

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024

Vilma Riitahuhta

# Muoviampullien ja testausmenetelmän tutkimus



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2024 | 57 sivua

Vilma Riitahuhta

## Muoviampullien ja testausmenetelmän tutkimus

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella muoviampullien laatua ja testata soveltuuko metyleenisineä ja alipainekammiota soveltava menetelmä niiden tiiviystestaukseen. Menetelmästä laskettiin herkkyys- ja spesifisyysaste sekä väärien negatiivisten ja positiivisten aste.

Muoviampullien laadusta selvitettiin vuotavien ampullien osuus ja kartoitettiin ampullien säilyvyyttä eri olosuhteissa. Ampulleista tehtiin myös mikrobiologinen viljely, jonka tarkoituksena oli alustavasti selvittää pakkauslinjan mikrobiologista puhtautta.

Työn tarkoituksena oli kehittää laadunvalvontaa ja selvittää tuotettujen ampullien nykyistä laatua. Linja ei ollut vielä tuotantokäytössä opinnäytetyön aikana, joten oli tärkeää selvittää miltä osin se vaati vielä parannuksia.

Työn lopputuloksena todettiin, että metyleenisinitestimenetelmä ei kykene havaitsemaan kaikkia vuotavia ampulleja. Menetelmä soveltuu kuitenkin havaitsemaan runsaasti vuotavat ampullit hyvällä varmuudella. Ampullit, joita testi ei havaitse, eivät tyhjene merkittävästi vuotamattomia ampulleja nopeammin.

Metyleenisinitesteissä todettiin, että alle kolme prosenttia testatuista ampulleista oli vuotavia. Mikrobiologisissa testeissä todettiin ampullilinjalla esiintyvän ainakin kahta eri mikrobilajia.

Asiasanat:

metyleenisini, laatu, mikrobiologia, tiiviystestaus, ampulli

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Degree Programme in Biotechnology and Chemical Engineering

2024 | 57 pages

Vilma Riitahuhta

## Study on plastic ampoules and testing method

The objective of this thesis was to study the quality of plastic ampoules and test if a destructive methylene blue dye penetration test can be applied to their container closure integrity testing. The rate of false positives and negatives will be observed as well as the degree of sensitivity and specificity.

The percentage of leaking ampoules was tested using a methylene blue dye penetration test. The effect of different environmental conditions on the ampoules was studied. A microbiological culture was performed on the ampoules to study the microbiological purity of the packaging line.

The aim of this study was to improve quality control and study the current quality of produced ampoules. The packaging line has not yet been implemented, so it is crucial to study which parts still need improving.

The result of this study was that the methylene blue dye penetration test cannot detect all leaking ampoules. The method can still be used to detect ampoules that leak significantly with good accuracy. The leaking ampoules not detected by the test do not empty significantly sooner than their non-leaking counterparts.

It was determined with the methylene blue dye penetration test that approximately three percent of produced ampoules leak. The microbiological culture revealed that there are at least two species of microbe present during packaging.

Keywords:

methylene blue, quality, microbiology, container closure integrity testing, ampoule

# Sisältö

<b>Käytetyt lyhenteet tai sanasto</b>	<b>8</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>9</b>
<b>2 Ampullikone ja ampullien materiaali</b>	<b>11</b>
<b>3 Primääripakkauksen tiiviystestaus</b>	<b>14</b>
3.1 Primääripakkaus	14
3.2 Pakkausten tiiviystestaus	14
3.2.1 Ampulleille soveltuvia testimenetelmiä	15
3.2.2 Metyleenisinitesti	15
3.3 Tiiviystestausmenetelmän kehitys	16
3.4 Kvalitatiiviset ja kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät	17
<b>4 Menetelmän soveltuvuuden testaus</b>	<b>18</b>
4.1 Tutkitun metyleenisinitestin kuvaus	18
4.2 Positiivisten ja negatiivisten kontrollien valmistus	21
4.3 Testien tulokset	22
4.4 Spektrofotometrinen analyysi	23
4.4.1 UV-VIS spektroskopia	24
4.4.2 Testin toteutus	24
<b>5 Laatutestaus</b>	<b>27</b>
5.1 Olosuhdetestaukset	28
5.1.1 Olosuhdetestaus 5 °C	29
5.1.2 Olosuhdetestaus -20 °C	30
5.1.3 Olosuhdetestaus 37 °C	31
5.1.4 Olosuhdetestaus 37 °C RH 70 % ± 5 %	32
5.1.5 Olosuhdetestaus pitkäaikaisnäytteet	33
5.2 Vuototestaukset	35
5.3 Pitkäaikaistestaukset ja ampullien säilyvyys	36
<b>6 Lisäselvityksiä tuotannon laadun parantamiseksi</b>	<b>41</b>

6.1 Painoon perustuva metyleenisini testimenetelmä	41
6.2 Mikrobiologinen testaus	42
6.3 Vuotojen syy	46
<b>7 Päätelmät</b>	<b>48</b>
<b>Lähteet</b>	<b>50</b>

## Liitteet

Liite 1. Dataloggerista saatu data olosuhdetestien aikana	
Liite 2. Olosuhdetestattujen ampullien tulokset	
Liite 3. Pitkäaikaissäilytystestin tulokset	
Liite 4. Painoon perustuvalla metyleenisini menetelmällä testattujen ampullien K1-K50 painon muutokset	

## Kuvat

Kuva 1. Tutkimuksessa käytetty ampullikone.....	11
Kuva 2. Ampullien valmistuksessa käytetyn muovikalvon rakenne (Finnvacum, 2023).....	12
Kuva 3. Metyleenisininen kemiallinen rakenne (PubChem) .....	16
Kuva 4. Tässä opinnäytetyössä käytetty testauslaitteisto .....	19
Kuva 5. Negatiivisia ja positiivisia ampulleja. ....	20
Kuva 6. Esimerkkikuva kannen toiminnasta dekantterilasissa metyleenisinitestin aikana. ....	20
Kuva 7. Positiivisiksi valmistetut ampullit metyleenisinitestin jälkeen ja kuva, miltä positiiviseksi valmistetut ampullit näyttivät ennen testiä. ....	22
Kuva 8. Spektrofotometritestihin mukaan otetut ampullit. ....	26
Kuva 9. Ampullit K1-K50 metyleenisinitestien jälkeen.....	42
Kuva 10. Alkunäytteet, joita säilytetty päivä jääkaapissa ennen viljelyä.....	44
Kuva 11. Alkunäytteet, joita on säilytetty 37 °C ennen viljelyä. ....	44

Kuva 12. Loppunäytteet, joita on säilytetty päivä jääkaapissa ennen viljelyä....	45
Kuva 13. Loppunäytteet, joita on säilytetty 37 °C ennen viljelyä. ....	45
Kuva 14. Pieni vaalea (vasemmalla) ja isohko keltainen (oikealla) pesäke esitetty rinnakkain. ....	46
Kuva 15. Kuva siitä, miten nestepisara muodostuu ja jää ampullin täyttöaukkoon.....	47

## Kuviot

Kuvio 1. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 5 °C:ssa.	30
Kuvio 2. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon -20 °C:ssa.	31
Kuvio 3. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 37 °C:ssa.	32
Kuvio 4. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 37 °C RH 70 % ± 5 %.	33
Kuvio 5. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon pitkäaikaisnäytteissä.	34
Kuvio 6. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon. Pitkäaikaisnäytteet. Tulokset yksittäispunnituista vakuumpakatuista ampulleista. Mukana myös keskiarvo ei vakuumi, joka on laskettu 30 kappaleen PBSL ampullisarjasta.	34
Kuvio 7. PBS ampullien painon muutoksen keskiarvo ja mediaani vakuumpakatuista ja ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleissa. Lisäksi keskiarvo vakuumpakatuista ampulleista, kun suurin muuttuja on poistettu.	37
Kuvio 8. PBS ampullien suurimmat ja pienimmät painon muutokset vakuumpakatuista ja ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleissa.	38

## Taulukot

Taulukko 1. Laskut metyleenisinitestien tarkkuudesta.	23
Taulukko 2. Valmistetun PBS-liuoksen sisältö.	27
Taulukko 3. Näytesarjoille annettujen lyhenteiden selitykset	28
Taulukko 4. Olosuhdetestauksen parametrit	29
Taulukko 5. Vuototestausten tulokset pelkkien vuotojen osalta testatuista ampulleista.	35

Taulukko 6. Vuototestauksen tulokset kaikkien ampullien osalta.	36
Taulukko 7. Pitkäaikaissäilytyksessä huoneenlämmössä olleille PBS ampulleille lasketut tyhjenemisajat.	39
Taulukko 8. Pitkäaikaissäilytyksessä jääkaapissa olleille vesiampulleille lasketut tyhjenemisajat.	40

## Käytetyt lyhenteet tai sanasto

ASTM	American Society for Testing and Materials (Valmistajat.fi)
APET	Kidemuodoton polyetyleenitereftalaatti, Amorphous polyethylene terephthalate (Tingstad)
EVA	Eteeniaisvinyyliaasetatikopolymeeri (Xiamen Keyuan Plastic Co)
OES	Optical Emission Spectroscopy (McLaren, 2022)
PBS-liuos	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (Helmenstine), Phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich solutions)
PE	Polyeteeni (Tingstad)
PET	Polyetyleenitereftalaatti (Tingstad)
pmy	Pesäkkeen muodostava yksikkö (Tieteen termipankki)
r-PET	Kierrätetty polyetyleenitereftalaatti, Recycled polyethylene terephthalate (Tingstad)
TSA	Tryptoni-soija-agar (Sojakka;ym., 2011)
UV-VIS	Ultravioletti-näkyvä (Measurlabs), ultraviolet-visible (Justin, 2021)
%RH	Suhteellinen kosteus, relative humidity (Partanen)



# 1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Salofa Oy:lle, joka on Salossa sijaitseva 2013 vuonna perustettu terveydenhuollon tuotteita valmistava yritys. Salofa valmistaa ja markkinoi esimerkiksi korkealaatuisia IVD-tuotteita ja infuusioletkuja erikoissairaanhoidon sekä päihde-, huume- ja sinilevätestejä. (Salofa Oy.)

Oleellisena osana työtä oli selvittää sopsisiko Saara Purasen vuonna 2022 validoima lasiampullien tiivistäusmenetelmä metyleenisini-immersiotestillä myös muoviampullien laadun seurantaan tuotannon aikana. Soveltuvuutta testattiin kontrollinäytteiden avulla. Menetelmää käytettiin normaalien näytteiden testaamiseen ja tuloksia verrattiin ampullien menettämään nestemäärään pitkäaikaisessa säilytyksessä.

Tarkoituksena oli kartoittaa ampullien laatua sekä nesteiden haihtumista ampullista eri ympäristöolosuhteissa. Laatua selvitettiin kartoittamalla, paljonko ampulleista on vuotavia ja tekemällä niistä mikrobiologiset testit, joilla alustavasti kartoitettiin pakkauslinjan puhtautta.

Aiemmin linjan optimoinnissa on päädytty Finnvacumin AMBAR 38/5NB TS MY400 muovikalvoon. Aiemmissä testeissä on havaittu osan ampulleista tyhjenevän täysin säilytyksen aikana. Tässä työssä selvitettiin myös vuotojen syytä, jotta siihen voitaisiin myöhemmin puuttua tehokkaasti.

Nesteiden haihtumista selvitettiin tekemällä ampulleille olosuhdetestit ja pitkäaikaissäilytystestit. Nyt suoritettavissa testeissä oli tarkoitus selvittää, kuinka nopeasti ampullit tyhjenisivät normaaleissa säilytysolosuhteissa, ja kuinka eri ympäristöolosuhteet voivat vaikuttaa ampullien tyhjenemiseen.

Ampullilinjaa ei ole saatu täysin optimoitua, eikä se ollut tuotantokäytössä opinnäytetyön aikana. Linjan käyttöönottoa varten olisi ampullien oltava korkealaatuisia. Jotta ampullista saadaan paras mahdollinen ja sille voidaan löytää oikea tuote, on tärkeää tiedostaa mihin asioihin voidaan vielä vaikuttaa ja mitkä ovat ampullin heikkoja kohtia. Riippuen pakattavasta tuotteesta, on primääripakkauksen laadulle eri laatuvaatimukset. Koska ampullin

valmistusmateriaali ei itsessään ole täysin tiivis, on esimerkiksi huomiotava pakattavan tuotteen konsentraation hyväksyttävä vaihtelu ja valittava säilyvyysaika sen mukaisesti.

## 2 Ampullikone ja ampullien materiaali

Tässä opinnäytetyössä viitataan ampullikoneena kuvassa 1 esitettyyn automaattiseen nesteiden täyttökoneeseen. Ampullikoneen täyttötilavuuden vakioasetus on 500 µl, eikä täyttötilavuutta voi muuttaa. Ampullien muodostus- ja sulkemislämpötila on optimoitu Finnvacumin AMBAR 38/5NB TS MY400 muovikalvolle, jota käytetään tässä työssä. Ampullin muodostuslämpötilana käytetään 115 °C:tta ja täyttöaukon sulkemislämpötilana 140 °C:tta.



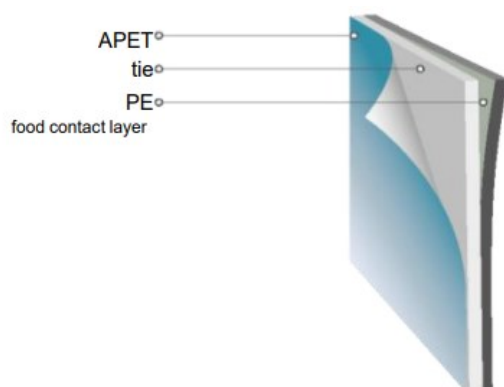
Kuva 1. Tutkimuksessa käytetty ampullikone.

Nesteen tulee pakkauksen aikana olla viileää, noin + 5 °C:tta. Pakkauksen jälkeen ampulleja säilytetään vuorokausi jääkaapissa. Näihin ratkaisuihin on päädytty aiemmin, koska näillä parametreilla ampullien laatu on ollut korkein aiemmissa testeissä ja niitä noudatetaan myös tässä tutkimuksessa.

Ampullikone muodostaa ampullit viiden kappaleen sarjoissa kahdesta muovikalvosta. Muovikalvot kulkevat ensin muottien läpi, jotka muodostavat ampullin perusmuodon sulattamalla muovikalvot yhteen 115 °C:n lämpötilassa. Tässä vaiheessa ampullin yläosa jää vielä auki täyttöä varten. Tämän jälkeen

ampullit täytetään nesteellä. Täyttöpäät laskeutuvat ampullin sisään avoimesta täyttöaukosta, jonka jälkeen pumput pumppaavat 500 µl:a pakattavaa nestettä ampullin sisään ja nousevat pois. Täytön jälkeen ampullit liikkuvat eteenpäin ja kone sulkee ampullin täyttöaukon 140 °C:n lämpötilassa. Lopuksi ampullit leikataan erilleen ja ne tippuvat ramppia pitkin keräysastiaan. Ylimääräinen muovi ampullin ympäriltä poistuu koneesta roskeen.

Ampullikoneessa käytetään materiaalina Finnvacumin AMBAR 38/5NB TS MY400 muovikalvoa. Muovikalvon rakenne on esitetty kuvassa 2. Valmistaja markkinoi muovia hyvällä mekaanisella kestävyydellä ja läpinäkyvyydellä sekä soveltuvuudella elintarvikekäyttöön. (Finnvacum, 2023.)



Kuva 2. Ampullien valmistuksessa käytetyn muovikalvon rakenne (Finnvacum, 2023)

AMBAR 38/5NB TS muovikalvo koostuu kolmesta kerroksesta. Kerrokset ovat APET, tie ja PE. APET kerros on kontaktissa tuotteen kanssa. Muovikalvon komponentit ovat PET, r-PET, PE ja EVA. (Finnvacum, 2023.)

