www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

ISIRI
7171-2-5
1st. edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۷۱۷۱-۲-۵
چاپ اول

آب - قابلیت مصرف محصولات غیر فلزی در تماس با آب مصرفی انسان با توجه به تاثیر آنها بر کیفیت آب-
قسمت دوم: روش‌های آزمون- بخش ۲-۵: استخراج موادی که می‌تواند سلامت عمومی را به خطر اندازد

Water- Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water-
Part 2: Methods of test- Section 2.5: The extraction of substances that may be of concern to public health

www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه : www.isiri.org
بخش فروش، تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱) ، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها: ۱۷۵۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard @ isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787
Price: 1750 Rls.

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی(رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد« آب - قابلیت مصرف محصولات غیر فلزی در تماس با آب مصرفی انسان با توجه به تاثیر آنها بر کیفیت آب- قسمت دوم: روش‌های آزمون- بخش ۲-۵: استخراج موادی که می‌تواند سلامت عمومی را به خطر اندازد »

رئیس:	سمت و/ یا نمایندگی
مدنی، مسعود (دکترای شیمی آلی)	دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین
دبیر:	
نصراصفهانی، مجتبی (دکترای شیمی معدنی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان اصفهان
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسدیان، پژمان (کارشناسی شیمی)	شرکت صنایع شیمیایی اصفهان
شریعتی‌فر، مینا (کارشناسی ارشد صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان اصفهان
محمدی، هادی (کارشناسی میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان اصفهان
مختاری، مسعود (کارشناسی ارشد مدیریت صنعتی)	شرکت پوشش لوله کوهپایه
یوسفیان، هومن (کارشناسی شیمی)	شرکت ایران اسپیرال

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
مقدمه	۱
هدف و دامنه کاربرد	۲
مراجع الزامی	۲
اصطلاحات و تعاریف	۳
اصول آزمون	۴
پیش فرض‌های آزمون	۴
ایمنی	۴
مواد	۵
وسایل	۷
آزمونه‌ها	۸
روش آزمون	۸
بیان نتایج	۱۱
گزارش آزمون	۱۱
پیوست الف (اطلاعاتی)	۱۴

پیش گفتار

استاندارد " آب - قابلیت مصرف محصولات غیر فلزی در تماس با آب مصرفی انسان با توجه به تاثیر آنها بر کیفیت آب- قسمت دوم: روش‌های آزمون- بخش ۲-۵: استخراج موادی که می‌تواند سلامت عمومی را به خطر اندازد " که پیش نویس آن درکمیسیون های مربوط توسط مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و در هفتصد و هفتاد و سومین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۸۷/۹/۵ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

BS 6920-2.5-2000: Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water- Part 2: Methods of test- Section 2.5: The extraction of substances that may be of concern to public health

مقدمه

اخطار– علاوه بر مشاهده دستورالعمل‌های ایمنی کار، مراقبت‌های ویژه در کار با زنجیره‌های سلولی باید به کار رود، زیرا امکان آلودگی زنجیره‌های سلولی با ویروس‌های بیماری‌زا و باکتری‌ها در طی دوره کار با آنها وجود دارد.

محیط‌های مغذی که در این آزمون استفاده می‌شود قادر به رشد میکروبی است، بنابراین زنجیره سلولی را قادر به آلودگی توسط ویروس‌های انسانی می‌کند.

احتیاط– این روش آزمون الزاماً باید توسط افراد با تجربه در کار با تکنیک‌های کشت بافتی و ریخت‌شناسی زنجیره سلولی انجام شود.

این استاندارد در برگیرنده تکنیک ساده سمیت سلولی بر روی ترکیباتی است که از نظر بیولوژیکی فعال است و از لیچیت‌های[1] حاصل از مواد و قطعاتی که طبق فرضیات مشتری در تماس با آب مصرفی انسان قرار می‌گیرد، ایجاد می‌شود. محصولات و مواد شیمیایی که توسط تامین‌کنندگان آب مورد استفاده قرار می‌گیرد، باید در معرض ارزیابی کامل از طریق یک روش استخراج و در پی آن روش‌های آنالیز پیشرفته قرار گرفته باشد.

توصیه می‌شود این استاندارد را فقط بعنوان یک آزمون غربالی اولیه برای موادی که بطور بالقوه برای سلامت انسان خطرساز است در نظر بگیرید. نتایج رضایت‌بخشی وجود دارد که نشان می‌دهد لیچیت به احتمال قوی حاوی مقادیر زیادی از مواد واقعاً سمی نیست، ولی این نتایج نشان دهنده فقدان مقادیر کوچک از موادی که ممکن است در تماس دراز مدت خطرناک باشد، نیست.

1 - Leachate

آب- قابلیت مصرف محصولات غیر فلزی در تماس با آب مصرفی انسان با توجه به تاثیر آنها بر کیفیت آب- قسمت دوم: روش‌های آزمون- بخش ۲-۵: استخراج موادی که می‌تواند سلامت عمومی را به خطر اندازد

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش‌کار غربالی[1] (آزمون ساده سمیت سلولی[2]) با استفاده از یک زنجیره سلولی جانوران پستاندار و یک لیچیت از یک محصول می‌باشد. نتایج این روش‌کار در ارزیابی سمیت سلولی محصولی که در تماس با آب مصرفی انسان قرار می‌گیرد، بکار خواهد رفت.

