

2021 • 2022

Faculteit Industriële Ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: chemie

Masterthesis

Identification of inline image analysis parameters for API
flowability prediction and modelling

PROMOTOR :

Prof. dr. ir. Leen BRAEKEN

BEGELEIDER :

Mevrouw Nele MERKELBACH

Wim Vanbockryck

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: chemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



KU LEUVEN



KU LEUVEN

2021 • 2022

Faculteit Industriële Ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: chemie

Masterthesis

Identification of inline image analysis parameters for API
flowability prediction and modelling

PROMOTOR :

Prof. dr. ir. Leen BRAEKEN

BEGELEIDER :

Mevrouw Nele MERKELBACH

Wim Vanbockryck

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: chemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

Deze masterproef werd gemaakt om mijn master industriële ingenieurswetenschappen: chemie met afstudeerrichting duurzame procestechnologie en kunststoffen te behalen. De masterproef was een interessante ervaring waaruit ik veel heb geleerd naar de toekomst toe. Ik zou dit alles niet alleen gerealiseerd kunnen hebben en daarom zou ik graag een aantal personen bedanken.

Als eerste wil ik mijn promotor prof. dr. ir. Leen Braeken bedanken voor het grondig opvolgen van mijn progressie en om me gerust te stellen wanneer het moeizamer verliep. Daarnaast wil ik ook mijn begeleidster ing. Nele Merkelbach bedanken. Nele was altijd beschikbaar om mijn vragen te beantwoorden, inzichten te geven m.b.t. experimenten, feedback te geven, etc. en dat altijd met een lach. Ook wil ik ing. Arne Vancleef bedanken voor de hulp bij het opmeten en verwerken van de materiaaleigenschappen m.b.v. een beeldanalyse. Tenslotte wil ik ook mijn medestudenten die ook hun masterproef uitvoerden in het CIPT bedanken voor het zorgen van een leuke werkomgeving.

Inhoudsopgave

Woord vooraf.....	1
Lijst van tabellen	5
Lijst van figuren.....	7
Woordenlijst.....	9
Abstract.....	11
Abstract in English.....	13
1 Introductie.....	15
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling/onderzoeksvraag.....	16
1.3 Doelstellingen.....	16
2 Literatuurstudie.....	19
2.1 Productieproces van farmaceutische tabletten	19
2.1.1 API synthese.....	19
2.1.2 Kristallisatie	19
2.1.3 Downstream processen.....	21
2.1.4 Tabletteren	21
2.2 Materiaaleigenschappen API's	22
2.2.1 Deeltjesgrootte.....	22
2.2.2 Deeltjesgrootteverdeling	22
2.2.3 Vorm.....	23
2.3 Vloeigedrag van API's	24
2.3.1 Definitie.....	25
2.3.2 Angle of repose.....	26
2.3.3 Roterende trommel.....	26
2.3.4 Samendrukbaarheid	27
2.3.5 FT4 poederreometer	28
2.3.6 Afschuifcel.....	29
2.4 Verband poedereigenschappen en vloeigedrag.....	30
2.4.1 Deeltjesgrootte.....	30
2.4.2 Deeltjesgrootteverdeling	31
2.4.3 Deeltjesvorm.....	32
2.4.4 Elektrostatische lading en vochtgehalte.....	32
3 Materiaal en methoden	35
3.1 Geselecteerde poeders.....	35
3.2 Materiaaleigenschappen.....	36
3.2.1 Opstelling.....	36

3.2.2	Beeldanalyse	38
3.2.3	Correctie op de rondheid van ImageJ	41
3.3	Stromingseigenschappen	42
3.3.1	Staalvoorbereiding	42
3.3.2	Cohesieve index en dynamische angle of repose	42
3.3.3	Samendrukbaarheidsindex en Hausner Ratio	43
3.4	Correlatie.....	44
3.4.1	Pearson correlatie.....	44
3.4.2	Kendall rang correlatie	44
3.4.3	Statistische significantie.....	45
4	Resultaten en discussie.....	46
4.1	Materiaaleigenschappen.....	46
4.1.1	Inline microscoop beelden	46
4.1.2	Deeltjesgrootte.....	48
4.1.3	Deeltjesvorm.....	50
4.2	Stromingseigenschappen	53
4.2.1	Cohesieve index en dynamische angle of repose	53
4.2.2	Hausner ratio en samendrukbaarheidsindex.....	56
4.3	Overzicht van de materiaal- en stromingseigenschappen.....	58
4.4	Correlatie.....	58
4.4.1	Pearson correlatie.....	59
4.4.2	Kendall rang correlatie	59
4.4.3	Modeleren: meervoudige lineaire regressie	60
5	Besluit.....	63
	Referentielijst	65
	Appendix A.....	69

Lijst van tabellen

Tabel 1: Schaal voor stromingseigenschappen.	27
Tabel 2: Overzicht van de verschillende fracties voor elke component.....	35
Tabel 3: overzicht grootte en grootteverdeling van de verschillende poeders.	49
Tabel 4: Samenvattende tabel van materiaal- en stromingseigenschappen.....	58
Tabel 5: resultaten voor de Pearson r correlatie voor de volledige dataset (boven) en de ingekorte dataset met enkel benzoëzuur (onder).....	59
Tabel 6: resultaten voor de Kendall Rang correlatie voor de volledige dataset (boven) en de ingekorte dataset met enkel benzoëzuur (onder).....	60
Tabel 7: data voor het modelleren.....	60

Lijst van figuren

Figuur 1: Proces van bolvormige agglomeratie.	15
Figuur 2: : Blokschema van de continue productie van farmaceutische tabletten.	19
Figuur 3: oplosbaarheidscurve met illustratie van koelingskristallisatie (a → d) en verdampingskristallisatie of anti-solventkristallisatie (a → g).	20
Figuur 4: Blokschema compressie van farmaceutische tabletten.	21
Figuur 5: Kristalgrootteverdeling (streepjeslijn) en cumulatieve kristalgrootteverdeling (volle lijn).	23
Figuur 6: Bepalen van de lange as (blauw) en de korte as (rood).	23
Figuur 7: Bepalen van de convex hull.	24
Figuur 8: Samenvatting van alle vormfactoren met links de circulariteit en rondheid, en rechts de convexiteit en de robuustheid. Een waarde van 1 staat voor alle factoren gelijk aan een perfect ronde cirkel.	24
Figuur 9: Veelvoorkomende stromingsproblemen bij een vultrechter.....	25
Figuur 10: Angle of repose methode.....	26
Figuur 11: Beeld dat de cohesie-index (groene lijnen) en het principe van de dynamische hellingshoek (rode lijn) benadrukt.....	27
Figuur 12: Visuele weergaven van de bulk dichtheid en de tap dichtheid.....	28
Figuur 13: werking van een FT4 poederreometer (links) en resultaat voor totale stromingsenergie (rechts).....	29
Figuur 14: een parallelle afschuifcel.	29
Figuur 15: Resultaat van een afschuifcel test (boven) waaruit de hoek van inwendige wrijving (linksonder) en de grote consolidatiespanning en de cohesiesterkte (rechtsonder) gehaald kunnen worden.	30
Figuur 16: Invloed van de deeltjesgrootte op de angle of repose (links) en de samendrukbaarheid (rechts).....	31
Figuur 17: Hausner ratio van de originele bulk en de verschillende fracties van deze bulk.	31
Figuur 18: Kritische trillingsversnelling in functie van de angle of repose en de samendrukbaarheid.	32
Figuur 19: De cohesie index van lactose poeders gemeten met een roterende trommel bij 8 rpm, als functie van de relatieve vochtigheid RH met een verblijftijd in het reactorvat van 150 min.	33
Figuur 200: Opstelling voor het maken van benzoëzuur agglomeraten. In stap 1 wordt een ethanol-benzoëzuur oplossing van 0,375 g/ml toegevoegd voor kristallisatie en in stap 2 wordt het bridging liquid toluëen voor sferische agglomeratie.	36
Figuur 211: opstelling voor het maken van een inline microscoopbeelden van de deeltjes.....	37
Figuur 222: Standaard instellingen ImageJ voor het bepalen van de grootte van de deeltjes	38
Figuur 23: verschil tussen een watershed van 0,96 en 0,8 voor naaldvormige deeltjes.....	39
Figuur 24: Standaard instellingen ImageJ voor het bepalen van de vorm van de deeltjes	40
Figuur 25: Macro in excel voor het verwijderen van luchtbellens en emulsies.....	41
Figuur 26: Transformatie van een perfecte cirkel naar een ellips door de omtrek constant te houden en de oppervlakte te verminderen.....	41
Figuur 27: :inline microscoopbeelden verwerkt in ImageJ: a) BZ_bulk, b) BZ_<125, c) BZ_315-125, d) BZ_500-315, e) BZ_710-500, f) BZ_sf_800rpm, g) BZ_BZ_sf_1000rpm, h) BZ_sf_1200rpm i) AZ<125, j) AZ_500-125, k) AZ_1000-500 en l) SZ_naaldjes.....	48
Figuur 28: cumulatieve grootteverdeling van de verschillende poeders.	49
Figuur 29: De circulariteit van de verschillende poederstalen.....	50
Figuur 30: De aspect ratio van de verschillende poederstalen.....	51
Figuur 31: De rondheid van de verschillende poederstalen. Links zijn de resultaten bekomen uit ImageJ en rechts zijn de resultaten na correctie gebaseerd op de circulariteit.	51

Figuur 32: De robuustheid van de verschillende poederstalen.....	53
Figuur 33: cohesieve index voor de verschillende stalen bij een toerental van 2, 6, 10 en 40 toeren per minuut.	54
Figuur 34: salycilzuur (links) die agglomeraten vormt in de Granudrum. Benzoëzuur (rechts) heeft een gelijkaardige deeltjesgrootte, maar vormt geen agglomeraten.....	55
Figuur 35: dynamische angle of repose	56
Figuur 36: Hausner ratio van de verschillende poederstalen.	57
Figuur 37: samendrukbaarheidsindex van de verschillende poederstalen.	57
Figuur 38: voorspelde waarde cohesieve index VS eigenlijke waarde cohesieve index	61

Woordenlijst

Symbol	Betekenis
A	Oppervlakte
API	Actieve farmaceutische ingrediënt
AR	Aspect ratio
BD	Bulk dichtheid
CI	Cohesive index
d	Sferische equivalente diameter
D	Diameter
D[4,3]	Volume-gemiddelde diameter
h	Hoogte
HR	Hausner ratio
RH	Relatieve vochtigheid
RI	Reologische index
TD	Tap dichtheid
ΔH	Hoogteverschil
θ	Angle of repose

Abstract

Tabletten zijn de meest populaire doseringsvorm van farmaceutische componenten. Voor de productie is een goede stroming van de poederdeeltjes noodzakelijk om de verschillende downstream processtappen efficiënt te laten verlopen. Onvoldoende stroming van het actief farmaceutisch ingrediënt (API) kan leiden tot grote variaties in gewicht en dosering van het eindproduct. Voorspellen hoe een poeder zal stromen, is niet eenvoudig aangezien vloeibaarheid een multidimensionale eigenschap is. De vloeibaarheid is het resultaat van de materiaaleigenschappen alsook van het ontwerp van de gebruikte apparatuur.

Deze masterproef zal dieper ingaan op de relatie tussen de materiaaleigenschappen en het vloeigedrag van farmaceutische componenten. Materiaaleigenschappen zoals deeltjesgrootte en -vorm worden bepaald a.d.h.v. een beeldanalyse. De stromingseigenschappen met name de cohesieve index en de samendrukbaarheidsindex worden opgemeten met respectievelijk een Granudrum en een tap dichtheid tester.