Monikerroksisissa pakkauksissa puhutaan "tie layer" termillä kerroksesta, joka auttaa kahta muutoin huonosti toisiinsa tarttuvaa materiaalia yhdistymään. Käytetty hartsi riippuu siitä, kuinka vahva kiinnittyminen halutaan ja mitkä ovat kiinnitettävät materiaalit. Hartseja on reaktiivisia ja ei-reaktiivisia. Yksi esimerkki ei reaktiivisesta hartseista on eteeniasvinyyliasetatikopolymeeri (EVA). (Zimmerman;ym. s. 1.)

Polyetyleenitereftalaattia (PET) käytetään esimerkiksi pulloissa ja elintarvikkeiden säilytysastioissa. PET on vakaata, kevyttä ja läpinäkyvää sekä täysin kierrätettävää. PET valmistetaan raakaöljystä. APET on lyhenne englanninkielisestä nimestä "Amorphous polyethylene terephthalate". Tämä tarkoittaa, että se on kidemuodotonta polyetyleenitereftalaattia. r-PET on lyhenne englanninkielisestä nimestä "Recycled polyethylene terephthalate" ja se puolestaan on kierrätettyä polyetyleenitereftalaattia. (Tingstad.)

Polyeteeni (PE) on hiilivedystä ja maakaasusta valmistettu valkoinen tai luonnonväriäinen muovi. PE kestää hyvin lämpötilojen vaihtelua, kemikaaleja ja kosteutta. PE:stä valmistetaan pusseja, pulloja, kansia ja kalvoja. (Tingstad.)

Eteeniaisivinyyliaasetatikopolymeeri (EVA) muistuttaa hieman PE:tä, mutta sen molekyyliketjussa on enemmän vinyyliaasetatimonomeeria. Tämä lisää joustavuutta, iskunkestävyyttä ja lämmön tiivistystehoa sekä vähentää kiteisyyttä. (Xiamen Keyuan Plastic Co.)

Valmistaja on antanut muoville säilytyslämpötilaksi 0 - +40 °C:tta ja säilytyskosteudeksi alle 70 %RH. Muovikalvosta valmistetut ampullit eivät ole täysin tiiviitä. Valmistaja on käyttänyt ASTM F-1249 standardia määrittääkseen veden kulkeutumista materiaalin läpi. ASTM International on standardien valmistaja, jonka standardeja käytetään yli 140 maassa (ASTM). Lämpötilan ollessa 38 °C ja kosteuden 90 %RH, muovikalvon läpi haihtuu alle 2 g vettä neliometriä kohden vuorokaudessa. (Finnvacum, 2023.)

Tässä työssä kaikissa testeissä käytetään kosteuden määrittämiseen suhteellista kosteutta, jonka lyhenne on %RH. Suhteellinen kosteus kertoo, miten suuri prosenttiosuus kyllästyspistettä vastaavasta vesihöyryn määrästä on läsnä vallitsevassa lämpötilassa. Ilmassa oleva vesi alkaa tiivistyä 100 %RH paineessa. Korkeammassa lämpötilassa ilmassa voi olla enemmän vettä, jonka takia suhteellinen kosteus on matalammassa lämpötilassa korkeampi, vaikka veden määrä ei muuttuisi. (Partanen.)

## 3 Primääripakkauksen tiiviystestaus

Tiiviystestaukseen on olemassa erilaisia menetelmiä ja erilaisiin pakkauksiin liittyviä vaatimuksia. Ampullit luokitellaan primääripakkaukseksi. Tässä luvussa pääasiassa käsitellään primääripakkausta steriilin lääkepakkauksen näkökulmasta. Metyleenisinitestin teorian lisäksi perehdytään myös vaihtoehtoisiin menetelmiin, joita käytetään ampulleille yleisesti.

### 3.1 Primääripakkaus

Primääripakkaus viittaa pakkaukseen, joka on suoraan kosketuksissa tuotteen kanssa. Pakkauksen tarkoituksena on luoda este tekijöille, jotka saattaisivat vaurioittaa tai pilata tuotteen. Esimerkiksi lääkepakkauksissa primääripakkaus voi olla lasipullo, läpipainopakkaus tableteille, voidetuubi tai muovipurkki. Lääkepakkauksien ominaisuuksia säätelee EU:n yhteinen farmakopea. Farmakopea asettaa vähimmäisrajat pakkauksen laadulle ja turvaominaisuuksille. Primääripakkauksen tulee olla sellainen, että se ei reagoi tuotteen kanssa eikä siitä saa irrota mitään tuotteeseen. (Kähkönen, 2020.)

### 3.2 Pakkausten tiiviystestaus

Pakkauksen tiiviystestaus on testi, jolla voidaan arvioida pakkauksen kykyä suojata tuotetta mahdollisilta kontaminaatioilta. Kontaminaation aiheuttaja voi olla esimerkiksi mikro-organismi, reagoiva kaasu tai muu aine. Pakkauksen tulisi pystyä suojaamaan tuotetta sen hyllysäilyvyyden ajan. (Booth, 2016.)

Euroopan komission määräyksestä steriilit lääkevalmisteet, jotka suljetaan fuusioimalla, kuten lasi- ja muoviampullit, tulisi kaikki testata. Lisäksi pakkaukset tulisi sulkea validoidulla metodilla. Testeille on kehitetty monia metodeja, sillä komissio ei määritä tarkkaa menetelmää, miten tiiviys tulisi todentaa. (McLaren, 2022.)

### 3.2.1 Ampulleille soveltuvia testimenetelmiä

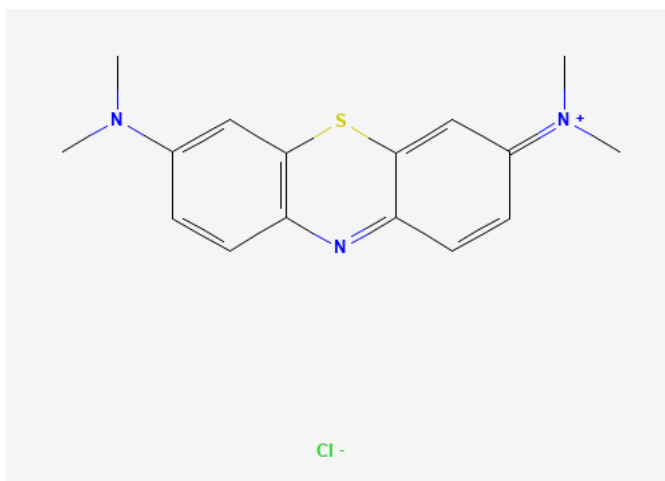
Uusia testimenetelmiä on kehitetty. Yksi testimenetelmä on upottaa pakkaus kasvatusliemeen, jossa on mikrobiininen testiorganismi. Tämän jälkeen tarkkaillaan kasvaako organismi pakkauksen sisään. Menetelmän apuna saatetaan toisinaan käyttää painetta tai alipainetta. (McLaren, 2022.)

Sinivärimenetelmä eli metyleenisinimenetelmä on ollut käytössä jo vuosikymmeniä ja se on laajalti hyväksytty. Metyleenisinitestistä on kerrottu lisää luvussa 3.2.2. Metyleenisinimenetelmä ei silti ole paras mahdollinen, koska se tuhoaa tuotteen eikä sillä siis voida tarkastaa koko tuotannon tiiviyyttä. (McLaren, 2022.)

Metyleenisinimenetelmän jatkajaksi on kehitetty Pfeiffer Vacuum:n toimesta optisen säteilyn spektroskopiaan (OES) perustuva menetelmä. Menetelmä ei ole tuhoava, ja sitä voidaan siitä syystä käyttää testaamaan kaikki tuotetut pakkaukset. (McLaren, 2022.)

### 3.2.2 Metyleenisinitesti

Metyleenisineä, jonka kemiallinen rakenne esitetty kuvassa 3, käytetään yleisesti vuotojen havaitsemiseen muun muassa lääke ja elintarviketeollisuudessa (Limab, 2023). Metyleenisinen empiirinen kaava on  $C_{16}H_{18}ClN_3S$  (PubChem).



Kuva 3. Metyleenisininen kemiallinen rakenne (PubChem)

Metyleenisinitestillä viitataan tässä työssä englanninkieliseen nimeen ”destructive methylene blue dye penetration test”, missä pakkaukset peitetään sinisellä väriaineella ja laitetaan vakuunikammioon. Alipaine pakottaa ilman pakenemaan vuotokohdista ja väriaine imeytyy pakkauksen sisälle paineen palautuessa normaalipaineeseen. Väriaine ei läpäise vuotamattoman pakkauksen pintaa. (Limab, 2023.)

Metyleenisinitestauksen huonona puolena on se, että sillä ei kyetä havaitsemaan pienimpiä vuotoja. Esimerkiksi Limab ilmoittaa metyleenisinitestilleen havaitsemisrajaksi 20 µm. Menetelmä on nopea ja helppo suorittaa, mutta siinä on riskinä operaattorin virheet. Operaattorin virheitä voivat olla esimerkiksi vakuunikammion huono sulkeutuminen, väriaineen huono leviäminen tai väriaine ei peitä tuotetta riittävän hyvin. (Limab, 2023.)

### 3.3 Tiivistestausmenetelmän kehitys

Tiivistestimenetelmän tulisi olla sellainen, että se kuvaa hyvin pakkauksen tiivyyttä koko sen elinsyklin ajan. Testit tulee aina optimoida juuri haluttuun käyttötarkoitukseen. Menetelmän valinta riippuu myös siitä, mitä halutaan selvittää. Eri menetelmillä voidaan selvittää esimerkiksi vuotoreittejä, vuodon sijaintia, nopeutta tai mahdollista mikrobikontaminaatiota. (Booth, 2016.)



Menetelmän kehitykseen tarvitaan positiivisia ja negatiivisia kontrolleja. Kontrollien tulisi muistuttaa oikeaa pakkausta ja esimerkiksi vuodon kohdan tulisi olla sama, kuin oikeissa vuotavissa pakkauksissa. Positiivinen kontrolli simuloi vikoja, joita ilmenee pakkauksien tiiviydessä. Harvoin kuitenkaan positiivisella kontrollilla voidaan täysin simuloida oikeaa vuotoa, sillä oikea vuoto on harvoin selkeän muotoinen. Yksi tapa luoda positiivinen kontrolli on käyttää johtoa. Tämä menetelmä on käytössä tässä työssä. (Booth, 2016.)

Positiivisista kontrolleista kaikkien, joiden vuodon koko on suurempi, kuin testin havaitsemisraja, tulee näkyä testissä. Kaikkien negatiivisten kontrollien tulee läpäistä testi. Testin suurin ja pienin havaitsemisraja tulisi määrittää. (Booth, 2016.)

### 3.4 Kvalitatiiviset ja kvantitatiiviset tutkimusmenetelmät

Kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen tutkimus ovat kaksi eri tutkimusmenetelmää. Kvalitatiivisella tarkoitetaan laadullista ja kvantitatiivisella määrällistä tutkimusta. (Jyväskylän yliopisto, 2015.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa käytetään numeroita ja tilastoja kohteen kuvaamiseen ja tulkitsemiseen (Jyväskylän yliopisto, 2015). Kvalitatiivisessa tutkimuksessa taas pyritään kohteen laadun ja merkityksen ymmärtämiseen kokonaisvaltaisesti (Jyväskylän yliopisto, 2021).

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa on usein käytössä erilaisia laskennallisia ja tilastollisia analyysimenetelmiä. Kiinnostuksen kohteena on usein erilaiset luokittelut sekä syy- ja seuraussuhteet. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa ilmiö usein pyritään selittämään numeerisiin tuloksiin perustuen. (Jyväskylän yliopisto, 2015.)

Metyleenisinimenetelmä on kvalitatiivinen tutkimus, sillä siitä saadut tulokset perustuvat tarkastelijan arvioon eivätkä numeeriseen arvoon. Jos taas tulokset voitaisiin esittää esimerkiksi absorbanssin arvona, olisi menetelmä kvantitatiivinen.

## 4 Menetelmän soveltuvuuden testaus

Tässä luvussa kuvataan tarkasti testeissä käytettyä metyleenisinimenetelmää ja kuvataan, miten sen soveltuvuutta testattiin muoviampulleille. Luvussa kuvataan, miten testattiin spektrofotometrisen menetelmän soveltuvuutta havaitsemaan metyleenisinisen läsnäolo liuoksessa ihmissilmää tarkemmin.

### 4.1 Tutkitun metyleenisinitestin kuvaus

Menetelmässä haluttiin käyttää pohjana NextPharma Oy:lle Saara Purasen validoimaa vuototestausmenetelmää, josta on kirjoitettu opinnäytetyö vuonna 2022. Opinnäytetyössä validoitiin menetelmää tästä työstä poiketen lasiampulleille. Opinnäytetyössä lasiampullit kävivät vuototestauksessa läpi kaksi kymmenen minuutin sykliä 0,2–0,4 bar:n välillä pulsseittain. Paine palautui välissä minuutiksi normaaliin ilmanpaineeseen. (Puranen, 2022.)

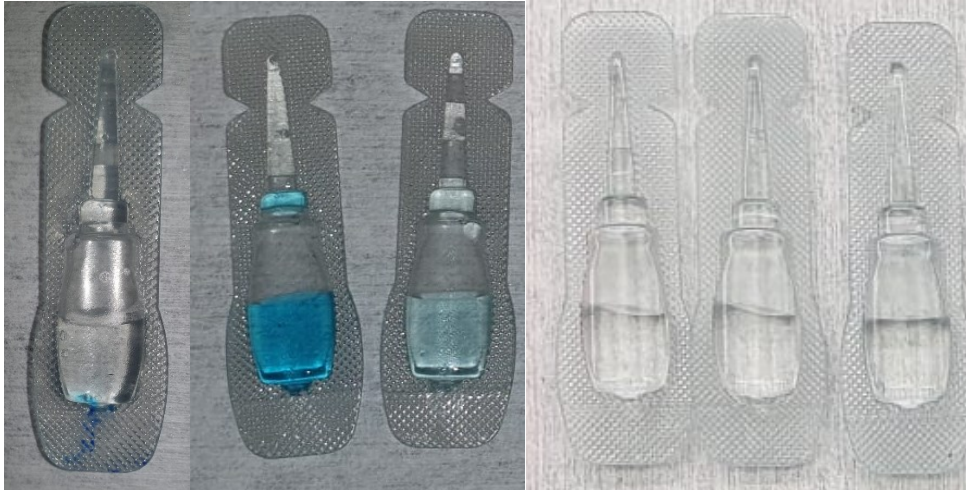
Purasen opinnäytetyön menetelmästä poiketen käytettiin vakuumin saamiseen eksikkaattoria ja vakuumpumppua. Purasen opinnäytetyössä laitteistona oli painesäiliö ja eheystestauslaite, jossa oli alipainepumppu sekä piirturi (Puranen, 2022). Vakuumpumppu muodostaa eksikkaattoriin tasaisen 0,292 bar:n alipaineen. Kuvassa 4 on esitetty testauslaitteisto, jota käytettiin tässä opinnäytetyössä.



Kuva 4. Tässä opinnäytetyössä käytetty testauslaitteisto

Menetelmässä ampullit upotettiin metyleenisineen ja asetettiin eksikkaattoriin dekantterilasissa. Vakuumpumppu kytkettiin päälle, eksikkaattorin venttiili suljettiin ja odotettiin 10 minuuttia. Tämän jälkeen pumppu sammutettiin ja venttiili avattiin. Minuutin ajastus käynnistettiin, kun paine oli tasaantunut normaaliin ilmanpaineeseen eikä venttiili enää imenyt ilmaa sisään. Minuutin kuluttua pumppu käynnistettiin uudelleen ja venttiili suljettiin. Annettiin olla 10 minuuttia alipaineessa, jonka jälkeen palautettiin normaaliin ilmanpaineeseen. Testin jälkeen kaadettiin metyleenisiniä pois. Ampullit huuhdottiin hanavedellä ja asetettiin kuivumaan valkoisten pyyhkeiden päälle, jotta värin muutos näkyisi selkeästi.

