
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัช ปราศจากเชื้อ โดยวิธี Agar Diffusion

ปวีณา เจริญสิทธิ์ และทวีทรัพย์ ชัยสมบุญพันธ์

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถ.ติวานนท์ อ.เมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ ตามวิธีที่กำหนดไว้ใน มอก. 531 จะใช้เทคนิค Direct Contact แต่วิธีนี้พบปัญหาบ้างเมื่อทดสอบตัวอย่างที่อยู่ในรูปแบบของถุงและขวด ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีการทดสอบใหม่ที่เหมาะสม จึงได้ทดสอบตัวอย่างภาชนะพลาสติกจำนวน 34 ตัวอย่างเปรียบเทียบวิธีตาม มอก. 531 กับวิธีใหม่ คือ เทคนิค Agar Diffusion โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 5 จนเซลล์โตเป็นชั้นเดียว จากนั้นเติมอาหาร MEM ที่มีวุ้นร้อยละ 1.5 และสีย้อม neutral red ก่อนวางชิ้นตัวอย่างบนชั้นวุ้น สังเกตการตายของเซลล์ในบริเวณด้านใต้และรอบๆ ชิ้นตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต ภายหลังการสัมผัสกับชิ้นตัวอย่าง 24 ชั่วโมง โดยใช้แผ่นพลาสติก USP Positive Bioreaction RS เป็นตัวควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกจากการทดสอบพบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เทคนิค Agar Diffusion เหมาะสำหรับพลาสติกทั้งชนิด โพลีเอทิลีน โพลีโพรพิลีน โพลีไวนิลคลอไรด์ และพลาสติกชั้น ดังนั้นเทคนิค Agar Diffusion จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้แทนที่เทคนิค Direct Contact

Accepted for publication, 23 July 2015

บทนำ

ภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อ เช่น หลอดบรรจุยาฉีด (ampoule) ขวดบรรจุยาฉีด (vial) ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุน้ำเกลือ ขวดพลาสติกสำหรับบรรจุโลหิต เป็นต้น มีทั้งที่ทำจากแก้วและพลาสติก ภาชนะบรรจุเภสัชภัณฑ์ที่ทำจากแก้วแม้ว่าจะป้องกันการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำได้ดี และสามารถทำให้ปราศจากเชื้อและกำจัดสารก่อไข่โดยใช้อุณหภูมิสูงได้ แต่มีข้อเสียคือ แตกง่าย และอาจมีออกไซด์ของโลหะบางชนิดที่เป็นส่วนผสมของแก้วหลุดออกมาปนเปื้อนกับเภสัชภัณฑ์ที่บรรจุอยู่ ทำให้เภสัชภัณฑ์มีความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชที่ทำจากพลาสติกขึ้นมา ซึ่งมีน้ำหนักเบา ไม่แตกง่าย มีความยืดหยุ่น ผลิตเป็นรูปแบบต่างๆ ได้ง่าย วัสดุที่ใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ ได้แก่ โพลีเอทิลีน (PE) โพลีโพรพิลีน (PP) โพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC) และพลาสติกชั้น (laminar) อย่างไรก็ตาม พลาสติกที่นำมาผลิตเป็นภาชนะบรรจุต้องไม่ทำปฏิกิริยากับเภสัชภัณฑ์ที่บรรจุจนทำให้คุณภาพเปลี่ยนแปลงไป และเกิดผลข้างเคียงของตัวยา กล่าวคือภาชนะพลาสติกนั้นต้องไม่ปล่อยสารปนเปื้อนกับเภสัชภัณฑ์ในปริมาณที่ทำให้เกิดพิษเป็นอันตรายต่อสุขภาพ และต้องไม่ดูดซึมโมเลกุลหรือไอออนของสารต่างๆ ในเภสัชภัณฑ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของภาชนะบรรจุว่าเหมาะสมกับเภสัชภัณฑ์ที่จะบรรจุ⁽¹⁻²⁾

ภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อ (มอก. 531)⁽³⁾ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพระราชกฤษฎีกากำหนดให้ต้องเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด หรือเป็นมาตรฐานที่ใช้บังคับ กล่าวคือ ภาชนะพลาสติกที่บรรจุเภสัชภัณฑ์สำหรับฉีด ทั้งปริมาตรมากและปริมาตรน้อย ทั้งที่ผลิตในประเทศ และนำเข้าเพื่อจำหน่ายในประเทศ ต้องได้รับการควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คือ ต้องมีการตรวจคุณภาพทั้งทางฟิสิกส์ เคมี และชีวภาพก่อน จึงจะสามารถนำมาบรรจุเภสัชภัณฑ์เพื่อจำหน่ายได้ การทดสอบคุณลักษณะทางชีวภาพมี 4 หัวข้อ ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง การทดสอบหาสารไพโรเจน การทดสอบการทำลายเม็ดเลือด และการทดสอบการซึมผ่านเข้าออกของเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (Cytotoxicity Test) ตาม มอก. 531 นั้น เป็นการทดสอบโดยใช้เทคนิค Direct Contact คือ วางชิ้นตัวอย่างลงในหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดสำหรับพลาสติกชนิด high density และ low density เนื่องจากพลาสติกนี้อาจจะไปกีดกั้นให้เซลล์ตายได้ หรืออาจจะลอยไปมาในหลุมทดสอบ จนอาจทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้ อีกทั้งภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อในประเทศไทยมีทั้งในรูปแบบของขวด และในรูปแบบของถุง การทดสอบตามวิธีใน มอก. 531 จึงอาจไม่เหมาะสมกับรูปแบบของตัวอย่างในปัจจุบัน ซึ่งมีการพัฒนารูปร่างลักษณะและขนาดไปเป็นอันมาก จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคใหม่ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเหมาะสมกับสภาพตัวอย่างในปัจจุบัน

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในเภสัชตำรับและมาตรฐานต่างๆ เช่น United States Pharmacopeia (USP)⁽⁴⁾ American Society for Testing and Materials (ASTM)⁽⁵⁾ และ ISO 10993, ISO 7405⁽⁶⁻⁷⁾ สามารถแบ่งได้เป็น 3 เทคนิค ได้แก่ Elution, Direct Contact และ Agar Diffusion วิธีการทดสอบโดยเทคนิค Elution จำเป็นต้องมีขั้นตอนการสกัดตัวอย่างก่อนนำมาทดสอบกับเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer วิธีการทดสอบโดยเทคนิค Agar Diffusion เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบตัวอย่างที่มีน้ำหนักมาก เช่น เครื่องมือแพทย์ วัสดุทางทันตกรรม จุกยาง เป็นต้น⁽⁸⁻¹²⁾ และสามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีรูปร่างต่างๆ ได้ วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิค Direct Contact และ Agar Diffusion มีวิธีการทดสอบที่คล้ายกันและมีวิธีการประเมินผลที่เหมือนกัน คือ วิธี Direct Contact เป็นการทดสอบโดยวางชิ้นตัวอย่างบนเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer โดยตรง ส่วนวิธี Agar Diffusion เป็นการทดสอบโดยมีการเพาะชิ้นตัวอย่างบนเซลล์ที่เลี้ยงเป็น monolayer ก่อนที่จะวางชิ้นตัวอย่าง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำวิธีการทดสอบแบบ Agar Diffusion มาใช้แทนที่วิธีการทดสอบแบบเดิม คือ วิธี Direct Contact ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

วัสดุและวิธีการ

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1 ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุภัณฑ์ปราศจากเชื้อ ซึ่งถูกส่งมาตรวจคุณลักษณะทางชีวภาพ ในระหว่างปีงบประมาณ 2553- 2555 จำนวนรวมทั้งสิ้น 34 ตัวอย่าง

