

# TRACTATENBLAD

VAN HET

KONINKRIJK DER NEDERLANDEN

---

---

JAARGANG 1971 Nr. 20

---

---

A. TITEL

*Europese Overeenkomst betreffende de uitwisseling van  
geneesmiddelen van menselijke oorsprong, met Bijlagen;  
Parijs, 15 december 1958*

B. TEKST

De tekst van Overeenkomst en Bijlagen is geplaatst in *Trb.* 1959, 118. Zie ook *Trb.* 1967, 142 en *Trb.* 1969, 109. Bijlage 9 bij het bij de Overeenkomst behorende Protocol is in overeenstemming met artikel 4, vierde lid, van de Overeenkomst gewijzigd door het Comité van Ministers tijdens de 187e bijeenkomst van de Plaatsvervangers, welke van 2 tot 7 maart 1970 te Straatsburg werd gehouden. De Engelse en de Franse tekst van de gewijzigde Bijlage luiden, blijkens een door de Secretaris-Generaal van de Raad van Europa opgesteld Proces-verbaal d.d. 21 september 1970, als volgt:

## **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

## Annexe 9 au Protocole Conseil de l'Europe

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

#### Innocuité des appareillages de transfusion sanguine en matière 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

numbers of all batches of transfusion equipment made from it and the results of all tests relevant to these batches.

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 cm<sup>2</sup> plastics (total surface area, both sides, of a plastics sample in sheet form with surface area of 625 cm<sup>2</sup>). The sample – without any printing or label on it – should be cut into pieces of not more than 10 cm<sup>2</sup>.

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

$$L = \frac{1250}{3.14 (D_1 + D_2)}$$

D<sub>1</sub> = inner diameter cm

D<sub>2</sub> = 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 cm<sup>2</sup>.

(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<sup>1</sup>). 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.

---

<sup>1</sup>) 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.

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.

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 cm<sup>2</sup> de matière plastique (surface totale des deux faces d'un échantillon constitué par une feuille de matière plastique dont chaque face mesure 625 cm<sup>2</sup>). L'échantillon qui ne porte aucune indication écrite ou étiquette doit être découpé en morceaux de 10 cm<sup>2</sup> au maximum.

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

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

D<sub>1</sub> = diamètre intérieur en cm

D<sub>2</sub> = 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 cm<sup>2</sup>.

(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<sup>1)</sup>. 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.

---

<sup>1)</sup> 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.

## 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.

### 2. Chloride

The extract complies with a suitable limit test for chloride equivalent to not more than 400 microgrammes Cl<sup>-</sup> per litre.

### 3. Ammonia

The extract complies with a suitable limit test for ammonia equivalent to not more than 2.0 mg NH<sub>3</sub> 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.

## 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. Titrez 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 0,01 N.

### 2. *Chlorure*

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

### 3. *Ammoniaque*

L'extrait satisfait à un essai-limite approprié pour l'ammoniaque correspondant à un maximum de 2,0 mg de NH<sub>3</sub> 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 0,01 N, l'addition de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle donne une coloration rouge ou rouge-orangée.

#### 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

#### 10. *Residue on ignition*

1.0 g of the plastic 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



### 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. Eléments 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. 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).

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.

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.

#### *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 1 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 the transfusion sets at a flow rate of approximately 10 ml per minute and pool the effluents. Test the solution obtained.

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.

#### *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.

*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 pharmacopoeia.

#### C. Test for haemolytic effects in buffered systems

(See Item II, 3 of Annex above):

##### (a) Limit:

0.50% 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.

##### (b) Method:

From the primary buffer stock solution for haemolysis three solutions are prepared: 30 ml buffer stock solution and 10 ml water (solution  $a_0$ ), 30 ml buffer stock solution and 20 ml water (solution  $b_0$ ) and 15 ml buffer stock solution and 85 ml water (solution  $c_0$ ).