Ampullit tarkasteltiin silmämääräisesti. Sininen väri ampullin sisällä viittasi vuotoon eli ampulli oli positiivinen. Vuotamaton, eli negatiivinen, ampulli oli väritön. Kuvassa 5 on esitetty kuvia, miltä negatiivinen ja positiivinen ampulli näytti. Vasemmalla kolme eri tavalla ilmenevää positiivista ampullia ja oikealla kolme negatiivista ampullia vertailuksi.



Kuva 5. Negatiivisia ja positiivisia ampulleja.

Testien aikana havaittiin, että vuotavat ampullit nousevat herkästi pinnan yläpuolelle ja sen takia läpäisevät testin negatiivisina. Ongelma ratkaistiin leikkaamalla muovisesta purkista kansi ja teippaamalla se dekanterilasın päälle, jotta ampullit painuvat pinnan alle (kuva 6).



Kuva 6. Esimerkkikuva kannen toiminnasta dekanterilasissa metyleenisinitestin aikana.

Kuvassa 6 vasemmalla kuvattu, miten ampullit nousivat metyleenisinen pinnan yläpuolelle. Oikealla on kuvattu miltä dekanterilasi näytti, kun kansi toimii

toivotusti. Kannen lisäämisen jälkeen kaikki positiiviseksi valmistetut ampullit ilmenivät positiivisina, joten ratkaisu toimi toivotusti.

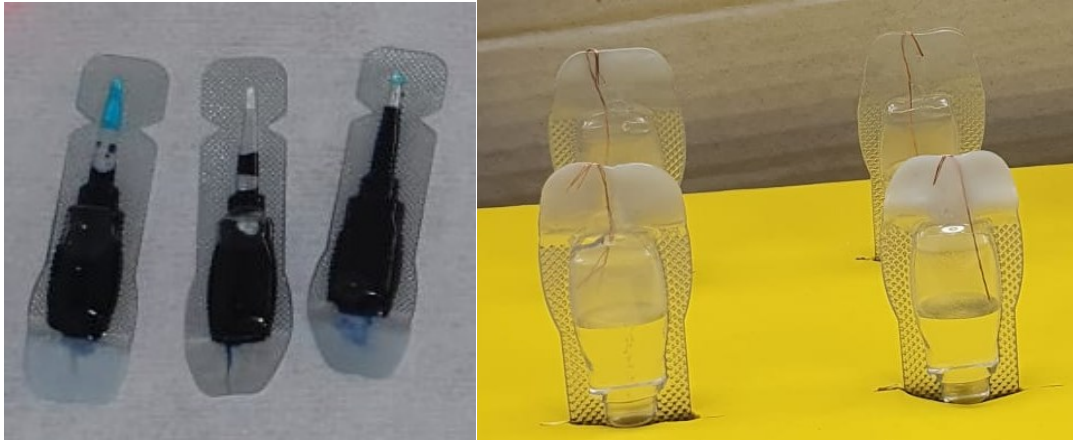
#### 4.2 Positiivisten ja negatiivisten kontrollien valmistus

Menetelmän soveltuvuutta testattiin valmistamalla tunnettuja negatiivisia ja positiivisia näytteitä. Negatiiviset näytteet valmistettiin ajamalla vesitäytteisiä ampulleja normaalisti ja vahvistamalla niiden reunat Loctite 406 liimalla.

Positiivisten näytteiden valmistaminen oli hankalampi tehtävä. Testeissä käytettävien ampullien tulisi rakenteeltaan muistuttaa aitoja, mutta koneella ei ollut mahdollista ajaa varmasti positiivisia ampulleja. Päädyttiin ratkaisuun, jossa ampullit ajettiin tyhjinä eikä niitä suljettu. Tämän jälkeen ampulleihin laitettiin 500 µl vettä automaattipipetillä ja ne sulatettiin kiinni suoristusraudalla siten, että välissä oli kuparilanka.

Kuparilangan paksuudeksi mitattiin keskiarvoisesti 107 µm. Reiän koko on siis yli nelinkertainen metyleenisinitestille oletettuun 20 µm havaitsemisrajaan nähden (Limab, 2023). Todettiin, että positiiviset ampullit vuosisivat todella runsaasti. Haluttiin kuitenkin, että ampullit vuotavat muovikalvojen välistä eikä muovin läpi, joten ampulleihin ei tehty neulalla reikiä. Tästä syystä myöskään havaitsemisrajoja ei ollut mahdollista selvittää.

Positiivisten ampullien valmistusta kokeiltiin useammalla lankamäärällä. Kuitenkin, koska jo yhden langan todettiin vuotavan, käytettiin sitä testeissä. Kuvassa 7 on vasemmalla kuvattu, miten positiivisiksi valmistetut ampullit ilmenivät metyleenisinitestien jälkeen. Oikealla on kuvattu miltä ampullit näyttivät ennen lankojen poistamista ja testejä. Kuvasta huomataan, että metyleenisinen kulkureitti näkyy selkeästi testatuissa ampulleissa. Ampullien täyttöaukon saumaus on normaaleista ampulleista poikkeava, koska sulkemiseen käytettiin suoristusrauta, joka sulatti muovin.



Kuva 7. Positiiviseksi valmistetut ampullit metyleenisinitestin jälkeen ja kuva, miltä positiiviseksi valmistetut ampullit näyttivät ennen testiä.

Testien alkutaipaleella havaittiin, että liiman pitää antaa kuivua kunnolla. Valmistajan antama kovettumisaika liimalle on 24 tuntia (Lakkapää), joten ampulleja ei testattu heti liimaamisen jälkeen, vaan vasta korkeintaan parin päivän kuluttua. Havaittiin myös, että ampullien nouseminen pinnan päälle vääristää tuloksia ja aiheuttaa jopa 30 % varmasti positiivisista ampulleista ilmenevän negatiivisena. Ennen näitä havaintoja tehtyjä testejä ei huomioitu tuloksissa.

#### 4.3 Testien tulokset

Kaikkiaan testattiin 31 kappaletta positiivisia ja 944 kappaletta negatiivisia kontrolleja. Testatuista negatiivisista kontrolleista positiivisia oli lopulta kaksi kappaletta. Menetelmää testatessa kaikkien negatiivisten näytteiden tulisi läpäistä testi. Tämä johtuu kuitenkin todennäköisimmin huonosta liimaustuloksesta. Tuloksista laskettiin väriin positiivisten ja negatiivisten aste, sekä herkkyys ja spesifisyysaste. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Laskut metyleenisinitestien tarkkuudesta.

<b>Laskut metyleenisinitestin tarkkuudesta muoviampulleilla</b>		
Väärät pos. aste	$\frac{\text{Väärät pos.}}{\text{Oikeat neg. +Väärät pos.}}$	0,002
Väärät neg. aste	$\frac{\text{Väärät neg.}}{\text{Oikeat pos. +Väärät neg.}}$	0,000
Herkkyysaste	$\frac{\text{Testatut pos. näytteet}}{\text{Tunnettujen pos. lkm.}}$	1,000
Spesifisyysaste	$\frac{\text{Testatut neg.}}{\text{Tunnetut neg. lkm.}}$	0,998

Väärin positiivisten aste kertoo, kuinka suuri osa negatiivisista kontrollinäytteistä oli positiivisia. Väärin negatiivisten aste puolestaan kertoo, kuinka suuri osa positiivisista kontrolleista ilmeni negatiivisina. Herkkyysaste kertoo kuinka suuri osa positiivisista näytteistä jää kiinni testissä. Spesifisyysaste kertoo vastaavasti, kuinka suuri osa negatiivisista kontrollinäytteistä läpäisi testin.

Koska pienempää reikää ei onnistuttu valmistamaan siten, että se simuloisi aitoja olosuhteita, ei ole mahdollista selvittää metyleenisinimenetelmälle vuotokohdan koon havaitsemisrajaa tutkituille muoviampulleille.

Pitkäaikaissäilytystesteissä, joita esitellään luvussa 5.3, todettiin myös metyleenisinitestissä negatiivisten ampullien satunnaisesti menettävän poikkeuksellisen paljon nestettä. Pitkäaikaistestien tulokset on esitetty liitteessä 3. Tällä testimenetelmällä ei siis ole mahdollista löytää kaikkia vuotavia ampulleja.

#### 4.4 Spektrofotometrinen analyysi

Koska metyleenisinitesti perustuu silmämääräiseen tarkasteluun värin perusteella, haluttiin tutkia spektrofotometrillä pääseekö osa positiivisista

ampulleista läpi silmämääräisestä tarkastelusta ja samalla selvittää toisiko spektrofotometri mahdollisesti kvantitatiivisia tuloksia testille.

#### 4.4.1 UV-VIS spektroskopia

Ultravioletti-näkyvä spektroskopia (UV-VIS) perustuu materiaalin vuorovaikutukseen ultravioletti ja näkyvän valon kanssa. Värillisille liuoksille UV-VIS spektroskopiaa voidaan käyttää pitoisuuden määrittämiseen vertaamalla näytteen absorbanssia liuoksiin, joiden pitoisuus tunnetaan. (Measurlabs.)

UV-VIS spektrofotometrin toiminta perustuu valon heijastamiseen näytteeseen, joka on liuotettu liuokseen. Aallonpituutta vaihdellaan asteittain ultravioletti ja näkyvän valon aallonpituuksilla. Liuoksen läpi kulkevan valon prosenttiosuutta seurataan. Tuloksena saadaan absorptiokäyrä. (Measurlabs.)

Ihmissilmälle näytteen väri on yleensä päinvastainen, kuin sen absorboima aallonpituus. Tämä johtuu siitä, että ihminen havaitsee pinnoilta pois heijastuvan valon, ei niiden absorboimaa valoa.

Kun näytteitä valmistellaan UV-VIS spektroskopiaa varten, ne pitää saada liukenemaan nestemäiseen muotoon tarkoitukseen sopivalla liuottimella. Myöskään uusia yhdisteitä ei saa syntyä. Näyteliuoksen on oltava sellaista pitoisuutta, joka vielä sallii valon läpäisemisen. Liian korkealla pitoisuudella ei saada tarkkoja tuloksia. (Measurlabs.)

#### 4.4.2 Testin toteutus

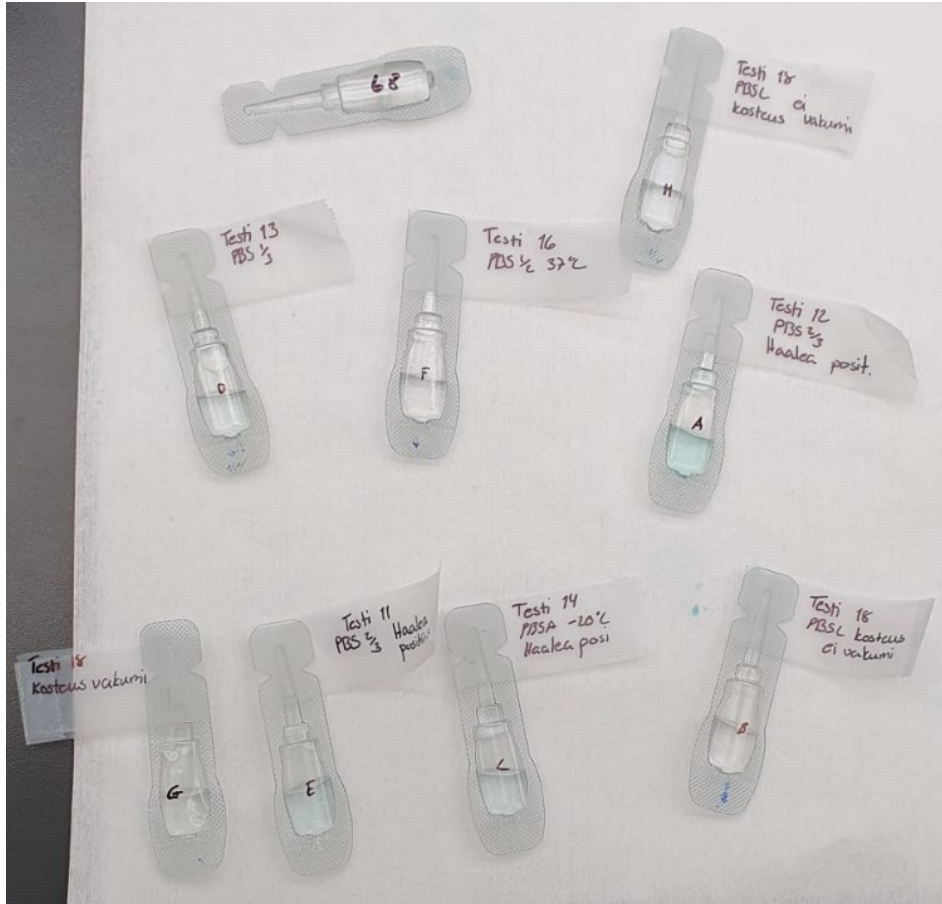
Testiä varten tehtiin laimennossarja metyleenisinestä PBS-liuoksella, jossa on laimennokset 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000, 1/ 1 000 000 ja 1/10 000 000. Laimennoksissa käytettiin samaa kaupallista metyleenisiniliuosta, jota käytettiin testeissä. 1/10 laimennos valmistettiin pipetoimalla 100 µl metyleenisinistä ja 900 µl PBS liuosta. Laimennossarjaa jatkettiin siitä pipetoimalla aina 100 µl edellistä laimennosta ja 900 µl PBS liuosta. Liuokset



sekoitettiin aina ravistamalla ennen seuraavaan laimennokseen pipetoimista. Laimennossarjaa tehdessä todettiin, että 1/1000 laimennos on viimeinen selkeästi sinisen värinen laimennos, mutta 1/10 000 on vielä havaittavissa sininen sävy.

Testissä käytettiin Mettler Toledon UV 7 spektrofotometriä. Aallonpituudeksi valikoitui 668 nm, sillä se oli silmämääräisesti eniten absorboiva aallonpituus näkyvän valon spektrillä valmistettujen liuosten absorptiokäyrää tarkastellessa. Metyleenisinen oletettu absorptiopiikki alkaa 662 nm:n kohdalla (AAT Bioquest). Kuitenkin PBS liuos on saattanut vaikuttaa liuoksen absorbanssiin.

Spektrofotometritutkimukseen otettiin mukaan positiivisia ja negatiivisia ampulleja. Positiivisista valittiin ampulleja, joiden väri on haalea, mutta havaittava. Negatiivisista ampulleista valittiin sellaisia, joita on painonmuutoksen tai pitkien metyleenisinen kulkureittien takia syytä epäillä positiivisiksi. Ampullit numeroitiin aakkosilla A-H. Lisäksi testiin otettiin mukaan painonseurannassa ollut ampulli 68, jonka paino oli laskenut poikkeuksellisen paljon. Ampullit A, E ja L otettiin mukaan, jotta voidaan verrata spektrofotometrin antamia tuloksia silmämääräiseen tarkasteluun, sillä niissä on havaittavissa haalea sininen väri. Loput aakkosilla merkatut ampullit ovat taas mukana, koska niissä näkyy pitkiä metyleenisinen kulkujälkiä täyttöaukon kohdalla. Kuvassa 8 on esitetty kuvat testissä mukana olleista ampulleista.



Kuva 8. Spektrofotometritesteihin mukaan otetut ampullit.

Testissä todettiin, että spektrofotometri ei havaitse luotettavasti metyleenisineä yli 1/10 000 laimennoksissa. Testattiin ampulli L, B ja ampulli 68 ja todettiin, että spektrofotometri ei havainnut väriä ampulleissa, joissa se ei ollut silmin havaittavissa. Asiaa ei tutkittu enempää, koska todettiin, että spektrofotometrin tarkkuus ei riitä havaitsemaan metyleenisineä riittävän matalassa konsentraatiossa.

Voidaan kuitenkin todeta, että spektrofotometri pystyy havaitsemaan hyvin haalean positiivisen näytteen. Tätä voitaisiin käyttää hyödyksi, jos myöhemmin linjan käyttöönoton jälkeen on tarpeen minimoida inhimillistä virhettä tulosten tulkinnassa.