1.2 เซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง L-929 mammalian fibroblast cell (ATCC cell line CCL1, NCTC clone 929)

1.3 เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ท (inverted microscope) ตู้บเพาะเชื้อ แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ไมโครมิเตอร์ haemocytometer และ laminar flow cabinet

1.4 อุปกรณ์ ได้แก่ ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม (6-well tissue culture petridish) ไมโครปิเปต ปิเปต เครื่องแก้วต่างๆ

1.5 สารเคมี ได้แก่ Phosphate Buffer Solution, Trypsin Solution (0.25 g/100 ml), สีย้อม Trypan Blue, สารละลาย Neutral Red 50 µg/ml, 1% Sodium Bicarbonate Solution, Glutamine Solution (29.2 g/100 ml)

1.6 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) ที่มี Fetal Bovine Serum 5%

1.7 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตที่มีวุ้น 1.5% โดยการเตรียม MEM ให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า (2X) และมี Fetal Bovine Serum 10% และสารละลาย neutral red 2% นำไปอุ่นที่ 47 องศาเซลเซียส ผสมกับวุ้น 3% ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส

1.8 วัสดุมาตรฐาน

- วัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก (Positive Material Control) คือแผ่น USP Positive Bioreaction RS

- วัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ (Negative Material Control) คือแผ่น USP High-density Polyethylene RS

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัดภาชนะพลาสติกทรงบริเวณที่โค้งน้อยที่สุดและมีเนื้อสม่ำเสมอ ตัดชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกให้มีพื้นที่ผิวไม่น้อยกว่า 100 ตารางมิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลาประมาณ 1 นาที

2.2 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

นำเซลล์เนื้อเยื่อ L-929 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วย Phosphate Buffer Solution เติม Trypsin Solution เพื่อให้เซลล์หลุดล่อนจากพื้นผิวขวด แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต (อาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ที่มี Fetal Bovine Serum 5%) ให้ได้สารแขวนตะกอนของเซลล์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตพร้อมทั้งคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ในสารแขวนตะกอน โดยใช้เครื่องมือนับเม็ดเลือด (Haemocytometer) จากนั้นเจือจางสารแขวนตะกอนของเซลล์นี้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนตะกอนของ

เซลล์ที่เจือจางแล้วเติมลงในภาตเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม หลุมละ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วัน จนเซลล์โตเป็นชั้นเดียว (monolayer) อย่างน้อย 80% ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์

2.3 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง โดยเทคนิค Direct Contact

เมื่อเซลล์โตเป็นชั้นเดียว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต หลุมละ 0.8 มิลลิลิตร วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ 1 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น และอีกหลุมเป็น blank จากนั้นนำภาตเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์และวงใส (zone) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphological change) และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต (cell density) แล้วประเมินผล (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นทำการยัด (fix) และย้อมสีเซลล์ให้ติดบนภาตเลี้ยงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลินคริสทัลไวโอเลต การทดสอบจะถือว่า ตัวอย่างไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เมื่อชิ้นตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงไม่มากกว่าระดับ 2 และการทดสอบจะมีผลเชื่อถือได้ เมื่อ blank และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบไม่เป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (ระดับ 0) และชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในระดับ 3 ขึ้นไป

2.4 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง โดยเทคนิค Agar Diffusion

เมื่อเซลล์โตเป็นชั้นเดียว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในภาตเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออก และเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจริญเติบโต ที่มีวุ้น 1.5% หลุมละ 3 มิลลิลิตร รอให้แข็งในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที วางชิ้นตัวอย่างทดสอบ 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวก 2 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น วางชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลลบ 1 หลุม หลุมละ 1 ชิ้น และอีกหลุมเป็น blank จากนั้นนำภาตเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บเพาะเชื้อชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูความเป็นพิษที่เกิดกับเซลล์ โดยดูลักษณะของเซลล์และวงใส ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกการตายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิต แล้วประเมินผลตาม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