To each of three centrifuge tubes (1, 2 and 3), 1.40 ml extract are added. To tube 1 is added 0.10 ml  $a_0$ , to tube 2, 0.10 ml  $b_0$  and tube 3, 0.10 ml  $c_0$ , thus obtaining salt solutions corresponding to 0.50% (tube 1), 0.40% (tube 2) and 0.10% (tube 3) of sodium chloride insofar 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 ( $\pm 1^\circ$ ) for 40 minutes. Then three solutions containing 3.0 ml  $a_0$  and 12.0 ml water (solution  $a_1$ ), 4.0 ml  $b_0$  and 11.0 ml water (solution  $b_1$ ), and 4.75 ml  $b_0$  and 10.25 ml water (solution  $c_1$ ) are prepared.

*Réceptif en matière plastique:* vider le réceptif: 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 réceptifs en matière plastique au moins, laisser reposer dans les réceptifs pendant 10 mn et recueillir l'effluent par évacuation à travers les tuyaux de transfert. Analyser la solution ainsi obtenue.

*Réceptif en matière plastique contenant un anticoagulant* (Voir paragraphe III).

---

## APPENDICE

### Analyse biologique: limites et méthodes

#### 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) 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 a<sub>0</sub>), 30 ml de la solution-mère et 20 ml d'eau (solution b<sub>0</sub>) et 15 ml de la solution-mère et 85 ml d'eau (solution c<sub>0</sub>).

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 a<sub>0</sub>; dans le tube 2, 0,10 ml de solution b<sub>0</sub> et dans le tube 3, 0,10 ml de solution c<sub>0</sub>; 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 a<sub>0</sub> et 12,0 ml d'eau (solution a<sub>1</sub>); 4,0 ml de b<sub>0</sub> et 11,0 ml d'eau (solution b<sub>1</sub>) et 4,75 ml de b<sub>0</sub> et 10,25 ml d'eau (solution c<sub>1</sub>).

To the first tube is added 1.50 ml of  $a_1$ , to the second 1.50 ml of  $b_1$  and to the third 1.50 ml of  $c_1$ . The tubes are centrifuged for 5 minutes at 2,000 to 2,500 rpm 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:

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

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

and  $E_{\text{exp}}$  = 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 vivo 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.
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.

Dans le tube 1, on met 1,50 ml de a<sub>1</sub>, dans le tube 2, 1,50 ml de b<sub>1</sub> et dans le tube 3, 1,50 ml de c<sub>1</sub>. 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:

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

où E<sub>100%</sub> = extinction pour une solution saline à 0,10%

E<sub>exp</sub> = 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. Cr<sup>51</sup> - I<sup>125</sup> 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.

---



Cr<sup>51</sup> - I<sup>125</sup> 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.

---

C. VERTALING

Zie *Trb.* 1959, 118, *Trb.* 1967, 142 en *Trb.* 1969, 109.

De vertaling in het Nederlands van de bij het Proces-verbaal van 21 september 1970 tot stand gekomen wijziging van Bijlage 9 bij het bij de Overeenkomst behorende Protocol luidt als volgt:

**Bijlage 9 bij het Protocol Raad van Europa****Europese Overeenkomst betreffende de uitwisseling van geneesmiddelen van menselijke oorsprong****Afwezigheid van toxiciteit bij plastic bloedtransfusie-apparatuur***I. Chemische proeven*

De proeven moeten worden verricht op plastic bloedtransfusie-apparatuur. Deze apparatuur bestaat uit twee hoofdgroepen:

- (1) de plastic ampullen voor het opvangen, scheiden en bewaren van bloed en bloedproducten;
- (2) plastic systemen voor het afnemen en toedienen van bloed.

De proeven dienen te worden uitgevoerd op het materiaal nadat dit is gesteriliseerd volgens de methode die gebruikt zal worden voor de definitieve sterilisatie van de apparatuur. Dit materiaal omvat:

- (1) het voor de vervaardiging van de ampullen gebruikte plastic;
- (2) de slangen in de ampullen;
- (3) de systemen voor het afnemen en toedienen van bloed.