## 5 Laatutestaus

Ampullien laatua haluttiin tarkastella erilaisilla testeillä. Testien tarkoitus on selvittää millaisia olosuhteita ampullit kestävät, kuinka pitkään ne säilyvät ja kuinka laadukkaita ne ovat. Laatutestejä varten valmistettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta eli PBS-liuosta, jonka sisältö on esitetty taulukossa 2. Taulukossa 2 luetellut reagenssit liuotettiin veteen 1 litraksi ja pH:ksi tasattiin 7,20 käyttäen suolahappoa.

Taulukko 2. Valmistetun PBS-liuoksen sisältö.

Reagenssi	Kaava	Määrä
Natriumkloridi	NaCl	8,005 g
Natriumvetyfosfaatti	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,443 g
Kaliumkloridi	KCl	0,200 g
Kaliumdivetyfosfaatti	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,241 g

Koska ampullilinja ei ollut vielä tuotantokäytössä, eikä tiedetty mitä kaikkea sillä voitaisiin pakata, päädyttiin käyttämään PBS-liuosta. PBS-liuos jäljittelee ihmisen kehon nesteiden ioni pitoisuutta, osmolaarisuutta ja pH:ta. Tästä johtuen PBS-liuos ei todennäköisesti aiheuta solujen vaurioita, myrkyllisyyttä tai ei-toivottua saostumista. Nämä ominaisuudet ovat toivottavia, kun suoritetaan mikrobiologiset testit. Mikrobiologisia testejä kuvataan luvussa 6.2. (Helmenstine.)

Laatutestejä varten ajettiin ampulleja, joihin pakattiin PBS-liuosta 500 µl. Ampullit jaettiin sarjoihin, Taulukossa 3 on esitetty näytesarjoille annetut lyhenteet. Näytteitä PBS1/3 ja PBS2/3 käytettiin vuototestauksissa.

Taulukko 3. Näytesarjoille annettujen lyhenteiden selitykset

<b>Lyhenteiden selitykset</b>	
PBSA	PBS-liuoksella tehdyn ajon alkunäytteet
PBS 1/3	PBS-liuoksella tehdyn ajon alkupää
PBS 1/2	PBS-liuoksella tehdyn ajon puolivälinäytteet
PBS 2/3	PBS-liuoksella tehdyn ajon loppupää
PBSL	PBS-liuoksella tehdyn ajon loppunäytteet

Ampulleille suoritettiin olosuhdetestaukset, joissa simuloitiin erilaisia ympäristön olosuhteita, joissa ampulleja voidaan säilyttää, ja pyrittiin selvittämään niiden vaikutus ampullien laatuun ja säilyvyyteen. Tämä on tärkeä tieto, jotta tiedetään millaisia olosuhteita ampullit kestävät ja tiedon avulla voidaan ohjeistaa mahdollista asiakasta niiden oikeaoppiseen säilytykseen.

Ampullien laatua kartoitettiin testaamalla metyleenisinimenetelmällä, kuinka suuri osa ampulleista on positiivisia. Metyleenisinimenetelmällä positiiviseksi todetut ampullit ovat varmasti vuotavia. Tämä on tärkeä tieto, jotta ampullien laatua voidaan parantaa. Vuotavat ampullit tyhjenevät ehjiä nopeammin, joten säilyvyys on huonompi, jos suuri osa ampulleista on vuotavia.

Pitkäaikaistesteillä pyrittiin selvittämään, kuinka pitkä hyllysäilyvyys täytetyillä ampulleilla on. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka nopeasti ehjät tai vuotavat ampullit tyhjenevät. Tämä tieto auttaa ohjaamaan lopullisen tuotteen säilyvyyttä.

### 5.1 Olosuhdetestaukset

Olosuhdetesteillä haluttiin selvittää erilaisten olosuhteiden vaikutus pakkauksen eheyteen sekä tuotteen säilyvyyteen. Lämpötilan osalta testattiin 30 kappaletta ampulleja sarjoista PBSA, PBS1/2 ja PBSL. Kuvaajia varten laskettiin 30 ampullin keskiarvoinen paino. Kosteuden osalta testattiin 60 ampullia sarjasta PBSL, joista puolet oli vakuumpakattu. Kaikki lämpötilaolosuhteet ja testien

kestot on esitetty taulukossa 4. Testien kestot määräytyivät muiden aikataulujen mukaan. Tavoitteena oli saada jokaisen testin kestoksi yli kolme päivää ja saada testattua ampullit metyleenisinitestillä samana päivänä, kun testi lopetetaan sekä saada ampullit punnittua uudelleen seuraavana päivänä. Kosteustesti venyi sairastumisten takia.

Taulukko 4. Olosuhdetestauksen parametrit

Olosuhde	Kesto
5 °C	6 pv
5 °C → -20 °C	6 pv
5 °C → 37 °C	5 pv
37 °C, RH 70 % ± 5 %	8 pv

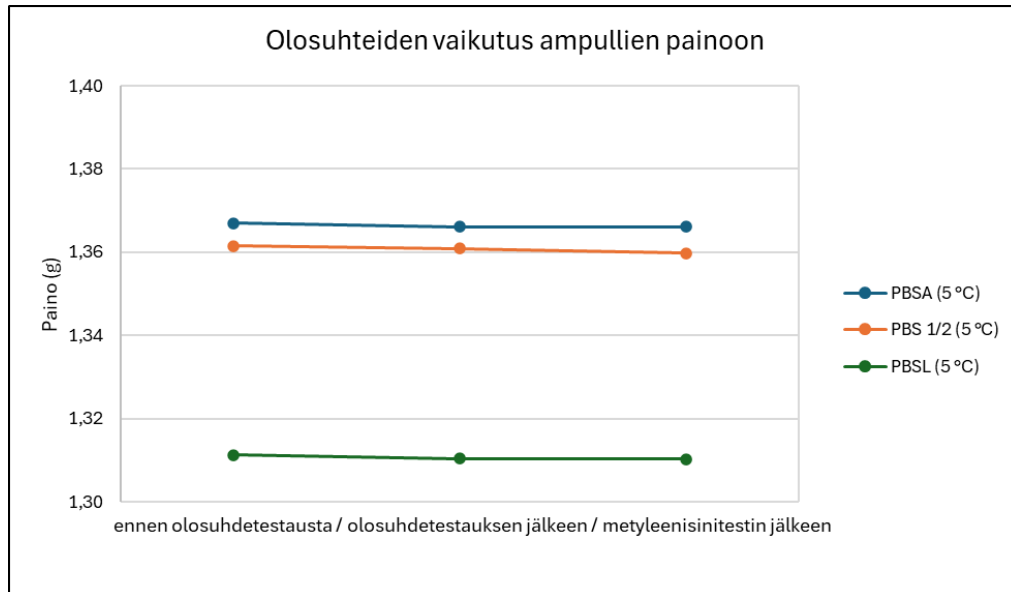
Eri olosuhteet valittiin siten, että ne simuloivat olosuhteita, joihin ampullit saattavat joutua. Olosuhdetesteissä käytettiin Vötsch industrieteknik type VT4021 olosuhdekaappia. Poikkeuksellisesti kosteustestiin käytettiin lämpökaappia, jossa pohjalla foliolla peitetty vesiastia.

Olosuhdetestauksen alkuvaiheessa ei ollut käytössä dataloggeria, mutta se saatiin käyttöön -20 °C:n testien toisena päivänä. Dataloggerista saatu lämpötilan ja kosteuden seurantadata on liitteessä 1.

Lämpötila palautettiin 5 °C:seen ennen jokaisen uuden vaiheen aloitusta. Ampullien annettiin myös olla muutama tunti 5 °C:ssa ennen tavoitelämpötilaan siirtymistä. Numeerinen data on esitetty liitteessä 2 kaikkien olosuhdetestien osalta.

#### 5.1.1 Olosuhdetestaus 5 °C

Ampullit säilytettiin 5 °C:ssa kuusi päivää. Tämän jälkeen ampullit testattiin metyleenisinimenetelmällä ja punnittiin seuraavana päivänä. Ampullien painon muutokset on kuvattu kuviossa 1.

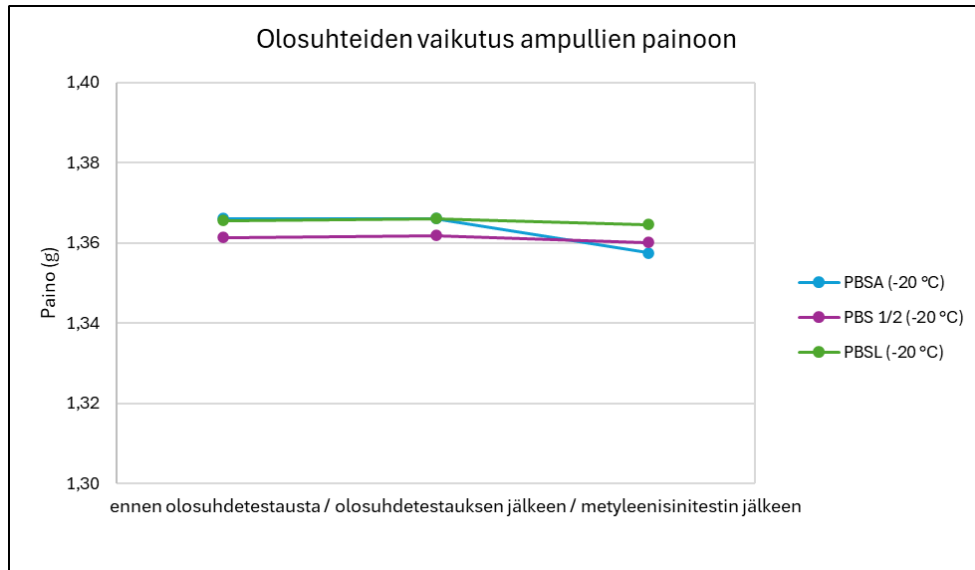


Kuvio 1. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 5 °C:ssa.

Kuviosta 1 voidaan huomata, että ampullien paino pysyi verrattain samana. Vuototestauksissa selvisi, että sarjassa PBSA oli yksi positiivinen ampulli ja PBSL sarjassa 2 positiivista ampullia. Kuviosta voidaan havaita, että vuotavista ampulleista huolimatta paino ei laske merkittävästi jääkaappilämpötiloissa, mitä myös pitkäaikaistestausten tulokset tukevat luvussa 5.3.

#### 5.1.2 Olosuhdetestaus -20 °C

Ampulleja säilytettiin -20 °C:ssa kuusi päivää, jonka jälkeen niille suoritettiin metyleenisinitesti ja punnittiin seuraavana päivänä uudelleen. Tuloksista havaittiin, että ampullien paino ei laskenut olosuhdetestin aikana. Kuitenkin metyleenisinitestissä havaittiin lisääntyneitä metyleenisinen kulkureittejä ampullien reunoilla. Ampullien paino on myös laskenut metyleenisinitestin jälkeen. Tulokset on esitetty kuviossa 2.



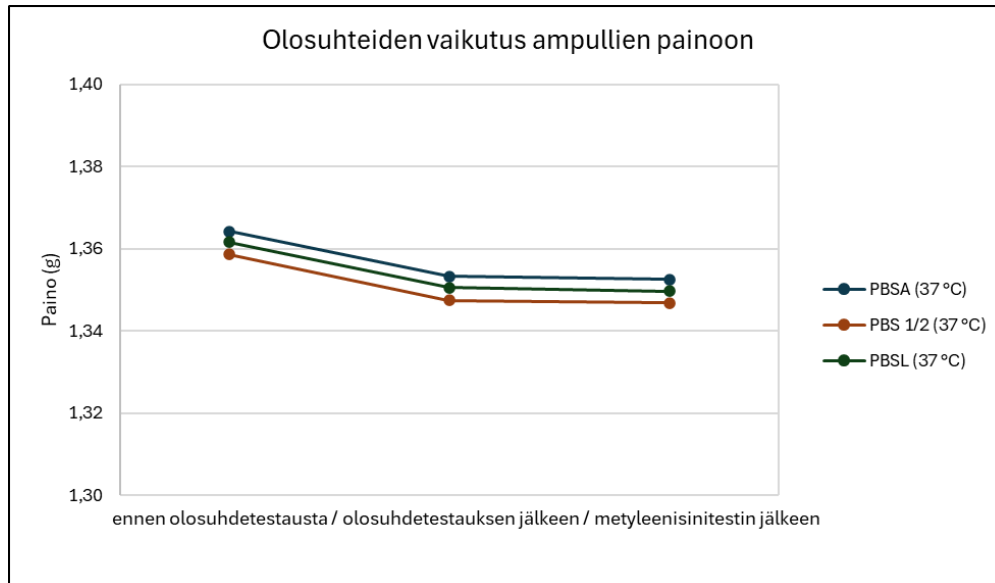
Kuvio 2. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon -20 °C:ssa.

Metyleenisinitesteissä todettiin, että -20 °C:ssa säilytetyissä ampulleissa oli eniten positiivisia ampulleja. PBS1/2 ja PBSL sarjoissa oli molemmissa yksi positiivinen ampulli. PBSA sarjassa oli kaksi positiivista ampullia.

Tuloksista päätellen on syytä epäillä pakkasen vaurioittavan ampullien rakennetta. Syynä voi olla joko pakkasen tai nopea sulaminen huoneenlämpöön. Pitkäaikaisnäytteissä ei havaittu lisääntyneitä positiivisten määriä, joten nopea sulaminen saattaa olla vaikuttava tekijä.

### 5.1.3 Olosuhdetestaus 37 °C

Ampulleja säilytettiin 37 °C:ssa viisi päivää, jonka jälkeen niille suoritettiin metyleenisinitesti ja punnittiin seuraavana päivänä uudelleen. Tuloksista havaittiin, että korkeassa lämpötilassa ampullin paino laskee merkittävästi. Ampullien paino ei kuitenkaan muutu merkittävästi enää huoneenlämmössä kuivuessa. Painon muutos on esitetty kuviossa 3.



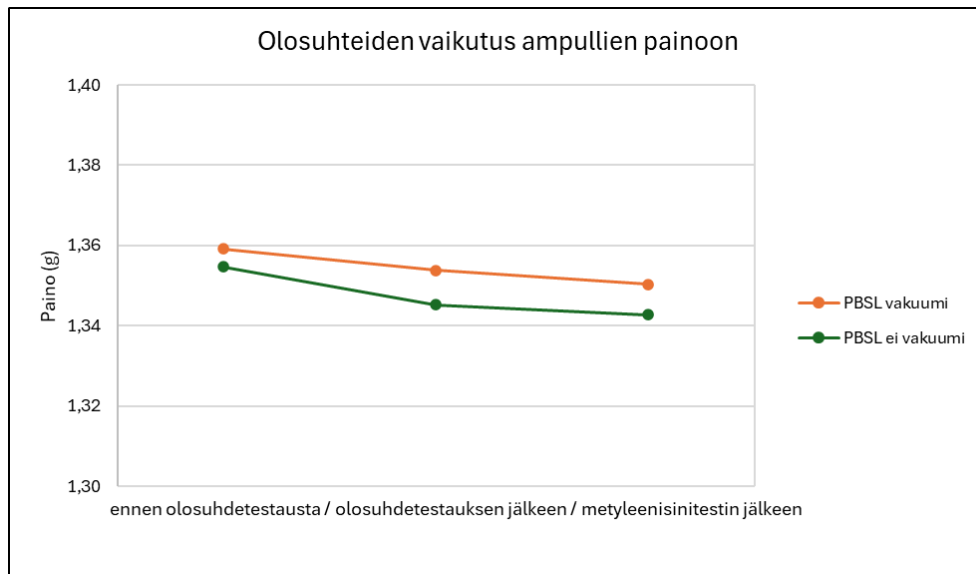
Kuvio 3. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 37 °C:ssa.

Metyleenisinitestissä todettiin, että PBSA sarjasta yksi ampulli oli positiivinen ja kaikki loput negatiivisia. Tämä viittaa siihen, että 37 °C:ssa ampullit tyhjenevät nopeasti siitä huolimatta, että niissä ei ole selkeää vuotoa.