ระดับ (grade)	ปฏิกิริยา (reactivity)	สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อ (Description of Reactivity Zone)
0	ไม่เป็นพิษ (none)	ไม่พบวงใสรอบๆ หรือภายในชิ้นทดสอบ
1	เป็นพิษน้อยมาก (slightly)	พบเซลล์มีรูปร่างผิดปกติภายในชิ้นทดสอบ
2	เป็นพิษน้อย (mild)	มีเซลล์ตายเป็นวงจำกัดอยู่ในพื้นที่ชิ้นทดสอบ
3	เป็นพิษปานกลาง (moderate)	มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นทดสอบ 0.5 – 1.0 ซม.
4	เป็นพิษรุนแรง (severe)	มีเซลล์ตายเป็นวงใสแผ่ขยายออกจากชิ้นทดสอบ มากกว่า 1.0 ซม.

ผล

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อที่ผลิตและนำเข้าในประเทศไทย ซึ่งถูกส่งมาตรวจคุณลักษณะทางชีวภาพ ในระหว่างปี 2553 - 2555 จำนวน 34 ตัวอย่าง โดยวิธีตาม มอก. 531 คือ เทคนิค Direct Contact และวิธีใหม่ คือ เทคนิค Agar Diffusion พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อเปรียบเทียบระหว่าง เทคนิค Direct Contact และเทคนิค Agar Diffusion

ตัวอย่าง	ชนิดพลาสติก	รูปแบบ Grade	Direct Contact Grade	Agar Diffusion
BOE-1, BOE-2, BOE-3, BOE-4, BOE-6, BOE-7, BOE-10, BOE-11, BOE-12, BOE-13, BOE-14	PE	ขวด	0	0
BOE-8, BOE-9	PE	ขวด	1	0
BOE-5	PE	ขวด	1	1
BOP-1, BOP-2, BOP-3, BOP-4, BOP-6, BOP-7, BOP-9, BOP-10, BOP-11, BOP-12, BOP-13	PP	ขวด	0	0
BOP-5, BOP-8	PP	ขวด	1	1
BAP-1, BAP-2, BAP-3, BAP-4,	PP	ถุง	0	0
BAV-1	PVC	ถุง	0	0
BAL-1, BAL-2	ชั้น	ถุง	0	0

วิจารณ์

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของตัวอย่างภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ จำนวน 34 ตัวอย่าง ตามวิธีที่กำหนดใน มอก. หรือเทคนิค Direct Contact เปรียบเทียบกับเทคนิค Agar Diffusion พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แม้ว่าจะมีภาชนะพลาสติก

ชนิดขวดจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธี ที่ต่างกันบ้าง ซึ่ง 2 ตัวอย่างเป็นภาชนะพลาสติกที่ทำจาก PE โดยพบว่า เทคนิค Direct Contact มีความเป็นพิษมากกว่าเทคนิค Agar Diffusion ทั้ง 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ภาชนะพลาสติกอาจเป็นชนิด high density มีน้ำหนักมาก เมื่อทำการทดสอบโดยเทคนิค Direct Contact ชิ้นพลาสติกนี้จะไปกดทับทำให้เซลล์ได้ชั้นทดสอบตายได้ หรือภาชนะพลาสติกอาจเป็นชนิด low density มีน้ำหนักเบา เมื่อทำการทดสอบโดยเทคนิค Direct Contact ชิ้นพลาสติกนี้จะเคลื่อนที่ไปมาในหลุมทดสอบทำให้เซลล์ได้ชั้นทดสอบตายได้ หรืออาจเกิดจากสารพิษที่มีอยู่ในชิ้นพลาสติกอาจไม่ละลายหรือถูกดูดซับไว้ในชั้นวุ้น มีผลทำให้ความเข้มข้นของสารพิษลดลงเมื่อซึมผ่านชั้นวุ้นมาสัมผัสกับเซลล์ จึงพบความเป็นพิษโดยเทคนิค Direct Contact มากกว่าเทคนิค Agar Diffusion⁽⁶⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดวงใสของชิ้นวัสดุควบคุมเพื่อยืนยันผลบวกพบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ มีขนาดวงใส 0.5 – 0.7 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่า สารพิษที่หลุดรอดออกมาสามารถละลายและซึมผ่านชั้นวุ้นลงมาสัมผัสกับเซลล์ได้

