



Treaty Series No. 107 (1970)

Revised Text of
Annex 9 to the Protocol
to the European Agreement on the
Exchange of Therapeutic Substances of
Human Origin

adopted by the Committee of Ministers of the
Council of Europe on 30 April 1970

*Presented to Parliament
by the Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs
by Command of Her Majesty
December 1970*

LONDON

HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE

2s. 6d. [12½p] net

**REVISED TEXT OF ANNEX 9 TO THE PROTOCOL
TO THE EUROPEAN AGREEMENT ON THE EXCHANGE
OF THERAPEUTIC SUBSTANCES OF HUMAN ORIGIN**

CERTIFICATE OF THE SECRETARY GENERAL

Whereas it is stated in the fourth paragraph of Article 4 of the European Agreement on the Exchange of Therapeutic Substances of Human Origin⁽¹⁾ that the Protocol and its Annexes⁽²⁾ may be amended or supplemented by the Governments of the Contracting Parties to the said Agreement;

Whereas, at the 187th meeting of the Ministers' Deputies (Committee of Ministers) held in Strasbourg from 2nd to 7th March 1970, the representatives of the Governments of Belgium, Cyprus, Denmark; France, the Federal Republic of Germany, Ireland, Italy, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Sweden, Switzerland, Turkey and the United Kingdom, Contracting Parties to the said Agreement, approved the revised text of Annex 9 to the Protocol to the European Agreement on the Exchange of Therapeutic Substances of Human Origin;

Whereas at the same meeting, the representatives of the above-mentioned Governments further agreed that the Governments of the Contracting Parties to the Agreement, which are not represented on the Committee of Ministers, should be invited to make known, by a specific date, their agreement to the revised text and that, after the expiry of this time-limit, any Government so invited which had not replied to the invitation would be deemed to have given its tacit approval.

Whereas by letters of the Secretary General, dated 23rd March 1970, the Governments of Greece and of the Principality of Liechtenstein, Contracting Parties to the Agreement, but not represented on the Committee of Ministers, were invited to make known their agreement to the said revised text before 30th April 1970, date on which the revised text would be considered as definitively adopted in the absence of any objection on the part of a Government of a Contracting Party;

Whereas by letter of 4th May 1970, the Head of the Government of the Principality of Liechtenstein made known to the Secretary General the agreement of the princely Government to the said revised text and the Government of Greece has not replied to the invitation addressed to it on 23rd March 1970,

The Secretary General hereby certifies as follows :

The following text constitutes Annex 9 to the Protocol to the European Agreement on the Exchange of Therapeutic Substances of Human Origin.

⁽¹⁾ Treaty Series No. 27 (1965), Cmnd. 2591.

⁽²⁾ The revised text of the Protocol, as approved in January 1968, was published as Treaty Series No. 110 (1968), Cmnd. 3822.

TEXTE RÉVISÉ
DE L'ANNEXE 9 AU PROTOCOLE À L'ACCORD
EUROPÉEN RELATIF À L'ÉCHANGE DE SUBSTANCES
THÉRAPEUTIQUES D'ORIGINE HUMAINE

PROCÈS-VERBAL DU SECRÉTAIRE GÉNÉRAL

Considérant que le quatrième alinéa de l'article 4 de l'Accord européen relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine énonce que le Protocole et ses annexes pourront être modifiés ou complétés par les Gouvernements des Parties audit Accord;

Considérant que les représentants des Gouvernements de la Belgique, de Chypre, du Danemark, de la France, de la République Fédérale d'Allemagne, de l'Irlande, de l'Italie, du Luxembourg, de Malte, des Pays-Bas, de la Norvège, de la Suède, de la Suisse, de la Turquie et du Royaume-Uni, Parties Contractantes audit Accord, ont approuvé, au cours de la 187^e réunion des Délégués des Ministres (Comité des Ministres), tenue à Strasbourg du 2 au 7 mars 1970, le texte révisé de l'Annexe 9 du Protocole à l'Accord européen relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine;

Considérant qu'au cours de la même réunion, les représentants des Gouvernements susmentionnés ont en outre convenu que les Gouvernements des Parties Contractantes à l'Accord, qui ne sont pas représentés au Comité des Ministres, seraient invités à faire connaître, dans un délai ferme, leur accord avec ledit texte révisé et que, passé ce délai, tout Gouvernement ainsi invité qui n'aurait pas répondu à l'invitation serait considéré comme ayant approuvé tacitement le texte révisé;

Considérant que par lettres du Secrétaire Général, datées du 23 mars 1970, les Gouvernements de la Grèce et de la Principauté de Liechtenstein, Parties Contractantes à l'Accord, mais non représentées au Comité des Ministres, ont été invités à faire connaître leur accord avec ledit texte révisé avant le 30 avril 1970, date à laquelle le texte révisé serait considéré comme définitivement arrêté, sauf objection de la part d'un Gouvernement d'une Partie Contractante;

