ

(1.1) แบลงก์และวัสดุควบคุมเชิงลบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)

(1.2) วัสดุควบคุมเชิงบวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

(2) เกณฑ์การตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเมื่อชิ้นพลาสติกตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2

8.14.7 กรณีไม่สามารถทดสอบโดยวิธีข้างต้นได้ ให้ทำการทดสอบโดยวิธีต่อไปนี้

8.14.7.1 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมสารละลายทดสอบ

(1.1) ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละหน่วยตรงบริเวณที่มีความหนาสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุดให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่าๆ กัน นำมารวมกันให้พื้นที่ผิวทั้งสองด้านรวมกันได้ 120 cm^2 สำหรับภาชนะพลาสติกหนาน้อยกว่า 0.5 mm หรือ 60 cm^2 สำหรับภาชนะพลาสติกหนาเท่ากับหรือมากกว่า 0.5 mm แล้วนำมาตัดออกเป็นชิ้นย่อยขนาดกว้างประมาณ 0.1 cm ถึง 0.3 cm และยาวประมาณ 1 cm ถึง 5 cm ใส่ใน

ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง ล้างและนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดันหรือโดยวิธีอื่นที่ไม่ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพ

(1.2) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ (37±1) °C เป็นเวลา (24±1) h เขย่าขวดเป็นระยะ

(2) การเตรียมสารละลายควบคุม (เลือกข้อใดข้อหนึ่ง)

(2.1) เตรียมสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวกและสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ โดยสกัดวัสดุควบคุมเชิงบวกและวัสดุควบคุมเชิงลบ ตามวิธีในข้อ (1.1)

(2.2) เตรียมสารเคมีควบคุมเชิงบวกและสารเคมีควบคุมเชิงลบ โดยเตรียมสารละลายซิงก์แอซิเทตในอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 8 mg/l และ 2 mg/l ตามลำดับ

(3) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก

(4) เติมสารละลายทดสอบและสารละลายควบคุมดังต่อไปนี้ลงสัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหลุมละ 3 ml

(4.1) สารละลายทดสอบ โดยเติม 2 หลุม

(4.2) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวก และ/หรือสารละลายซิงก์แอซีเทต 8 mg/l โดยเติม 2 หลุม

(4.3) สารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ และ/หรือสารละลายซิงก์แอซีเทต 2 mg/l โดยเติม 1 หลุม

(4.4) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับสกัดตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงก์ โดยเติม 1 หลุม

(5) นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอบในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ (37±1) °C เมื่อครบระยะเวลา 48 h ให้ประเมินผลตามวิธีในข้อ (6)

(6) การประเมินผล

หลังจากปล่อยให้เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์สัมผัสกับสารละลายทดสอบ สารละลายควบคุมและแบลงก์ เป็นเวลา 48 h แล้ว ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผลตามตารางที่ 3 หลังจากบันทึกผลที่ 48 h แล้วและต้องการเก็บเซลล์บนถาดเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลานาน ให้ยึด (fix) และย้อมสีเซลล์ให้ติดบนถาดเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน-คริสทัลไวโอเลต

(7) การแปลผล

(7.1) การทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ต่อเมื่อ

(7.1.1) แบลงก์ สารละลายซิงก์แอซีเทตความเข้มข้น 2 mg/l หรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงลบ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (ความเป็นพิษระดับ 0)

(7.1.2) สารละลายซิงก์แอซีเทตความเข้มข้น 8 mg/l หรือสารละลายวัสดุควบคุมเชิงบวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับ 3 ขึ้นไป

(7.2) เกณฑ์ตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเมื่อสารละลายทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่มากกว่าระดับ 2

ตารางที่ 3 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

(ข้อ 8.14.7.1(6))

ระดับ (grade)	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (conditions of cell cultures)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	พบเซลล์แผ่เป็นชั้นเดี่ยว มีเม็ดอินทราไซโตพลาสมิก (intracytoplasmic granule) กระจายอยู่ในเซลล์ตามปกติ ไม่พบการแตกทำลายของเซลล์
1	เป็นพิษน้อยมาก (slight)	พบเซลล์มีลักษณะกลมใกล้หลุดออกจากพื้นผิวไม่เกิน 20% อาจพบการแตกทำลายของเซลล์ได้บ้าง
2	เป็นพิษน้อย (mild)	พบเซลล์มีลักษณะกลมไม่เกิน 50% อาจพบการแตกทำลายของเซลล์แต่ไม่รุนแรง และไม่พบช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเดี่ยว
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	พบเซลล์มีลักษณะกลม หรือพบการแตกทำลายของเซลล์ไม่เกิน 70%
4	เป็นพิษรุนแรง (severe)	พบการทำลายของเซลล์ชั้นเดี่ยวเกือบทั้งหมดหรือทั้งหมด