#### 5.1.4 Olosuhdetestaus 37 °C RH 70 % ± 5 %

Ampulleja säilytettiin 37 °C:ssa RH 70 % ± 5 % kahdeksan päivää, jonka jälkeen niille suoritettiin metyleenisinitesti ja punnittiin seuraavana päivänä uudelleen. Testattiin, miten vakuumpakkaus vaikuttaa painonmuutokseen. Vakuumpakkaus toteutettiin kotikäyttöön tarkoitetulla Finnvacuum Home vakuumikoneella. Vakuumpakkaus estää ilmankosteutta kulkeutumasta ampulleihin, joten vakuumpakatut ampullit toimivat vertailuryhmänä. Kuviossa 4 on esitetty painon vaihtelu testin eri vaiheissa.





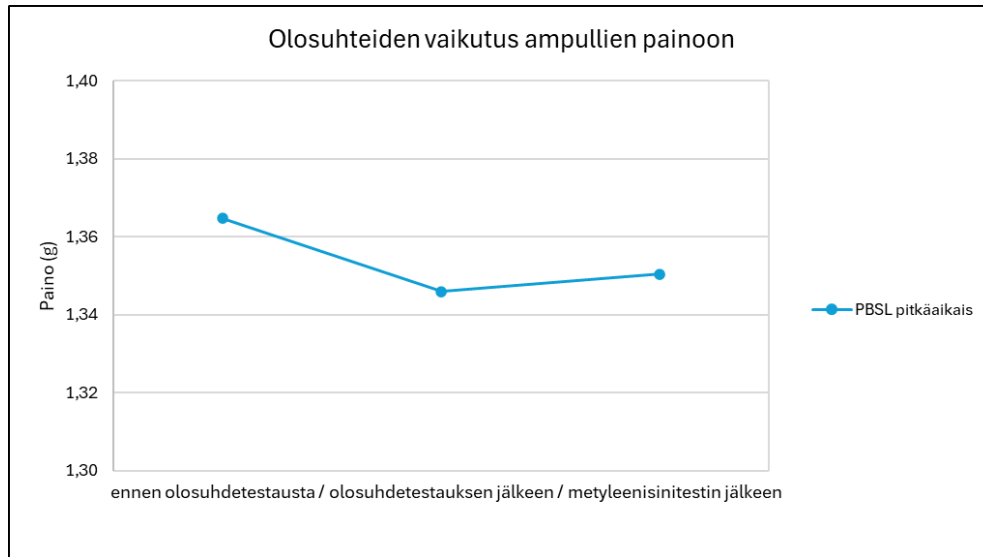
Kuvio 4. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon 37 °C RH 70 % ± 5 %.

Kuviosta 4 voidaan huomata, että paino laski hieman hitaammin vakuumipakkauksessa. Ampulleilla, jotka eivät olleet vakuumipakkauksessa, paino laski likimain saman verran, kuin 37 °C:n näytteiden. Metyleenisinitesteissä ei todettu positiivisia ampulleja. Kosteudella ei vaikuttaisi olevan vaikutusta ampullien painoon.

#### 5.1.5 Olosuhdetestaus pitkäaikaisnäytteet

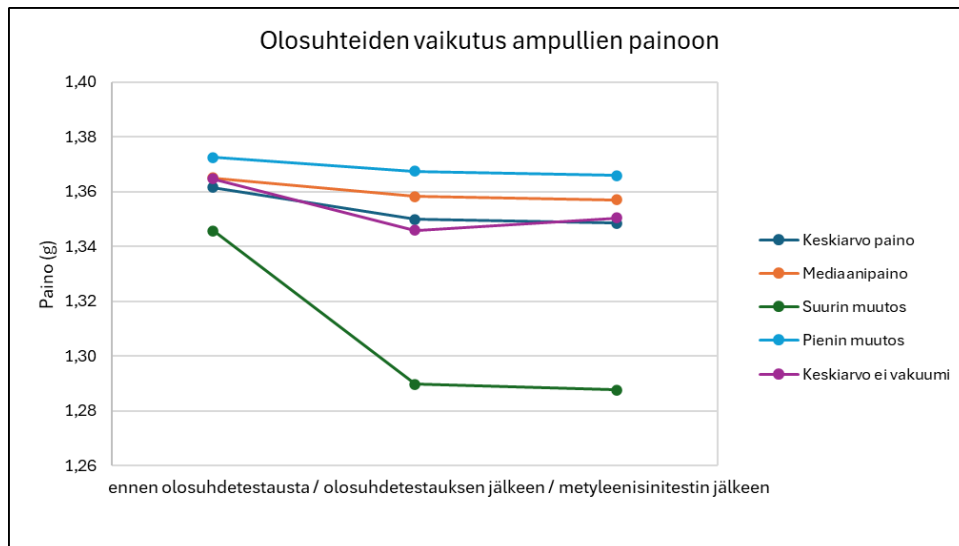
Pitkäaikaiset olosuhdenäytteet kävivät läpi kaikki neljä olosuhdetta, jonka jälkeen ne testattiin metyleenisinimenetelmällä ja punnittiin seuraavana päivänä. Näytteissä oli mukana 30 kappaletta PBSL sarjaa sekä 20 kappaletta vakuumipakattuja PBS ampulleja, joista kirjattiin yksilölliset painot. Metyleenisinitesteissä kaikki näytteet olivat negatiivisia. Vakuumipakatuilla näytteillä haluttiin tutkia, voisiko vakuumipakkaus vähentää nesteiden haihtumista ampullista.

Kuviossa 5 huomataan ampullien painon laskeneen merkittävästi olosuhdetestien aikana. Metyleenisinitestin tai kuivumisen aikana ampullien paino on noussut poikkeavasti muista ampullisarjoista, vaikka positiivisia ampulleja ei ollut.



Kuvio 5. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon pitkäaikaisnäytteissä.

Kuviossa 6 on esitetty, miten paino on muuttunut olosuhdetestien aikana yksittäispakatuilla ampulleilla, jotka olivat olleet vakuumpakkauksessa. Kuvioon on laskettu kaikkien 20 ampullin painojen keskiarvo ja mediaani eri vaiheissa, sekä esitetty ampullien suurin ja pienin painonmuutos olosuhdetestien aikana. Mukana on myös PBSL sarjasta laskettu ei-vakuumpakattujen ampullien painojen keskiarvo testisarjan eri vaiheissa.



Kuvio 6. Olosuhteiden vaikutus ampullien painoon. Pitkäaikaisnäytteet. Tulokset yksittäispunnituista vakuumpakatuista ampulleista. Mukana myös keskiarvo ei vakuumi, joka on laskettu 30 kappaleen PBSL ampullisarjasta.

Kuviosta 6 voidaan huomata, että vaikka yhtään positiivista ampullia ei ole havaittu, painon muutoksessa oli merkittävää vaihtelua. Metyleenisinitestillä ei siis ainakaan nykyisellään kyetä karsimaan tyhjeneviä ampulleja pois tuotannosta. Keskiarvossa ei myöskään ole merkittävää eroa siinä, ovatko ampullit olleet vakuumpakkauksessa vai eivät.

## 5.2 Vuototestaukset

Vuotavien ampullien määrää haluttiin tarkastella metyleenisinimenetelmää käyttäen. Vuototestauksissa testattiin kaikkiaan 545 kappaletta PBS-liuoksella täytettyjä ampulleja. Taulukossa 5 on esitetty vuototestausten tulokset pelkästään vuototestauksissa olleista ampulleista, jolloin positiivisia oli 2,9 %.

Taulukko 5. Vuototestausten tulokset pelkkien vuotojen osalta testatuista ampulleista.

Testatut ampullit	Ampulleja (kpl)	Positiivisia (kpl)
PBS 2/3	200	6
PBS 2/3	170	4
PBS 1/3	175	6
<b>Yhteensä</b>	545	16
Positiivisia pros.	2,9 %	

Jos huomioidaan myös olosuhdetesteissä olleet ampullit, on ampulleja otannassa 905 ja positiivisten ampullien osuus on 2,7 %. Taulukossa 6 on esitetty vuototestausten tulokset, kun huomioidaan kaikki testatut ampullit.

Taulukko 6. Vuototestauksen tulokset kaikkien ampullien osalta.

Testatut ampullit	Ampulleja (kpl)	Positiivisia (kpl)
PBS 2/3	200	6
PBS 2/3	170	4
PBS 1/3	175	6
PBSA (5 °C)	30	1
PBSL (5 °C)	30	2
PBS 1/2 (5 °C)	30	0
PBSA (-20 °C)	30	2
PBS 1/2 (-20 °C)	30	1
PBSL (-20 °C)	30	1
PBSA (37 °C)	30	1
PBS 1/2 (37 °C)	30	0
PBSL (37 °C)	30	0
PBSL vakuumi	30	0
PBSL ei vakuumi	30	0
PBSL pitkäaikais	30	0
<b>Yhteensä</b>	905	24
Positiivisia pros.	2,7 %	

Taulukoista 5 ja 6 huomataan, että missään ajon vaiheessa ei vaikuttaisi olevan selkeästi enempää vuotavia ampulleja. Vuotavat ampullit ovat jakautuneet verrattain tasaisesti kaikkiin näytesarjoihin. Otannan suuruudesta riippuen vuotavien ampullien osuus vaihtelee, mutta pysyy kuitenkin alle kolmessa prosentissa.

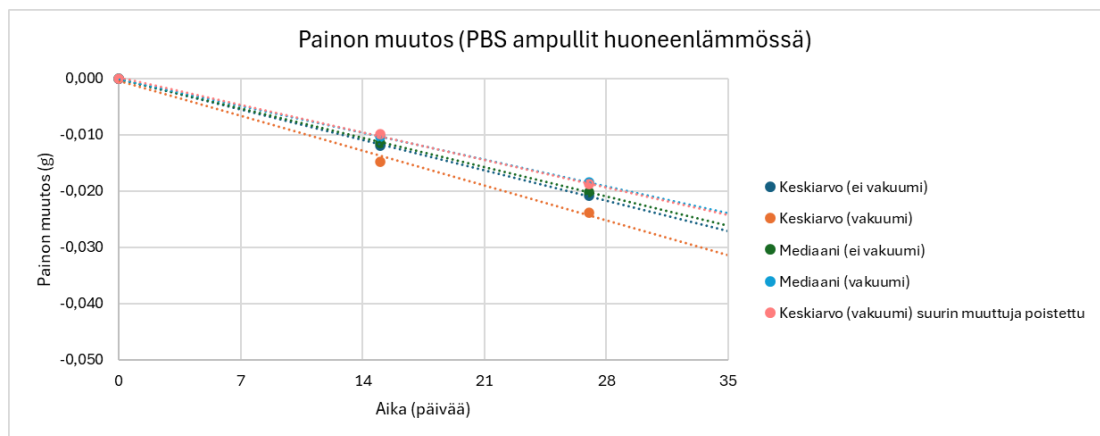
### 5.3 Pitkäaikaistestaukset ja ampullien säilyvyys

Ampulleista haluttiin selvittää niiden säilyvyys huoneenlämmössä. Testissä käytettiin ampulleja, joihin oli pakattu 500 µl PBS-liuosta.

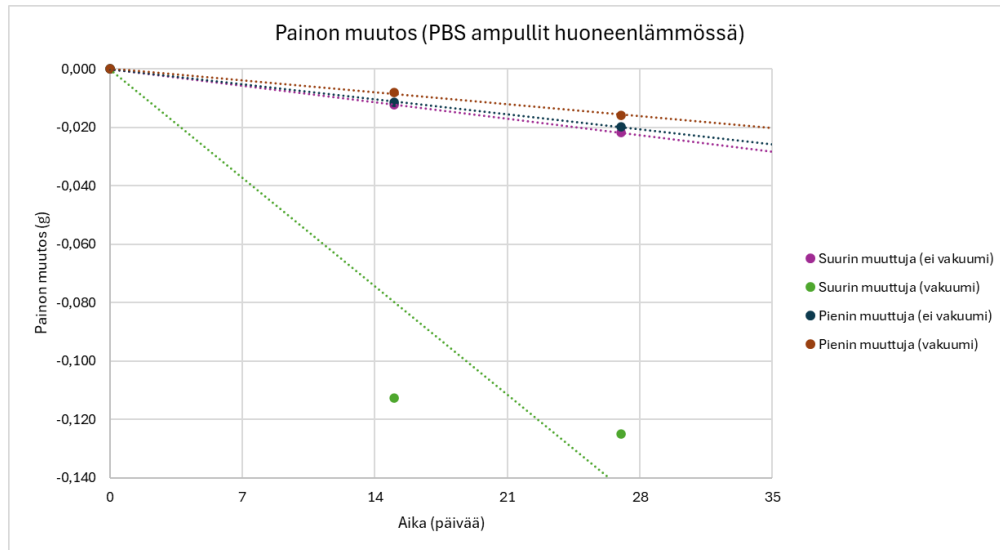
Ampulleja punnittiin yksittäin 40 kappaletta. Niistä 30 kappaletta pakattiin vakuumpusseihin ja 10 kappaletta käytettiin vertailuna ilman vakuumpakkausta. Vakuumpakkaus toteutettiin kotikäyttöön tarkoitetulla Finnvacuum Home vakuumikoneella, samoin kuin pitkäaikaistesteissä. Jokaiseen vakuumpakkaukseen säilöttiin 10 ampullia. Tarkoituksena oli selvittää, olisiko vakuumpakkauksesta apua nesteiden haihtumiseen ampulleista. Ampullit

punnittiin kolmesti 27 päivän aikana ja niistä laskettiin painon muutos. Liitteessä 3 on esitetty punnitusten tulokset sekä painon muutokset ja metyleenisinitestien tulokset.

Kuvioissa 7 ja 8 on esitetty kuvaajia painon muutoksesta. Kuviossa 7 sekä vakuumpakatuista että ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleista on laskettu keskiarvo- ja mediaanimuutos. Muutosten laskemiseen käytettiin kunkin päivän keskiarvo ja mediaanipainoa. Kuviossa 8 on esitetty suurimmat ja pienimmät muutokset painoissa vakuumpakatuista ja ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleissa.



Kuvio 7. PBS ampullien painon muutoksen keskiarvo ja mediaani vakuumpakatuista ja ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleissa. Lisäksi keskiarvo vakuumpakatuista ampulleista, kun suurin muuttuja on poistettu.



Kuvio 8. PBS ampullien suurimmat ja pienimmät painon muutokset vakuumpakatuista ja ilman vakuumpakkausta säilytetyistä ampulleissa.

Kuviosta 7 voidaan huomata, että mediaanin perusteella vakuumpakkauksesta ei ole hyötyä ampullien säilyvyyteen. Keskiarvoja tarkastellessa siitä voi tulkita olevan jopa haittaa. Kuitenkin kuviosta 8 huomataan, että suurin muuttuja vakuumpakkauksessa oli merkittävästi muita suurempi ja muuttaa keskiarvoa huomattavasti. Tästä syystä laskettiin erillinen keskiarvo ilman suurinta muuttujaa, jolloin vakuumpakkaus vaikuttaisi tyhjenevän hieman hitaammin, kuin ilman vakuumpakkausta olevat ampullit.

Ampulleista laskettiin myös, missä ajassa ne tyhjenisivät teoreettisesti kokonaan huoneenlämmössä. Ampulleihin oli pakattu 500 µl PBS-liuosta, joten ampullin lasketaan tyhjeneen kokonaan, kun sen paino on pudonnut 500 mg. Ampullin tyhjenemisajan määrittämiseen luotiin seuraava kaava:

$$\frac{500 \text{ mg}}{\text{Painon lasku päivässä} \left( \frac{\text{mg}}{\text{d}} \right)} = \text{Tyhjenemisaika (d)}$$

Taulukossa 7 on esitetty tulokset ampullien lasketuista teoreettisista tyhjenemisajoista. Tuloksista voitiin päätellä, että keskiarvoisesti ampullit säilyisivät melkein kaksi vuotta. Kuitenkaan ampulli ei saa olla, edes lähes tyhjä saapuessaan asiakkaalle, joten todellinen säilymisaika on lyhyempi. Tuloksista

voidaan myös huomata, että nopeimmin tyhjenevät ampullit saattavat olla tyhjiä jo kolmen kuukauden jälkeen.