Considérant que par lettre du 4 mai 1970, le Chef du Gouvernement de la Principauté de Liechtenstein a fait connaître au Secrétaire Général l'accord du Gouvernement princier avec ledit texte révisé et que le Gouvernement de la Grèce n'a pas répondu à l'invitation qui lui avait été adressée le 23 mars 1970,

Le Secrétaire Général certifie, par les présentes, ce qui suit :

Le texte ci-après constitue l'Annexe 9 au Protocole à l'Accord européen relatif à l'échange de substances thérapeutiques d'origine humaine.

ANNEX 9 TO THE PROTOCOL
COUNCIL OF EUROPE

*European Agreement on the Exchange
of Therapeutic Substances of Human Origin*

FREEDOM FROM TOXICITY OF PLASTICS BLOOD
TRANSFUSION EQUIPMENT

I. Chemical tests

The tests are intended to be applied to plastics blood transfusion equipment. This equipment consists of two main categories:

- (1) plastics containers for the collection, separation and storage of blood and blood products;
- (2) plastics sets for taking and giving blood.

The tests shall be carried out on the materials after they have been sterilised by the method to be used in the final sterilisation of the equipment. These materials shall include:

- 1) the plastics used to make the containers,
- 2) the tubing used in the containers and
- 3) the blood-taking and giving sets.

The tests on containers shall be carried out before the containers are filled with anticoagulant solution. However, if the tests are carried out on containers which have been filled with anticoagulant solution, the limit tests in Section III on the anticoagulant solution itself shall be taken into account when evaluating the results of the tests on the container.

The manufacturer of the transfusion equipment is required to disclose to the appropriate health authority the detailed formulations of the plastics material or materials and other materials used in the manufacture of the equipment, the source of the components of the material or materials and their methods of manufacture (or alternatively, the compound reference numbers), details of manufacture of the equipment, the nature of any processing additives and adhesives and the method of sterilisation. No change shall be permitted in any of the foregoing without prior submission to and approval of the appropriate health authority.

Each batch of raw material used in the manufacture of the equipment shall be identified by a batch number, which shall be recorded by the manufacturer of the equipment together with the identification numbers of all batches of transfusion equipment made from it and the results of all tests relevant to these batches.

ANNEXE 9 AU PROTOCOLE
CONSEIL DE L'EUROPE

*Accord européen relatif à l'échange de substances
thérapeutiques d'origine humaine*

INNOCUITE DES APPAREILLAGES DE TRANSFUSION SANGUINE
EN MATIERE PLASTIQUE

I. Essais chimiques

Les essais sont à effectuer sur les appareillages de transfusion sanguine en matière plastique. Ces appareillages se composent de deux catégories principales d'éléments :

- (1) des récipients en matière plastique destinés à la collecte, à la séparation et à la conservation du sang et des produits sanguins;
- (2) un équipement en matière plastique pour le prélèvement et l'administration du sang.

Le matériel sera soumis aux essais après avoir été stérilisé selon la méthode qui sera employée pour la stérilisation définitive de l'appareillage. Ce matériel comprendra :

- 1) la matière plastique employée pour fabriquer les récipients,
- 2) les tuyaux se trouvant dans les récipients,
- 3) l'équipement de prélèvement et d'administration du sang.

Les récipients doivent être soumis aux essais avant leur remplissage avec la solution anticoagulante. Cependant, si les essais sont effectués sur des récipients qui ont été remplis avec la solution anticoagulante, les essais-limite sur la solution anticoagulante elle-même, prescrits au chapitre III doivent être pris en considération lors de l'évaluation des résultats des essais auxquels le récipient a été soumis.

Le fabricant d'appareillage de transfusion est tenu de dévoiler aux autorités sanitaires compétentes la formulation détaillée de la ou des matières plastiques et de toute autre substance utilisée pour la fabrication de l'appareillage, ainsi que d'indiquer l'origine des composés entrant dans la fabrication de la ou des matières, leur méthode de fabrication (ou, à défaut, les numéros de référence composé), les méthodes détaillées de fabrication de l'appareillage, la nature de tout additif et adhésif employés en cours de production, ainsi que le mode de stérilisation. Aucune modification ne peut être apportée aux données ci-dessus si elle n'a pas été communiquée au préalable à l'autorité sanitaire compétente et approuvée par elle.

Chaque lot de matière première utilisée pour la fabrication de l'appareillage est identifié par un numéro qui est consigné par le fabricant, en même temps que les numéros d'identification de tous les lots d'appareillages de transfusion fabriqués à partir de cette matière première et les résultats de toutes les analyses auxquelles ils ont été soumis.