De bekomen correlaties moeten met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. De gebruikte dataset is namelijk te klein en te onvolledig om statistisch correcte conclusies uit te trekken. Toch kan gesteld worden dat de deeltjesgrootte de voornaamste invloed heeft op de vloeibaarheid van een poeder. Ook de vorm heeft duidelijk een invloed, maar welk vormkenmerk het meest doorweegt, kan niet gezegd worden.

Abstract in English

Tablets are the most popular dosage form of pharmaceutical components. For production, proper flow of the powder particles is necessary for the various downstream process steps to proceed efficiently. Inadequate flow of the active pharmaceutical ingredient (API) can lead to large variations in weight and dosage of the final product. Predicting how a powder will flow is not easy since flowability is a multidimensional property. Flowability is the result of material properties as well as the design of the equipment used.

This master's thesis will study the correlation between material properties and the flow behavior of pharmaceutical components. Material properties such as particle size and shape are determined by image analysis. The flow properties particularly the cohesive index and compressibility index are measured using a Granudrum and a tap density tester respectively.

The correlations obtained should be interpreted with caution. This is because the data set used is too small and incomplete to draw statistically correct conclusions from. Nevertheless, it can be stated that the particle size has the main influence on the flowability of a powder. Also the particle shape clearly has an influence, but which shape characteristic weighs is most important, cannot be concluded.

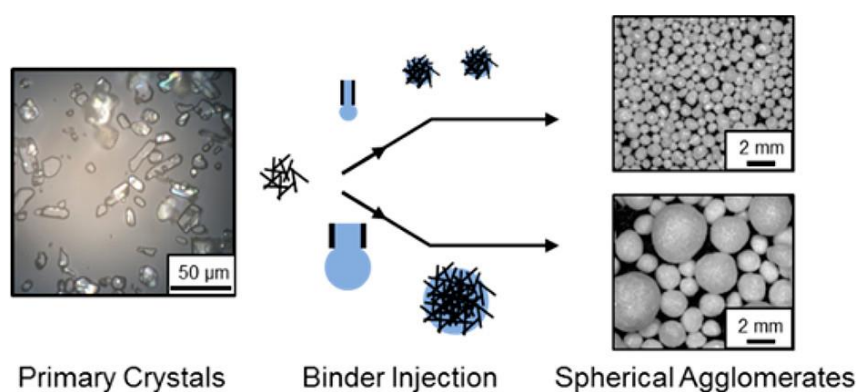
1 Introductie

1.1 Situering

Tabletten staan bekend als de meest populaire doseringsvorm van farmaceutische componenten vanwege de eenvoudige toediening aan de patiënt en de grote precisie waarmee deze geproduceerd kunnen worden. Tabletten worden in de farmaceutische industrie vervaardigd met behulp van drie basistypen ingrediënten: een inerte drager die volume geeft voor de uiteindelijke dosering, een vulstof om tabletten te vormen, en het actieve farmaceutische bestanddeel in poedervorm (API). Het vloeigedrag van deze farmaceutische poeder heeft een grote invloed op de kwaliteit van het product op het gebied van uniformiteit in gewicht en dosering. Daarbij is het vloeigedrag ook belangrijk voor de efficiëntie van verschillende processtappen (zoals filtratie, menging, tableting...) en het transport tussen deze stappen [1].

De vloeibaarheid van een poeder wordt beïnvloed door zowel het procesontwerp als de eigenschappen van de deeltjes. Deeltjeseigenschappen die de vloeibaarheid beïnvloeden zijn de gemiddelde deeltjesgrootte, de grootteverdeling, de deeltjesvorm, de oppervlakteruwheid en de vochtconcentratie. Algemeen wordt aangenomen dat hoe groter de deeltjes zijn, hoe beter de stroming is. Als de deeltjes groter zijn, is er namelijk meer ruimte tussen de deeltjes waardoor de cohesiekrachten afnemen. Ook de vorm van de deeltjes heeft een grote invloed op het vloeigedrag. Zo wordt aangenomen dat bolvormige deeltjes beter vloeien dan naaldevormige deeltjes aangezien deze makkelijker kunnen rollen [2].

Er bestaan enkele methodes die het vloeigedrag van farmaceutische componenten bevorderen. Eén van deze methode is sferische agglomeratie. Dit is een kristallisatietechniek waarbij fijne kristallen worden omgezet in grote, bolvormige agglomeraten. Eerst vindt er een gewone kristallisatie stap plaats. Vervolgens wordt er een bridging liquid toegevoegd, dat niet mengbaar is met het solvent, maar wel een hoge affiniteit heeft voor de vaste stof. Het bridging liquid zal dus een emulsie vormen in de oplossing waarnaar de kristallen zullen migreren en hierin uiteindelijk agglomereren tot een sferische vorm. Hierdoor treedt zowel een verbetering in deeltjesvorm als grootte op naar vloeibaarheid toe. Figuur 1 geeft dit proces weer [3]–[5].



Figuur 1: Proces van bolvormige agglomeratie. [3]

1.2 Probleemstelling/onderzoeksvraag

In de farmaceutische industrie kristalliseren vele API's uit in naaldvormige deeltjes die een slechte vloeibaarheid hebben. Dit kan ernstige complicaties veroorzaken in de productielijn. Inzicht krijgen in het vloeigedrag van farmaceutische componenten tijdens het proces is essentieel voor het inschatten en verbeteren van de vloeibaarheid van deze componenten. Voorspellen hoe een poeder zal stromen, is echter niet eenvoudig aangezien vloeibaarheid een complexe, multidimensionale eigenschap is. De vloeibaarheid is zowel het resultaat van de fysische eigenschappen van deeltjes zoals vorm en grootte, als van de apparatuur die wordt gebruikt om de deeltjes te verwerken.

Er zijn veel verschillende karakteriseringstechnieken ontwikkeld om het vloeigedrag van poeders te bepalen. Deze methoden omvatten de angle of repose, de samendrukbaarheidsindex, de roterende drum, poeder reometers en diverse varianten van de afschuifcel tester. Helaas zijn dit allemaal offline meetmethoden. Deze metingen staan dus allen los van de productielijn. Ook neigen deze eenvoudige vloeimetingen te falen voor de voorspelling van een poederstroom, omdat de juiste omstandigheden van het proces niet gesimuleerd kunnen worden [6].

Er bestaan echter wel inline meetmethoden om de fysische eigenschappen van deeltjes op te meten. Daarbij is in de literatuur ook al duidelijk aangetoond dat er een verband is tussen deze eigenschappen en de vloeibaarheid. Enkel dient nog een nauwkeurig wiskundig model opgesteld te worden die de correlatie legt tussen de inline opgemeten fysische eigenschappen en het vloeigedrag.

1.3 Doelstellingen

Het hoofddoel van dit project is dus om een statistisch model op te stellen waarmee het vloeigedrag van farmaceutische poeders voorspeld kan worden aan de hand van hun fysische eigenschappen. Eigenschappen die bekeken worden zijn de deeltjesgrootte en de deeltjesvorm aan de hand van volgende parameters:

- Deeltjesgrootte
 - Volume-gemiddelde diameter $D[4,3]$
 - Span
- Deeltjesvorm
 - Aspect ratio = verhouding tussen de lengte van de korte en lange as
 - Circulariteit = de maatstaf van hoe dicht de oppervlakte van een deeltje die van een wiskundig perfecte cirkel benadert
 - Rondheid = de maatstaf van hoe dicht de omtrek van een deeltje die van een wiskundig perfecte cirkel benadert
 - Robuustheid = de maatstaf voor de opvulling van een deeltje (veel holtes in een deeltje, geeft een slechte robuustheid terug)

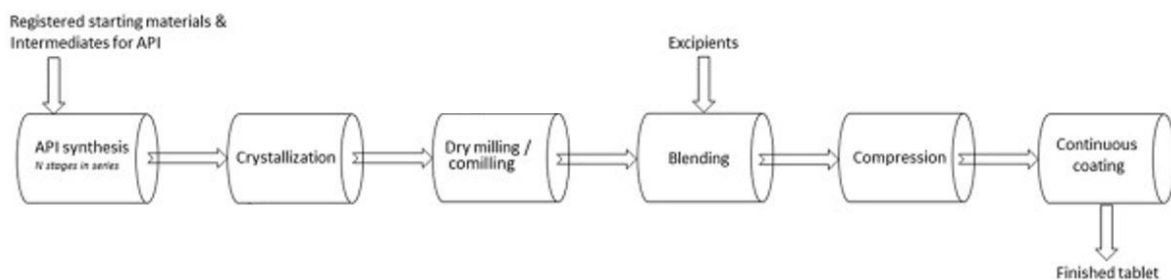
Dit doel wordt opgesplitst in enkele deeldoelstellingen. Ten eerste dient een reproduceerbare analysemethode opgesteld te worden om zowel de offline metingen van het vloeigedrag als de inline metingen van de fysische eigenschappen via beeldanalyse uit te voeren. Hierbij wordt nagegaan wat het effect van staalvoorbehandeling is en welke range van deeltjesgroottes analyseerbaar zijn.

Het tweede deel heeft tot doel te identificeren welke fysische eigenschappen de grootste invloed hebben op de vloeibaarheid van de poeders. Hiervoor worden aan de hand van de ontwikkelde analysemethodes uit het eerste deel verschillende API's met verschillende fysische eigenschappen geanalyseerd. Tot slot dient via een statistisch pakket een correlatie opgesteld te worden waarbij het vloeigedrag van een farmaceutisch poeder voorspeld kan worden op basis van de fysische eigenschappen.

2 Literatuurstudie

2.1 Productieproces van farmaceutische tabletten

Het ontwerpen van farmaceutische tabletten is een complex proces van verschillende fasen, waarbij moet gezorgd worden dat een exacte hoeveelheid geneesmiddel op het juiste moment op de gewenste plaats wordt geleverd. De meeste geneesmiddelen bezitten niet de vereiste eigenschappen om een bevredigende stroom te verkrijgen doorheen het gehele proces. Daarom ondergaan ze een aantal behandeling om vrij stromende korrels te vormen die zich lenen voor tabletering [7]. Het volgende blokschema (figuur 2) toont het continue proces voor de vervaardiging van tabletten.



Figuur 2: : Blokschema van de continue productie van farmaceutische tabletten. [8]

2.1.1 API synthese

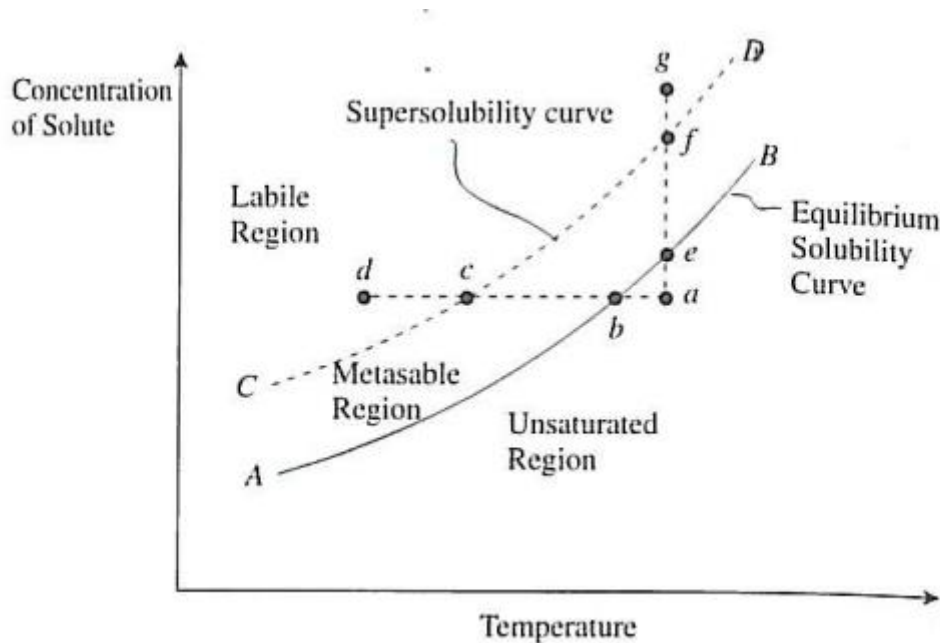
Een actief farmaceutisch ingrediënt wordt gedefinieerd als elke stof die een actief bestanddeel is bij de vervaardiging van een geneesmiddel. Dergelijke stoffen zijn bedoeld om een rechtstreeks effect te hebben bij de diagnose, genezing of preventie van een bepaalde aandoening op het menselijk lichaam. API's kunnen verkregen worden aan de hand van chemische synthese, plantenextractie of biotechnologie en worden niet rechtstreeks door patiënten ingenomen. De synthese van een API is gewoonlijk een ingewikkeld proces van meerdere stappen, waarbij talrijke chemische transformaties en bewerkingen op een reeks grondstoffen met verschillende fysische en chemische eigenschappen moeten worden uitgevoerd [8].