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของตัวอย่างภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อที่อยู่ในรูปผง จำนวน 7 ตัวอย่าง แม้พบว่า ทุกตัวอย่างให้ผลไม่ต่างกัน แต่เนื่องจากถุงมีความบางมากกว่าขวด จึงมีโอกาสเกิดการเคลื่อนที่ของตัวอย่างภายในหลุมทดสอบ เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Direct Contact จำเป็นต้องระวังในเรื่องดังกล่าวเป็นอย่างมาก ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดได้ การนำเทคนิค Agar Diffusion มาใช้แทนที่จึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้

เมื่อประเมินผลตามเกณฑ์ที่ มอก. กำหนด พบว่า ทุกตัวอย่างเข้ามาตรฐานทั้ง 2 วิธี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของทวีทรัพย์และคณะซึ่งรายงานถึงคุณภาพของภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ปราคาจากเชื้อในประเทศไทย⁽¹³⁾ ทั้งนี้เนื่องจาก ตำรายา USP ได้กำหนดให้เม็ดพลาสติกที่นำมาใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุเภสัชภัณฑ์ต้องผ่านการทดสอบคุณภาพและความปลอดภัยก่อน ถ้าไม่ผ่านก็ไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อได้⁽³⁾

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่กำหนดใน มอก. 531 เป็นเทคนิค Direct Contact วิธีนี้แม้จะสามารถสกัดและทดสอบตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการทดสอบ คือ เมื่อวางชิ้นทดสอบลงในหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะสกัดเอาสารพิษจากชิ้นตัวอย่างออกมา และลงสัมผัสกับเซลล์โดยตรง ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในการสกัด สามารถใช้ตัวอย่างที่มีด้านเรียบเพียงแค่ 1 ด้าน ก็สามารถนำมาใช้ประเมินความเป็นพิษได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่เป็นโลหะหรือตัวอย่างที่มีพื้นผิวไม่เรียบ รวมทั้งตัวอย่างที่เป็นพลาสติกชนิด high density หรือ low density เนื่องจาก ตัวอย่างพลาสติกชนิด high density อาจทำให้เกิดการกดทับบนเซลล์เนื้อเยื่อทำให้เซลล์ตาย ส่วนตัวอย่างพลาสติกชนิด low density อาจทำให้ชิ้นตัวอย่างเกิดการเคลื่อนที่ทำให้เซลล์ตายได้ ทั้งนี้การตายเกิดจากลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง ไม่ได้เกิดจากสารพิษที่หลุดรอดออกมา ทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดพลาดได้^(4, 8)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่นำมาแทนที่วิธีเดิมเป็นเทคนิค Agar Diffusion วิธีนี้สามารถสกัดและทดสอบตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการทดสอบ เช่นเดียวกับกับเทคนิค Direct Contact วิธีนี้ยังสามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันได้และไม่ขึ้นกับ material density เนื่องจากมีชั้นวุ้นรองรับน้ำหนักไว้ หรือถ้าตัวอย่างมีพื้นผิวไม่เรียบหรือมีขนาดเล็ก ก็สามารถนำตัวอย่างมาสกัดและนำสารสกัดหยดลงบนกระดาษกรองก่อนที่จะนำมาทดสอบได้⁽⁶⁻⁸⁾ ดังนั้นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจึงจะมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบจากเทคนิคเดิม คือ Direct Contact เป็นเทคนิคใหม่ คือ Agar Diffusion ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบกับภาชนะพลาสติกบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราคาจากเชื้อในประเทศไทยที่มีทั้งในรูปแบบของขวด และในรูปแบบของถุง ซึ่งมีการผลิตมาจากวัตถุดิบทั้ง PE PP PVC และพลาสติกชั้นได้