Taulukko 7. Pitkäaikaissäilytyksessä huoneenlämmössä olleille PBS ampulleille lasketut tyhjenemisajat.

		Painon lasku päivässä	Tyhjenemisaika	
		mg/d	d	kk
Keskiarvo (g)	Ei vakuumi	0,77	650	22
	Vakuumi	0,88	567	19
	Vakuumi ilman suurinta muuttujaa	0,70	717	24
Mediaani (g)	Ei vakuumi	0,75	670	22
	Vakuumi	0,68	732	24
Suurin muuttuja (g)	Ei vakuumi	0,81	619	21
	Vakuumi	4,63	108	4
Pienin muuttuja (g)	Ei vakuumi	0,73	682	23
	Vakuumi	0,59	854	28

Ampullit testattiin metyleenisinitestillä ja vakuumpakkauksessa ollut eniten painoan muuttanut ampulli havaittiin positiivisena testissä. Muut ampullit havaittiin negatiivisina. Voidaan todeta, että metyleenisinitestissä positiivisena havaittu ampulli tyhjenee huomattavasti muita nopeammin.

Vertailuksi vesiampulleista tehtiin vastaava laskelma, jossa tyhjenemisajat laskettiin 45 päivän muutoksesta jääkaappisäilytyksessä. Tulokset on esitetty taulukossa 8. Tulokset eivät ole täysin verrannollisia ampullien erilaisen sisällön takia, mutta niistä voidaan epäillä jääkaappisäilytyksen pidentävän ampullien tyhjenemisaikaa merkittävästi. Voidaan kuitenkin todeta, että jääkaappisäilytetyiden vesiampullien tyhjenemisajassa on suurempi hajonta, kuin PBS ampulleilla huoneenlämmössä.

Vertailuksi vesiampulleista tehtiin vastaava laskelma, jossa tyhjenemisajat laskettiin 45 päivän muutoksesta jääkaappisäilytyksessä. Tulokset on esitetty taulukossa 8. Tulokset eivät ole täysin verrannollisia ampullien erilaisen sisällön takia, mutta niistä voidaan epäillä jääkaappisäilytyksen pidentävän ampullien tyhjenemisaikaa merkittävästi. Voidaan kuitenkin todeta, että jääkaappisäilytetyiden vesiampullien tyhjenemisajassa on suurempi hajonta, kuin PBS ampulleilla huoneenlämmössä.

Taulukko 8. Pitkäaikaissäilytyksessä jääkaapissa olleille vesiampulleille lasketut tyhjenemisajat.

		Painon lasku päivässä	Tyhjenemisaika	
		mg/d	d	kk
Keskiarvo	Ei vakuumi	0,03	16423	547
	Vakuumi	0,08	6221	207
Mediaani	Ei vakuumi	0,03	15517	517
	Vakuumi	0,01	37500	1250
Suurin muuttuja	Ei vakuumi	0,06	8333	278
	Vakuumi	2,48	202	7
Pienin muuttuja	Ei vakuumi	0,02	25000	833
	Vakuumi	0,01	37500	1250

Metyleenisinitesteissä todettiin, että eniten painoaaan pudottanut vakuumpakkauksessa ollut ampulli oli positiivinen. Muut ampullit olivat negatiivisia.



## 6 Lisäselvityksiä tuotannon laadun parantamiseksi

Koska metyleenisinitestit eivät soveltuneet kaikkien vuotavien ampullien löytämiseen, päätettiin tutkia, jos löytyisi toinen paremmin soveltuva menetelmä. Päädyttiin testaamaan painoon perustuvaa metyleenisini testimenetelmää. Menetelmää käsitellään luvussa 6.1. Menetelmä ei kuitenkaan soveltunut testatuille ampulleille.

Metyleenisinitesteissä havaittiin myös, että usein ampulli vuotaa täyttöaukon kohdilta. Tutkittiin, aiheuttaako jokin täyttövaiheessa vuotoja. Luvussa 6.3 käsitellään vuotokohdan etsimistä.

Haluttiin myös kartoittaa, kuinka puhdas pakkauslinja on. Tätä päätettiin tutkia mikrobiologisella viljelyllä, jota esitellään luvussa 6.2.

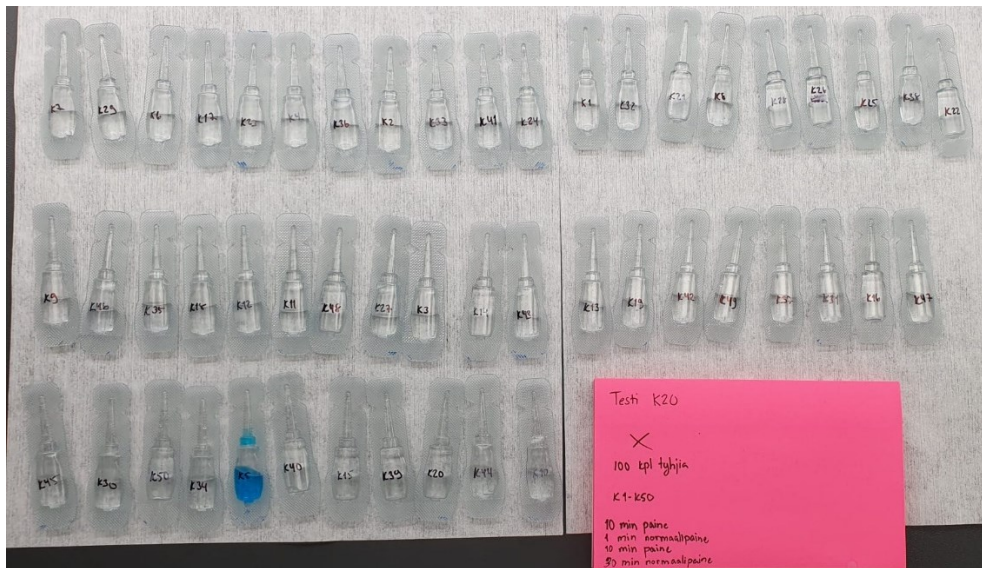
### 6.1 Painoon perustuva metyleenisini testimenetelmä

Metyleenisinen käyttöön perustuvassa menetelmässä laitteistolla ELT-201W voidaan havaita vuodot läpipainotablettipakkauksissa painoon perustuvalla menetelmällä. Menetelmä on verrattain yksinkertainen ja nopea, joten testattiin toimiiko menetelmä luotettavasti ampullien testauksessa. (Electrolab, 2015.)

Menetelmässä pakkaukset numeroidaan ja punnitaan jokaisen yksilöllinen paino. Tämän jälkeen pakkaukset testataan vakuumikammiossa metyleenisinillä. Testin jälkeen pakkaukset kuivataan ja punnitaan uudelleen. Tietokone analysoi punnitustulokset ja toteaa pakkaukset, joiden paino nousee poikkeavasti, vuotaviksi. (Electrolab, 2015.)

Testi tehtiin merkitsemällä 50 PBS ampullia numeroilla K1-K50 ja punnitsemalla ne yksitellen. Ampulleille tehtiin metyleenisinitesti kahdella 10 minuutin syklillä ja testin jälkeen ne kuivattiin käsin ja punnittiin uudelleen. Punnituksen tuloksia verrattiin silmämääräisellä tarkastelulla saatuihin tuloksiin ja todettiin, että tulokset eivät ole yhteneväisiä keskenään. Testin tulokset on esitetty liitteessä 4.

Liitteessä 4 keskiarvoista muutosta suuremmat muutokset on merkattu violetilla värillä. Ampulleille tehtiin metyleenisinitesti, jonka tulokset on esitetty kuvassa 9. Ampullissa K2 oli pitkä kulkureitti täyttöaukon kohdalla ja ampulli K5 oli selkeästi sinertävä testin jälkeen. Nämä ampullit on merkattu liitteeseen 4 punaisella. Kuitenkaan näiden kahden ampullin painonmuutos ei ole ollut merkittävä. Sen sijaan monen muun oli ja ampulli K49 oli jopa pudottanut painoaan merkittävästi.



Kuva 9. Ampullit K1-K50 metyleenisinitestien jälkeen.

Ampullien painon nousu voi johtua myös siitä, että huuhtelussa kosteutta jää kuivauksesta huolimatta ampullin rosoiselle pinnalle. Siitäkään huolimatta, vaikka ampullit saataisiin täydellisesti kuivattua, on painon muutos niin pieni positiivisessa ampullissa K5, että sen perusteella ei voi luotettavasti todeta ampullia vuotavaksi.

## 6.2 Mikrobiologinen testaus

Mikrobiologisilla testeillä pyrittiin selvittämään olisiko linja mahdollisesti myöhemmin riittävän hyvin puhdistettavissa, jotta sillä voitaisiin pakata parempaa puhtautta vaativia tuotteita. Linjan letkuja testattiin liuottaa isopropanolialkoholissa, ja todettiin, että letkut eivät kestä pitkäaikaista

altistumista. Tämän takia linja voidaan sisäisesti puhdistaa vain steriilillä vedellä, joka ei poista mikrobikontaminaatiota.

Täyttöpäät ja letkujen päät puhdistettiin isopropanoliaalkoholilla ennen pakkausta. Ennen varsinaista pakkausta ampullikonetta huuhdeltiin puhtaalla vedellä noin 400 ampullin ajan. Ampulleihin pakattiin autoklaavattua ja jääkaapissa säilytettyä PBS-liuosta.

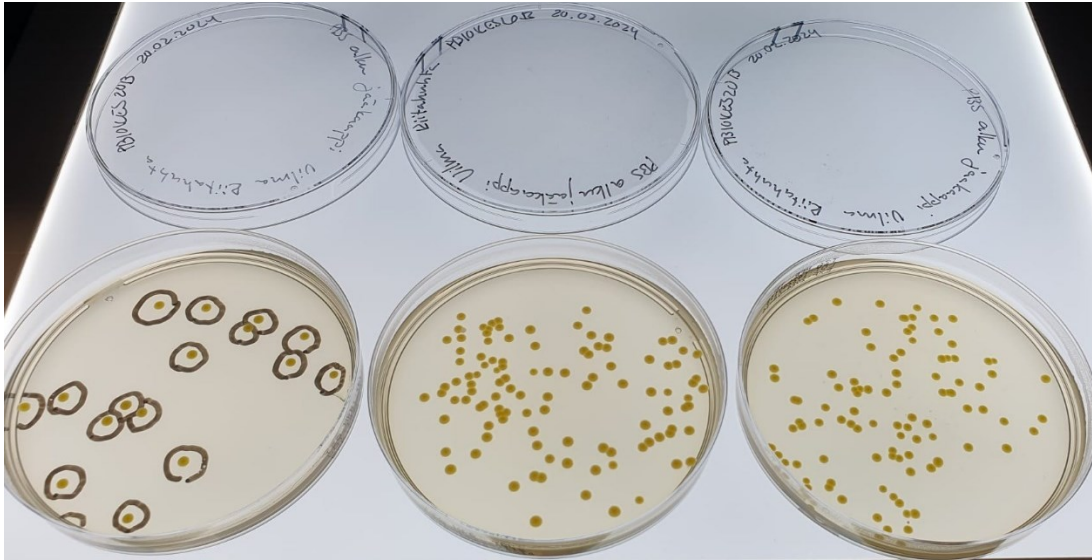
Ajosta otettiin näytteitä aluksi ja lopuksi. Kaikkia näytteitä säilytettiin muutamia tunteja jääkaapissa, jonka jälkeen osa ampulleista oli päivän jääkaapissa ja osa 37 °C lämpökaapissa. Kaikkia ampulleja ehdittiin säilyttää jääkaapissa poikkeuksellisesti vain muutamia tunteja aikataulurajoitteiden takia. Eri lämpötiloilla selvitettiin, voidaanko mikrobien määrässä havaita eroja riippuen säilytyslämpötilasta.

Ampulleista tehtiin mikrobiologinen suoraviljely, jossa koko ampullin sisältö laitettiin tryptoni-soija-agar (TSA) -maljoille. Menetelmän ei haluttu olevan selektiivinen millekään mikrobille, joten päädyttiin TSA maljoihin, jotka määritellään yleisalustoiksi. (Sojakka;ym., 2011 s. 74)

Maljojen viljelyssä käytettiin pintalevitystekniikkaa. Viljelyssä käytettiin steriilejä levityssauvoja. Menetelmänä käytettiin American Society For Microbiology vuonna 2006 luomaa menetelmää. Pintalevitystekniikassa mikrobit pyritään levittämään tasaisesti agarin pinnalle. Pintalevitystekniikka soveltuu erityisen hyvin, jos mikrobeita halutaan kerätä talteen inkuboinnin jälkeen. (Wise, 2006).

Useimpia bakteereja inkuboidaan 30–35 °C lämpötiloissa vähintään 3 vuorokautta (SFS, 2021 s. 35). Tässä työssä inkubointiaika oli 3 vuorokautta ja lämpötila 33 °C.

Kuvassa 10 on esitetty maljat, joissa oli ajon alusta otettuja näytteitä, joita säilytettiin jääkaapissa ennen viljelyä. Pesäkkeitä on ensimmäisellä maljalla 17 pmy/500 µl, toisella 125 pmy/500 µl ja kolmannella 102 pmy/500 µl. Pesäkkeet olivat suurehkoja ja keltaisia.



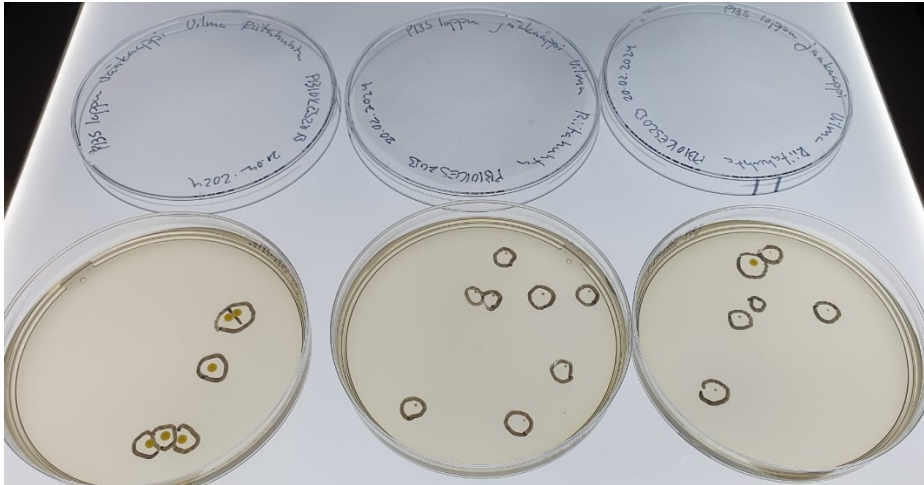
Kuva 10. Alkunäytteet, joita säilytetty päivä jääkaapissa ennen viljelyä.

Kuvassa 11 on esitetty maljat, joissa oli ajon alusta otettuja näytteitä ja joita säilytettiin 37 °C ennen viljelyä. Pesäkkeitä oli maljoilla ensimmäisessä 0 pmy/500 µl, toisessa 2 pmy/500 µl, kolmannessa 5 pmy/500 µl, neljännessä 14 pmy/500 µl ja viidennessä 6 pmy/500 µl. Pesäkkeet olivat pieniä ja vaaleita.