این استاندارد برای انواع محصولات غیر فلزی که در تماس با آب آشامیدنی از آنها استفاده می‌شود، کاربرد دارد.

یادآوری- مراجع قانونی و ذی‌الصلاح کشور[3] قوانین و ضوابط خاصی را در برخی موارد تعیین و به مورد اجرا گذاشته و اهمیت نتایج حاصل را ارزیابی می‌کنند.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن موردنظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آنها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۷۱۷۱-۱: سال ۱۳۸۲، کیفیت آب - قابلیت مصرف محصولات غیر فلزی در تماس با آب مصرفی انسان با توجه به تاثیر آن بر کیفیت آب- بخش اول: ویژگی‌ها

2-2 BS EN ISO 3696:1995, Water for analytical laboratory use- Specification and test methods.

2-3 BS 748:2000, Specification for haemacytometer and particle counting chambers.

2-4 BS 6920-2.1:2000, Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water- Part2: Methods of test- Section 2.1: Samples for testing.

---

1 - Screening procedure
2 - Cytotoxicity test

۳- وزارت نیرو و وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

2-5 BS 6920-3:2000, Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water- Part3: High temperature tests.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۱-۳

سمیت سلولی[1]

سمی برای سلول‌ها در شرایط این استاندارد است.

۲-۳

تک لایه[2]

لایه سلولی (به ضخامت یک سلول) که یک سلول در تماس با یک سطح جامد مناسب در محیط کشت، عموماً بر روی دیواره ظرف محیط کشت رشد می‌کند، تشکیل می‌دهد. این سلول‌ها وابسته به تماس هستند و بر روی این سطح و تا زمانی‌که در تماس با سلول‌های مجاور قرار گیرد و در نتیجه رشد متوقف شود، پخش و چند لایه می‌شوند.

یادآوری- فقط انواع خاصی از کشت سلولی (شامل زنجیره سلولی که در این آزمون استفاده می‌شود) تک لایه تشکیل می‌دهد.

۳-۳

کشت بافتی[3]

تکنیکی که در آن سلول‌ها رشد می‌کند و بصورت یک ورقه تک‌لایه بر روی سطح داخلی یک ظرف در یک محیط کشت خنثی نگهداری می‌شود.

۴-۳

زنجیره سلولی[4]

به سلول‌های قادر به رشد تحت شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از تکنیک کشت بافتی،گفته می‌شود. یک زنجیره سلولی را که قادر به رشد نامحدود در لوله آزمایش است، زنجیره سلولی پیوسته می‌نامند.

۵-۳

هوای تمیز بیولوژیکی[5]

هوایی است که تعداد میکروارگانیسم‌ها به اندازه کافی پایین باشد تا اثر نامطلوبی بر این آزمون نگذارد.

---

1 - Cytotoxic
2 - Monolayer
3 - Tissue culture
4 - Cell line
5 - Biologically clean atmosphere

۶-۳

ریخت‌شناسی[1]

بررسی میکروسکوپی شکل فیزیکی یک سلول می‌باشد. وقتی ریخت‌شناسی برای زنجیره سلولی بکار می‌رود منظور ظاهر کلی سلول تک‌لایه و ظاهر اختصاصی اجزاء تشکیل دهنده سلول می‌باشد.

۷-۳

راندینگ آف[2]

سلول‌های غیر طبیعی است که کروی یا بیضوی شکل هستند و با استفاده از میکروسکوپ با توان کم، هیچ ساختار داخلی قابل مشاهده‌ایی نشان نمی‌دهند.

۸-۳

سوسپانسیون سلولی[3]

سوسپانسیونی از یک تک لایه است که با استفاده از آنزیم‌های هضمی و یا عوامل شلات کننده[4] به منظور شل شدن سلول‌ها از سطحی که سلول‌ها به آن چسبیده‌اند و پخش کردن آنها تهیه می‌شود که برای دایر کردن محیط کشت‌های تازه و یا انجام آزمون‌ها می‌تواند بکار برده شود.

۴ اصول آزمون

نمونه‌های محصول در آب مورد استفاده برای آزمون، یک دوره ۲۴ ساعته غوطه‌ور می‌شود. از این آب بعداً در تهیه محیط مغذی استفاده می‌شود.

ریخت‌شناسی زنجیره سلولی جانور پستاندار که در این محیط رشد کرده است مشاهده می‌شود.

یک استخراج شاهد بطور موازی با این ماده ارزیابی می‌شود.

یادآوری– نمودار گردشی برای نمایش ترتیب مراحل روش‌کارهای آزمون در پیوست الف نوشته شده است.

۵ پیش فرض‌های آزمون

سلول‌ها و محیط‌های کشت را فقط در یک آزمایشگاه با هوای تمیز بیولوژیکی که از گرد و غبار عاری است تهیه کنید و آزمون را در محیطی که دور از عفونت زنجیره سلولی[5] است، انجام دهید.