2.1.2 Kristallisatie

In de farmaceutische industrie is kristallisatie een van de belangrijkste procesonderdelen, aangezien meer dan 90% van alle actieve farmaceutische ingrediënten kristallen zijn van organische moleculen. Het kristallisatieproces bepaalt de uiteindelijke kristalkarakteristieken zoals deeltjesgrootteverdeling (PSD), kristalmorfologie, polymorfe vorm en zuiverheid, die een grote invloed hebben op verdere downstream processen en de biologische beschikbaarheid [9].

Kristallisatie is een scheidingsproces waarbij vaste deeltjes gevormd worden uitgaande van een homogene oplossing. De oplossing ondergaat een behandeling zodat de concentratie van de te verwijderen component hoger wordt dan zijn oplosbaarheidsgrens, waardoor oververzadiging optreedt en kristallen kunnen vormen. Er bestaan verschillende methoden om deze oververzadiging te bewerkstelligen. De belangrijkste methoden in de farmaceutische industrie zijn antisolventkristallisatie, koelingskristallisatie en verdampingskristallisatie.

Figuur 3 geeft een algemene oplosbaarheidscurve (AB) en oververzadigingscurve (CD) weer. Het gebied tussen de twee curves is de metastabiele zone. In dit gebied kunnen er kristalkiemen gevormd worden, maar deze zijn niet stabiel genoeg om te groeien waardoor ze terug oplossen. De oververzadigingscurve moet dus overschreden worden om kristallen te vormen. Koelingskristallisatie wordt weergegeven door het traject $a \rightarrow d$. De temperatuur wordt verlaagd om de vereiste oververzadiging te bereiken. Anti-solventkristallisatie en verdampingskristallisatie worden weergegeven door het traject $a \rightarrow g$. Bij anti-solventkristallisatie wordt een tweede solvent toegevoegd die de oplosbaarheid van de gewenste component in de oplossing vermindert om ze een oververzadiging te creëren. Verdampingskristallisatie daarentegen creëert oververzadigd door het solvent te doen verdampen.



Figuur 3: oplosbaarheidscurve met illustratie van koelingskristallisatie ($a \rightarrow d$) en verdampingskristallisatie of anti-solventkristallisatie ($a \rightarrow g$). [10]

Het kristallisatieproces wordt verdeeld in een nucleatie- en een groeistap. In de eerste stap worden kleine vaste deeltjes uit de homogene fase gevormd. In de tweede stap groeien deze kiemen laag voor laag uit tot grotere kristallen. De nucleatiestap omvat primaire en secundaire nucleatie. Bij primaire nucleatie worden kiemen gevormd uit een oplossing voordat kristalgroei optreedt. Dit kan optreden door interactie van het contact agens (roerwerk, wand, ...) met de oplossing of door een voldoende oververzadiging waardoor grote stabiele clusters gevormd worden. Bij secundaire nucleatie daarentegen vindt de nucleatie plaats in aanwezigheid van andere kristallen en gelijktijdig met de kristalgroei. Vaak worden entkristallen gebruikt om primaire nucleatie te vermijden en secundaire nucleatie te stimuleren. Dit leidt tot een meer gecontroleerde deeltjesgrootte en polymorfe vorm van de kristallen [10].

Het evenwicht tussen de nucleatie en de kristalgroei bepaalt de kristal grootte en de grootteverdeling. Bij een lage oververzadiging groeien kristallen sneller dan dat ze nieuwe kernen vormen, wat resulteert in een grotere verdeling van de kristal grootte. Bij een hogere oververzadiging, daarentegen, domineert de nucleatie ten opzichte van de kristal grootte, wat uiteindelijk resulteert in meer maar kleinere kristallen. Andere factoren die een invloed hebben op dit evenwicht zijn: de verblijftijd, het specifieke koel- of verwarmingsvermogen, het roervermogen, roerderontwerp en concentratie zout in de voeding [11].

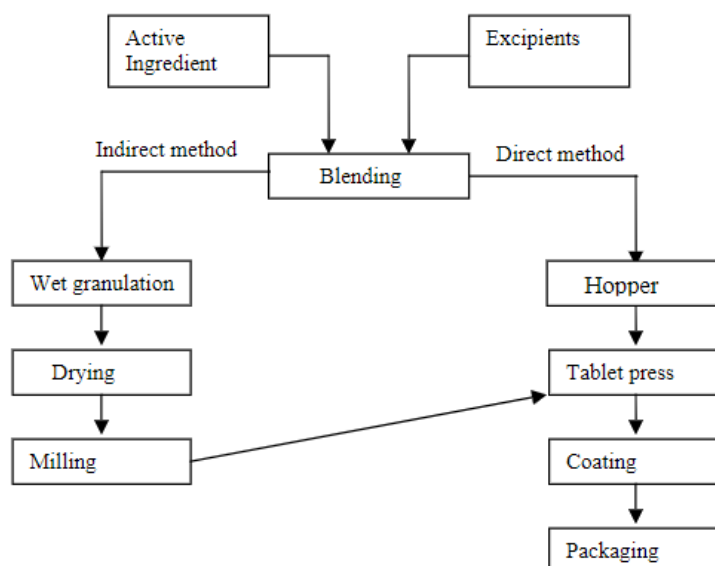
2.1.3 Downstream processen

Filtratie is een processtap die gewoonlijk onmiddellijk na de kristallisatie wordt uitgevoerd om de gevormde kristallen fysiek te scheiden. Filtratie kan worden omschreven als het stromen van een vloeistof door een poreus medium onder invloed van een drukgradiënt waarbij de kristallijne producten achter blijven. Het filterbed bestaat uit het filtermedium en de vaste stoffen die zich daarop ophopen in de vorm van een filterkoek. De doorlaatbaarheid van de filterkoek is het meest bepalend voor de werking van een filtratieproces, omdat de weerstand van de koek over het algemeen overheerst. De grootte en vorm van de kristallen bepalen de manier waarop de deeltjes zich stapelen en daardoor de poreuze structuur van de koek [12].

Drogen is ook een belangrijke processtap na kristallisatie. Restvocht dient verwijderd te worden om bederf van het product tijdens opslag te voorkomen en ervoor te zorgen dat het product vrij kan stromen tijdens het gehele proces [13].

2.1.4 Tabletteren

Er bestaan twee methoden voor het persen van tabletten: een directe en een niet directe. Volgend blokschema toont deze twee methoden.



Figuur 4: Blokschema compressie van farmaceutische tabletten. [14]

De productiemethode die de voorkeur geniet is de directe methode (directe compressie rechts op Figuur 4), omdat deze extra bewerkingsstappen overbodig maakt en extra apparatuurskosten voorkomt die wel nodig zijn voor de indirecte methode. Bij directe compressie worden de ingrediënten gemengd in een blender en vervolgens in een trechter geloosd van waaruit zij naar de tablettenpers worden gevoerd. Toch kan minder dan 20% van de geneesmiddelen worden verwerkt met behulp van directe compressie. Dit komt door de slechte stromings-, verpakkings- en compressiekenmerken van API's. Het toevoegen van hulpstoffen kan helpen bij het verminderen van deze beperkingen. Echter voor geneesmiddelen met een hoge dosis vergroot het gebruik van hulpstoffen de bulk van het tablet, waardoor de inname ervan moeilijk wordt. Geneesmiddelen met een hoge dosering worden dus meestal geformuleerd door middel van de indirecte methode waarbij extra processtappen zoals natte granulatie, drogen en mixen nodig zijn [14], [15].

2.2 Materiaaleigenschappen API's

De vorm en grootte van een kristal zijn uiterst belangrijk voor het productieproces. Om deze eigenschappen te kunnen sturen is het belangrijk om procesparameters, zoals afkoelsnelheid en oververzadiging, tijdens de kristallisatie onder controle te houden. Voor verdere verwerking zijn grote kristallen met uniforme afmetingen belangrijk voor wassen, filteren, transport en opslag, omdat grote kristallen gemakkelijker uit een oplossing te filteren zijn dan kleine kristallen. Ook hebben grotere kristallen een kleinere oppervlakte-volumeverhouding, wat leidt tot een hogere zuiverheid. In de farmaceutische industrie zijn kleine kristalformaten vaak gewenst om de oplosbaarheid en de biologische beschikbaarheid van het geneesmiddel te verbeteren. De materiaaleigenschappen hebben dus een grote invloed op het gehele proces. Hieronder wordt besproken hoe deze eigenschappen worden gekarakteriseerd.

2.2.1 Deeltjesgrootte

De deeltjesgrootte kan bepaald worden onder een microscoop, wat een tweedimensionaal beeld oplevert. Er zijn een aantal diameters die kunnen worden gemeten om het deeltje te karakteriseren. Academics geven gewoonlijk de voorkeur aan de volume-gemiddelde diameter ($D[4,3]$). De volume-gemiddelde diameter is de gemiddelde diameter van elke volume-eenheid, zodat grotere deeltjes veel meer wegen dan kleine, waarbij elk deeltje een gewicht heeft dat gelijk is aan zijn diameter tot de derde orde:

$$D[4,3] = \frac{\sum_{i=0}^n d^4}{\sum_{i=0}^n d^3} \quad (1)$$

Hierbij is d gelijk aan de sferisch equivalente diameter. Dit is de diameter in functie van de opgemeten oppervlakte A van een perfecte bol met hetzelfde volume als het deeltje [16]:

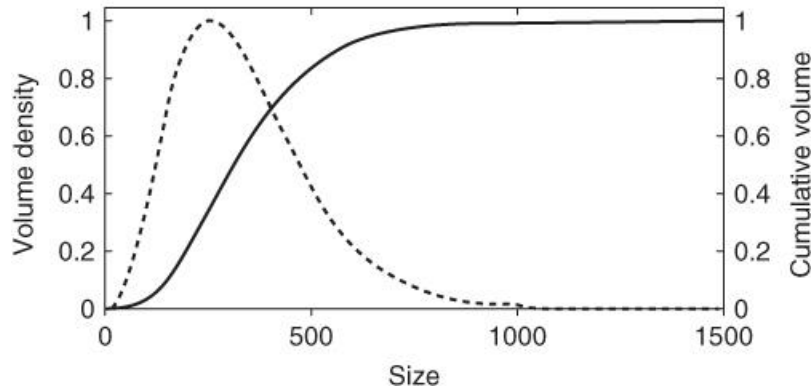
$$d = \frac{1}{6} * \pi * \left(\sqrt{\frac{4 * A}{\pi}} \right)^3 \quad (2)$$

2.2.2 Deeltjesgrootteverdeling

De deeltjesgrootteverdeling is een beschrijving van het feit dat niet elk deeltje van een monster dezelfde grootte heeft. Er is een reeks van groottes. Een veelgebruikte parameter voor de grootteverdeling is de span:

$$span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (3)$$

Waarbij bijvoorbeeld $d(0,1)$ de deeltjesdiameter bij 10% retentie. Figuur 5 geeft de deeltjesgrootteverdeling (streepjeslijn) en de cumulatieve deeltjes grootteverdeling (volle lijn) weer. De kristalgrootte verdeling geeft weer welke fractie van de deeltjes, in dit geval in een volumefractie uitgedrukt, een bepaalde grootte heeft. De cumulatieve kristalgrootteverdeling geeft weer welke fractie van deeltjes een grootte hebben die kleiner is dan een bepaalde waarde.