8.15 สารไพโรเจน

ให้ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้ ซึ่งปฏิบัติตามหลักการใน USP35 หัวข้อ Bacterial Endotoxins Test โดยมีวิธีการทดสอบ 2 วิธี คือ เจลคล็อตเทคนิค (gel-clot technique) และโฟโตเมทริกเทคนิค (photometric technique) สามารถเลือกทดสอบด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง

8.15.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ทุกชนิดต้องปราศจากสารไพโรเจน สำหรับอุปกรณ์ที่ทนความร้อนให้ทำลาย สารไพโรเจนด้วยความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) ในกรณีอุปกรณ์ที่ใช้เป็นพลาสติกหรือไม่สามารถทนความร้อนสูงได้ ต้องเลือกใช้เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากสารไพโรเจน

8.15.1.1 ตู้อบเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (37 ±1) °C

8.15.1.2 ลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) reagent)

8.15.1.3 สารมาตรฐานเอ็นโดท็อกซิน

8.15.1.4 แอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ (LAL reagent water) เอ็นโดท็อกซินไม่เกิน 0.005 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตรหรือน้อยกว่าความไวของแอลเอแอลรีเอเจนต์ที่ใช้

8.15.1.5 น้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดที่ได้ผ่านการตรวจแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินแล้ว

8.15.1.6 หลอดแก้วขนาด 10 mm x 75 mm เป็นหลอดทำปฏิกิริยา (reaction tube) สำหรับเจลคล็อตเทคนิค

8.15.1.7 หลอดแก้วขนาด 16 mm x 125 mm หรือ 13 mm x 100 mm เป็นหลอดสำหรับเจือจาง (dilution tube)

8.15.1.8 ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ชนิดพอลิสไตรีนปราศจากเชื้อ และสารไพโรเจนสำหรับโฟโทเมตริกเทคนิค

8.15.1.9 ไมโครปิเปตต์และทิป

8.15.1.10 เครื่องผสม (vortex mixer)

8.15.1.11 นาฬิกาจับเวลา

8.15.1.12 เตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนสำหรับเจลคล็อตเทคนิค

8.15.1.13 เครื่องอ่านผลวิเคราะห์ถาดเลี้ยงเซลล์ (microplate reader) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ (37±1) °C พร้อมโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซินสำหรับโฟโทเมตริกเทคนิค

8.15.2 การเตรียมสารละลายทดสอบ

ใช้ภาชนะพลาสติกตัวอย่างจำนวน 3 ใบ ถึง 10 ใบ สำหรับการทดสอบในแต่ละครั้ง ล้างภายในภาชนะพลาสติกตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดจำนวนไม่น้อยกว่า 20% ของความจุ เขย่าให้น้ำกลั่นสัมผัสผิวภายในจนทั่ว แล้วเททิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดจำนวนเท่ากับความจุของภาชนะพลาสติกตัวอย่าง นำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ (37±1) °C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 h นำสารละลายสกัดจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างทั้งหมดมาผสมรวมกันสำหรับการทดสอบ

8.15.3 การคำนวณค่าการเจือจางใช้ได้สูงสุด (maximum valid dilution, MVD)

(1) คำนวณปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน

$$\text{ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซินของสารละลายทดสอบ} = \frac{KxN}{V}$$

เมื่อ K คือ ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซินของอุปกรณ์การแพทย์ตามมาตรฐาน USP เท่ากับ 20 หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่ออุปกรณ์

N คือ จำนวนชิ้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

V คือ ปริมาตรรวมของสารสะลายทดสอบ

(2) คำนวณค่าการเจือจางใช้ได้สูงสุด (MVD)

$$\text{MVD} = \frac{\text{ปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน (จากข้อ 8.15.3(1))}}{\lambda}$$

เมื่อ λ คือ ความไวของแอลเอแอลรีเอเจนต์

8.15.4 สารละลายและวิธีเตรียม

สารละลายที่เตรียมต่อไปนี้ ต้องทำการเตรียมในวันที่ทำการทดสอบ และไม่ควรนำสารละลายที่เหลือหลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบแล้วกลับมาใช้อีก ยกเว้นสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซิน สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 8 °C ได้ไม่เกิน 4 สัปดาห์

8.15.4.1 สารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซิน

ปิเปตต์แอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ตามปริมาตรที่ระบุโดยผู้ทำ ลงในผงแห้งของสารมาตรฐานเอ็นโดท็อกซิน และผสมโดยใช้เครื่องผสม เป็นเวลา 30 min หรือตามที่ผู้ทำระบุ จะได้สารละลายเอ็นโดท็อกซิน มีความแรงตามที่ระบุในใบรับรองของผู้ทำ

8.15.5 วิธีทดสอบ

สารละลายทดสอบต้องผ่านการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา (test for interfering factors หรือ inhibition/enhancement test) ตามหลักการที่ระบุใน USP ถ้าพบว่าสารละลายทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา ให้เจือจางสารละลายทดสอบด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ก่อนนำมาทำการทดสอบโดยค่าการเจือจาง ต้องไม่เกินค่า MVD