۶ ایمنی

به اخطارهایی که در مقدمه این استاندارد ذکر شده است توجه کنید.

---

1 - Morphology
2 - Rounding off
3 - Cell suspension
4 - Chelating agents
5 - Infection of the cell line

۷ مواد

۷-۱ آب‌ها

۷-۱-۱ آب مورد استفاده در آزمون

آب مورد استفاده در آزمون باید از یک شیر آب متصل به شبکه آبرسانی با فشار اصلی تهیه شود. قبل از جمع‌آوری آب، شیر آب را با فشار باز کنید تا دمای جریان آب بیشتر از ۱ °C در یک دوره یک دقیقه‌ایی تغییر نکند و دمای آن از ۲۵ °C تجاوز نکند. آبی که به روش تقطیر در ظروف شیشه‌ایی[1]،یون‌زدایی و یا اسمز معکوس[2] مطابق با استاندارد BS EN ISO 3696 (درجه سوم) تصفیه شده است نیز می‌تواند استفاده شود.

آب مورد استفاده در آزمون باید عاری از مواد سمی یا موادی که مانع رشد زنجیره سلولی است باشد.

یادآوری- بعنوان مثال، عاری بودن آب مورد استفاده در آزمون از مواد سمی را می‌توان با رشد حداقل سه تولید مثل موفق از زنجیره سلولی در یک محیط مغذی که از آن ساخته شده است و مقایسه ریخت‌شناسی سلول‌ها با ریخت‌شناسی سلول‌هایی با همان تولید مثل‌های رشد کرده در محیطی که با آب مقطر ساخته شده است، مورد تایید قرار داد (بند ۱۰-۲ ملاحظه شود).

۷-۱-۲ آب مقطر (برای تهیه محیط)

آب مقطری که از تقطیر در ظروف شیشه‌ایی تهیه شده است و یا آب حاصل از اسمز معکوس که مطابق با استاندارد BS EN ISO 3696 (درجه سوم) می‌باشد.

یادآوری- آب یون‌زدایی‌شده مناسب نیست.

۷-۲ محیط

۷-۲-۱ کلیات

کلیه واکنشگرها باید دارای کیفیت آزمایشگاهی باشد.

یادآوری- استفاده از سرم گوساله تازه بدنیا آمده بجای سرم جنین گوساله مجاز است.

یادآوری- استفاده از سایر محیط‌های نگهداری و رشد دارای مشخصات مشروط بر آنکه سلامت رشد زنجیره سلولی را بتوان با استفاده از آنها حفظ کرد، بجای محیط‌های بالا مجاز است.

استفاده از جنتامایسن نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل احتمال رشد باکتری یا آلودگی از آزمونه‌های غیر سترون و آب مورد استفاده در آزمون، باید ترجیح داده شود.

یادآوری- اجزاء سازنده محیط‌های سترون بطور تجاری در دسترس است و توصیه می‌شود در صورت امکان مورد استفاده قرار گیرد.

---

1 - Glass-distilled
2 - Reverse osmosis

۷-۲-۲ محیط رشد

محیط رشد از مواد زیر تهیه می‌شود:

- آب مقطر سترون ۹۰ ml،
- تغلیظ ۱۹۹ (۱۰ برابر) با نمک‌های ارلی[1] بدون بافر سدیم هیدروژن کربنات ۱۰ ml
- سرم گوساله تازه بدنیا آمده ۷ ml،
- محلول جنتامایسون (۴۰۰۰ i.u/ml) ۱ ml،
- محلول بافر سدیم هیدروژن کربنات ۴۴ g/l، اشباع از کربن دی‌اکسید (بند ۷-۲-۴) ۲ml.

اجزاء سازنده باید بصورت سترون استفاده شود. محیط باید بصورت سترون و دور از نور در دمای ۱±۴°C نگهداری شود.

یادآوری- تغلیظ ۱۹۹ (ده برابر) با نمک‌های ارلی بدون گلوتامین و سدیم هیدروژن کربنات بطور تجاری در دسترس است. توصیه می‌شود قبل از استفاده ۰/۳۴ ml از یک محلول ۲۰۰ L- گلوتامین mmol/l به هرکدام از ۱۰۰ ml تغلیظ اضافه کنید. سرم گوساله تازه بدنیا آمده نیز بطور تجاری در دسترس است.

۷-۲-۳ محیط نگهدارنده[2]

محیط نگهداری از مواد زیر تهیه می‌شود:

- آب مقطر سترون ۹۰ ml،
- تغلیظ ۱۹۹ (۱۰ برابر) با نمک‌های ارلی[3] بدون بافر سدیم هیدروژن کربنات ۱۰ ml
- سرم گوساله تازه بدنیا آمده ۲ ml،
- محلول جنتامایسن ۴۰۰۰ i.u/ml) ۱ ml،
- محلول بافر سدیم هیدروژن کربنات ۴۴ g/l، اشباع از کربن دی‌اکسید (بند ۷-۲-۴) ۳ml.