De ampullen moeten aan de proeven worden onderworpen voordat zij worden gevuld met het antistollingsmiddel. Indien de proeven evenwel worden verricht op met het antistollingsmiddel gevulde ampullen moet bij de beoordeling van de resultaten van de proeven waaraan de ampul is onderworpen rekening worden gehouden met de in hoofdstuk III voorgeschreven grensreacties op het antistollingsmiddel zelf.

De vervaardiger van de transfusie-apparatuur is gehouden de bevoegde gezondheidsautoriteiten tot in bijzonderheden mededeling te doen van de samenstelling van het plastic materiaal en van iedere andere stof die bij de vervaardiging van de apparatuur wordt gebruikt, alsmede de oorsprong aan te duiden van de bestanddelen van

het materiaal en de wijze waarop zij zijn vervaardigd (of de referentienummers van de bestanddelen), tot in bijzonderheden de wijze aan te geven waarop de apparatuur is vervaardigd, de aard van alle toegevoegde stoffen en gebruikte kleefmiddelen en de wijze van sterilisatie te vermelden. In bovenstaande gegevens mogen geen wijzigingen worden aangebracht zonder voorafgaande mededeling aan en goedkeuring door de bevoegde gezondheidsautoriteit.

Elke partij grondstof die wordt gebruikt bij de vervaardiging van de apparatuur wordt aangeduid met een nummer (batch-nummer) dat door de vervaardiger van de apparatuur wordt geregistreerd te zamen met de identificatienummers van alle partijen („batches”) transfusie-apparatuur die uit deze grondstof worden vervaardigd en de resultaten van alle proeven waaraan deze partijen zijn onderworpen.

In ieder stadium van vervaardiging dienen alle mogelijke voorzorgsmaatregelen te worden genomen om het risico van toevallige besmetting te verminderen.

#### A. *Bereiding van extract en controlevloeistof*

(a) Voor een volledige proef zoals hieronder wordt beschreven is 1250 cm<sup>2</sup> plastic nodig (totale oppervlakte van de beide zijden van een plastic proefplaat van 625 cm<sup>2</sup>). Het monster, waarop geen aanduiding of etiket staat, wordt in stukken van maximaal 10 cm<sup>2</sup> geknipt.

De lengte (L) in cm van de slangen wordt als volgt berekend:

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

D<sub>1</sub> = inwendige doorsnede in cm

D<sub>2</sub> = uitwendige doorsnede in cm

De slangen dienen over de lengte in stukken van ongeveer 10 cm te worden geknipt. Voor de extractie wordt 10 ml water per 50 cm<sup>2</sup> gebruikt.

(b) De stukken plastic folie of slang worden geplaatst in een fles of vat van borosilicaatglas met 250 ml pyrogeenvrij gedestilleerd water uit een goede destillatie-apparatuur met glazen condensor en glazen opvangbuizen<sup>1)</sup>. De hals van de fles of het vat wordt afge-

<sup>1)</sup> Indien de plastic stoffen in aanraking zijn geweest met een antistollingsmiddel moeten de stukken in eenzelfde fles of vat met koud gedestilleerd water (100 ml) worden geplaatst en enige keren geschud. Dit moet één keer worden herhaald.

dekt met een omgekeerd bekerglas en de fles of het vat wordt vervolgens 30 minuten lang verhit in verzadigde stoom van  $110^{\circ}\text{C}$  (in autoclaaf) en daarna snel afgekoeld tot kamertemperatuur, waarna het volume wordt gebracht op 250 ml door toevoeging van pyrogeenvrij gedestilleerd water. Er behoeft geen rekening te worden gehouden met het eventueel enigszins aan elkaar kleven van de plastic monsters.