Every practicable precaution must be taken to reduce the risk of adventitious contamination at each stage of the manufacturing process.

A. PREPARATION OF EXTRACT AND BLANK

(a) A total test as described below requires 1,250 cm² plastics (total surface area, both sides, of a plastics sample in sheet form with surface area of 625 cm²). The sample—without any printing or label on it—should be cut into pieces of not more than 10 cm².

For tubing the length (L) in cm is calculated as follows:

$$L = \frac{1250}{3 \cdot 14 (D_1 + D_2)}$$

D₁ = inner diameter cm

D₂ = outer diameter cm

The tubing should be cut lengthwise into sections measuring approximately 10 cm. For the extraction 10 ml of water is used per surface area of 50 cm².

(b) The pieces of plastics film or tubing should be placed in a container of borosilicate glass with 250 ml pyrogen-free distilled water obtained from an efficient still having glass condensation surfaces and collecting tubes.⁽¹⁾ The opening of the container is covered with an inverted beaker and the container is then heated in saturated steam at 110°C for 30 minutes (autoclaving) and then quickly cooled to room temperature and the volume adjusted to 250 ml with pyrogen-free distilled water. It is of no significance if the plastics specimens tend to stick together slightly.

Heat-sensitive plastics material, instead of being heated in an autoclave, may be heated at 70° C for 72 hours.

A blank preparation is made in a corresponding manner omitting the plastics.

B. TESTS ON THE EXTRACT

1. OXIDISABLE MATTER

To 20 ml of the extract in an Erlenmeyer flask of borosilicate glass add 20 ml of 0.01N potassium permanganate solution and 1.0 ml of 2N sulphuric acid and boil the mixture for 3 minutes. Cool the solution rapidly and add 0.1 g of potassium iodide and 5 drops of starch solution. Titrate with 0.01N sodium thiosulphate solution. At the same time carry out a blank titration. The difference in the volume of thiosulphate used in the two titrations does not exceed 2.00 ml of 0.01N sodium thiosulphate.

⁽¹⁾ If the plastics have been in contact with an anticoagulant solution, the pieces should first be placed in a similar container with cold distilled water (100 ml) and shaken several times. This should be repeated once.

Toutes les précautions possibles doivent être prises pour diminuer les risques de contamination accidentelle à chaque stade de fabrication.

A. PRÉPARATION DE L'EXTRAIT ET DE LA SUBSTANCE TÉMOIN

(a) Pour effectuer un essai complet tel qu'il est décrit ci-dessous, on utilise 1.250 cm² de matière plastique (surface totale des deux faces d'un échantillon constitué par une feuille de matière plastique dont chaque face mesure 625 cm²). L'échantillon qui ne porte aucune indication écrite ou étiquette doit être découpé en morceaux de 10 cm² au maximum.

La longueur (L) en cm des tuyaux est calculée comme suit:

$$L = \frac{1250}{3,14 (D_1 + D_2)}$$

D₁ = diamètre intérieur en cm

D₂ = diamètre extérieur en cm

Les tuyaux doivent être découpés dans le sens de la longueur, en tronçons de 10 cm environ. Pour l'extraction on utilise 10 ml d'eau par 50 cm².

(b) Les morceaux de pellicule ou de tuyau en matière plastique doivent être introduits dans un récipient de verre borosilicaté avec 250 ml d'eau distillée apyrogène provenant d'un alambic efficace muni de surfaces de condensation et de tubes de captage en verre.⁽¹⁾ L'ouverture du récipient est recouverte d'un becher renversé et le récipient est ensuite réchauffé dans la vapeur saturée à 110°C pendant 30 minutes (dans l'autoclave) et rapidement refroidi à la température de la pièce, puis le volume est porté à 250 ml par addition d'eau distillée apyrogène. Il n'est pas nécessaire de tenir compte d'une éventuelle légère adhérence entre les échantillons de matière plastique.

Au lieu d'être chauffées dans un autoclave, les matières plastiques sensibles à la chaleur peuvent être chauffées à 70° pendant 72 heures.

Une solution témoin correspondante est préparée sans les matières plastiques.

B. ESSAIS SUR L'EXTRAIT

1. MATIÈRES OXYDABLES

A 20 ml de l'extrait contenus dans une fiole Erlenmeyer de verre borosilicaté, ajoutez 20 ml de solution de permanganate de potassium 0,01N et 1,0 ml d'acide sulfurique 2N, et faites bouillir le mélange pendant 3 minutes. Refroidissez la solution rapidement et ajoutez 0,1 g d'iodure de potassium et 5 gouttes de solution d'amidon. Titrer par une solution de thiosulfate de sodium 0,01N en effectuant un titrage parallèle avec la solution témoin. La différence entre la quantité de thiosulfate utilisée dans les deux titrages ne dépasse pas 2,00 ml de thiosulfate de sodium 0,01N.