اجزاء سازنده باید بصورت سترون استفاده شود. محیط باید بصورت سترون و دور از نور در دمای ۱±۴°C نگهداری شود.

۷-۲-۴ محلول بافر سدیم هیدروژن کربنات ۴۴ گرم در لیتر اشباع از CO_2

محلول بافر سدیم هیدروژن کربنات ۴۴ گرم در لیتر به روش زیر تهیه می‌شود:

- سدیم هیدروژن کربنات ۸/۸ g،
- فنل قرمز (محلول آبی ۲ گرم در لیتر) ۱۰ ml،
- آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر.

اجزاء سازنده باید مخلوط شود و محلول با حباب زدن گاز کربن دی‌اکسید یا اضافه کردن یک تکه کربن دی‌اکسید جامد، اشباع شود.

---

1 - Earle's salts
2 - Maintenance medium
3 - Earle's salts

فوراً بعد از تهیه، این بافر باید در یک بطری شیشه‌ایی ۱۰ ml ریخته و تا لبه پر شود، درب بطری را بسته و در یک اتوکلاو کوچک در دمای ۱۱۵°C و در فشار ۶۹ کیلوپاسکال به مدت ۲۰ دقیقه سترون کنید. بطری را در دمای ۱±۴ °C نگهداری کنید. بطری‌هایی که رنگ قرمز روشن می‌شود را تخلیه کنید.

۷-۲-۵ محلول نمکی بافر فسفات[1]

محلول نمکی بافر فسفات به روش زیر تهیه می‌شود:

- سدیم کلرید ۸/۰ g،
- پتاسیم کلرید ۰/۲ g،
- دی سدیم هیدروژن ارتو فسفات ۱/۱۵ g،
- پتاسیم دی هیدروژن اورتوفسفات ۰/۲ g،
- آب مقطر تا رسیدن به حجم یک لیتر.

اجزاء سازنده باید مخلوط شود و محلول حاصل باید داخل بطری‌های شیشه‌ایی در مقادیر ۲۰ ml توزیع و در یک اتوکلاو کوچک در دمای ۱۱۵°C و در فشار ۶۹ کیلوپاسکال به مدت ۱۰ دقیقه سترون شود.

۷-۲-۶ محلول تریپسین-EDTA [2]

محلول تریپسین-EDTA یا محلول تجاری معادل آن استفاده شود.

یادآوری- توصیه می‌شود این محلول در دمای زیر ۱۸ °C- نگهداری شود.

۷-۲-۷ محیط رشد غلیظ

محیط رشد غلیظ مشابه با روش مندرج در بند ۷-۲-۲ ولی با حذف آب مقطر تهیه می‌شود. محیط را در دمای ۱°C±۴ به دور از نور نگهداری کنید.

۷-۳ زنجیره سلولی

باید از زنجیره سلولی پایدار VERO از سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی (ATCC شماره CCL81) استفاده شود. زنجیره سلولی باید در هنگام تحویل سالم باشد (بند ۱۰-۲ ملاحظه شود).

یادآوری- استفاده از زنجیره سلولی کلیه میمون BGM بجای زنجیره سلولی VERO در این آزمون مجاز است ولی زنجیره سلولی VERO ترجیح داده می‌شود.

۸ وسایل

۸-۱ ظروف کشت بافتی

ظروف کشت بافتی باید طبق الزامات زیر تهیه شود:

کلیه ظروف شیشه‌ایی که در این آزمون استفاده می‌شود باید با استفاده از یک شوینده اختصاصی که برای استفاده در تکنیک رشد بافتی طراحی شده است، تمیز شود. ظروف شیشه‌ایی باید بعد از تمیزکاری بطور

1 - Phosphate-buffered saline solution
2 - Trypsin-EDTA

کامل آبکشی شود و در انتها دوبار با آب مقطر (بند ۷-۱-۲) آبکشی شود. ظروف شیشه‌ایی باید در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۰۴ کیلو پاسکال به مدت ۱۵ دقیقه سترون شود.

یادآوری- استفاده از ظروف پلاستیکی پیش سترون که اختصاصاً برای عملیات کشت بافتی تامین می‌شود مجاز است.

۸-۲ اتاقک شمارش هموسیتومتر[1] مطابق با استاندارد BS 748

۸-۳ ظروف استخراج

ظروف استخراج شامل بشرهای شیشه‌ایی کالیبره از جنس بور سیلیکات[2] با ظرفیتی مطابق با استاندارد BS 6920-2.1 (بند ۴-۱-۲) می‌باشد.

بشرها باید با محلول آبی یک شوینده قابل تجزیه در محیط زیست شسته شود. بشرها را با آب مورد استفاده در آزمون (بند ۷-۱-۱) آبکشی کنید. سپس یکبار با آب مقطر (بند ۷-۱-۲) آبکشی کنید. آب بشرها باید در یک قفسه هوای گرم چکیده و خشک شود. بشرها قبل از استفاده باید با آب مورد استفاده در آزمون (بند ۷-۱-۱) آبکشی شود.