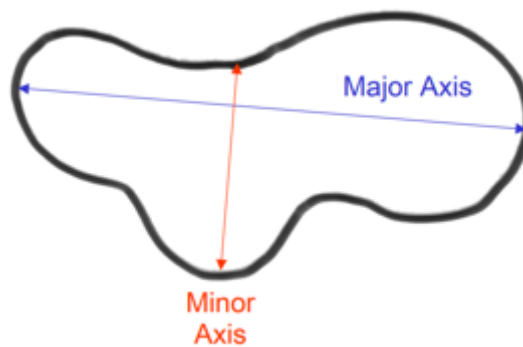


Figuur 5: Kristalgrootteverdeling (streepjeslijn) en cumulatieve kristalgrootteverdeling (volle lijn). [10]

2.2.3 Vorm

Er kunnen verschillende methoden worden gebruikt om de vorm van poeder te kwantificeren, er is geen universeel aanvaarde vormfactor. Elke factor zal gevoelig zijn voor een specifiek vormkenmerk, afhankelijk van de parameters die voor de berekening zijn gekozen. Een veel voorkomende vormfactor is de aspect ratio (AR), die de verhouding is tussen de lengte van de korte en lange as (zie figuur 6).

$$\text{Aspect ratio} = \frac{\text{lange as}}{\text{korte as}} \quad (4)$$



Figuur 6: Bepalen van de lange as (blauw) en de korte as (rood). [17]

Kleine waarden van de aspect ratio komen overeen met langgerekte deeltjes. De aspectratio geeft alleen de rek van een deeltje weer, zodat het nut ervan beperkt is. Een andere vormfactor is de circulariteit die gebaseerd is op het geprojecteerde oppervlak van het deeltje en de totale omtrek van de projectie. Ook de rondheid is een belangrijke vormfactor. Deze is vergelijkbaar met de circulariteit, maar is ongevoelig voor onregelmatige randen.

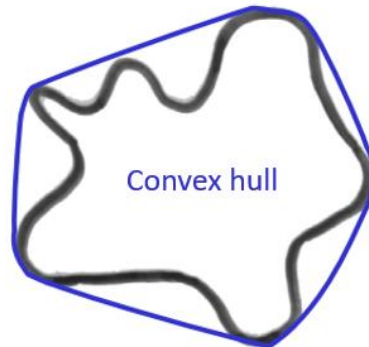
$$\text{Circulariteit} = 4 * \pi * \frac{\text{oppervlakte}}{\text{omtrek}^2} \quad (5)$$

$$\text{Rondheid} = 4 * \frac{\text{oppervlakte}}{\pi * \text{lange as}^2} \quad (6)$$

Tot slot is er ook nog de robuustheid en de convexiteit. Deze twee factoren zijn een maatstaf voor de opvulling van een deeltje. Ze zijn afhankelijk van de *convex hull* van een deeltje. Dit is de kleinste mogelijk vorm die rond een deeltje kan getekend worden (zie figuur 7).

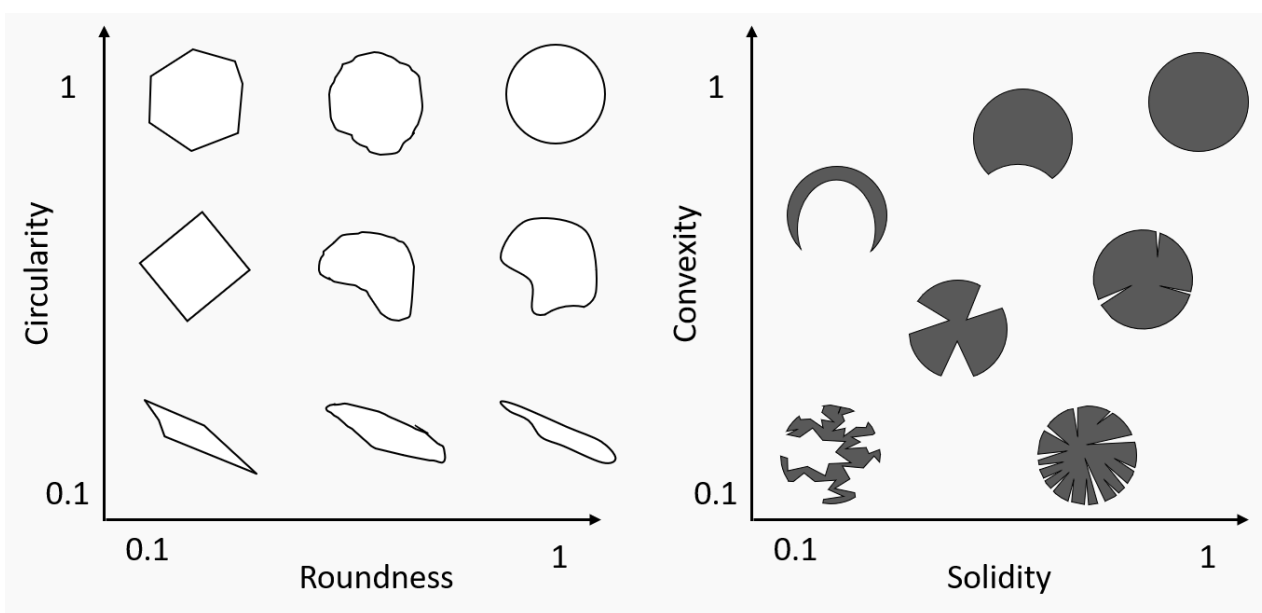
$$\text{Convexiteit} = \frac{\text{convex hull omtrek}}{\text{omtrek}} \quad (7)$$

$$\text{Robuustheid} = \frac{\text{oppervlakte}}{\text{convex hull oppervlakte}} \quad (8)$$



Figuur 7: Bepalen van de convex hull. [17]

De waarden van de aspect ratio, circulariteit als rondheid benaderen 1 voor een perfect bolvormig deeltje en 0 voor een extreem langwerpig, onregelmatig deeltje. Een deeltje met veel holte zal een slechte robuustheid teruggeven en een deeltje met grote holtes zal een slechte convexiteit teruggeven [18]. Figuur 8 geeft visueel een goede samenvatting van wat elke parameter wilt zeggen.

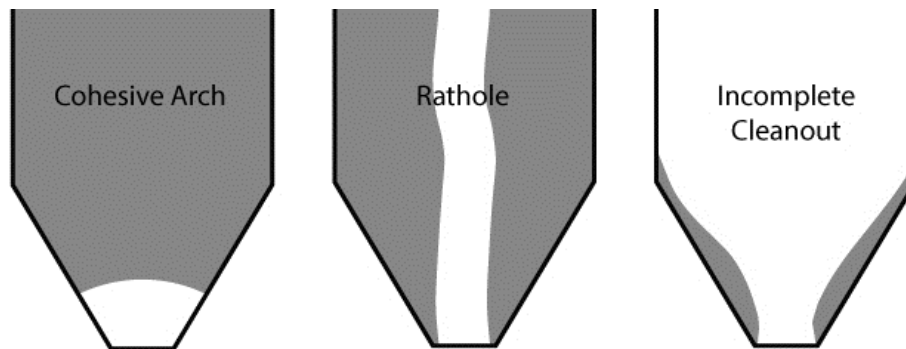


Figuur 8: Samenvatting van alle vormfactoren met links de circulariteit en rondheid, en rechts de convexiteit en de robuustheid. Een waarde van 1 staat voor alle factoren gelijk aan een perfect ronde cirkel.

2.3 Vloeigedrag van API's

Doorheen het gehele productieproces van tabletten kunnen vloeigerelateerde problemen opduiken. Zo kan bijvoorbeeld een poeder dat door een vultrechter stroomt, blijven kleven aan de wand en een *rathole* vormen (zie figuur 9). Dit is een zelfdragend verticaal kanaal dat zich uitstrekt doorheen de volledige vultrechter. Ook kan poeder ophopen aan de uitlaat van de trechter met als gevolg vorming van een cohesieve boog (*arch*). Dit kan plaatsvinden om twee redenen. Ten eerste

kunnen deeltjes mechanisch in elkaar haken wat vooral voorkomt bij deeltjes met een onregelmatige vorm. Ten tweede kan de cohesiekracht tussen de deeltjes toenemen vanwege een verandering van de fysische, chemische of elektrostatische eigenschappen van de deeltjes. Zo kan bijvoorbeeld blootstelling aan een vochtige lucht het vochtgehalte van de deeltjes doen laten toenemen. Hierdoor neemt de cohesiekracht toe als gevolg van de vorming van vloeistofbruggen tussen naburige deeltjes. Een ander probleem in verband met stroming kan optreden indien een proces wordt stilgelegd. Tijdens een continue stroom kan het grootste deel van de deeltjes vrij gemakkelijk bewegen. Maar als het proces wordt stopgezet, hebben de deeltjes de tijd om dichter opeengepakt te raken, waardoor ze mogelijk bij de opstart niet meer in staat zijn om vrij te stromen [19]–[22].



Figuur 9: Veelvoorkomende stromingsproblemen bij een vultrechter. [22]

2.3.1 Definitie

De vloeibaarheid van een poeder wordt gedefinieerd door de relatieve beweging van een bulk van deeltjes tussen naburige deeltjes of langs het wandoppervlak van de container. Met andere woorden, de vloeibaarheid van poeder verwijst naar het vermogen van een poeder om in een specifiek apparaat op een gewenste manier te stromen. Poedervloeibaarheid is dus een multidimensionaal probleem waarbij poederkarakteristieken worden bestudeerd in combinatie met de geometrie van een toepassing om de vloeibaarheid te voorspellen. Inzicht krijgen in het gedrag van poeders is van cruciaal belang voor het juiste ontwerp van proces en apparatuur. In een continue productielijn is een consistente en continue stroom door het systeem een kritieke vereiste voor de kwaliteit van het eindproduct en de efficiëntie van de downstream processen.

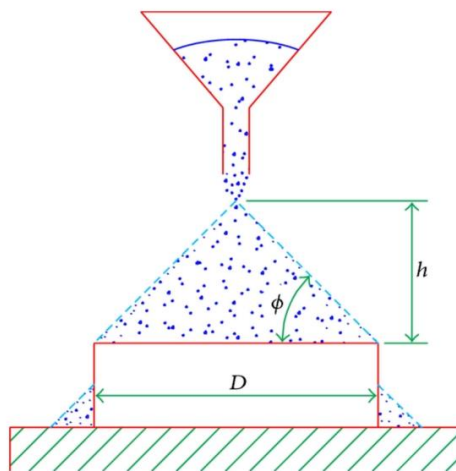
Vloeibaarheid kan dus niet uitgedrukt worden als één enkele waarde of index. En om deze reden kan geen enkele test de vloeibaarheid exact kwantificeren en worden meestal meerdere parameters in rekening gebracht. Lindberg et al. (2004) onderzochten de vloeibaarheid van vier verschillende farmaceutische mengsels met verschillende technieken. De technieken die bekeken werden, zijn de angle of repose, de Hausner ratio, een FT4 poederreometer en een shear cell tester. Zij stelden vast dat de door deze technieken gemeten vloeieigenschappen het gedrag tijdens de verwerking van de poedermengsels tijdens het legen van de menger en het tabletteerproces weerspiegelden. Zo gaf de Hausner ratio aan hoe goed de deeltjes samenpakten tijdens het tableetteren. Angle of repose metingen gaven het poedergedrag in de menger aan terwijl de FT4 powder rheometer de energie aangaf die nodig was tijdens het mengen. De Jenike shear cell gaf het gedrag van poeder in een tablettenpers onder compressie weer [6]. Hieronder worden deze technieken en anderen verder uitgelegd.