⁽¹⁾ Dans le cas de matières plastiques qui ont été en contact avec une solution anticoagulante, les morceaux devraient être introduits d'abord dans un récipient semblable contenant de l'eau distillée froide (100 ml), qui est agité plusieurs fois. Cette opération doit être répétée une fois encore.

2. CHLORIDE

The extract complies with a suitable limit test for chloride equivalent to not more than 400 microgrammes Cl' per litre.

3. AMMONIA

The extract complies with a suitable limit test for ammonia equivalent to not more than 2.0 mg NH₃ per litre.

4. PHOSPHORIC ACID—PHOSPHATE

The extract complies with the limit test for phosphate.

Limit test for phosphate

Evaporate 25 ml of the extract almost to dryness in a Kjeldahl flask, cool the residue, add 2 drops sulphuric acid and 1 ml nitric acid, heat the mixture until white fumes appear, then cool. Add 1 drop of perchloric acid and heat gently for half an hour. Cool the residue and add water to 25 ml. Transfer 10 ml of the solution to a 25 ml titration flask, add 8 ml ammonium molybdate-sulphuric acid solution and 2 ml of freshly prepared 10 per cent w/v solution of ascorbic acid. Heat on a water bath at 50°C for thirty minutes, cool and dilute the mixture to 25 ml. The green or blue colour of the solution is not more intense than that obtained by treating 25 ml of the blank solution in the same manner.

5. ACIDITY OR ALKALINITY

10 ml of the extract is not coloured red on the addition of 2 drops of phenolphthalein solution and requires not more than 0.4 ml of 0.01N sodium hydroxide to produce a red colour. After removal of the colour by the addition of 0.8 ml 0.01N hydrochloric acid, the addition of 5 drops of methyl red solution produces a red or orange-red colour.

6. RESIDUE ON EVAPORATION

Evaporate 100 ml of the extract to dryness on a water bath and dry at 105°C to constant weight. The residue weighs not more than 5.0 mg.

7. CLARITY AND COLOUR

The extract when viewed through a thickness of 5 cm is clear and colourless when compared with the blank.

8. TASTE AND SMELL

The extract compared with the blank is odourless and tasteless.

9. SPECIAL ELEMENTS

The extract complies with suitable limit tests for

- (i) any of the following elements: arsenic, chromium, copper, lead, silicon, silver and tin, equivalent to 1.0 ppm
- (ii) cadmium equivalent to 0.1 ppm

2. CHLORURE

L'extrait satisfait à un essai-limite approprié pour les chlorures correspondant à un maximum de 400 microgrammes de Cl' par litre.

3. AMMONIAQUE

L'extrait satisfait à un essai-limite approprié pour l'ammoniaque correspondant à un maximum de 2,0 mg de NH₃ par litre.

4. ACIDE PHOSPHORIQUE—PHOSPHATE

L'extrait satisfait à l'essai-limite des phosphates.

Essai-limite des phosphates

Faites évaporer 25 ml de l'extrait presque à sec dans une fiole Kjeldahl, refroidissez le résidu, ajoutez 2 gouttes d'acide sulfurique et 1 ml d'acide nitrique, chauffez le mélange jusqu'à dégagement de vapeurs blanches et refroidissez. Ajoutez une goutte d'acide perchlorique et chauffez doucement pendant une demi-heure. Refroidissez le résidu et ajoutez de l'eau pour obtenir 25 ml. Transvasez 10 ml de la solution dans une fiole de titrage de 25 ml, ajoutez 8 ml de solution de molybdate d'ammonium-acide sulfurique et 2 ml d'une solution d'acide ascorbique à 10% p/v récemment préparée. Chauffez au bain-marie à 50°C pendant 30 minutes, refroidissez et étendez le mélange à 25 ml. La coloration verte ou bleue de la solution n'est pas plus intense que celle obtenue en traitant 25 ml de la solution témoin de la même façon.

5. RÉACTION

10 ml de l'extrait ne prennent pas une coloration rouge par addition de 2 gouttes de solution de phénolphtaléine et n'exigent pas plus de 0,4 ml d'hydroxyde de sodium 0,01N pour donner une coloration rouge. Après élimination de cette coloration par addition de 0,8 ml d'acide chlorhydrique 0,01N, l'addition de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle donne une coloration rouge ou rouge-orangée.

6. RÉSIDU À L'ÉVAPORATION

Faites évaporer 100 ml de l'extrait à sec au bain-marie et séchez à 105°C jusqu'à poids constant. Le résidu ne pèse pas plus de 5,0 mg.