۹ آزمونه‌ها

۹-۱ کلیات

بجز در موارد زیر، آزمونه‌ها باید مطابق با الزامات مندرج در استاندارد BS 6920-2.1 باشد.

۹-۲ مواد مرجع

تاکنون هیچ ماده مرجع ایمن و به اثبات رسیده‌ایی که بتواند در این استاندارد استفاده شود، وجود ندارد.

۹-۳ نمونه‌های سیمانی

چون افزایش pH محیط مغذی بر رشد زنجیره سلولی اثر خواهد گذاشت، کلیه نمونه‌های حاصل از مواد سیمانی را طبق استاندارد BS 6920-2.1 (بند ۵-۲-۸) پیش تثبیت کنید.

۹-۴ محلول تایید

محلولی از روی سولفات (با کیفیت آزمایشگاهی) به غلظت ۸۰۰ گرم در لیتر $ZnSO_4$ تهیه کنید. این محلول باید در هرکدام از مجموعه آزمونه‌هایی که بوسیله این تکنیک ارزیابی می‌شود، وارد شود.

۱۰ روش آزمون

۱۰-۱ مقدمه

این روش آزمون را به سه مرحله زیر تقسیم کنید:

- ایجاد و نگهداری از زنجیره سلولی بر اساس یک اصول پیوسته در آزمایشگاه،

1 - Haemocytometer counting chamber
2 - Borosilicate

- انجام یک روش استخراج روی نمونه‌ها، جمع‌آوری لیچیت و استفاده از آن در تهیه بهرهای محیط‌های کشت مغذی،
- مشاهده اثر این محیط‌ها بر روی ریخت‌شناسی سلول‌ها.

۱۰-۲ نگهداشت زنجیره سلولی

زنجیره سلولی را (بند ۷-۳) در ظروف سترون با درپوش‌های محکم و هوابند[1] و با استفاده از محیط‌های رشد (بند ۷-۲-۲) و نگهداشت (بند ۷-۲-۳) رشد دهید. از یک روش مناسب برای نگهداشت زنجیره سلولی استفاده کنید:

در یک ظرف کشت بافتی سترون ۱۰۰ ml، بصورت سترون ۱ ml تا ۲ ml سوسپانسیون سلولی تازه ساز محتوی 1×10^{6} سلول در میلی‌لیتر (بند ۱۰-۳ ملاحظه شود) را ریخته و به آن ۹ ml از محیط رشد (بند ۷-۲-۲) اضافه کنید. درپوش بطری را محکم ببندید و در دمای ۳۷±۱ °C تا زمانی که برای دستیابی به یک تک لایه متلاقی[2] لازم است گرمخانه‌گذاری کنید. محیط رشد را سر ریز کنید و بطور کامل تک لایه سلولی را با ۱۰ ml محلول بافر نمکی فسفات آبکشی کنید (بند ۷-۲-۵). محلول آبکشی را دور ریخته و ۹ ml محیط نگهداشت (بند ۷-۲-۳) را اضافه کنید. مشابه با بالا گرمخانه‌گذاری کنید. محیط نگهداشت (بند ۷-۲-۳) را حداقل هر ۵ روز تعویض کنید. بعد از ۲ تا ۳ هفته یک سوسپانسیون سلولی جدید (بند ۱۰-۳ ملاحظه شود) تهیه کنید و حجم‌های ۱ ml تا ۲ ml را به ظروف کشت بافتی جدید منتقل کنید و رشد دادن سلول‌ها را با تکرار کلیه مراحل بالا ادامه دهید. هر هفته، سلول‌ها را بطور میکروسکوپی مورد بررسی قرار دهید و اگر علائمی از رشد غیرعادی یا زائده‌های دانه‌ایی[3] وجود دارد، این سلول‌ها را با توجه به کلیه ضروریت‌های ایمنی در روش‌های دفع، دور بریزید.

یادآوری- استفاده از سایر روش‌های کشت سلولی به شرطی که زنجیره سلولی سالم باقی بماند، مجاز است.

۱۰-۳ تهیه سوسپانسیون سلولی

محیط نگهداشت (بند ۷-۲-۳) را از یک تک لایه سالم از سلول‌ها (حاصل از بندهای ۷-۳ یا ۱۰-۲) سرریز کنید، تک‌لایه‌ها را با ۱۰ ml محلول بافر نمکی فسفات (بند ۷-۲-۵) آبکشی کنید و محلول را دور بریزید. ۳ ml محلول تریپسین-EDTA (بند ۷-۲-۶) بطوری که بطور کامل روی تک‌لایه را بپوشاند، به این بطری اضافه کنید. به مدت ۳۰ ثانیه بطری را در دمای اتاق رها کنید. بطری را در دمای ۳۷±۱ °C به مدت ۴ تا ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری کنید. برای اطمینان از اینکه سلول‌ها از سطح ظرف جدا می‌شود، ظرف کشت بافتی را مورد بررسی قرار دهید و سپس ۲/۵ ml محیط رشد را (بند ۷-۲-۲) اضافه کنید و به آرامی ظرف را تکان دهید تا سلول‌ها در محیط معلق شود.