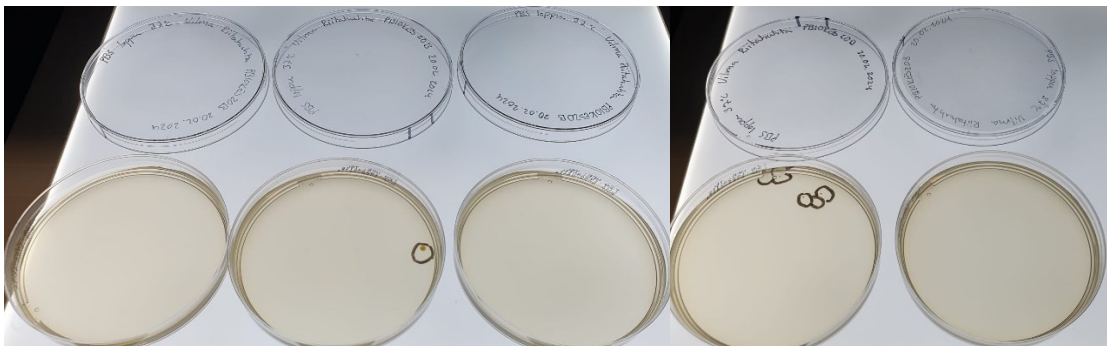
Kuva 11. Alkunäytteet, joita on säilytetty 37 °C ennen viljelyä.

Kuvassa 12 on esitetty maljat, joissa oli ajon lopusta otettuja näytteitä, joita säilytettiin jääkaapissa ennen viljelyä. Pesäkkeitä oli ensimmäisellä maljalla 6 pmy/500 µl, toisella 8 pmy/500 µl ja kolmannella 6 pmy/500 µl. Pesäkkeet olivat osa suurehkoja ja keltaisia ja osa pieniä valkoisia.



Kuva 12. Loppunäytteet, joita on säilytetty päivä jääkaapissa ennen viljelyä.

Kuvassa 13 on esitetty maljat, joissa oli ajon lopusta otettuja näytteitä ja joita säilytettiin 37 °C ennen viljelyä. Pesäkkeitä oli maljoilla ensimmäisessä 0 pmy/500 µl, toisessa 1 pmy/500 µl, kolmannessa 0 pmy/500 µl, neljännessä 5 pmy/500 µl ja viidennessä 0 pmy/500 µl. Pesäkkeet olivat pieniä ja vaaleita maljalla neljä ja toisessa maljassa oli yksi iso ja keltainen pesäke.



Kuva 13. Loppunäytteet, joita on säilytetty 37 °C ennen viljelyä.

Kuvassa 14 on esitetty rinnakkain pieni vaalea ja isohko keltainen pesäke. Viljelyissä ilmenee selkeästi kaksi erilaista mikrobia, jotka molemmat muodostivat erilaisen pesäkkeen.



Kuva 14. Pieni vaalea (vasemmalla) ja isohko keltainen (oikealla) pesäke esitetty rinnakkain.

Mikrobiologisen viljelyn tuloksista voitiin päätellä, että ajon alussa mikrobeja esiintyy selkeästi enemmän, mutta niitä ilmenee myös ajon loppupuolella. Vaikka eri mikrobien määrä ei ole suuri, on mikrobikuorma verrattain iso. Näiden tulosten perusteella pakkauslinjalla ei ole suotavaa sellaisenaan pakata mitään tuotteita, jotka tarjoavat mikrobeille otollisen kasvualustan, eikä mitään puhtautta vaativia tuotteita.

### 6.3 Vuotojen syy

Metyleenisinitestien aikana havaittiin, että usein metyleeninen sisäänmenoaukko on ampullin täyttöaukon kohdalla. Laitteiston heikkojen kohtien tunteminen on tärkeää, kun parannetaan tuotannon laatua.

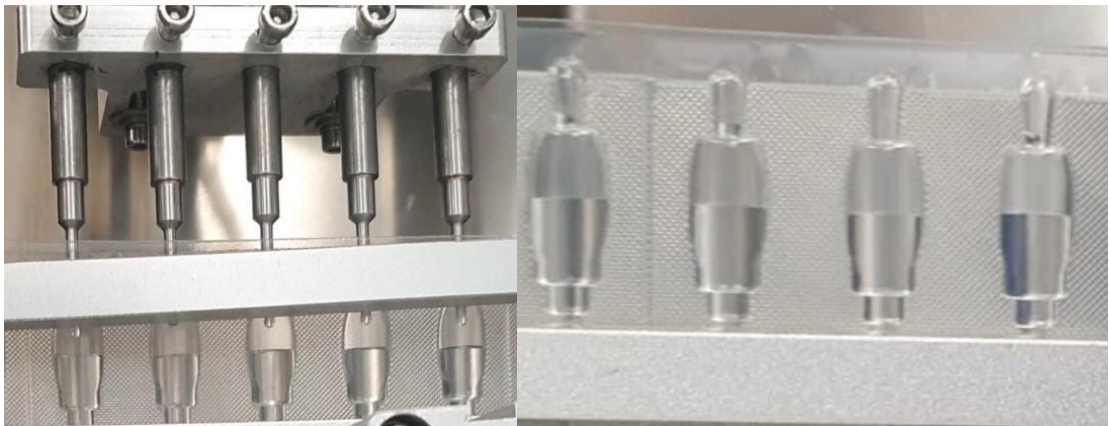
Muodostui teoria, jonka mukaan kosteus/pakattava neste jää pienissä määrin täyttöpäiden mukaan niiden noustessa ja jättää muovin kosteaksi, jolloin se ei kunnolla pääse sulamaan yhteen.

Teoriaa testattiin ajamalla 300 ampullia normaaleilla ajoparametreilla, mutta siten, että kone ei täytä ampulleja. Ampulleille suoritettiin metyleenisinitestaus ja todettiin niiden laadun olevan korkea. Joukosta ei löytynyt yhtään vuotavaa ampullia eikä metyleeninen kulkureittejä läheskään samoissa määrin, kuin



täytetyissä ampulleissa. Kaikkiaan tyhjiä ampulleja testattiin 354 kappaletta ja tulokset olivat yhteneväisiä.

Nestepisarasta pyrittiin saamaan videokuva, jotta ongelman syy saadaan varmistettua. Tässä onnistuttiin ja hidastetusta videosta voitiin todeta, että syöttöpäiden täyttäessä ampullin, niiden kärkeen jää pisarat. Pisarat jäävät täyttöaukkoon täyttöpäiden noustessa ulos ampullista. Pisarat on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Kuva siitä, miten nestepisara muodostuu ja jää ampullin täyttöaukkoon.

Kuvassa 15 vasemmalla täyttöpäät ovat juuri lopettaneet täyttämisen ja niiden päihin on jäänyt nestepisarot. Seuraavaksi täyttöpäät nousevat ampullista ja nestepisara jää täyttöaukkoon, kuten oikealla on kuvattu.

## 7 Päätelmät

Ampullien painon muutoksista voidaan päätellä, että testattu metyleenisinimenetelmä ei havaitse kaikkia vuotavia ampulleja. Menetelmällä pystytään kuitenkin havaitsemaan runsaasti vuotavat ampullit suhteellisen luotettavasti. Menetelmän validointia varten pitäisi kuitenkin kehittää parempi tapa saada negatiivisia ja positiivisia kontroleja. Nyt osa negatiivisista kontroleista ei läpäissyt testiä ja positiivisilla testeillä ei ollut mahdollista määrittää havaitsemisrajaa.

Taulukosta 7 huomataan, että eniten painoan muuttanut vakuumpakattu ampulli, joka ilmeni positiivisena metyleenisinitestissä, olisi tyhjä 108 päivän jälkeen. Vastaavasti ilman vakuumpakkausta ollut eniten painoan muuttanut ampulli olisi tyhjä vasta 619 päivän jälkeen. Tämä ampulli oli negatiivinen metyleenisinitestissä. Tämä on myös lähellä keskiarvoa, joka on 650 ilman vakuumpakkausta olleilla ampulleilla. Metyleenisinitestissä positiivisen vuotavan ampullin tyhjenemistahti on siis melkein kuusi kertaa nopeampi kuin testissä negatiivisten verrokkiensa.

Painoon perustuvasta metyleenisinen testimenetelmästä todettiin, että se ei ole käyttökelpoinen. Ampullin painon muutos metyleenisinitestin aikana ei korreloi siihen, onko ampulli positiivinen vai negatiivinen.

Jos metyleenisinitestillä positiiviset ampullit saataisiin karsittua tuotannosta, paranisi ampullien laatu merkittävästi. Kuitenkaan kaikkia vuotavia ampulleja ei ole mahdollista karsia menetelmää hyödyntämällä nykyisillä parametreilla. Myös mahdollisesti paineistusaikoja muuttamalla olisi testistä mahdollista saada herkempi. Kuitenkin ampulleista tulee tiiviystä huolimatta haihtumaan nestettä, mikä saattaa johtaa pakatun tuotteen konsentroitumiseen pidemmän ajan kuluessa.

Metyleenisinitesteissä todettiin, että vajaa 3 % tuotetuista ampulleista on positiivisia. Kuitenkin kaikki ampullit pudottavat painoan, joka saattaa osaltaan johtua myös muovin läpäisykyvystä.



Täyttöpäihin jäävät nestepisararat paljastuivat todennäköisimmäksi vuotojen aiheuttajaksi. Kun ongelman syy on selvillä, sitä voidaan lähteä korjaamaan. Tässä tapauksessa, jos pumppuihin saataisiin esimerkiksi pieni takaisin imu täytön jälkeen, saattaisi ongelma ratketa kokonaan. Tyhjille ampulleille tehtyjen testien perusteella voidaan päätellä, että ampullien laatu nousisi merkittävästi, kun nestepisaroista päästäisiin eroon.

Mikrobiologiselta laadultaan ampulleja tuskin on mahdollista saada korkealle tasolle, ellei ampullikonetta siirretä puhdistilaan ja sille löydetä soveltuvaa mikrobistoa tuhoavaa puhdistusainetta. On myös huomioitava mahdollisista vuotavista ampulleista aiheutuva kontaminaatoriski ampullien säilytyksen aikana.

Jos metyleenisinitestissä positiiviset ampullit saataisiin karsittua pois, olisi ampullien tyhjenemisaika keskiarvoisesti yli 1,5 vuotta. Tässä on kuitenkin huomioitava se, ettei ampulli saa tyhjentyä myyntiaikana eikä pakattava tuote saa liiaksi konsentroitua. Todellinen säilymisaika tulee riippumaan pakattavasta tuotteesta ja sen hyväksyttävissä olevista konsentraation vaihteluista.

Lämpötilalla on merkittävä vaikutus ampullien tyhjenemisnopeuteen. Korkeammissa lämpötiloissa ampullit tyhjenevät nopeammin. Kuitenkin pakkanen saattaa vaurioittaa ampullin rakennetta, eikä myöskään muovin valmistaja suosittele materiaalin säilytystä pakkasessa.

Tyhjenemisajat laskettiin myös jääkaappisäilytetyille vesiampulleille. Tuloksista voi päätellä, että jääkaappisäilytys lisäisi ampullien säilyvyyttä merkittävästi. Asiasta pitäisi kuitenkin tehdä vielä laajempi tutkimus eri liuoksilla.

## Lähteet

**AAT Bioquest.** Absorption [Methylene Blue]. [Online] [Viitattu: 1.. 3. 2024.] [https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/methylene\\_blue](https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/methylene_blue).

**ASTM.** About us. [Online] [Viitattu: 1. 3. 2024.] <https://www.astm.org/about/overview.html>.

**Booth, Crystal. 2016.** Understanding Container Closure Integrity Testing. [Online] American Pharmaceutical Review, 30. 9. 2016. [Viitattu: 2. 3. 2024.] <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/239498-Understanding-Container-Closure-Integrity-Testing/>.

**Electrolab. 2015.** LPP-group. *Leak testers*. [Online] 6. 2015. [Viitattu: 8. 2. 2024.] [https://backend.lpp-group.com/sites/lpp\\_group\\_com/files/2021-01/Leak%20Tester\\_1.pdf](https://backend.lpp-group.com/sites/lpp_group_com/files/2021-01/Leak%20Tester_1.pdf).

**Finnvacuum. 2023.** Declaration of compliance for plastic materials intended for food contact. [Online] 3. 8. 2023. Rev 06.

—. **2023.** Technical data sheet. *AMBAR 38/5NB TS MY400*. [Online] 13. 7. 2023. Rev 8.

**Helmenstine, Anne Marie.** EFerrit. *Fosfaattipuskuroitu suolaliuos tai PBS-liuos*. [Online] [Viitattu: 22. 2. 2024.] <https://fi.eferrit.com/fosfaattipuskuroitu-suolaliuos-tai-pbs-liuos/>.

**Justin, Tom. 2021.** Technology Network Analysis&separations. *UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications*. [Online] 30. 5. 2021. [Viitattu: 6. 3. 2024.] <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>.

**Jyväskylän yliopisto. 2015.** Koppa. *Määrällinen tutkimus*. [Online] 23. 4. 2015. [Viitattu: 6. 3. 2024.]

<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/tutkimusstrategiat/maarallinen-tutkimus>.

—, 2021. Koppa. *Laadullinen tutkimus*. [Online] 28. 10. 2021. [Viitattu: 6. 3. 2024.]

<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/tutkimusstrategiat/laadullinen-tutkimus>.

**Kähkönen, Essi. 2020.** Ihme pakkaus! Hyvä lääkepakkaus turvaa lääkkeen laadun ja paljon muuta. [Online] Orion, 1. 4. 2020. [Viitattu: 2. 3. 2024.]

<https://www.orion.fi/uutishuone/kaikki-uutiset/artikkelit/vastuullisuus/ihme-pakkaus-hyva-laakepakkaus-turvaa-laakkeen-laadun-ja-paljon-muuta/>.

**Lakkapää.** Pikaliima Loctite 406 20g Kumi, Muovi. *Tuotokuvaus*. [Online] [Viitattu: 14. 2. 2024.] <https://www.lakkapaa.com/fi/sisustaminen/pikaliima-loctite-406-20g-kumi-muovi-v-1032540623-nopeasti-kovettuva/p/1032540623/>.

**Limab. 2023.** Limab. *Dye Penetration Seal Integrity Testing*. [Online] 24. 6. 2023. [Viitattu: 13. 2. 2024.] <https://www.limab.co.uk/knowledge-base/dye-penetration-seal-integrity-testing/>.

**McLaren, Miranda. 2022.** What's next for Container Closure Integrity Testing? [Online] *Pharmaceutical Technology*, 30. 11. 2022. [Viitattu: 2. 3. 2024.] <https://www.pharmaceutical-technology.com/sponsored/whats-next-for-container-closure-integrity-testing/>.

**Measurlabs.** UV-VIS-spektroskopia. [Online] [Viitattu: 2. 3. 2024.] <https://measurlabs.com/fi/menetelmat/ultravioletti-nakyva-spektroskopia-uv-vis/>.

**Partanen, Joni.** Vaisala. *Miten suhteellinen kosteus määritellään ja lasketaan?* [Online] [Viitattu: 1. 3. 2024.] <https://www.vaisala.com/fi/expert-article/relative-humidity-how-is-it-defined-and-calculated>.

**PubChem.** National Center for Biotechnology Information. *Compound Summary for CID 6099, Methylene Blue*. [Online] [Viitattu: 2. 13. 2024.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-Blue>.

**Puranen, Saara. 2022.** *Silmälääkepakkauspullojen eheystestaus metyleenisini-immersiotestillä.* Tampere : s.n., 2022.

**Salofa Oy.** Salofa Oy – suomalaista terveydenhuollon teknologiaosaamista Salosta. [Online] [Viitattu: 22. 2. 2024.] <https://www.salofa.com/salofa-oy>.

**SFS. 2021.** SFS-EN 17141:2020. *Puhdastilat ja puhtaat alueet. Biokontaminaation hallinta.* [Online] 31. 8. 2021. [Viitattu: 22. 2. 2024.]

**Sigma-Aldrich solutions.** Phosphate Buffered saline (PBS). [Online] [Viitattu: 6. 3. 2024.] <https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/products/chemistry-and-biochemicals/biochemicals/biological-buffers/phosphate-buffer-saline-pbs>.

**Sojakka, Kirsi ja Välimäki, Maija-Liisa. 2011.** *Ammatillinen mikrobiologia.* Tampere : Opetushallitus, 2011. ISBN 978-952-13-4723-8.