7. LIMPIDITÉ ET COULEUR

L'extrait, observé à travers une épaisseur de 5 cm, est limpide et incolore lorsqu'il est comparé à la solution témoin.

8. SAVEUR ET ODEUR

Comparé à la solution témoin, l'extrait est inodore et sans saveur.

9. ÉLÉMENTS SPÉCIAUX

L'extrait satisfait aux essais-limite approprié pour

- (i) l'un quelconque des éléments suivants: arsenic, chrome, cuivre, plomb, silicium, argent et étain, correspondant à 1,0 ppm
- (ii) le cadmium correspondant à 0,1 ppm

10. RESIDUE ON IGNITION

1.0 g of the plastics material when ignited to constant weight leaves not more than 1 mg of residue.

11. HEAVY METALS

Dissolve the residue on ignition in the minimum quantity of 2N hydrochloric acid, heating if necessary. Carry out a suitable limit test for heavy metals. The plastics material complies with a limit not exceeding 5 microgrammes per gramme calculated as Pb.

II. Biological tests

(1) A test for undue toxicity shall be carried out in the initial evaluation of plastics formulations intended for the fabrication of containers and taking and giving sets, using extract A, and on each new batch of materials of the approved formulations, using extract B, by the procedure specified in the national pharmacopoeia or some other method approved by the national control authority. (Extracts A and B are defined in the note below.)

(2) A test for freedom from pyrogens shall be carried out in the initial evaluation of plastics formulations intended for the fabrication of containers and taking and giving sets, using extract A, and on each new batch of materials of the approved formulation, using extract C, and in the routine control of containers and taking and giving sets, using extract C, by the procedure specified in the national pharmacopoeia or some other method approved by the national control authority.

The incidence of pyrogen testing, using extract C, shall be decided by the national control authority.

(Extracts A and C are defined in the note below.)

(3) A test for haemolytic effects in buffered systems shall be performed in the initial evaluation of plastics formulations intended for the fabrication of containers and taking and giving sets and on each new batch of materials of the approved formulations using the extract described in paragraph I. A above. (For method and acceptable limit see Appendix to the present Annex.)

(4) A test for the *in vivo* survival of red cells shall be carried out in the initial evaluation of plastics formulations intended for the fabrication of containers for blood. If any change is made in the agreed formulation, the test shall be repeated. (For suggested methods and acceptable limit, see Appendix to the present Annex.)

Note

Extract A is prepared by adding to the extract described in I. A above pyrogen-free sodium chloride to a final concentration of 0.9% w/v.

10. RÉSIDU À L'INCINÉRATION

1,0 g des matières plastiques, incinéré à poids constant, ne doit pas laisser de résidu dépassant 1 mg.

11. MÉTAUX LOURDS

Dissolvez le résidu à l'incinération dans une quantité minimum d'acide chlorhydrique 2N en chauffant, le cas échéant. Effectuez un essai-limite approprié pour les métaux lourds. La matière plastique satisfait à une limite ne dépassant pas 5 microgrammes par gramme, calculée comme Pb.

II. Analyses biologiques

(1) La recherche d'un excès de toxicité sera effectué lors de l'analyse initiale des formulations des matières plastiques destinées à la fabrication des flacons et des dispositifs de prélèvement et d'injection, à l'aide de l'extrait A, et pour chaque nouveau lot de matières de la formulation approuvée, à l'aide de l'extrait B, selon la procédure prescrite dans la pharmacopée nationale ou toute autre méthode approuvée par l'autorité nationale chargée du contrôle (la composition des extraits A et B est indiquée dans la note ci-dessous).

(2) Le contrôle d'apyrogénéité sera effectué lors de l'analyse initiale des formulations des matières plastiques destinées à la fabrication des flacons et des dispositifs de prélèvement et d'injection, à l'aide de l'extrait A, et pour chaque nouveau lot de matières de la formulation approuvée, à l'aide de l'extrait C, et lors du contrôle courant des flacons et des dispositifs de prélèvement et d'injection, à l'aide de l'extrait C, selon la procédure prescrite dans la pharmacopée nationale ou toute autre méthode approuvée par l'autorité nationale chargée du contrôle.

L'incidence des contrôles d'apyrogénéité, à l'aide de l'extrait C, sera déterminée par l'autorité nationale chargée du contrôle.

(La composition des extraits A et C est indiquée dans la note ci-dessous.)

(3) L'analyse des effets hémolytiques dans un système tamponné sera effectuée lors de l'analyse initiale des formulations des matières plastiques destinées à la fabrication des récipients et de l'équipement pour le prélèvement et l'administration du sang et portera sur chaque nouveau lot de matière répondant aux formulations approuvées, à l'aide de l'extrait exposé sous I. A ci-dessus. (Pour la méthode et les limites acceptables, voir appendice à la présente annexe.)