با استفاده از یک اتاقک شمارش هموسیتومتر مطابق با استاندارد BS 748 تعداد سلول‌های زنده را در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی تعیین کنید.

---

1 - Airtight
2 - Confluent monolayer
3 - Excessive granular inclusion

۱۰-۴ روش استخراج

در همان روزی که آزمون شروع می‌شود، نمونه را با آب مورد استفاده در آزمون (بند ۷-۱-۱) به مدت ۱۰ دقیقه آبکشی کنید. هر نمونه (بند ۷-۱-۱) را در ظرف استخراج تمیز (بند ۸-۳) جداگانه قرار دهید. علاوه بر این، برای هر بهر از آزمونه‌ها، یک ظرف خالی بعنوان یک شاهد آزمون در نظر بگیرید. به ظرف آزمون مقدار کافی آب مورد استفاده در آزمون (بند ۷-۱-۱) را به هریک از ظروف تا رسیدن به خط نشان کالیبراسیون مندرج در استاندارد بند ۲-۴ (بند ۵-۱-۲) اضافه کنید. هر ظرف را با یک تکه فویل آلومینیمی تازه غیر قابل نفوذ کنید. اگر چگالی آزمونه از آب کمتر است، مطمئن شوید که آزمونه در طی آزمون با استفاده از یک وزنه شیشه‌ایی بطور کامل در آب مورد استفاده در آزمون غوطه‌ور شده است.

این ظروف را به دور از نور و در دمای ۲±۲۳ ºC به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۱۰-۵ روش رشد

بعد از گرمخانه‌گذاری (بند ۱۰-۴ ملاحظه شود)، بخش‌های اندازه‌گیری شده‌ایی از هریک از استخراج‌های حاصل از هر ظرف (شامل شاهد و محلول تایید سولفات روی) را خارج کنید و از آن برای رقیق‌سازی محیط رشد تغلیظ شده (بند ۷-۲-۷) تا غلظتی معادل با اجزاء سازنده محیط رشد (بند ۷-۲-۲) استفاده کنید. بعنوان مثال، این کار را می‌توان با ریختن ۰/۵۵ ml محیط رشد تغلیظ شده (بند ۷-۲-۷) داخل بطری شیشه‌ایی سترون ۳۰ ml همراه با ۲/۴۵ ml استخراج (بند ۱۰-۴) بدست آورد. به هر بطری $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۵}$ سلول (بند ۱۰-۳) اضافه کنید و به آرامی محتوای بطری‌ها را مخلوط کنید. بخش‌های ۱ ml سوسپانسیون سلولی حاصل را داخل سه بطری پلاستیکی سترون یا ظروف کشت بافتی با درپوش‌های هوابند بریزید. درپوش هر ظرف را محکم ببندید.

یادآوری- اگر از سایر محیط‌های رشد شناخته شده بجای محیط رشد این استاندارد استفاده می‌شود، محیط رشد تغلیظ شده را ده بار با این استخراج رقیق کنید و مکمل‌های لازم را به همان نسبتی که زمان تهیه محیط رشد با آب مقطر سترون استفاده شده است، اضافه کنید.

بطری‌ها را در دمای ۱°C±۳۷ به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. لوله‌ها را با زاویه ۵ تا ۱۵ درجه نسبت به افق کج نگه دارید.

۱۰-۶ بررسی میکروسکوپی

بعد از گرمخانه‌گذاری، با میکروسکوپ شرایط سلول‌ها را در هرکدام از ظرف‌های بند ۱۰-۵ مورد بررسی قرار دهید.

یادآوری- از یک میکروسکوپ نوری با توان پایین که بزرگنمایی ۴۰ برابر دارد استفاده کنید.

حضور یا عدم حضور لایه سلولی متلاقی و حضور هرگونه سلول با شکل غیرعادی یا سلول‌هایی که علائمی از راندینگ آف نشان می‌دهد را ثبت کنید. اگر رشد متلاقی مشاهده نمی‌شود، ظاهر سلول‌های شناور در محیط رشد را ثبت کنید.

۱۱ بیان نتایج

۱۱-۱ تایید

اگر لوله‌های مربوط به شاهد رشد متلاقی یا علائمی از راندینگ آف سلول‌ها و یا سلول‌هایی با شکل غیرعادی نشان ندهد، روش‌کارهای مندرج در بندهای ۱۰-۴، ۱۰-۵ و ۱۰-۶ را با استفاده از واکنشگرها و نمونه‌های جدید تکرار کنید.

اگر محلول ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات روی باعث راندینگ آف و مرگ سلول‌ها نشود، روش‌کارهای مندرج در بندهای ۱۰-۴، ۱۰-۵ و ۱۰-۶ را با استفاده از واکنشگرها و نمونه‌های جدید تکرار کنید.

یادآوری- اطمینان از اینکه هرگونه مرگ سلولی ناشی از شکست در هوابندی لوله‌ها نیست، ضروری است. این وضعیت معمولاً با تشکیل رنگ قرمز روشن در محیط، شناسایی می‌شود. بنابراین اگر کشت بافتی در لوله شاهد به رنگ قرمز روشن درآید، توصیه می‌شود این آزمون با استفاده از آزمونه‌های جدید تکرار شود.