Plastic stoffen die geen hoge temperaturen kunnen verdragen, kunnen 72 uur op een temperatuur van  $70^{\circ}\text{C}$  worden gehouden, in plaats van in een autoclaaf te worden verhit.

Op overeenkomstige wijze wordt een controlevloeistof bereid zonder de plastic stoffen.

## B. *Proeven met extract*

### 1. *Oxydeerbare stoffen*

Bij 20 ml extract in een Erlenmeyer-kolf van borosilicaatglas voegt men 20 ml 0,01 N kaliumpermanganaatoplossing en 1,0 ml 2 N zwavelzuur en laat het mengsel 3 minuten koken. Men laat de oplossing snel afkoelen en voegt 0,1 g kaliumjodide en 5 druppels stijfseeloplossing toe. Vervolgens titreren met 0,01 N natriumthiosulfaatoplossing. Tegelijkertijd voert men een blanco titratie uit. Het verschil in hoeveelheid thiosulfaat dat bij beide titraties wordt gebruikt is niet meer dan 2,00 ml 0,01 N natriumsulfaat.

### 2. *Chloride*

Het extract moet voldoen aan een geëigende grensreactie op chloride, overeenkomend met ten hoogste 400 microgram  $\text{Cl}^{-}$  per liter.

### 3. *Ammoniak*

Het extract moet voldoen aan een geëigende grensreactie op ammoniak, overeenkomend met ten hoogste 2,0 mg  $\text{NH}_3$  per liter.

### 4. *Fosforzuur - fosfaat*

Het extract moet voldoen aan een geëigende grensreactie op fosfaat.

### *Grensreactie op fosfaat*

Verdamp 25 ml extract in een Kjeldahl-kolf tot bijna droog, laat de rest afkoelen en voeg 2 druppels zwavelzuur en 1 ml salpeterzuur toe; verhit het mengsel totdat een witte damp wordt ontwikkeld en

laat vervolgens afkoelen. Voeg een druppel perchloorzuur toe en verwarm het mengsel matig gedurende een half uur. Laat de rest afkoelen en voeg water tot 25 ml toe.

Giet vervolgens 10 ml van de oplossing over in een titreerkolfje van 25 ml en voeg toe 8 ml van een ammoniummolybdaatzwavelzuuroplossing, alsmede 2 ml van een versbereide 10% (gew./vol.) ascorbinezuuroplossing. Houd de oplossing gedurende 30 minuten met behulp van een waterbad op een temperatuur van 50° C. Koel vervolgens af en verdun het mengsel tot 25 ml. De groene of blauwe kleur van de oplossing is niet donkerder dan die welke wordt verkregen indien 25 ml van de controlevloeistof op dezelfde wijze wordt behandeld.

#### 5. *Zuurgraad*

10 ml extract mag niet rood kleuren na toevoegen van 2 druppels phenolphthaleïneoplossing, terwijl na niet meer dan 0,4 ml 0,01 N natriumhydroxyde een rode kleur moet ontstaan. Na toevoeging van 0,8 ml 0,01 N zoutzuur ontstaat met 5 druppels van een methylroodoplossing een rode of oranje-rode kleur.

#### 6. *Verdampingsrest*

Verdamp 100 ml extract op een waterbad en droog bij een temperatuur van 105° C tot constant gewicht. De rest mag niet meer dan 5,0 mg bedragen.

#### 7. *Helderheid en kleur*

Vergeleken met de controlevloeistof is het extract bij een doorzichtlengte van 5 cm helder en kleurloos.

#### 8. *Smaak en geur*

In vergelijking met de controlevloeistof is het extract reukloos en smaakloos.

#### 9. *Bijzondere elementen*

Het extract moet voldoen aan de geëigende grensreacties op

- |   |          |
|---|----------|
| (i) een van de volgende elementen: arsenicum, chroom, koper, lood, silicium, zilver en tin, overeenkomend met | 1,0 mg/l |
| (ii) cadmium, overeenkomend met   | 0,1 mg/l |

#### 10. *Asrest*

Na verassen van 1,0 g van het plastic materiaal tot constant gewicht mag de rest niet meer bedragen dan 1 mg.