(4) Un test de survie in vivo des globules rouges sera effectué lors de l'analyse initiale des formulations des matières plastiques destinées à la fabrication des flacons de sang. Si quelque modification est apportée à la formulation convenue, le test est répété. (Voir les méthodes proposées et les limites acceptables figurant à l'appendice de la présente annexe.)

Note

Extrait A : ajouter à l'extrait décrit sous I. A ci-dessus du chlorure de sodium apyrogène jusqu'à obtention finale d'une concentration de 0,9% p/v.

Extract B :

Transfusion Set. Fill a transfusion set as completely as possible with sterile pyrogen-free sodium chloride solution, 0.9% w/v., clamp the ends securely and immerse the filled set completely for one hour in water maintained at 85°C. Collect the contents of the set.

Plastics Container. If the container is filled with anticoagulant solution it should be emptied and rinsed twice with 250 ml portions of sterile pyrogen-free distilled water at a temperature of 20°C. Fill the container with 100 ml sterile pyrogen-free sodium chloride solution, 0.9% w/v, close it securely and immerse it for one hour in a horizontal position in water maintained at 85°C. Collect the contents of the container.

Extract C :

Transfusion Set. Pass 40 ml portions of sterile pyrogen-free sodium chloride solution, 0.9% w/v, at room temperature through not less than ten transfusion sets at a flow rate of approximately 10 ml per minute and pool the effluents. Test the solution obtained.

Plastics Container. Empty : Pass 100 ml portions of sterile pyrogen-free sodium chloride solution, 0.9% w/v, at room temperature through the collecting tubes of not less than four plastics containers, allow to remain in the containers for ten minutes and pool the effluent by discharging through the transfer tubes. Test the solution obtained.

Plastics Container with anticoagulant (See paragraph III).

APPENDIX

BIOLOGICAL TEST: LIMITS AND METHODS

A. TEST FOR UNDUE TOXICITY

(See Item II, 1 of Annex above): limit as specified in national pharmacopoeia.

B. TEST FOR FREEDOM FROM PYROGENS

(See Item II, 2 of Annex above): limit as specified in national pharmacopoeias.

C. TEST FOR HAEMOLYTIC EFFECTS IN BUFFERED SYSTEMS

(See Item II, 3 of Annex above):

(a) *Limit :*

0.05% salt solution shall not produce a haemolysis value higher than 10 per cent and 0.40% salt solution shall not differ by more than 10% in haemolysis value from that caused by the corresponding control solution.

Extrait B :

Appareil de transfusion : remplir un appareil de transfusion, aussi complètement que possible, d'une solution stérile et apyrogène à 0,9% p/v de chlorure de sodium, en fixer les extrémités et immerger complètement l'appareil ainsi rempli pendant une heure dans de l'eau maintenue à 85°. Recueillir le contenu de l'appareil.

Récipient en matière plastique : si le récipient est rempli d'une solution anticoagulante, il convient de le vider et de le rincer deux fois avec 250 ml d'eau distillée stérile et apyrogène à une température de 20°. Remplir le récipient de 100 ml de solution stérile et apyrogène à 0,9% p/v de chlorure de sodium, le boucher soigneusement et l'immerger pendant une heure en position horizontale dans de l'eau maintenue à 85°. Recueillir le contenu du récipient.

Extrait C :

Appareil de transfusion : passer 40 ml de solution de chlorure de sodium stérile et apyrogène à 0,9% p/v, à température ambiante, à travers 10 appareils de transfusion au moins, à raison de 10 ml environ par mn et recueillir l'effluent. Analyser la solution ainsi obtenue.

Récipient en matière plastique : vider le récipient : passer 100 ml de solution stérile et apyrogène à 0,9% p/v de chlorure de sodium à température ambiante, à travers les tuyaux de captage de quatre récipients en matière plastique au moins, laisser reposer dans les récipients pendant 10 mn et recueillir l'effluent par évacuation à travers les tuyaux de transfert. Analyser la solution ainsi obtenue.

Récipient en matière plastique contenant un anticoagulant (Voir paragraphe 111).

APPENDICE

ANALYSE BIOLOGIQUE : LIMITES ET METHODES

A. ANALYSE CONCERNANT LA RECHERCHE D'UN EXCÈS DE TOXICITÉ

(Voir II, 1 de l'annexe ci-dessus) : limite prescrite dans la pharmacopée nationale.

B. ANALYSE CONCERNANT LE CONTRÔLE D'APYROGÉNÉITÉ

(Voir II, 2 de l'annexe ci-dessus) : limite prescrite dans la pharmacopée nationale.