8.15.5.1 วิธีเจลคล็อตเทคนิค

(1) การทดสอบยืนยันความไวของสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์

เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันความไวของของสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ตามที่ระบุไว้ในฉลาก ซึ่งต้องทำการทดสอบทุกครั้งเมื่อมีการเปลี่ยนรุ่นการผลิต

(1.1) นำสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซินที่เตรียมตาม 8.15.4.1 มาทำการเจือจางต่อด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ให้ได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรงครอบคลุมความไวของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต (Lysate sensitivity) ที่ 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละระดับการเจือจาง ต้องนำ

สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินไปปั่นบนเครื่องผสมอย่างน้อย 1 min ก่อนนำไปทำการเจือจางต่อไป

(1.2) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลอด ชนิดละ 4 หลอด

(1.2.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ (negative control) ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(1.2.2) สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(1.3) นำหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดไปอุ่นในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(1.4) เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ลงในผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลากหรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ผสมเบาๆจนผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตละลายหมด

(1.5) เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทำปฏิกิริยาแต่ละหลอด แกว่งหลอดเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง เริ่มทำการจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตลงในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดแรกเสร็จ

(1.6) บ่มหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37± 1) °C เป็นเวลา (60 ± 2) min หลีกเลี่ยงการวางในบริเวณที่สั่นสะเทือน

(1.7) ดูผลการเกิดเจลในหลอดทำปฏิกิริยา โดยคว่ำหลอด 180° ถ้าเจลที่เกิดขึ้นคงสภาพโดยไม่ไหลลงมาจากก้นหลอด ให้บันทึกเป็นผลบวก แต่ถ้าไม่เกิดเจล หรือเจลเสียสภาพไหลลงมา ให้บันทึกเป็นผลลบ การยกหลอดขึ้นดูผลต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะเจลที่เกิดขึ้นค่อนข้างเปราะและแตกง่าย

(1.8) การประเมินผล

(1.8.1) บันทึกค่าจุดยุติ (endpoint) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายเอ็นโดท็อกซินที่ให้ผลบวก

(1.8.2) คำนวณค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติ (geometric mean endpoint)โดยแปลงค่าจุดยุติแต่ละค่าเป็น log10 endpoint แล้วหาค่าเฉลี่ย ค่าแอนตี้ล็อก (antilog) ของค่าเฉลี่ย คือค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติ

(1.8.3) ความไวของน้ำยาลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตนำมาใช้ได้ ถ้าค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติ อยู่ในช่วง 0.5λ ถึง 2λ

(2) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายทดสอบ

(2.1) เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่จะทดสอบ แต่ต้องไม่เกิน MVD

(2.2) นำสารละลายเข้มข้นเอ็นโดท็อกซินที่เตรียมตาม 8.15.4.1 มาเจือจางต่อด้วยสารละลายตัวอย่างที่เตรียมในข้อ (2.1) ให้ได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละระดับการเจือจาง ต้องนำสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินไปปั่นบนเครื่องผสมอย่างน้อย 1 min ก่อนนำไปทำการเจือจางต่อไป

(2.3) นำสารละลายเข้มข้นแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินที่เตรียมตาม 8.15.4.1 มาทำการเจือจางต่อด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ให้ได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละระดับการเจือจาง ต้องนำสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินไปปั่นบนเครื่องผสมอย่างน้อย 1 min ก่อนนำไปทำการเจือจางต่อไป

(2.4) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลอด ชนิดละ 2 หลอด

(2.4.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ (negative control) ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(2.4.2) สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่เจือจางด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ที่มีความแรง 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(2.5) เติมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลอด ชนิดละ 4 หลอด

(2.5.1) สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่เจือจางด้วยสารละลายตัวอย่างที่มีความแรง 2λ 1λ 0.5λ และ 0.25λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(2.5.2) สารละลายตัวอย่าง

(2.6) นำหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดไปอุ่นในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(2.7) เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ลงในผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลากหรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ผสมเบาๆจนผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตละลายหมด

(2.8) เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทำปฏิกิริยาแต่ละหลอด แกว่งหลอดเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง เริ่มทำการจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตลงในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดแรกเสร็จ

(2.9) บ่มหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37±1) °C เป็นเวลา (60 ± 2) min หลีกเลี่ยงการวางในบริเวณที่สั่นสะเทือน

(2.10) ดูผลการเกิดเจลในหลอดทำปฏิกิริยา โดยคว่ำหลอด 180° ถ้าเจลที่เกิดขึ้นคงสภาพโดยไม่ไหลลงมาจากก้นหลอด ให้บันทึกเป็นผลบวก แต่ถ้าไม่เกิดเจลหรือเจลเสียสภาพไหลลงมา ให้บันทึกเป็นผลลบ การยกหลอดขึ้นดูผลต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะเจลที่เกิดขึ้นค่อนข้างเปราะและแตกง่าย