۱۱-۲ تفسیر نتایج

اگر این استخراج‌ها که از یک نمونه جمع‌آوری می‌شود بر ریخت‌شناسی زنجیره سلولی به هر روشی تاثیر بگذارد، دو نمونه دیگر را با استفاده از واکنشگرهای جدید مورد بررسی قرار دهید.

اگر استخراج‌های حاصل از بیش از یک نمونه از سه نمونه بر ریخت‌شناسی زنجیره سلولی اثر بگذارد، آن را بعنوان یک پاسخ سمیت سلولی تفسیر کنید.

یادآوری- چنین نتایجی الزاماً به معنی اینکه مواد مورد آزمون برای انسان سمی است نمی‌باشد، بلکه این آزمون نشان می‌دهد که موادی در استخراج حاصل از این محصول وجود دارد که قبل از اینکه این محصول برای استفاده در تماس با آب مصرفی انسان مورد تایید قرار گیرد، نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

اگر زنجیره سلولی در هریک از لوله‌ها تشکیل یک تک‌لایه سلولی متلاقی دهد و میزان راندینگ آف یا شکل‌های غیر عادی از آنچه در لوله‌های حاصل از نمونه شاهد است بیشتر نباشد، آن را بعنوان یک پاسخ غیر سمی تفسیر کنید.

۱۱-۳ دقت

این روش آزمون نتایج عددی ندارد که با عملیات آماری بتوان تکرارپذیری (r) و تجدیدپذیری (R) را محاسبه کرد. هر چند، در یک آزمون بین آزمایشگاهی شامل آزمون ۱۲ ماده بصورت دوتایی و در سه آزمایشگاه، ۹۲٪ توافق در ثبت حضور یا عدم حضور یک پاسخ سم‌شناختی با نمونه‌های استخراجی ۲۴ ساعته وجود داشته است.

۱۲ گزارش آزمون

۱۲-۱ کلیات

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱۲-۱-۱ عنوان (مانند گزارش آزمون) و تاریخ صدور این گزارش،

۱۲-۱-۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ...،

۱۲-۱-۳ نام و نشانی آزمایشگاه و محلی که آزمون‌ها در آن انجام شده است (در صورت تفاوت نشانی آزمایشگاه با محل آزمون)،

۱۲-۱-۴ شماره گزارش آزمون، علامتی بر روی هر صفحه به منظور اطمینان از اینکه آن صفحه قسمتی از گزارش آزمون می‌باشد و علامتی واضح در پایان گزارش آزمون،

۱۲-۱-۵ نام، نام خانوادگی و نشانی مشتری که این سفارش را داده است،

۱۲-۱-۶ شرح و شناسایی بدون ابهام موارد آزمون، این موارد باید مطابق با حداقل الزامات نوشته شده در استاندارد BS 6920-2.1 (بند ۹) باشد،

۱۲-۱-۷ ارجاع به نمونه‌برداری یا روش کار تهیه نمونه که توسط آزمایشگاه یا سایر اشخاص مورد استفاده قرار گرفته است و جزییات زنجیره کنترل و انتقال و دسترسی[1] که با آنها در ارتباط است، در مورد محصولاتی که در محل اجرا می‌شود، باید در بر گیرنده کلیه الزامات مطابق با استاندارد بند ۲-۴ (بند ۹-۵) باشد،

۱۲-۱-۸ تاریخ دریافت موارد آزمون و تاریخ اجرای آزمون‌ها،

۱۲-۱-۹ انحراف اضافی یا نقصانی از روش آزمون،

۱۲-۱-۱۰ شرحی از ریخت‌شناسی سلول‌های در تماس با استخراج، نمونه شاهد و محلول روی سولفات همراه با جمله‌ای در این مضمون که آیا این یافته‌ها یک پاسخ سمی یا غیر سمی را نشان می‌دهد،

۱۲-۱-۱۱ نام، نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده،

۱۲-۱-۱۲ جمله‌ایی در این مضمون که این نتایج فقط به موارد آزمون شده مربوط می‌شود و این گزارش آزمون نباید بدون تایید مکتوب آزمایشگاه و بطور ناقص مجدداً چاپ شود.

هرگاه گزارش‌ها با در نظر گرفتن خطاها و حذفیات مجدداً صادر می‌شود، باید نتایج آزمون‌های اضافی در توافق با یکی از دو روش زیر باشد:

- یک گزارش اضافی حاوی اطلاعات اضافی یا فقط تصحیحات و جمله مشخص "متمم گزارش آزمون، مرجع..." صادر کنید،
- یک گزارش اصلاحی کامل (که معمولاً انتخاب ارجح است) با یک جمله که در زیر تاریخ اصلی صدور گزارش عبارت زیر را بیان می‌کند " صدور مجدد با تصحیح/داده‌های اضافی/ وغیره (در صورت نیاز): (تاریخ)" صادر کنید.