**Tieteen termipankki.** Mikrobiologia:pesäkkeen muodostava yksikkö. [Online] [Viitattu: 2. 3. 2024.] [https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:pes%C3%A4kkeen\\_muodostava\\_yksikk%C3%B6](https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:pes%C3%A4kkeen_muodostava_yksikk%C3%B6).

**Tingstad.** Materiaaliopas: Muovi. *Oikea muovi oikeaan käyttötarkoitukseen.* [Online] [Viitattu: 2. 3. 2024.] <https://www.tingstad.com/se-fi/alla-kategorier/kunskapscenter/hallbarhet-ravaror/materialguide/materialguide-plast>.

**Valmistajat.fi.** ASTM standardit. [Online] [Viitattu: 3. 3. 2024.] <https://valmistajat.fi/standardit/astm-standardit>.

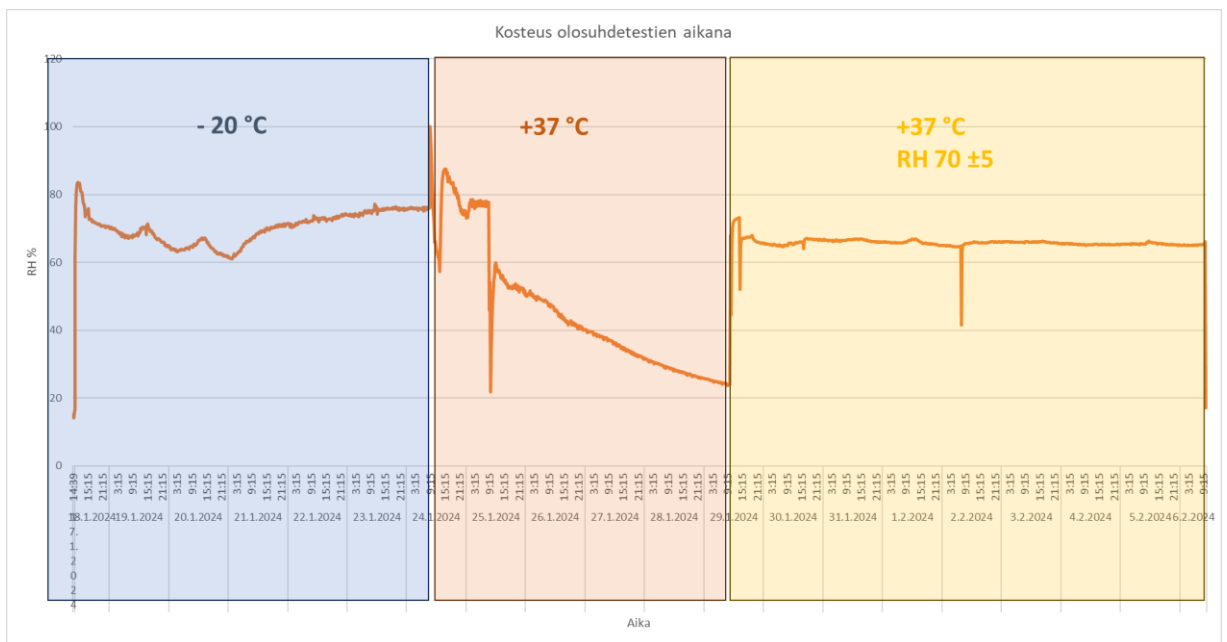
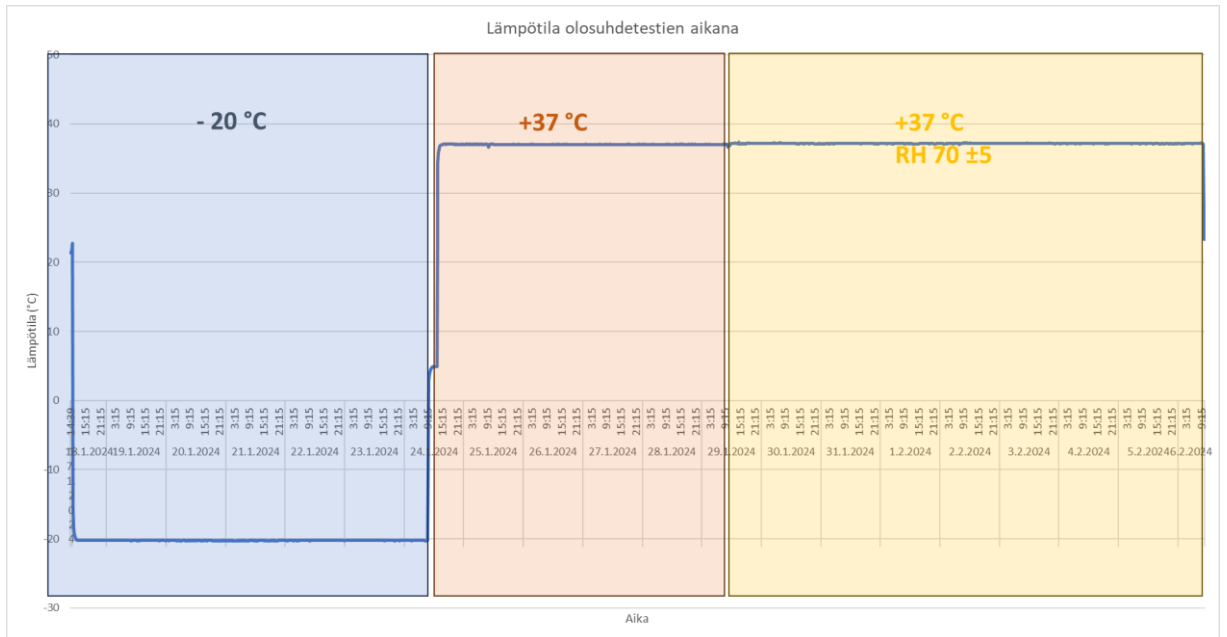
**Wise, Kathryn. 2006.** American Society Of Microbiology. *Preparing Spread Plates Protocols.* [Online] 9. 10. 2006. [Viitattu: 22. 2. 2024.] <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Preparing-Spread-Plates-Protocols.pdf?ext=.pdf>.

**Xiamen Keyuan Plastic Co.** EVA Muovi Raaka-Aine. *Tuotetiedot.* [Online] [Viitattu: 2. 3. 2024.] <https://fi.ky-plastics.com/others-plastic-raw-material/eva-plastic-raw-material.html>.

**Zimmerman, Dean A. ja Scheeser, Amy M.** An introduction to Plexar tie layer resins. [Online] [Viitattu: 2. 3. 2024.]

<https://www.lyondellbasell.com/4aa277/globalassets/documents/polymers-technical-literature/introduction-to-plexar-tie-layer-resins-9470.pdf>.

## Dataloggerista saatu data olosuhdetestien aikana



## Olosuhdetestattujen ampullien tulokset

Olosuhdetestien punnitustulokset ja metyleenisinitestien tulokset							
Testi	Testatut ampullit	Ampulleja (kpl)	Positiivisia (kpl)	Paino ennen olosuhdekaappia	Yhteispaino metyleenisinitestien alussa (g)	Yhteispaino metyleenisinitestien lopussa (g)	Punnittu seuraavaan päivänä (yes/no)
5 °C	PBSA (5 °C)	30	1	41,0100	40,9841	40,9822	Yes
	PBS 1/2 (5 °C)	30	0	40,8463	40,8270	40,7939	Yes
	PBSL (5 °C)	30	2	39,3378	39,3131	39,3111	Yes
5 °C → -20 °C	PBSA (-20 °C)	30	2	40,9829	40,9828	40,7254	Yes
	PBS 1/2 (-20 °C)	30	1	40,8390	40,8543	40,8035	Yes
	PBSL (-20 °C)	30	1	40,9660	40,9818	40,9372	Yes
5 °C → 37 °C	PBSA (37 °C)	30	1	40,9277	40,5980	40,5751	Yes
	PBS 1/2 (37 °C)	30	0	40,7608	40,4256	40,4045	Yes
	PBSL (37 °C)	30	0	40,8487	40,5169	40,4911	Yes
37 °C, RH 70 ±5	1 string	5	5	6,1916	6,1043	7,7337	Yes
	PBSL vakuumi	30	0	40,7760	40,6161	40,5122	Yes
	PBSL ei vakuumi	30	0	40,6403	40,3562	40,2817	Yes
Pitkäaikais	PBSL pitkäaikais	30	0	40,9427	40,3786	40,5122	Yes
	ESINÄYTE pitkäaikai	30	1	40,9657	40,3364	40,2653	Yes

## Pitkäaikaissäilytystestin tulokset

Taulukossa on esitetty kunkin huoneenlämmössä säilytetyn ampullin painon muutos ensimmäisen ja viimeisen päivän välillä. Muutoksessa on värikoodaus siten, että keskiarvoinen muutos on keltaisella ja väri muuttuu punaiseksi sen kasvaessa suhteessa keskiarvoon ja vihreäksi sen pienentyessä.

Pussi	Ampulli	Vakumoitu (yes/no)		23.1.2024	7.2.2024	19.2.2024	Metyleenisinitestin tulos	Suunta	Muutos
1	71	No	H u o n e n l ä m p ö	1,3659	1,3545	1,3458	Negatiivinen	-	0,0201
	72			1,3478	1,3354	1,3260	Negatiivinen	-	0,0218
	73			1,3757	1,3643	1,3559	Negatiivinen	-	0,0198
	74			1,3751	1,3635	1,3547	Negatiivinen	-	0,0204
	75			1,3489	1,3368	1,3275	Negatiivinen	-	0,0214
	76			1,3429	1,3305	1,3212	Negatiivinen	-	0,0217
	77			1,3496	1,3374	1,3279	Negatiivinen	-	0,0217
	78			1,3708	1,3594	1,3508	Negatiivinen	-	0,0200
	79			1,3640	1,3526	1,3438	Negatiivinen	-	0,0202
	80			1,3647	1,3532	1,3446	Negatiivinen	-	0,0201
	<b>Yht.</b>			<b>13,6066</b>	<b>13,4880</b>	<b>13,3989</b>		-	<b>0,2077</b>
2	81	Yes	H u o n e n l ä m p ö	1,3678	1,3595	1,3505	Negatiivinen	-	0,0173
	82			1,3159	1,2033	1,1908	Positiivinen	-	0,1251
	83			1,3369	1,3227	1,3106	Negatiivinen	-	0,0263
	84			1,3596	1,3493	1,3411	Negatiivinen	-	0,0185
	85			1,3583	1,3490	1,3406	Negatiivinen	-	0,0177
	86			1,3559	1,3460	1,3368	Negatiivinen	-	0,0191
	87			1,3305	1,3204	1,3112	Negatiivinen	-	0,0193
	88			1,3811	1,3729	1,3653	Negatiivinen	-	0,0158
	89			1,3716	1,3615	1,3528	Negatiivinen	-	0,0188
	90			1,3568	1,3481	1,3397	Negatiivinen	-	0,0171
	<b>Yht.</b>			<b>13,5362</b>	<b>13,3338</b>	<b>13,2387</b>		-	<b>0,2975</b>
3	91	Yes	H u o n e n l ä m p ö	1,3446	1,3337	1,3254	Negatiivinen	-	0,0192
	92			1,3816	1,3709	1,3625	Negatiivinen	-	0,0191
	93			1,3618	1,3508	1,3422	Negatiivinen	-	0,0196
	94			1,3435	1,3315	1,3218	Negatiivinen	-	0,0217
	95			1,3381	1,3243	1,3137	Negatiivinen	-	0,0244
	96			1,3807	1,3693	1,3608	Negatiivinen	-	0,0199
	97			1,3669	1,3562	1,3476	Negatiivinen	-	0,0193
	98			1,3516	1,3369	1,3268	Negatiivinen	-	0,0248
	99			1,3712	1,3599	1,3511	Negatiivinen	-	0,0201
	100			1,3720	1,3613	1,3525	Negatiivinen	-	0,0195
	<b>Yht.</b>			<b>13,6134</b>	<b>13,4918</b>	<b>13,4040</b>		-	<b>0,2094</b>
4	101	Yes	H u o n e n l ä m p ö	1,3646	1,3531	1,3453	Negatiivinen	-	0,0193
	102			1,3714	1,3602	1,3517	Negatiivinen	-	0,0197
	103			1,3604	1,3499	1,3420	Negatiivinen	-	0,0184
	104			1,3753	1,3644	1,3551	Negatiivinen	-	0,0202
	105			1,3365	1,3234	1,3138	Negatiivinen	-	0,0227
	106			1,3837	1,3729	1,3645	Negatiivinen	-	0,0192
	107			1,3626	1,3518	1,3435	Negatiivinen	-	0,0191
	108			1,3499	1,3376	1,3286	Negatiivinen	-	0,0213
	109			1,3480	1,3333	1,3242	Negatiivinen	-	0,0238
	110			1,3571	1,3455	1,3373	Negatiivinen	-	0,0198
	<b>Yht.</b>			<b>13,6104</b>	<b>13,4927</b>	<b>13,4035</b>		-	<b>0,2069</b>



## Painoon perustuvalla metyleenisini menetelmällä testattujen ampullien K1-K50 painon muutokset

Painoon perustuvalla metyleenisini menetelmällä testattujen ampullien K1-K50 painon muutokset. Punaisella merkatut ampullit K2 ja K5 todettiin vuotavaksi silmämääräisellä tarkastelulla. Violetilla merkityt painon muutokset ampulleilla K3, K12, K23, K24, K26, K43, K44, K47, K48 ja K49 ovat keskimääräistä suurempia.

Ampulli	Paino ennen testiä (g)	Paino testin jälkeen (g)	+/-	Muutos	Ampulli	Paino ennen testiä (g)	Paino testin jälkeen (g)	+/-	Muutos
K1	1,3511	1,3513	+	0,0002	K26	1,3377	1,3425	+	0,0048
K2	1,3392	1,3401	+	0,0009	K27	1,3212	1,3224	+	0,0012
K3	1,3386	1,3408	+	0,0022	K28	1,3644	1,3652	+	0,0008
K4	1,3667	1,3676	+	0,0009	K29	1,3629	1,3637	+	0,0008
K5	1,3377	1,3384	+	0,0007	K30	1,3275	1,3292	+	0,0017
K6	1,3409	1,3427	+	0,0018	K31	1,3649	1,3653	+	0,0004
K7	1,3484	1,3491	+	0,0007	K32	1,3537	1,3546	+	0,0009
K8	1,3471	1,3492	+	0,0021	K33	1,3583	1,3590	+	0,0007
K9	1,3279	1,3288	+	0,0009	K34	1,3505	1,3513	+	0,0008
K10	1,3403	1,3411	+	0,0008	K35	1,3660	1,3667	+	0,0007
K11	1,3353	1,3369	+	0,0016	K36	1,3447	1,3457	+	0,0010
K12	1,3661	1,3699	+	0,0038	K37	1,3697	1,3704	+	0,0007
K13	1,3772	1,3777	+	0,0005	K38	1,3468	1,3474	+	0,0006
K14	1,3428	1,3438	+	0,0010	K39	1,3557	1,3566	+	0,0009
K15	1,3554	1,3563	+	0,0009	K40	1,3309	1,3318	+	0,0009
K16	1,3572	1,3582	+	0,0010	K41	1,3324	1,3335	+	0,0011
K17	1,3628	1,3633	+	0,0005	K42	1,3432	1,3445	+	0,0013
K18	1,3428	1,3442	+	0,0014	K43	1,3468	1,3496	+	0,0028
K19	1,3459	1,3480	+	0,0021	K44	1,3530	1,3733	+	0,0203
K20	1,3305	1,3315	+	0,0010	K45	1,3481	1,3493	+	0,0012
K21	1,3485	1,3486	+	0,0001	K46	1,3409	1,3424	+	0,0015
K22	1,3599	1,3615	+	0,0016	K47	1,3675	1,3706	+	0,0031
K23	1,3456	1,3490	+	0,0034	K48	1,3540	1,3578	+	0,0038
K24	1,3408	1,3440	+	0,0032	K49	1,3721	1,3539	-	0,0182
K25	1,3287	1,3296	+	0,0009	K50	1,3322	1,3329	+	0,0007