(2.11) การประเมินผล

(2.11.1) บันทึกค่าจุดยุติ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายเอ็นโดท็อกซินที่ให้ผลบวก

(2.11.2) คำนวณค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติ โดยแปลงค่าจุดยุติแต่ละค่าเป็น log10 endpoint แล้วหาค่าเฉลี่ย ค่าแอนตี้ล็อกของค่าเฉลี่ย คือ ค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติ

(2.11.3) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นปฏิกิริยา (interfering factor) ถ้าค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติของสารละลายเอ็นโดท็อกซินที่เจือจางด้วยด้วยสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.5λ ถึง2λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(2.11.4) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา ถ้าค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติของเอ็นโดท๊อกซินในตัวอย่างมากกว่า 2λ หน่วย เอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(2.11.5) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ มีฤทธิ์กระตุ้นปฏิกิริยา ถ้าค่ามัชฌิมเรขาคณิตของจุดยุติของเอ็นโดท็อกซินในตัวอย่างต่ำกว่า 0.5λ หน่วย เอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(3) การทดสอบหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินของสารละลายทดสอบ

(3.1) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลอด ชนิดละ 2 หลอด

(3.1.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

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

(3.1.3) สารละลายทดสอบ (sample tested) ให้เติมสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง

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

(3.2) นำหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดไปอุ่นในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(3.3) เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ลงในผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลากหรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ผสมเบาๆจนผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตละลายหมด

(3.4) เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทำปฏิกิริยาแต่ละหลอด แกว่งหลอดเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง เริ่มทำการจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตลงในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดแรกเสร็จ

(3.5) บ่มหลอดทำปฏิกิริยาทั้งหมดในเตาหลุมไฟฟ้าหรืออ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ (37±1) °C เป็นเวลา (60 ± 2) min หลีกเลี่ยงการวางในบริเวณที่สั่นสะเทือน

(3.6) ดูผลการเกิดเจลในหลอดทำปฏิกิริยา โดยคว่ำหลอด 180° ถ้าเจลที่เกิดขึ้น คงสภาพโดยไม่ไหลลงมาจากก้นหลอด ให้บันทึกเป็นผลบวก แต่ถ้าไม่เกิดเจล หรือเจลเสียสภาพไหลลงมา ให้บันทึกเป็นผลลบ การยกหลอดขึ้นดูผลต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะเจลที่เกิดขึ้นค่อนข้างเปราะและแตกง่าย

(3.7) การประเมินผล

ผลการทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้เมื่อ

(3.7.1) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงลบได้ผลลบ

(3.7.2) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงบวกได้ผลบวก

(3.7.3) ผลการทดสอบของสารละลายทดสอบเชิงบวกได้ผลบวก

(4) เกณฑ์การตัดสิน

ผลการทดสอบจะถือว่าตัวอย่างเป็นไปตามมาตรฐาน ถ้ามีปริมาณสารเอ็นโดท็อกซินน้อยกว่าปริมาณขีดจำกัดเอ็นโดท็อกซิน

8.15.5.2 วิธีโฟโตเมทริกเทคนิค

ประกอบด้วยวิธีเทอบิไดเมตริก (Turbidimetric) และโครโมเจนิค (Chromogenic) ซึ่งน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบจะมีรายละเอียดบางส่วนของวิธีการทดสอบที่แตกต่างกันไปตามบริษัทผู้ทำกำหนด ผู้วิเคราะห์สามารถปรับขั้นตอนการทดสอบบางส่วนให้ได้ตามความเหมาะสมกับน้ำยาที่ใช้วิธีทดสอบที่กำหนดต่อไปนี้ เป็นไปตามขั้นตอนพื้นฐานที่ระบุใน USP

(1) การทดสอบยืนยันความไวของสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์

เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันความไวของของสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ตามที่ระบุไว้ในฉลาก ซึ่งต้องทำการทดสอบทุกครั้งเมื่อมีการเปลี่ยนรุ่นการผลิต

(1.1) ป้อนข้อมูลน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ และกำหนดตำแหน่งของสารละลายควบคุมและสารละลายเอ็นโดท็อกซินในแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์ (microplate template) ลงในโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(1.2) นำสารละลายเข้มข้นแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินที่เตรียมตาม 8.15.4.1 มาทำการเจือจางต่อด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ให้ได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรงครอบคลุมความไวของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต (Lysate sensitivity) ที่ 1λ 10λ 100λ และ 1 000λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละระดับการเจือจางต้องนำสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินไปปั่นบนเครื่องผสมอย่างน้อย 1 min ก่อนนำไปทำการเจือจางต่อไป

(1.3) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายต่อไปนี้ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม ชนิดละ 3 หลุม ตามตำแหน่งที่กำหนดในแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์

(1.3.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ (negative control) ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(1.3.2) สารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 1λ 10λ 100λ และ 1 000λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร

(1.4) นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอุ่นในเครื่องอ่านผลวิเคราะห์ถาดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ (37± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(1.5) เติมแอลเอแอลรีคอนสติติวชั่นบัฟเฟอร์ (LAL Reconstitution Buffer) หรือตัวทำละลายที่ผู้ทำกำหนด ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลาก หรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ลงในผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ ผสมเบาๆจนผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ละลายหมด

(1.6) เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมทำปฏิกิริยาทุกหลุมจนครบ แล้วเริ่มการทำงานของโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(1.7) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ โปรแกรมจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆให้โดยอัตโนมัติ

(1.8) การประเมินผล

(1.8.1) ค่าสัมบูรณ์ (absolute value) ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r) ของกราฟมาตรฐานต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.980

(1.8.2) ค่าของเวลาที่ทำปฏิกิริยา (reaction time) ที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินแต่ละความเข้มข้น ต้องมี % CVน้อยกว่า 10%

(2) การทดสอบหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินของสารละลายทดสอบ

(2.1) ป้อนข้อมูลน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ และกำหนดตำแหน่งของสารละลายควบคุม สารละลายทดสอบและสารละลายเอ็นโดท็อกซินในแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์ลงในโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(2.2) นำสารละลายเข้มข้นแบคทีเรียลเอ็นโดท็อกซินที่เตรียมตาม 8.15.4.1 มาทำการเจือจางต่อด้วยแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์ ให้ได้สารละลายเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรงครอบคลุมความไวของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตที่ 1λ 10λ 100λ และ1 000λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละระดับการเจือจาง ต้องนำสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินไปปั่นบนเครื่องผสมอย่างน้อย 1 min ก่อนนำไปทำการเจือจางต่อไป

(2.3) เตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่จะทดสอบ แต่ต้องไม่เกิน MVD

(2.4) เติมสารละลายควบคุมและสารละลายต่อไปนี้ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ โดยเติมสารละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม ชนิดละ 3 หลุม ตามตำแหน่งที่กำหนดในแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์

(2.4.1) สารละลายควบคุมเชิงลบ ให้เติมแอลเอแอลรีเอเจนต์วอเตอร์

(2.4.2) สารละลายควบคุมเชิงบวก เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 1λ 10λ 100λ และ 1 000λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

(2.4.3) สารละลายทดสอบ (sample tested) ให้เติมสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง

(2.4.4) สารละลายทดสอบเชิงบวก (positive product control) ให้เติมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินที่มีความแรง 100λ หน่วยเอ็นโดท็อกซินต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 11 µl ลงในก้นหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติมสารละลายทดสอบหรือสารละลายทดสอบที่เจือจาง ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมเดียวกัน

(2.5) เมื่อเติมสารละลายข้างต้นครบตามแผ่นแบบถาดเลี้ยงเซลล์แล้ว ให้นำถาดเลี้ยงเซลล์ไปอุ่นในเครื่องอ่านผลวิเคราะห์ถาดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ (37 ± 1) °C เป็นเวลาประมาณ 10 min

(2.6) เติมแอลเอแอลรีคอนสติติวชั่นบัฟเฟอร์ (LAL Reconstitution Buffer) หรือตัวทำละลายที่ผู้ทำกำหนด ตามปริมาตรที่ระบุบนฉลาก หรือใบรับรองที่มาพร้อมกับชุดน้ำยา ลงในผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ ผสมเบาๆจนผงแห้งของลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสตรีเอเจนต์ละลายหมด

(2.7) เติมสารละลายลิมูลัสอะมีโบไซต์ไลเสต ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมทำปฏิกิริยาทุกหลุมจนครบ แล้วเริ่มการทำงานของโปรแกรมตรวจหาสารเอ็นโดท็อกซิน

(2.8) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ โปรแกรมจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานและคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆให้โดยอัตโนมัติ

(2.9) การประเมินผล

(2.9.1) ผลการทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้เมื่อ

(2.9.1.1) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงลบได้ผลลบ

(2.9.1.2) ผลการทดสอบของสารละลายควบคุมเชิงบวกได้ผลบวก

(2.9.2) ค่าสัมบูรณ์ของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.980

(2.9.3) ค่าของเวลาที่ทำปฏิกิริยาที่วัดได้จากสารละลายมาตรฐานเอ็นโดท็อกซินแต่ละความเข้มข้น ต้องมี % CV น้อยกว่า 10%

(2.9.4) ตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นปฏิกิริยาถ้า % PPC Recovery ของสารละลายทดสอบเชิงบวกอยู่ในช่วง 50% ถึง 200%

8.16 การซึมผ่านของจุลินทรีย์

8.16.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

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

8.16.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาจเตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปหรือเตรียมตามวิธีต่อไปนี้