2.3.2 Angle of repose

Bij de angle of repose methode stroomt het poeder vanop een bepaalde hoogte uit een trechter op een oppervlak met bekende ruwheidseigenschappen. De trechter wordt langzaam, om het effect van de vallende deeltjes te minimaliseren, omhoog gebracht waardoor de deeltjes de vorm van een kegel aannemen. De poederstroom wordt gestopt wanneer de kegel een vooraf bepaalde hoogte of breedte heeft bereikt. De gemiddelde straal D van de gevormde kegel en de maximale hoogte van het opgehoopte materiaal worden gemeten en vervolgens wordt de angle of repose θ berekend aan de hand van deze verhouding.

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{h}{D/2}\right) \quad (9)$$

Een hoek kleiner dan of gelijk aan 30° wijst op een vrije poederstroom en een hoek groter dan 55° wijst op een zeer cohesieve stroming [23].



Figuur 10: Angle of repose methode. [24]

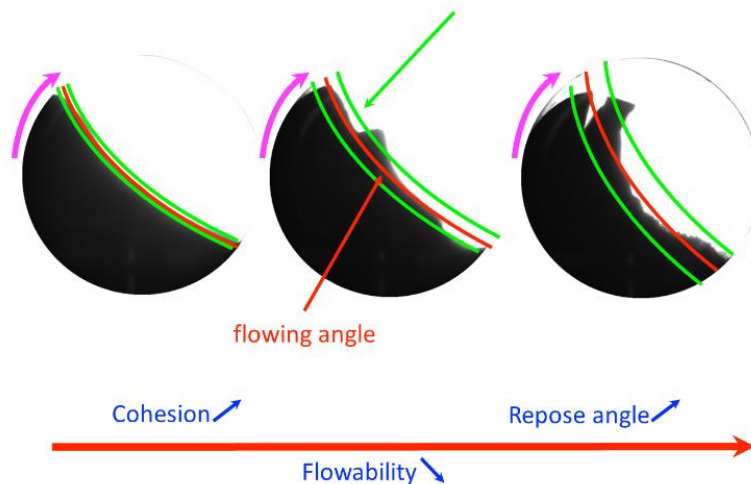
2.3.3 Roterende trommel

De roterende trommel evalueert de vloeieigenschappen van een poeder in het vrije stromingsregime. De trommel met glazen zijwanden wordt voor de helft gevuld met het poedermonster. Als de trommel draait rond zijn as, zal het poeder erin beginnen stromen door de zwaartekracht. De positie van het poeder/lucht interface bepaalt hoe goed het poeder stroomt in de trommel. De gemiddelde interfasepositie wordt gebruikt om de stromingshoek te berekenen zoals te zien is op figuur 11. De standaardafwijking van de tijdelijke fluctuaties van het grensvlak wordt gebruikt om de dynamische cohesie index te berekenen. Een cohesief poeder leidt tot een onderbroken stroming, terwijl een niet-cohesief poeder tot een regelmatige stroming leidt. Daarom komt een dynamische cohesieve index dicht bij nul overeen met een niet-cohesief poeder. Wanneer de cohesie van het poeder toeneemt, neemt de cohesieve index overeenkomstig toe. Een schaal voor de mate waarin een poeder stroomt, is weergegeven in tabel 1 [25], [26].

Tabel 1: Schaal voor stromingseigenschappen.

Cohesieve index	Schaal stroming
<5	Uitstekend
<10	Goed
<20	Degelijk
<30	Aanvaardbaar
<40	Matig
<50	Zeer matig
>50	Zeer slecht

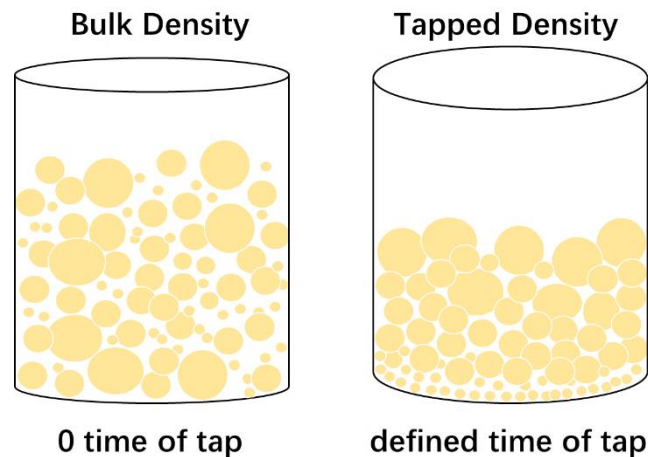
Dit instrument evalueert de stromingseigenschappen van poeder bij verschillende rotatiesnelheden, d.w.z. bij verschillende afschuifspanningen. Poeders kunnen bij een toenemende afschuifspanning hun weerstand tegen vervorming laten toenemen (*shear thickening*) of laten afnemen (*shear thinning*). Janssen et al. heeft hiervoor een nieuwe parameter geïntroduceerd, de reologische index (RI), gedefinieerd als de lineaire helling van de dynamische cohesie index in functie van de omwentelingsnelheid tussen 2 en 60 rpm. Bij een negatieve RI vertonen de poeders shear thinning gedrag en bij een positieve RI shear thickening. In dit onderzoek toonden de materialen die ze onderzochten, voornamelijk lactose, shear thickening gedrag. Echter konden ze geen link leggen welke materiaaleigenschappen invloed hadden op dit gedrag met de dynamische cohesie index [27].



Figuur 11: Beeld dat de cohesie-index (groene lijnen) en het principe van de dynamische hellingshoek (rode lijn) benadrukt. [28]

2.3.4 Samendrukbaarheid

De samendrukbaarheid is geen directe maat voor de vloeibaarheid, maar is een goede indicator voor de cohesie en het vloeigedrag van de poeder. Een hoge samendrukbaarheid wordt vaak geassocieerd met een hoge cohesiviteit van het poeder. De samendrukbaarheid wordt uitgedrukt in de Hausner ratio (HR) of de Carr index (CI). Om deze waarden te kunnen afleiden, dient eerst de bulk dichtheid (BD) en de tap dichtheid (TD) bepaald te worden (figuur 12).



Figuur 12: Visuele weergaven van de bulk dichtheid en de tap dichtheid. [29]

Als een poeder losjes in een maatcilinder wordt gegoten, kan de bulk dichtheid worden bepaald. Deze is gelijk aan de massa gedeeld door het af te lezen volume op de maatcilinder. De bulk dichtheid houdt rekening met de bestaande poriën en de interparticulaire holten van een los poederbed. De tap dichtheid bestaat ook uit poriën en interparticulaire holten, die niet gebaseerd zijn op een los poederbed, maar op een bed na een gedefinieerd aantal tapstappen.

$$HR = \frac{TD}{BD} \quad (10)$$

$$CI = \frac{(TD-BD)}{TD} * 100 \quad (11)$$

Cohesieve materialen hebben een Hausner ratio groter dan 1,4. Materialen met een Carr index van meer dan 20 tot 25 % worden geclassificeerd als niet-vrijstromend [30].

2.3.5 FT4 poederreometer

De FT4 poederreometer is in staat om procescondities te simuleren door poeders te testen in beluchte en gefluidiseerde toestand. Bij deze meting doordringt een impeller het poeder met een bepaalde omwentelings- en neerwaartse translatiesnelheid om een nauwkeurig stromingspatroon tot stand te brengen. Dit zorgt ervoor dat vele duizenden deeltjes op elkaar inwerken en/of ten opzichte van elkaar stromen. Hierdoor ondervindt de impeller zowel een weerstand tegen de draai beweging (*torque*) als tegen de verticale beweging (*force*) zoals weergegeven op figuur 13. De impeller meet beiden weerstanden en de totale stromingsweerstand van het poeder wordt gekwantificeerd door de combinatie van deze twee krachten. De arbeid die de impeller moet verrichten is gelijk aan:

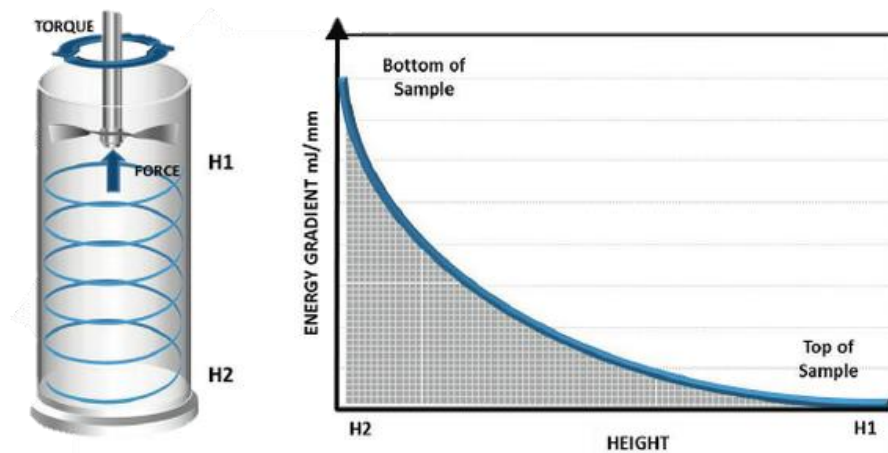
$$Arbeid = totale\ stromingsweerstand * \Delta H \quad (12)$$

Terwijl het blad door het poeder beweegt, veranderen de waarden van torque en force echter voortdurend, zodat het nodig is de energie te berekenen die nodig is om over zeer kleine afstanden door het poeder te bewegen. Dit is de berekening van het energieverloop, de energie die wordt gemeten voor elke millimeter verplaatsing van de impeller.

$$Energiegradiënt = \frac{arbeid}{verplaatsing\ impeller\ in\ mm} \quad (13)$$

De berekening van het oppervlak onder de energieverloopcurve levert de totale stromingsenergie op, die de weerstand van het poeder weergeeft tegen het laten stromen in een dynamische

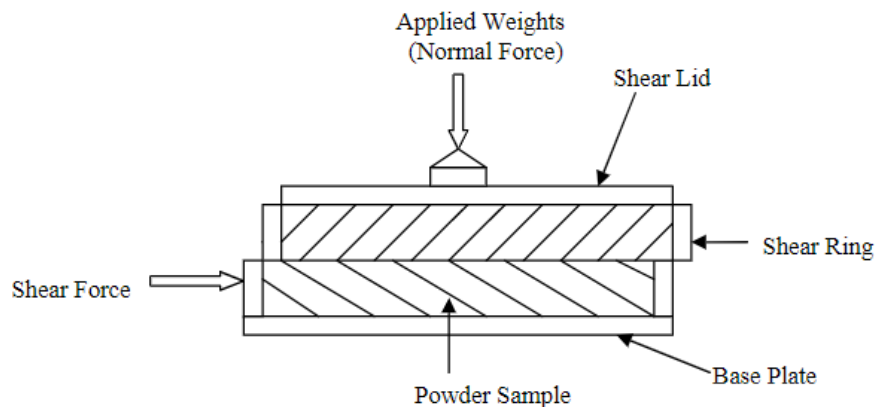
toestand. De weerstand die de impeller ondervindt vertegenwoordigt de moeilijkheid van deze relatieve deeltjesbeweging.