C. ANALYSE DES EFFETS HÉMOLYTIQUES DANS UN SYSTÈME TAMPONNÉ

(Voir II, 3 de l'annexe ci-dessus) :

(a) Limite

Une solution de chlorure de sodium à 0,50% ne doit pas donner de valeur d'hémolyse supérieure à 10%, et la valeur d'hémolyse d'une solution salée à 0,40% ne doit pas différer de plus de 10% de la valeur obtenue avec la solution-témoin correspondante.

(b) Method :

From the primary buffer stock solution for haemolysis three solutions are prepared: 30 ml buffer stock solution and 10 ml water (solution a₀), 30 ml buffer stock solution and 20 ml water (solution b₀) and 15 ml buffer stock solution and 85 ml water (solution c₀).

To each of three centrifuge tubes (1, 2 and 3), 1.40 ml extract are added. To tube 1 is added 0.10 ml a₀; to tube 2, 0.10 ml b₀ and tube 3, 0.10 ml c₀, thus obtaining salt solutions corresponding to 0.50% (tube 1), 0.40% (tube 2) and 0.10% (tube 3) of sodium chloride in so far as electrolyte osmotic action is concerned. To each tube is added 0.020 ml fresh, well mixed heparinised human blood. The tubes are put into water bath at 30°C (± 1°) for 40 minutes. Then three solutions containing 3.0 ml a₀ and 12.0 ml water (solution a₁), 4.0 ml b₀ and 11.0 ml water (solution b₁), and 4.75 ml b₀ and 10.25 ml water (solution c₁) are prepared.

To the first tube is added 1.50 ml of a₁, to the second 1.50 ml of b₁ and to the third 1.50 ml of c₁. The tubes are centrifuged for 5 minutes at 2,000 to 2,500 r.p.m. in a swing-out centrifuge. Concurrently, control solutions, in which the extract is replaced with water, are prepared for each of the concentrations.

The extinction at 540 nm of the liquid layer is measured. Buffer stock solution for haemolysis is used as blank. The haemolysis value in per cent is calculated according to the following formula:

$$\frac{E_{\text{exp}}}{E_{100\%}} \times 100$$

where E_{100%} = extinction for 0.10% salt solution

and E_{exp} = extinction for 0.40 and 0.50% salt solution respectively.

Buffer stock solution for haemolysis

90.0 g sodium chloride, 13.7 g anhydrous disodium phosphate and 1.90 g anhydrous monosodium phosphate are dissolved in distilled water and made up to 1000.0 ml.

D. TEST FOR THE IN VOVO SURVIVAL OF RED CELLS

(See Item II, 4 of Annex above):

(a) Limit :

Whole human blood in ACD anticoagulant which has been stored for 21 days at 4–6°C shall have a 24-hour post-transfusion survival value of at least 70%. This can be determined according to one of the methods proposed in (b) below.

(b) Suggested methods

1. Method of ISO/TC/76/WGD/3, App. E.

(b) *Méthode :*

A partir de la solution tampon-mère pour hémolyse, on prépare trois solutions: 30 ml de la solution-mère et 10 ml d'eau (solution a₀), 30 ml de la solution-mère et 20 ml d'eau (solution b₀) et 15 ml de la solution-mère et 85 ml d'eau (solution c₀).

Dans trois tubes à centrifugation (1, 2 et 3), on ajoute 1,40 ml d'extrait. Dans le tube 1, on ajoute 0,10 ml de solution a₀; dans le tube 2, 0,10 ml de solution b₀ et dans le tube 3, 0,10 ml de solution c₀; on obtient donc des solutions salées correspondant à 0,50% (tube 1), à 0,40% (tube 2) et à 0,10% (tube 3) en chlorure de sodium, en ce qui concerne l'action osmotique de l'électrolyte. On ajoute dans chaque tube 0,020 ml de sang humain épariné, frais et bien homogénéisé. Les tubes sont placés dans un bain-marie à 30°C (± 1°) pendant 40 minutes. Puis on prépare trois solutions contenant 3,0 ml de a₀ et 12,0 ml d'eau (solution a₁); 4,0 ml de b₀ et 11,0 ml d'eau (solution b₁) et 4,75 ml de b₀ et 10,25 ml d'eau (solution c₁).

Dans le tube 1, on met 1,50 ml de a₁, dans le tube 2, 1,50 ml de b₁ et dans le tube 3, 1,50 ml de c₁. Les tubes sont alors centrifugés 5 minutes entre 2.000 et 2.500 t.p.m. dans une centrifugeuse "swing-out". En même temps, des solutions-témoins dans lesquelles l'extrait est remplacé par de l'eau sont préparées pour chaque concentration.