(1) ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม

แอล-ซีสทีน	0.5	g
โซเดียมคลอไรด์	2.5	g
เดกซ์โทรส	5.5	g
อะการ์	0.75	g
ยีสต์เอกซ์แทรกต์	5.0	g
เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatic digest of casein)	15.0	g
โซเดียมไทโอไกลโคเลต (หรือกรดไทโอไกลโคลิก 0.3 ml)	0.5	g
สารละลายเรซาซูรินโซเดียม (resazurin sodium solution)		
0.1% โดยปริมาตรที่เตรียมขึ้นใหม่	1.0	ml
น้ำกลั่น	1	L

นำแอล-ซีสทีน โซเดียมคลอไรด์ เดกซ์โทรส อะการ์ ยีสต์เอกซ์แทรกต์ และเคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน มาผสมรวมกันในโกร่งและบดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย คนให้เข้ากันแล้วเทสารละลายที่ได้ใส่ในบีกเกอร์ ล้างโกร่งด้วยน้ำกลั่นจำนวนที่เหลือ เทรวมกันในบีกเกอร์นำไปทำให้ร้อน เติมโซเดียมไทโอไกลโคเลตหรือกรดไทโอไกลโคลิกลงไป ปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่า (7.1±0.2) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 mol/l (ถ้าจำเป็นต้องกรองให้นำสารละลายที่ได้มาทำให้ร้อนแต่ไม่ให้เดือด แล้วกรองในขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่เปียกชื้น)

เติมสารละลายเรซาซูรินโซเดียม ผสมให้เข้ากันแล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 min

(2) ซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม

เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน	17.0	g
ซอยบีนมีลที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน		
(papaic digest soybean meal)	3.0	g
โซเดียมคลอไรด์	5.0	g
ไดเบสิกโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	g

เดกซ์โทรส	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L

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

8.16.3 การเตรียมเชื้อเผื่อใช้ (stock culture)

(1) การเตรียมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส*

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

(2) การเตรียมเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส

ให้เพาะลงบนอะการ์ผิวเอียงของซอยบีนเคซีนไดเจสต์อะการ์นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 24 h แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 °C ถึง 8 °C

(3) การเตรียมเชื้อเผื่อใช้อาจเตรียมโดยวิธีการอื่นที่เหมาะสม

8.16.4 การเตรียมเชื้อทดสอบ (inoculum)

(1) ถ่ายเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 8.16.3) ลงในขวดหรือหลอดที่มีฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียม

(2) ถ่ายเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส จากเชื้อเผื่อใช้ (ข้อ 8.16.3) ลงในขวดหรือหลอดที่มีซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม

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

8.16.5 วิธีวิเคราะห์

(1) ใส่ฟลูอิดไทโอไกลโคเลตมีเดียมและซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม ลงในภาชนะพลาสติกตัวอย่างตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 4 สดมภ์ที่ 2 ให้ได้ปริมาณเท่ากับความจุที่ระบุไว้ของภาชนะพลาสติกตัวอย่างนั้น แล้วปิดให้สนิท

(2) วางภาชนะพลาสติกตัวอย่างตามข้อ (1) ลงในภาชนะที่เหมาะสม (เช่น บีกเกอร์ขนาดใหญ่ อ่างแก้ว) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับที่มีอยู่ในภาชนะพลาสติกตัวอย่างโดยให้พื้นที่ผิวภายนอกของภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบจมอยู่ใต้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่น้อยกว่า 60%

(3) เติมเชื้อ*บาซิลลัส ซับทิลิส* ที่ใช้ทดสอบ ลงในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ที่บรรจุฟลูอิดไทโอไกลโครเลตมีเดียม 20 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 L ผสมให้เข้ากันแล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

(4) เติมเชื้อ*ซาลโมเนลลา* คอเลอเรซูอิส ที่ใช้ทดสอบ ลงในบีกเกอร์ขนาดใหญ่ที่บรรจุซอยบีนเคซีนไดเจสต์มีเดียม 20 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 L ผสมให้เข้ากันแล้วปิดปากภาชนะด้วยกระจก

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

(6) เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทำความสะอาดภาชนะด้านบนที่อยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อโดยการล้างด้วยสารละลายโพรพานอล 60% โดยปริมาตร เป็นเวลา 120 s และล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้ออีกครั้ง

(7) ใช้แท่งแก้วร้อนแดง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 mm เจาะผนังภาชนะพลาสติกตัวอย่าง (ข้อ(6)) บริเวณเหนือผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายในทันทีแล้วใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาที่ปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบตามปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 4 สดมภ์ที่ 4

(8) แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดเอาไว้จากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบ(ข้อ(7))ใส่ลงในขวดเพาะเชื้อซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันขวดละ 10.0 ml ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 4 สดมภ์ที่ 5 นำขวดเพาะเชื้อทั้งหมดไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ถึง 35 °C เป็นเวลา 10 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด สังเกตดูว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ในขวดเพาะเชื้อแต่ละใบหรือไม่