#### 11. *Zware metalen*

Los de asrest op in de kleinst mogelijke hoeveelheid 2 N zoutzuur,

indien nodig onder verwarming. Voer een geëigende grensreactie uit op zware metalen. Het plastic materiaal moet voldoen aan een grens overeenkomend met maximaal 5 microgram, berekend als Pb.

## II. *Biologische proeven*

(1) Een onderzoek op giftigheid wordt uitgevoerd met extract A bij de eerste toepassing van een kunststof voor de vervaardiging van ampullen en systemen voor het afnemen en toedienen en met extract B voor elke nieuwe partij materiaal van de goedgekeurde samenstelling volgens de in de nationale farmacopee voorgeschreven procedure of volgens een methode die is goedgekeurd door de nationale toezichthoudende autoriteit (de samenstelling van de extracten A en B is aangegeven in de onderstaande noot).

(2) Controle op de afwezigheid van pyrogenen wordt uitgevoerd met extract A bij de eerste toepassing van een kunststof voor de vervaardiging van ampullen en systemen voor het afnemen en toedienen en met extract C voor elke nieuwe partij materiaal van de goedgekeurde samenstelling en bij de lopende controle van ampullen en systemen voor het afnemen en toedienen volgens de in de nationale farmacopee voorgeschreven procedure of volgens een methode die is goedgekeurd door de nationale toezichthoudende autoriteit.

De periodiciteit van de onderzoeken op de afwezigheid van pyrogenen met extract C wordt bepaald door de nationale toezichthoudende autoriteit.

(De samenstelling van de extracten A en C is aangegeven in de onderstaande noot).

(3) Een test ter bepaling van hemolytische effecten in gebufterde systemen wordt verricht bij de eerste toepassing van een kunststof voor de vervaardiging van ampullen en systemen voor het afnemen en toedienen van bloed en bij elke nieuwe partij materiaal die voldoet aan de goedgekeurde samenstelling met het extract zoals in paragraaf I. A hierboven is aangegeven.

(Voor voorgestelde methoden en aanvaardbare limieten zie het aanhangsel van deze bijlage).

(4) Een test ter bepaling van de overlevingsduur in vivo van erythrocyten geschiedt bij de eerste toepassing van een kunststof voor de vervaardiging van ampullen voor het bewaren van bloed. Indien een wijziging wordt aangebracht in de overeengekomen samenstelling, wordt de proef herhaald.

(Voor voorgestelde methoden en aanvaardbare limieten zie het aanhangsel van deze bijlage).

*Noot*

*Extract A:* Aan het in I. A. hierboven beschreven extract pyrogeenvrij natriumchloride toevoegen tot men een concentratie van 0,9% gew./vol. verkrijgt.

*Extract B:*

*Transfusie-apparaat:* Vul een transfusie-apparaat zo goed mogelijk met een steriele en pyrogeenvrije oplossing met 0,9% gew./vol. natriumchloride, maak de uiteinden zorgvuldig dicht en leg het gevulde apparaat een uur in water waarvan de temperatuur op 85° C wordt gehouden. Verzamel vervolgens de inhoud van het apparaat.

*Plastic ampul:* Indien de ampul is gevuld met een antistollingsmiddel, dient zij te worden geleegd en tweemaal omgespoeld met 250 ml steriel en pyrogeenvrij gedestilleerd water bij een temperatuur van 20° C. Vul de ampul met 100 ml steriele pyrogeenvrije natriumchlorideoplossing van 0,9% gew./vol., sluit haar zorgvuldig af en leg haar gedurende een uur horizontaal in water waarvan de temperatuur op 85° C wordt gehouden. Verzamel vervolgens de inhoud van de ampul.