L'extinction à 540 nm due à la couche liquide est mesurée. Comme référence on utilise la solution tampon-mère pure. La valeur de l'hémolyse en % est calculée par la formule suivante:

$$\frac{E_{\text{exp}}}{E_{100\%}} \times 100$$

où E_{100%} = extinction pour une solution saline à 0,10%

E_{exp} = extinction pour respectivement des solutions salines à 0,40 et 0,50%.

Solution tampon-mère pour mesurer le taux d'hémolyse

90,0 g de chlorure de sodium, 13,7 g de phosphate disodique anhydre et 1,90 g de phosphate monosodique anhydre sont dissous dans de l'eau distillée, dont on ajuste le volume à 1000,0 ml.

D. TEST DE SURVIE IN VIVO DES GLOBULES ROUGES

(Voir II, 4 de l'annexe ci-dessus):

(a) *Limite :*

Le sang humain complet en présence d'une solution anticoagulante ACD, après une conservation de 21 jours à 4°-6°C, doit avoir une survie, 24 heures après la transfusion, d'au moins 70%. Ceci peut être déterminé selon une des méthodes proposées sous (b) ci-après.

(b) *Méthodes proposées :*

1. Méthode de ISO/TC/76/WGD/3, App. E.

2. Ashby Technique—Ashby, W. The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man.

J. Exp. Med. 29: 267-82, 1919.

Young, L. E., Platzer, R. F., and Rafferty, J. A. Differential agglutination of human erythrocytes.

J. Lab. Clin. Med. 32: 489-501, 1947.

3. The Gibson-Scheitlin method—Gibson, J. G., and Scheitlin, W. A. A method employing radio-active chromium for assaying the viability of human erythrocytes returned to the circulation after refrigerated storage.

J. Lab. Clin. Med. 46: 679-88, 1955.

4. The Strumia method—Strumia, M. M., Taylor, L., Sample, A. B., Colwell, L. S., and Dugan, A. Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with Cr 51.

Blood 10: 429-40, 1955.

5. Cr⁵¹-I¹²⁵ technique—Button, L. N., Gibson, J. G., and Walter, C. W. Simultaneous determination of the volume of red cells and plasma for survival studies of stored blood.

Transfusion 5: 143-148, 1965.

III. Requirements for anticoagulant solution in plastics containers

Each container shall contain the quantity and formulation of anticoagulant solution indicated on the label for the volume of blood to be collected.

The anticoagulant solution and/or the ingredients used in its preparation shall satisfy the requirements of the national pharmacopoeia of the country concerned.

The anticoagulant solution shall satisfy the requirements of the national pharmacopoeia of the country concerned with regard to limits for heavy metals, the absence of particulate matter, freedom from toxicity and pyrogenicity.

2. Ashby Technique—Ashby, W. The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man.

J. Exp. Med. 29: 267-82, 1919.

Young, L. E., Platzer, R. F., and Rafferty, J. A. Differential agglutination of human erythrocytes.

J. Lab. Clin. Med. 32: 489-501, 1947.

3. The Gibson-Scheitlin method—Gibson, J. G., and Scheitlin, W. A. A method employing radio-active chromium for assaying the viability of human erythrocytes returned to the circulation after refrigerated storage.

J. Lab. Clin. Med. 46: 679-88, 1955.

4. The Strumia method—Strumia, M. M., Taylor, L., Sample A. B., Colwell, L. S., and Dugan, A. Uses and limitations of survival studies of erythrocytes tagged with Cr51.

Blood 10: 429-40, 1955.

5. Cr⁵¹-I¹²⁵ technique—Button, L. N., Gibson, J. G., and Walter, C. W. Simultaneous determination of the volume of red cells and plasma for survival studies of stored blood.

Transfusion 5: 143-148, 1965.

III. Prescriptions relatives à la solution anticoagulante contenue dans les récipients en matière plastique

Chaque récipient doit contenir la quantité de solution anticoagulante spécifiée sur l'étiquette pour le volume de sang à prélever; la formulation de cette solution doit être celle qui est indiquée sur l'étiquette pour ledit volume de sang.

La solution anticoagulante et/ou les produits qui entrent dans sa préparation doivent satisfaire aux exigences de la pharmacopée nationale du pays intéressé.

La solution anticoagulante doit satisfaire aux exigences de la pharmacopée nationale du pays intéressé relatives aux limites pour les métaux lourds, à l'absence de matières solides, à l'innocuité et à l'apyrogénéité.

Done at Strasbourg this 21st day
of September 1970.

Fait à Strasbourg le 21 Septembre
1970.

LUJO TONCIC-SORINJ

Secretary General

Secrétaire Général

Printed in England by Her Majesty's Stationery Office