8.16.6 การประเมินผล

ให้ถือว่าภาชนะพลาสติกตัวอย่างไม่มีการซึมผ่านของจุลินทรีย์เมื่อขวดเพาะเชื้อทุกใบไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

ตารางที่ 4 การทดสอบการซึมผ่านของจุลินทรีย์

(ข้อ 8.16.5)

ความจุของภาชนะพลาสติกตัวอย่าง ml	จำนวนภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ		ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดูดจากภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละใบ	จำนวนขวดเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบต่อภาชนะพลาสติกตัวอย่าง ใบ
	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดละ ใบ	รวม ใบ		
ไม่เกิน 100	5	10	1 % โดยปริมาตรของความจุ แต่ต้องไม่น้อยกว่า 0.1 ml	1
101 ถึง 500	3	6	1 % โดยปริมาตรของความจุ	2
เกิน 500	1	2	1 % โดยปริมาตรของความจุ แต่ไม่เกิน 25 ml	5

8.17 ความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

8.17.1 เครื่องมือ

เครื่องอังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 20°C ถึง 30°C

8.17.2 วิธีทดสอบ

นำภาชนะพลาสติกตัวอย่างที่บรรจุน้ำกลั่นจนถึงปริมาตรบรรจุและปิดผนึกเรียบร้อย แช่ในน้ำอุณหภูมิ 20 °C ถึง 30 °C เป็นเวลา 24 h แล้วตรวจพินิจสภาพของเครื่องหมายและฉลากบนภาชนะพลาสติกตัวอย่างแล้ว ต้องไม่หลุด

ภาคผนวก ก.
การทำลายเม็ดเลือด

(ข้อ 5.4.4)

ก.1 การทำลายเม็ดเลือด

ก.1.1 เครื่องมือ

(1) ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ (70 ± 2) °C

(2) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 540 nm

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(4) หม้อนึ่งอัด

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

ก.1.2 สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% โดยมวล ที่ปราศจากเชื้อ

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

(3) สารละลายแดรบคิน (Drabkin's solution)

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

(4) การควบคุมเชิงบวก (positive control) เช่น น้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีด

(5) การควบคุมเชิงลบ (negative control) เช่น แผ่นพลาสติกมาตรฐานพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง

ก.1.3 การเตรียมเลือดกระต่าย

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

ก.1.4 การเตรียมสารละลายทดสอบ

(1) ตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างแต่ละหน่วยตรงบริเวณที่มีความหนาสม่ำเสมอและโค้งน้อยที่สุดให้ได้ชิ้นพลาสติกพื้นที่เท่าๆกัน นำมารวมกันให้พื้นที่ผิวสองด้านรวมกันได้ 120 cm^2 สำหรับภาชนะพลาสติกหนาน้อยกว่า 0.5 mm และ 60 cm^2 สำหรับภาชนะพลาสติกที่หนาเท่ากับหรือมากกว่า 0.5 mm แล้วนำมาตัดออกเป็นชิ้นย่อยขนาดกว้างประมาณ 0.1 cm ถึง 0.3 cm และยาวประมาณ 1 cm ถึง 5 cm ในกรณีที่ไม่สามารถตัดภาชนะพลาสติกตัวอย่างให้ได้ขนาดดังกล่าว ให้ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนัก 4 g จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับสกัดตัวอย่าง

(2) ล้างภาชนะพลาสติกตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดอย่างน้อย 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

(3) สกัดชิ้นพลาสติกตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% โดยมวลที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 20 ml

เตรียมแผ่นพลาสติกที่ใช้สำหรับการควบคุมเชิงลบเช่นเดียวกับพลาสติกตัวอย่าง ส่วนน้ำกลั่นสำหรับทำยาฉีดที่ใช้สำหรับการควบคุมเชิงบวก และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% โดยมวลที่ปราศจากเชื้อใช้เป็นแบลงก์ ให้ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว แล้วปิดฝาให้สนิท

(4) นำภาชนะสำหรับสกัดทั้งหมดจากข้อ (3) ใส่ในหม้อนึ่งอัดที่อุณหภูมิ (121 ± 2) °C เป็นเวลา 1 h หรือใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ (70 ± 2) °C เป็นเวลา 24 h หรือที่อุณหภูมิ(50 ± 2) °C เป็นเวลา 72 h แล้วนำออกมาปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (20 °C ถึง 30 °C) เขย่าอย่างแรง แล้วเทสารละลายสกัดที่ได้ลงในภาชนะที่สะอาด แห้ง และปราศจากเชื้อทันที นำไปเก็บไว้ในที่ซึ่งมีอุณหภูมิ 20 °C ถึง 30 °C และต้องนำไปทดสอบต่อไปภายในเวลา 24 h หลังจากที่เตรียมได้

ก.1.5 วิธีทดสอบ

(1) การเตรียมกราฟสอบเทียบ

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

(1.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสอบเทียบแต่ละความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์

(1.3) สร้างกราฟสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นของฮีโมโกลบินมาตรฐานเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรกับค่าการดูดกลืนแสง