*Extract C:*

*Transfusie-apparaat:* Voer 40 ml van een steriele en pyrogeenvrije natriumchlorideoplossing van 0,9% gew./vol. bij kamertemperatuur door ten minste tien transfusie-apparaten met een snelheid van  $\pm 10$  ml per minuut en vang het filtraat op. Onderzoek de aldus verkregen oplossing.

*Plastic ampul; ongevuld:* Voer 100 ml van een steriele en pyrogeenvrije natriumchlorideoplossing van 0,9% gew./vol bij kamertemperatuur door de opvangslangen van ten minste vier plastic ampullen, laat dit 10 minuten in de ampullen staan en vang het filtraat op door uitstromen via de overdrachtsslangen. Onderzoek de aldus verkregen oplossing.

*Plastic ampul die een antistollingsmiddel bevat (zie paragraaf III).*

---

**AANHANGSEL****Biologische analyse: limieten en methoden****A. Onderzoek op giftigheid**

(Zie II, 1 van bijlage hierboven): limiet als voorgeschreven in de nationale farmacopee.

### B. Controle op de afwezigheid van pyrogenen

(Zie II, 2 van bijlage hierboven): limiet als voorgeschreven in de nationale farmacopee.

### C. Test ter bepaling van hemolytische effecten in gebufferde systemen

(Zie II, 3 van bijlage hierboven):

#### (a) Limiet:

Een 0,50% natriumchlorideoplossing mag geen hemolysewaarde opleveren die hoger is dan 10%, en de hemolysewaarde van een 0,40% natriumchlorideoplossing mag niet meer dan 10% verschillen van de waarde verkregen bij de overeenkomstige controle-vloeistof.

#### (b) Methode:

Uitgaande van de bufferstam-oplossing voor hemolyse bereidt men drie oplossingen: 30 ml bufferstam-oplossing en 10 ml water (oplossing a<sub>0</sub>), 30 ml bufferstam-oplossing en 20 ml water (oplossing b<sub>0</sub>) en 15 ml bufferstam-oplossing en 85 ml water (oplossing c<sub>0</sub>).

In drie centrifugebuizen (1, 2 en 3) doet men 1,40 ml extract. Aan buisje 1 voegt men 0,10 ml a<sub>0</sub> toe; aan buisje 2, 0,10 ml b<sub>0</sub> en aan buisje 3, 0,10 ml c<sub>0</sub>; men verkrijgt zodoende zoutoplossingen overeenkomend met 0,50% (buisje 1), 0,40% (buisje 2) en 0,10% (buisje 3) natriumchloride wat de osmotische elektrolytwerving betreft.

Aan ieder buisje wordt 0,020 ml vers, goed gemengd menselijk heparine-bloed toegevoegd. De buisjes worden 40 minuten in een waterbad van 30° C (± 1°) geplaatst. Vervolgens bereidt men drie oplossingen bevattende 3,00 ml a<sub>0</sub> en 12,00 ml water (oplossing a<sub>1</sub>); 4,00 ml b<sub>0</sub> en 11,00 ml water (oplossing b<sub>1</sub>) en 4,75 ml b<sub>0</sub> en 10,25 ml water (oplossing c<sub>1</sub>).

Aan buisje 1 wordt 1,50 ml a<sub>1</sub> toegevoegd, aan buisje 2, 1,50 ml b<sub>1</sub> en aan buisje 3, 1,50 ml c<sub>1</sub>. De buisjes worden vervolgens gedurende 5 minuten gecentrifugeerd in een horizontale centrifuge. Tegelijkertijd worden voor elk van de concentraties controle-oplossingen bereid waarin het extract is vervangen door water.