1 - Chain of custody

کلیه نتایج قبلی موارد آزمون شده باید در هر گزارشی که مجدداً صادر می‌شود، نتایج آزمون‌های اضافی را در برگیرد.
هرگاه بطور کامل صدور یک نتیجه آزمون جدید ضروری باشد، این نتیجه آزمون باید بطور واحد شناسایی شود و شامل یک ارجاع به نتیجه آزمون اصلی که این نتیجه آزمون جایگزین آن خواهد شد، باشد.
در گزارش‌هایی که فقط بر اساس برخی بخش‌های استانداردهای BS 6920-2 می‌باشد، باید شامل جمله "هیچ آزمون دیگری برای این محصول بر عهده گرفته نشده است" باشد.

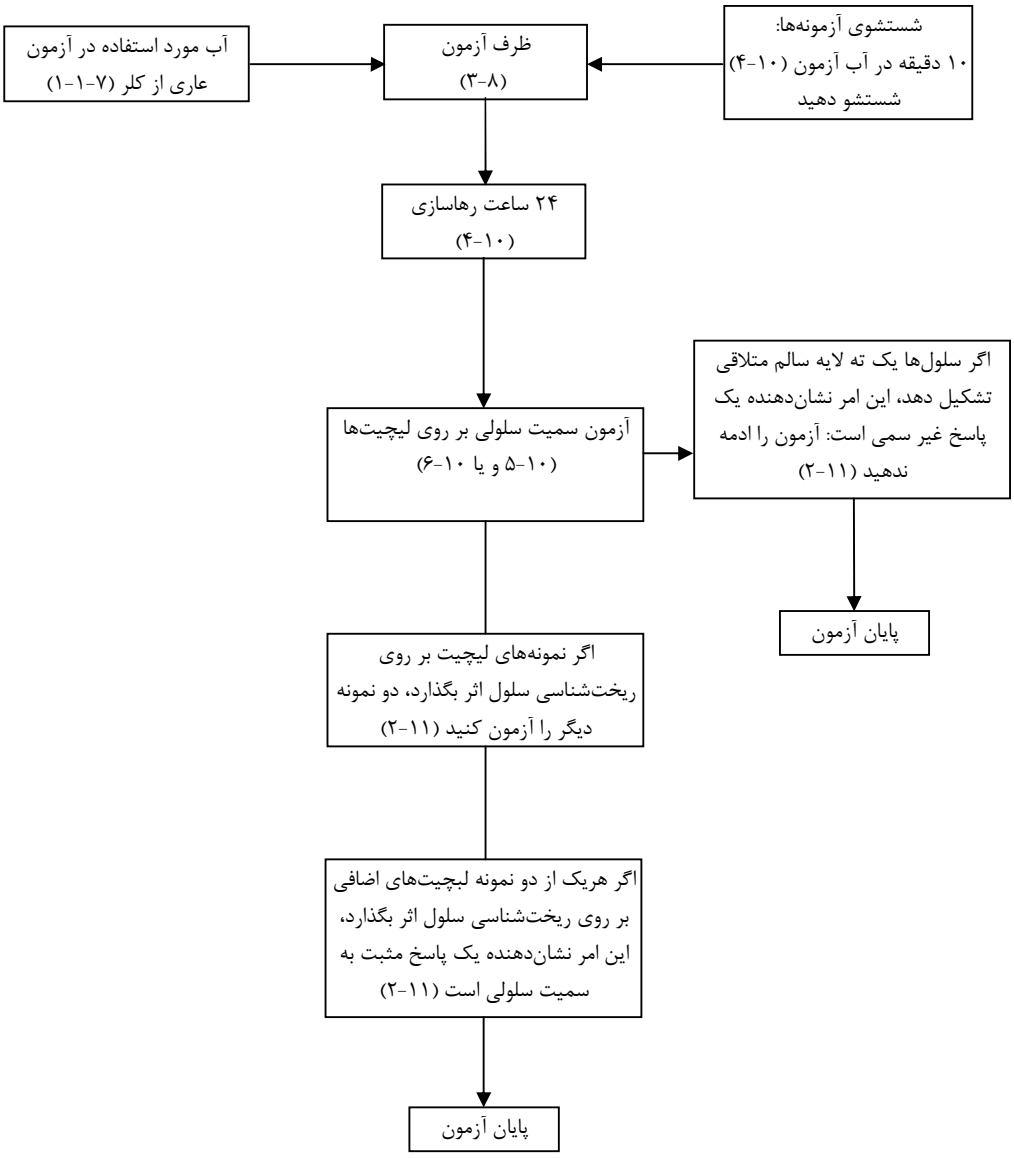
۱۲-۲ آزمون مجدد با استفاده از آب مورد استفاده در آزمون سرد طبق شرایط استاندارد BS 6920-3

اگر محصولی در توافق با آزمون‌های دمای بالا پذیرفته نشود و سپس در آزمون آب سرد پذیرفته شود و نتایج رضایت‌بخشی بدست آورد، هر دو دسته نتایج باید در گزارش نهایی درج شود.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

مراحل آزمون



شکل الف-۱- مراحل آزمون

ICS: 13.060.20

صفحه : ۱۴