Figuur 13: werking van een FT4 poederreometer (links) en resultaat voor totale stromingsenergie (rechts). [31]

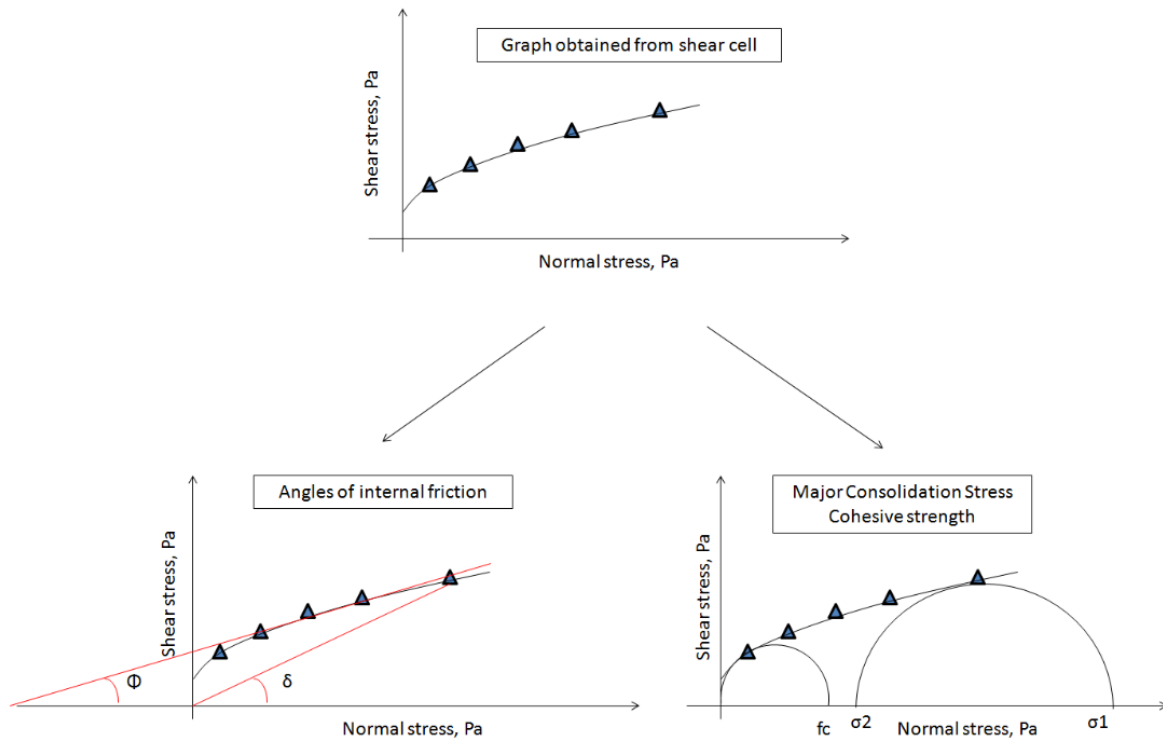
2.3.6 Afschuifcel

De afschuifkrachttester of afschuifcel is een poederstromingsmeter waarmee zeer belangrijke stromingseigenschappen zoals de cohesiesterkte en de wandwrijving kunnen worden geschat, die op hun beurt kunnen worden gebruikt om de uitlaatdiameter van de trechter en de afvoerhoek te berekenen. De werking van een afschuifcel wordt weergegeven in figuur 14.



Figuur 14: een parallele afschuifcel. [14]

Twee krachten worden uitgeoefend op een poedermonster. Eén normaalkracht, die vastligt per meting, en verhoogt naarmate het experiment vordert. En een tweede zijwaartse kracht die tijdens één meting geleidelijk toeneemt. Deze tweede kracht wordt gemeten en komt overeen met de kracht om het materiaalmonster te verschuiven. Elke normaalspanning en afschuifspanning wordt geregistreerd en vervolgens uitgezet. De verkregen grafiek, die *yield locus* wordt genoemd, is hieronder afgebeeld.



Figuur 15: Resultaat van een afschuifcel test (boven) waaruit de hoek van inwendige wrijving (linksonder) en de grote consolidatiespanning en de cohesiesterkte (rechtsonder) gehaald kunnen worden. [32]

Uit deze kromme kunnen verschillende poeder reologische eigenschappen worden berekend zoals de hoek van inwendige wrijving en de wandwrijvingshoek die iets zeggen over hoe goed een poeder over zichzelf als de wand glijdt; als ook de cohesiesterkte en de grote consolidatiespanning waarmee verder de flow functie uit berekend kan worden. Algemeen kan gezegd worden dat hoe hoger de yield locus, hoe cohesiever het poeder zal zijn.

2.4 Verband poedereigenschappen en vloeigedrag

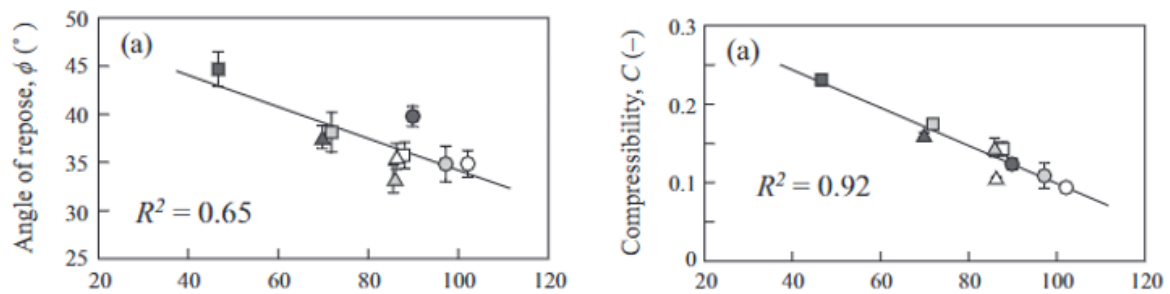
Zoals eerder vermeld hangt het vloeigedrag van farmaceutische poeders af van hun fysische materiaaleigenschappen en de geometrie van de apparatuur. De belangrijkste materiaaleigenschappen die een invloed hebben op het vloeigedrag en hoe dit komt, wordt hieronder verder uitgewerkt.

2.4.1 Deeltjesgrootte

De stromingseigenschappen van een poeder nemen toe naarmate de gemiddelde deeltjesdiameter toeneemt. Grotere deeltjes hebben namelijk een kleiner contact oppervlak naar verhouding en dus minder contactpunten met naburige deeltjes. In een poederstroom kunnen ze dus gemakkelijk over elkaar heen rollen. Kleine deeltjes daarentegen hebben een groter contactoppervlak naar verhouding en dus een groter aantal contactpunten met naburige deeltjes, waardoor de cohesie toeneemt. Ook is er meer ruimte tussen grotere deeltjes ten opzichte van kleinere deeltjes waardoor de invloed van de intermoleculaire krachten afneemt [14], [33], [34].

Kudo et al. heeft deze theorie bevestigd. Zij hebben gekeken naar drie verschillende lactose kristallen met een verschillende deeltjesgrootte tussen een range van 50 en 100 μm en de invloed

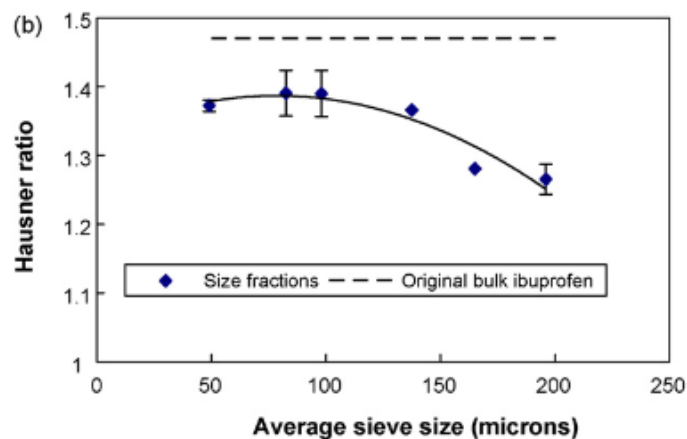
hiervan op de angle of repose en de samendrukbaarheid. Daarbij varieerde de rondheid van de deeltjes tussen 0,81 en 0,9 en werden andere factoren zoals relatieve luchtvochtigheid en temperatuur constant gehouden. Figuur 16 geeft de bekomen resultaten weer en toont duidelijk dat de vloeieigenschappen toenemen naarmate de diameter groter wordt [34].



Figuur 16: Invloed van de deeltjesgrootte op de angle of repose (links) en de samendrukbaarheid (rechts). [34]

2.4.2 Deeltjesgrootteverdeling

De stromingseigenschappen nemen toe naarmate de deeltjesgrootteverdeling smaller is. Bij een brede verdeling worden de ruimtes tussen de grotere deeltjes opgevuld door de kleinere deeltjes waardoor ook hier de onderlinge krachten tussen deeltjes toenemen. Liu et al. onderzocht de vloeibaarheid van ibuprofenpoeders met verschillende deeltjesgrootteverdelingen (Figuur 17). De originele bulk met een brede deeltjesgrootteverdeling van 200 tot 50 μm was zeer cohesief en gaf slechte vloeieigenschappen. Deze bulk werd opgesplitst in meerdere kleinere fracties. Zelfs de kleinste fractie vertoonde betere stromingseigenschappen dan de originele bulk. Hoe nauwer de verdeling bij één specifieke grootte, hoe beter de stromingseigenschappen van het poeder [2], [27].

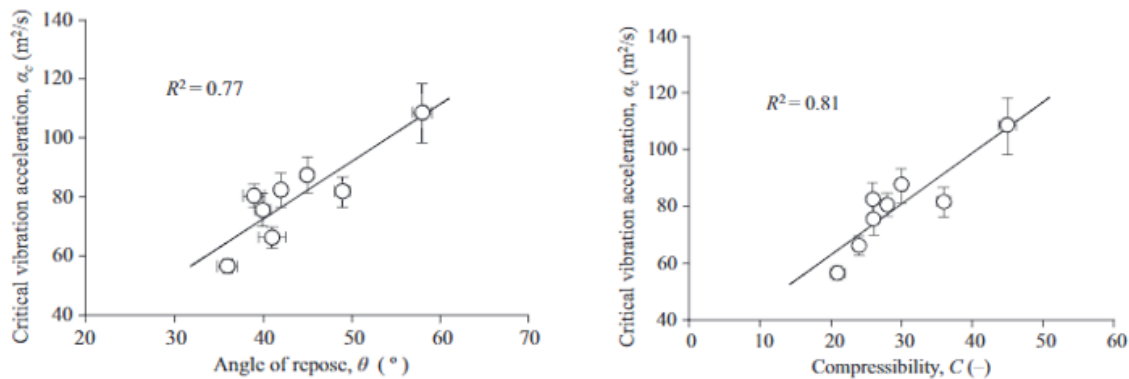


Figuur 17: Hausner ratio van de originele bulk en de verschillende fracties van deze bulk. [27]

Ook Bodhmag A et al. hebben onderzoek gedaan naar het vloeigedrag van verschillende poeders. Als in hun onderzoek bloem met lactose met elkaar vergeleken wordt, dan heeft bloem een volume gemiddelde diameter van 71 μm en lactose één van 89 μm . Volgens de deeltjesgrootte zou lactose dus betere vloeieigenschappen moeten hebben. Echter is dit niet het geval. Dit kon deels verklaard worden doordat de span van de bloemdeeltjes nauwer was dan deze van de lactose deeltjes. Lactose heeft namelijk een span van 3,4 terwijl bloem een span van 2,9 heeft. Dit was één van de verklaringen die ze gaven, verder had ook de deeltjesvorm een grote invloed op dit verschil [14].