(2) การตรวจหาระดับพลาสมาฮีโมโกลบินในเลือด

(2.1) นำเลือดกระต่ายแต่ละภาชนะบรรจุตามข้อ ก.1.3 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง และนำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับด้วยอัตราเร็ว 700 G ถึง 800 G นาน 15 min

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

(2.3) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาของเลือดกระต่ายแต่ละตัว เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(2.4) ถ้าเลือดกระต่ายตัวใดมีปริมาณฮีโมโกลบินในพลาสมาเกิน 1.0 mg/ml จะไม่นำเลือดกระต่ายตัวนั้นมาใช้ในการทดสอบต่อไป และต้องใช้เลือดกระต่าย 3 ตัวในการทดสอบ

(3) การเจือจางเลือด

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

(3.2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้สารละลายแดรบคินเป็นแบลงก์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟสอบเทียบ หาปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด

(3.3) เจือจางเลือดกระต่ายแต่ละตัวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% (โดยมวล) ที่ปราศจากเชื้อให้มีปริมาณฮีโมโกลบินอยู่ในช่วง (25.0 ± 2.5) mg/ml เป็นค่าฮีโมโกลบินปรากฏ (hemoglobin present)

(4) การทดสอบตัวอย่าง

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

(4.2) เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงในแนวระดับด้วยอัตราเร็ว 100 G ถึง 200 G เป็นเวลา 15 min

(4.3) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงหลอดใหม่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 700 G ถึง 800 G เป็นเวลา 5 min ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดแก้วใหม่ แล้วนำไปหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

(5) การหาค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด

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

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

(5.3) คำนวณค่าดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือดจากสูตร

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

(5.4) คำนวณค่าเฉลี่ยของดัชนีการแตกตัวของเม็ดเลือด แล้วเทียบหาระดับการแตกตัวของเม็ดเลือดตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ระดับการแตกตัวของเม็ดเลือด

(ข้อ ก.1.5(5.4))

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

ภาคผนวก ข.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 7.1)

ข.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ภาชนะพลาสติกชนิดเดียวกัน ที่ทำโดยกรรมวิธีเดียวกันและในคราวเดียวกัน หรือที่ทำหรือส่งมอบหรือซื้อขายในระยะเวลาเดียวกัน

ข.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ข.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป ความสม่ำเสมอของความหนา ความยืดหยุ่น และเครื่องหมายและฉลาก

ข.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.1

ข.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 5.1 ข้อ 5.2.3 ข้อ 5.2.5 และข้อ 6. ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ข.1 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป ความสม่ำเสมอของความหนา ความยืดหยุ่น และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ข.2.1)

ขนาดรุ่น ใบ	ขนาดตัวอย่าง ใบ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 1 200	20	2
1 201 ถึง 10 000	32	3
เกิน 10 000	50	5

ข.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบรูรั่ว ความทนต่อการตกกระแทก ความทนความดัน และปริมาณอนุภาคปนเปื้อน

ข.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 20 ใบ

ข.2.2.2 ตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5.2.1 ข้อ 5.2.2 ข้อ 5.2.4 และข้อ 5.2.8 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ข.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบพอลิไวนิลคลอไรด์เรซิน ได(2-เอทิลเฮกซิล)แทเลต ไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา คุณลักษณะของสารละลายที่สกัดได้ และปริมาณโลหะหนัก

ข.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.2

ข.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.3.1 ข้อ 4.3.2 ข้อ 4.3.3 ข้อ 5.2.7 ข้อ 5.3.1 และข้อ 5.3.2 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข.2 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบพอลิไวนิลคลอไรด์เรซิน ได(2-เอทิลเฮกซิล)แทเลต ไวนิลคลอไรด์โมโนเมอร์ ปริมาณกากที่เหลือจากการเผา คุณลักษณะของสารละลายที่สกัดได้ และปริมาณโลหะหนัก

(ข้อ ข.2.3)

ขนาดรุ่น ใบ	ขนาดตัวอย่าง ใบ
ไม่เกิน 1 200	20
1 201 ถึง 10 000	32
เกิน 10 000	50

ข.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ และความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

ข.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.3

ข.2.4.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 5.2.6 และข้อ 5.5 ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ข.3 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข.3 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ และความคงทนของเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ข.2.4)

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

ข.2.5 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางชีวภาพ

ข.2.5.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ ข.4

ข.2.5.2 จำนวนตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5.4 จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ข. 4 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางชีวภาพ

(ข้อ ข.2.5)

ขนาดความจุภาชนะพลาสติก ml	ขนาดตัวอย่าง ใบ
น้อยกว่า 100	80
100 ถึง 499	60
ตั้งแต่ 500	40

ข.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างภาชนะพลาสติกต้องเป็นไปตามข้อ ข.2.1.2 ข้อ ข.2.2.2 ข้อ ข.2.3.2 ข้อ ข.2.4.2 และข้อ ข.2.5.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าภาชนะพลาสติกรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้