สรุป

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแบบ Agar Diffusion เป็นวิธีที่มีความไว ให้ผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถทดสอบกับตัวอย่างที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันซึ่งมีทั้งในรูปแบบของขวดและในรูปแบบของถุง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น มอก. 1298 ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Laschi A, Sehnal N, Alarcon A, Barcelo B, Caire-Maurisier F, Delaire M, et al. Container-content compatibility studies: a pharmaceutical team's integrated approach. PDA J Pharm Sci Technol 2009; 63(4): 285-93.
2. ศุภพร ศรีพัฒนพิพัฒน์. ภาชนะบรรจุสำหรับผลิตภัณฑ์เภสัช. สมอ สาร 2545; 28(319): 7-8.
3. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 531-2546. ภาชนะพลาสติกสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์เภสัชปราศจากเชื้อ. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หน้า 14-16.
4. USP 35-NF 30: The United States Pharmacopeia. The National Formulary. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 2012. p. 92-94, 472-479.
5. ASTM F 895-11. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity. Pennsylvania: American Society for Testing and Materials (ASTM); 2011.
6. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2009.
7. ISO 7405:2008. Dentistry -- Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2008.
8. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J Pharm Sci 1965; 54(10): 1545-7.
9. Vidal MNP, Aiub C, Abrantes S, Zamith HPS. Evaluation of Brazilian medical devices using agar diffusion cytotoxicity assay. Rev Bras Hematol Hemoter 2009; 31(2): 84-7.
10. สุวรรณ ก่อสุวรรณวงศ์, ราชพร สัจจันทร์, ละอองทอง วัชรากย์. การประเมินพิษของสารยึดติดเนื้อฟันโดยวิธีอาการโอเวอร์เลย์. วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์ 2551; 58(3): 196-202.
11. Miranda RB, Fidel SR, Boller MA. L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay. Braz Dent J 2009; 20(1): 22-6.
12. Lonroth EC. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. Int J Occup Saf Ergon 2005; 11(2): 131-9.
13. ทวีทรัพย์ ชัยสมบุญพันธ์, ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์, ปวีณา สีลาภัทรานุรักษ์, อารีญา ดิษฐ์กิจ. คุณภาพความปลอดภัยและความเข้ากันได้ทางชีววิทยาของพลาสติกที่ใช้ทางการแพทย์. สารตำรายา 2546; 10(2): 33-43.

Cytotoxicity Testing of Plastic Parenteral Container by Agar Diffusion Technique

Paveena Charoensit and Daweesapya Chaisomboonpan

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road. Nonthaburi 11000. Thailand.

ABSTRACT Even though direct contact technique was used to screen the cytotoxicity of plastic parenteral containers according to TIS 531, some difficulties were encountered when samples having bag and bottle forms were found moving in the wells during testing. In order to be able to test all types of containers, agar diffusion technique was applied to evaluate 34 plastic parenteral containers parallel with direct contact technique. The L-929 cultures were grown to monolayer in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). After incubation, the agar layer (1.5%) supplemented with MEM in 5% FBS and neutral-red stain was added to replace the medium. The samples were cut and placed on the agar layer. After 24-hour exposure, the cell monolayers were observed for cell deaths beneath and surrounding the samples as well as changes in morphology and cell densities. In this study, USP Positive Bioreaction RS were used as positive material control. There were no statistical differences between both techniques ($P>0.05$). However, the agar diffusion technique was a useful method for screening plastic parenteral containers made from polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride and laminar. Therefore, it could be another useful method to be implemented for the cytotoxicity testing scheme in order to replace the direct contact technique.

Key words: Cytotoxicity testing, Plastic parenteral container, Agar diffusion technique