2.4.3 Deeltjesvorm

In het algemeen hebben meer bolvormige deeltjes betere stromingseigenschappen dan onregelmatige deeltjes. Dit komt omdat onregelmatige deeltjes een grotere neiging hebben om in elkaar te grijpen dan deeltjes met een rond en glad oppervlak [30], [35]. Horio et al. toonden aan zoals weergegeven in figuur 18 dat de angle of repose en de samendrukbaarheid beiden toenemen bij een toenemende kritische trillingsversnelling. De kritische trillingsversnelling is afhankelijk van de aspect ratio van de deeltjes. Hoe hoger de aspect ratio, hoe hoger de kritische trillingsversnelling en dus ook hoe slechter de vloeieigenschappen [36].

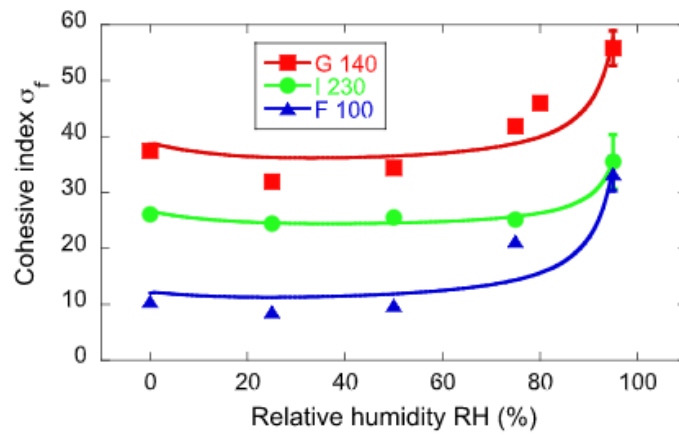


Figuur 18: Kritische trillingsversnelling in functie van de angle of repose en de samendrukbaarheid. [36]

2.4.4 Elektrostatische lading en vochtgehalte

Tijdens de verwerking van farmaceutische poeders komen poederdeeltjes vaak met elkaar en de wanden van de verwerkingsapparatuur in contact. Tijdens het wrijven kunnen elektrische lading uitgewisseld worden waardoor de deeltjes electrostatisch opladen. Dit fenomeen noemt het Tribo-elektrisch effect. Een verhoogde electrostatische lading heeft een negatief effect op de stromingseigenschappen.

Door de deeltjes voor een geruime tijd in contact te brengen met de lucht, kunnen ze terug ontladen. Hoe hoger de vochtigheid van de lucht, hoe efficiënter de ontlading kan gebeuren. Echter heeft een vochtige lucht ook invloed op het vloeigedrag van een poeder. Namelijk hoe hoger de relatieve luchtvochtigheid, hoe hoger het vochtgehalte van de deeltjes, hoe meer vloeistofbruggen gelegd kunnen worden met andere deeltjes en dus hoe cohesiever het poeder [37]. Figuur 19 geeft weer wat de invloed is van de relatieve luchtvochtigheid (RH) op de cohesieve index. De RH heeft tot een percentage van 60% weinig invloed op de cohesieve index, maar daarna is wel een duidelijk toename waarneembaar van het cohesief gedrag van de poeders. Voor de ontlading van deeltjes wordt aangeraden om te werken bij een RH van 45% voor voldoende marge te hebben [38], [39].



Figuur 19: De cohesie index van lactose poeders gemeten met een roterende trommel bij 8 rpm, als functie van de relatieve vochtigheid RH met een verblijftijd in het reactorvat van 150 min. [38]

3 Materiaal en methoden

Dit hoofdstuk beschrijft de methoden die in de huidige studie zijn gebruikt om de materiaal- en stromingseigenschappen van een poeder te meten. De geselecteerde poeders en de redenen van keuze worden ook besproken.

3.1 Geselecteerde poeders

In deze studie werden drie poeders gebruikt die een reeks deeltjesvormen en -groottes omvatten. Alle poeders waren afkomstig van de commerciële leveranciers Alfa Aesar. De geteste poeders zijn: adipinezuur (99%), benzoëzuur (99%), en salicylzuur (99%). Adipinezuur is een algemene organische componenten die geen grote risico's bevat rond gezondheid. Benzoëzuur is een organische component die kan voorkomen in verschillende vormen en kan toegepast worden voor sferische agglomeratie. Salicylzuur werd gekozen omdat het makkelijk uitkristalliseert in naaldvormige deeltjes waarvan bekend is dat ze slechte stromingseigenschappen vertonen. Om deze naaldvormige deeltjes te bekomen, werd het originele salicylzuurpoeder opnieuw uitgekristalliseerd via een anti-solvent kristallisatie. Een ethanol-salicylzuur oplossing van 215 g/l werd gemaakt en verwarmd tot 40 °C om alle deeltjes op te lossen. Een batch reactor van 1 L wordt gevuld met 750 ml water als anti-solvent en geroerd via een bovenroerder aan 300 toeren per minuut. Een Lauda omloopkoeler zorgt ervoor dat de reactor op een temperatuur van 20°C wordt gebracht. Aan het anti-solvent wordt 174 ml van de ethanol-salicylzuur oplossing toegevoegd aan een debiet van 80 ml/min met behulp van een Watson-Marlow 120s peristaltische pomp.

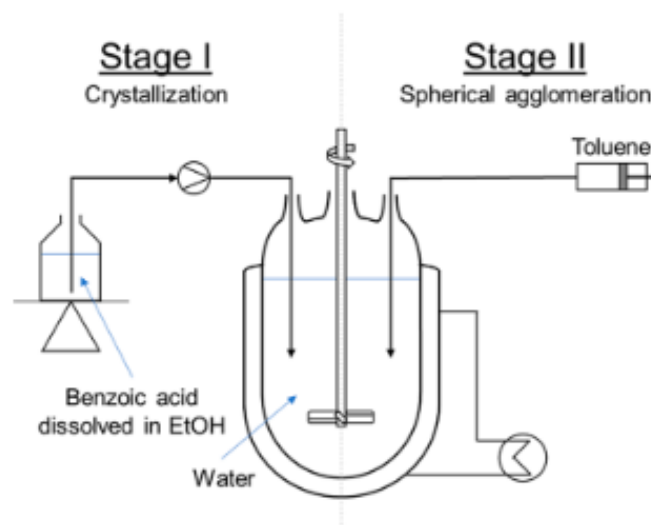
Van benzoëzuur en adipinezuur werden verschillende fracties gemaakt door te zeven in een zeeftoestel AS 200 (Retsch). Er waren vijf zeven beschikbaar met een poriegrootte van: 125 µm, 315 µm, 500 µm, 710 µm, 1000 µm. De bulk poeder wordt langs boven toegevoegd. Vervolgens trilt het toestel op en af met een amplitude van 2 cm gedurende één uur. Bij sommige zeven werden metalen balletjes extra toegevoegd die de deeltjes kapot sloegen, zodat het aantal kleinere deeltjes toenam.

Van benzoëzuur werden vier nauwe fracties gemaakt en van adipinezuur drie wijdere. Deze keuze werd gemaakt om de invloed van de deeltjesgrootteverdeling te onderzoeken. De kleinste fractie van beide componenten is wel dezelfde. Zo kan de invloed van de component met elkaar vergeleken worden. Van salicylzuur werden geen fracties gemaakt omdat de naaldvormige deeltjes niet geschikt zijn om te zeven. Een overzicht van de verschillende fracties die onderzocht zijn in dit onderzoek, is terug te vinden in tabel 2.

Tabel 2: Overzicht van de verschillende fracties voor elke component

Component	Fractie
Bezoëzuur	bulk
	<125
	315-125
	500-315
	710-500
Adipinezuur	<125
	500-125
	1000-500
Salicylzuur	naaldvormig

Tot slot werden er ook nog sferische agglomeraten van benzoëzuur toegevoegd. Deze werden gemaakt in de OptiMax 1001 Thermostat van Mettler Toledo. Op figuur 20 is de opstelling te zien.



Figuur 200: Opstelling voor het maken van benzoëzuur agglomeraten. In stap 1 wordt een ethanol-benzoëzuur oplossing van 0,375 g/ml toegevoegd voor kristallisatie en in stap 2 wordt het bridging liquid toluene voor sferische agglomeratie [3].

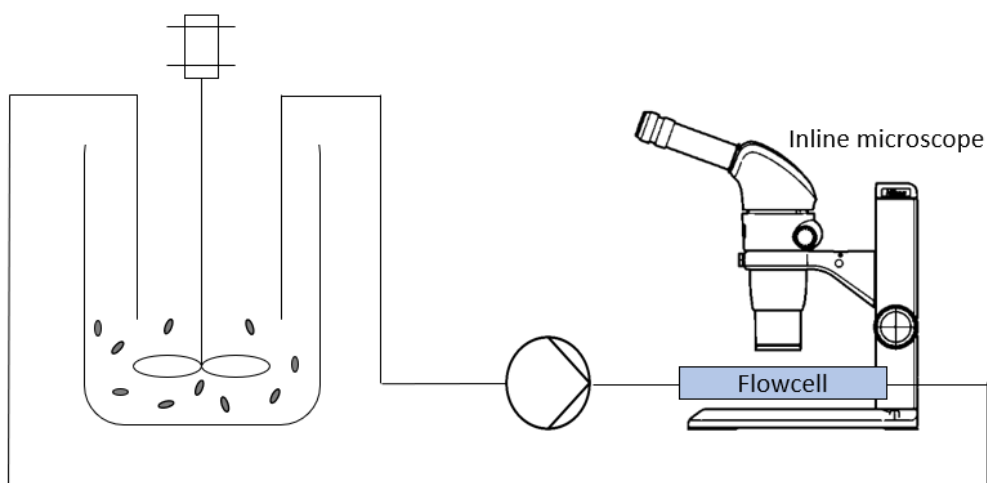
De batch reactor van 1 L wordt gevuld met 425 ml gedemineraliseerd water en de reactortemperatuur wordt ingesteld op 20 °C. De bovenroerder roert in dit eerste deel aan een snelheid van 300 toeren per minuut. Vervolgens wordt kristallisatie uitgevoerd door 25 ml van een 0,375 g/ml ethanol-benzoëzuur oplossing toe te voegen aan een debiet van 10 ml/min met een peristaltische pomp. Dit mengsel blijft voor 30 minuten lang geroerd zodat verdere nucleatie en kristalgroei kan plaatsvinden. In het tweede deel wordt het toerental van de roerder verhoogt naar een roersnelheid van 800, 1000 of 1200 toeren per minuut en wordt er vervolgens 3,5 ml toluene als bridging liquid toegevoegd aan een debiet van 2 ml/min. Agglomeraten beginnen te vormen. Dit mengsel blijft 5 minuten lang geroerd en nadien worden de agglomeraten af gefilterd over een Büchnerfilter. [3].

3.2 Materiaaleigenschappen

De materiaaleigenschappen worden bepaald aan de hand van een beeldanalyse. Uit deze techniek kunnen volgende eigenschappen gehaald worden: de volume-gemiddelde diameter $D[4,3]$, de PSD, de circulariteit, de aspect ratio, de rondheid en de robuustheid. Hieronder wordt verder uitgelegd hoe deze techniek werkt.

3.2.1 Opstelling

Eerst moet een video gemaakt worden van de deeltjes. Figuur 21 geeft de gebruikte opstelling weer.