De extinctie bij 540 nm van de vloeistoflaag wordt gemeten. De bufferstam-oplossing voor de hemolyse wordt gebruikt als blanco. De hemolysewaarde in % wordt berekend aan de hand van de volgende formule:

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

waarin E 100% = de extinctie voor een 0,10% natriumchlorideoplossing, en

E exp = de extinctie voor onderscheidenlijk 0,40% en 0,50% natriumchlorideoplossing.



*Bufferstam-oplossing voor het meten van het hemolysegehalte*

90,0 g natriumchloride, 13,7 g dinatriumfosfaatanhydride en 1,90 g mononatriumfosfaatanhydride worden opgelost in gedestilleerd water, dat wordt aangelengd tot 1000,0 ml.

D. *Test ter bepaling van de overlevingsduur in vivo van erythrocyten*

(Zie II, 4 van bijlage hierboven):

(a) *Limiet:*

70% van de erythrocyten uit vol menselijk bloed, opgevangen in een citraat-glucose antistollingsmiddel en gedurende 21 dagen bewaard bij 4° tot 6° C, moet 24 uur na transfusie nog in leven zijn. Dit kan worden bepaald aan de hand van een van de hieronder onder (b) voorgestelde methoden.

(b) *Voorgestelde methoden:*

1. Methode van 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.

L. 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. Cr<sup>51</sup> – I<sup>125</sup> 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. *Voorschriften betreffende het antistollingsmiddel in plastic ampullen*

Elke ampul moet de hoeveelheid en de samenstelling van het antistollingsmiddel bevatten welke op het etiket voor de hoeveelheid bloed staat aangegeven.

Het antistollingsmiddel en/of de produkten die bij de vervaardiging ervan worden gebruikt moeten voldoen aan de eisen van de nationale farmacopee van het betrokken land.

Het antistollingsmiddel moet voldoen aan de eisen van de nationale farmacopee van het betrokken land betreffende de limieten voor zware metalen, de afwezigheid van vaste stoffen, van toxiciteit en van pyrogeen.

---

D. GOEDKEURING

Zie *Trb.* 1961, 98.

E. BEKRACHTIGING

Zie *Trb.* 1961, 98 en *Trb.* 1967, 142.

Behalve de aldaar genoemde Staten heeft voorts de volgende Staat in overeenstemming met artikel 7 een akte van bekrachtiging bij de Secretaris-Generaal van de Raad van Europa nedergelegd:

Cyprus ..... 23 september 1969

F. TOETREDING

In overeenstemming met artikel 9 heeft de volgende Staat een akte van toetreding bij de Secretaris-Generaal van de Raad van Europa nedergelegd:

Liechtenstein ..... 28 oktober 1969

G. INWERKINGTREDING

Zie *Trb.* 1959, 118, *Trb.* 1961, 98, *Trb.* 1967, 142 en *Trb.* 1969, 109.

De bepalingen van de Overeenkomst zijn ingevolge artikel 8 op 1 oktober 1969 voor Cyprus en ingevolge artikel 9 op 1 november 1969 voor Liechtenstein in werking getreden.

De in rubriek B hierboven afgedrukte Bijlage 9 bij het bij de Overeenkomst behorende Protocol geldt vanaf 21 september 1970.

J. GEGEVENS

Zie *Trb.* 1959, 118, *Trb.* 1961, 98, *Trb.* 1967, 142 en *Trb.* 1969, 109.

In overeenstemming met artikel 60, tweede lid, van de Grondwet is het Protocol bij de onderhavige Overeenkomst, met bijlagen, zoals gewijzigd in 1968, medegedeeld aan de Eerste en de Tweede Kamer der Staten-Generaal bij brieven van 4 februari 1970 (Bijl. *Hand.* II 1969/70 - 10 527, nr. 1).

Voor het op 5 mei 1949 te Straatsburg tot stand gekomen Statuut van de Raad van Europa zie ook *Trb.* 1970, 37.

Uitgegeven de *tweede* februari 1971.

*De Minister van Buitenlandse Zaken a.i.,*

DE JONG.