Figuur 211: opstelling voor het maken van een inline microscoopbeelden van de deeltjes

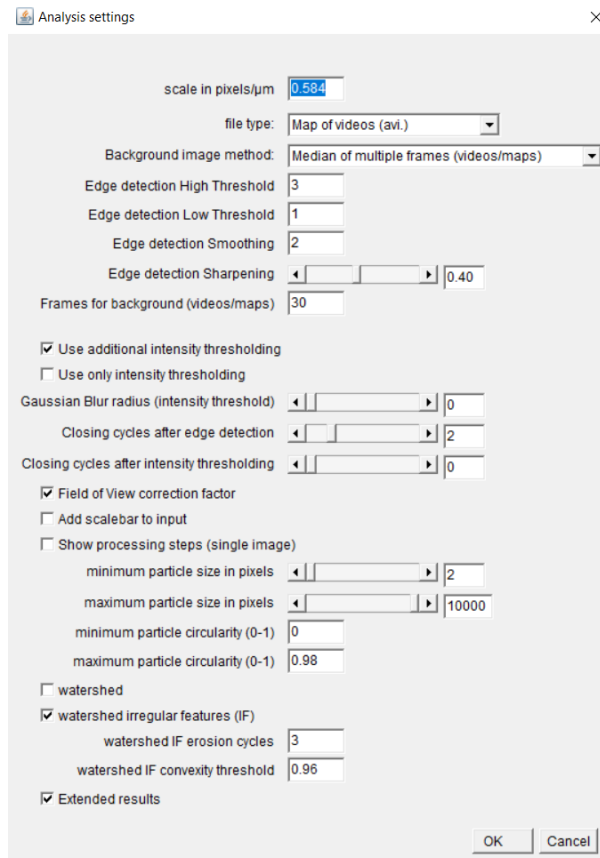
Een maatbeker van 400 ml wordt gevuld met 150 ml heptaan, waarin alle drie de componenten slecht oplossen. Enkel benzoëzuur heeft een oplosbaarheid van 1,52 wt% in heptaan. Om deze reden wordt bij benzoëzuur de oplossing op voorhand verzadigd door 0,5 g benzoëzuur van de kleinste fractie toe te voegen. Een kleine hoeveelheid surfactant (lecithine) wordt ook toegevoegd zodat de deeltjes niet zullen agglomereren. De roerder wordt aangezet op een toerental van 1500 toeren per minuut. Daarna kunnen de te analyseren deeltjes toegevoegd worden. Een wt% van 1 wordt gebruikt voor de deeltjes van een fractie groter dan 315 μm en een wt% van 0,3 wordt gebruikt voor de kleinere fracties. Vervolgens wordt de peristaltische pomp aangezet die de suspensie doorheen de flowcell pompt aan een debiet van 80 ml per minuut. De flowcell heeft een hoogte van 1000 μm zodat alle deeltjes erdoor kunnen stromen. De flowcell bevindt zich onder een inline microscoop die een video opneemt van 30 frames per seconden. Voor elk video dienen minstens 300 frames opgenomen te worden om een representatief beeld van de suspensie eigenschappen te krijgen.

De keuze van het niet-solvent is hier uiterst belangrijk. Het niet-solvent moet voldoen aan drie voorwaarden:

- Het niet-solvent moet een lage oplosbaarheid hebben voor de component die onderzocht wordt. Anders zou de component oplossen en zijn er geen deeltjes meer die geanalyseerd kunnen worden. Het oplossen van deeltjes in het niet-solvent kan tegengaan worden door het niet-solvent te verzadigen alsook de meting snel na het toevoegen van de deeltjes uit te voeren zodat de deeltjes geen tijd hebben om op te lossen.
- Het niet-solvent mag agglomeratie niet bevorderen. Zo heeft bijvoorbeeld water een lagere oplosbaarheid voor benzoëzuur dan water, maar beginnen de benzoëzuur deeltjes in water sterk te agglomereren waardoor verstoppingen optreden in de opstelling. Extra surfactant toevoegen helpt tegen het agglomereren, maar bevordert de ongewenste productie van luchtballen.
- Het niet-solvent moet een hogere dichtheid hebben dan de deeltjes. Anders zouden de deeltjes drijven en wordt het moeilijker om ze door de flowcell te krijgen.

3.2.2 Beeldanalyse

De opgenomen frames worden door ImageJ geanalyseerd via de macro weergegeven in appendix A. De deeltjes op de frames worden herkend door het algoritme door middel van randdetectie en op basis van het donkere en lichte contrast tussen deeltjes en achtergrond. Figuur 22 geeft de instellingen weer die gebruikt werden voor het bepalen van de grootte van de deeltjes.

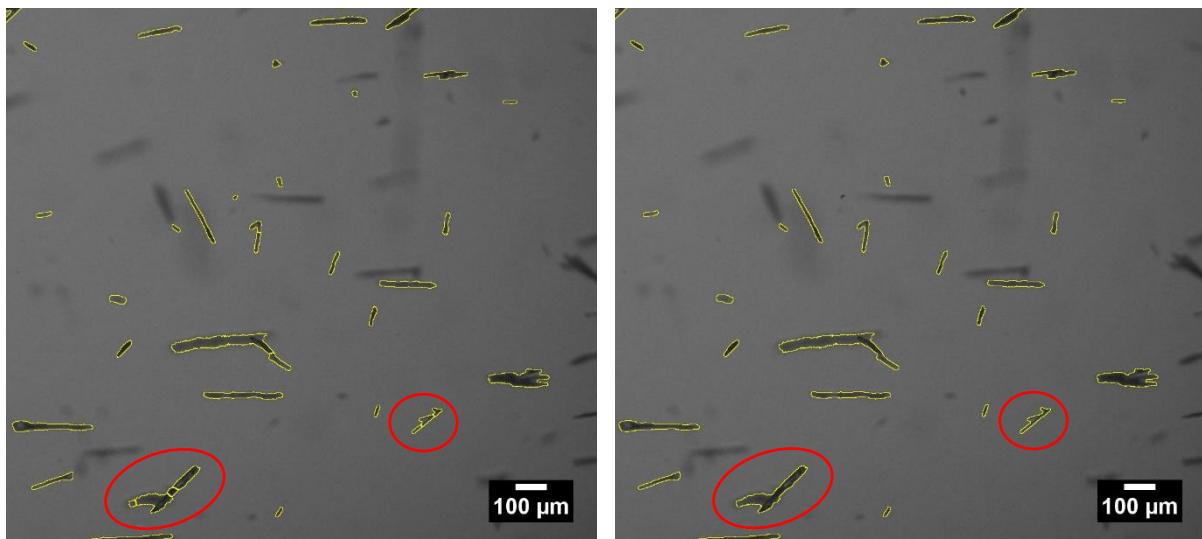


Figuur 222: Standaard instellingen ImageJ voor het bepalen van de grootte van de deeltjes

De *scale in pixels per µm* wordt ingesteld op 0,584 aangezien dit overeenkomt met de gebruikte vergroting van 40x van de microscoop bekomen uit kalibratie met een objectmicrometer. Als file type wordt geopteerd voor *map of videos (avi.)* voor de eerste analyse van de video. Als de video al eens geanalyseerd is en dus opgesplitst in meerdere frames, kan hier ook geopteerd worden voor *map that contains maps of images*. Vervolgens dient de achtergrond verwijderd te worden. De flowcell kan namelijk gecontamineerd zijn van vorige metingen of krassen op het glaswerk bevatten die vastgelegd worden als deeltjes. Qua methode wordt gekozen om een gemiddeld beeld op te stellen van de eerste 30 frames en dit beeld als achtergrond te verwijderen. De volgende stap is segmentatie, d.w.z. het proces waarbij de deeltjes van de achtergrond worden gescheiden. Twee methoden worden gebruikt voor de segmentatie: een randdetectiestap en een intensiteitsdrempel stap. De randdetectie is de belangrijkste segmentatiemethode. Hierbij wordt een hoge en lage drempelwaarde ingesteld. Als een deeltje boven de hoge drempelwaarde ligt, wordt het gedetecteerd. Als een deeltje onder de lage drempelwaarde ligt, wordt het verwijderd als achtergrond. Deeltjes die tussen de hoge en lage drempelwaarde liggen, worden nog gedetecteerd als ze gelijkaardig zijn aan deeltjes met een hoge drempelwaarde. De juiste drempelwaarden zijn afhankelijk van de belichting en scherpste van het beeld en worden gevonden door een bepaalde drempelwaarde in te stellen, naar het resultaat te kijken of er te veel of te weinig deeltjes worden gedetecteerd en de drempelwaarden te verfijnen. De intensiteitsdrempel stap detecteert deeltjes

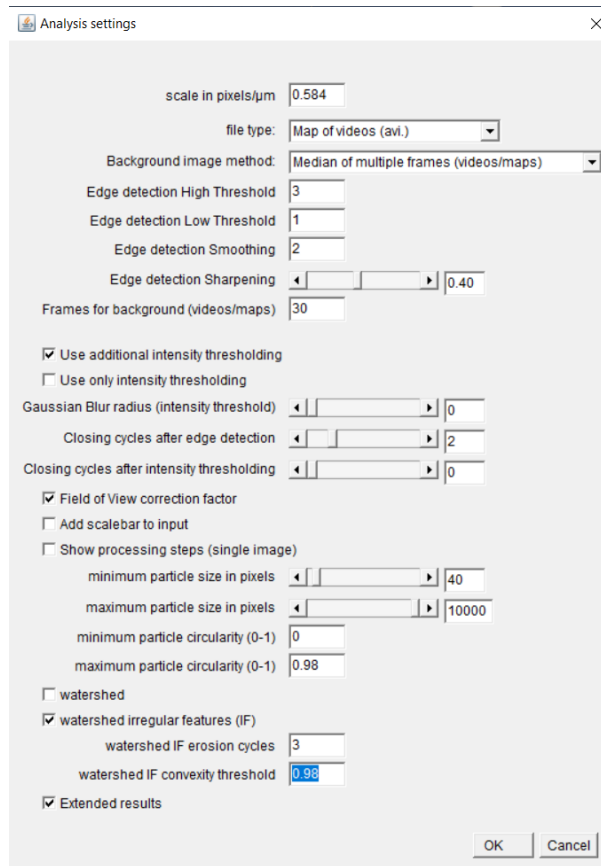
door een contrast in helderheid tussen deeltjes en achtergrond. De deeltjes die worden gevonden door beide methoden worden dan met elkaar vergeleken en een resulterend beeld wordt gemaakt. Voor de *edge detection* en de *intensity threshold* instellingen werden de standaardwaardes behouden want hierbij wordt het merendeel van de deeltjes waargenomen.

De *minimum particle size* in pixels wordt op 2 gezet omdat bij een *particle size* van 1 deeltjes worden gedetecteerd waarvan niet met zekerheid kan gezegd worden of deze bij het staal horen. Deze deeltjes kunnen van het surfactant afkomstig zijn. Als *maximum particle size* wordt gekozen voor de hoogst mogelijke waarde van 10000. De *maximum particle circularity* wordt verlaagd van 1 naar 0,98 zodat luchtbellen al gedeeltelijk worden verwijderd zonder deeltjes van het staal te verwijderen. Tot slot moet de *watershed IF convexity threshold* nog ingesteld worden. Deze instelling zorgt ervoor dat overlappende deeltjes gesplitst worden. Meestal wordt een waarde van 0,96 gebruikt. Echter voor naaldvormige deeltjes ligt deze waarde te hoog. Figuur 23 geeft weer dat bij deze waarde de grote, overlappende naaldvormige deeltjes van salicylzuur gefragmenteerd worden. Daarom dat de *watershed* verlaagd wordt naar 0,8. Deze waarde is de ideale balans waarbij geen fragmentatie optreedt en de overlappende deeltjes af en toe toch nog gesplitst worden.



Figuur 23: verschil tussen een *watershed* van 0,96 en 0,8 voor naaldvormige deeltjes.

Over de gehele lijn worden deze instellingen gebruikt voor de grootte. Echter kan het dat soms nog andere instellingen zijn gebruikt bepaald uit trial en error. De instellingen voor het bepalen van de vorm van de deeltjes zijn redelijk analoog als deze voor het bepalen van de grootte. Toch zijn er enkele verschillen (zie figuur 24).



Figuur 24: Standaard instellingen ImageJ voor het bepalen van de vorm van de deeltjes

De belangrijkste instelling die aangepast wordt, is de minimum particle size. Voor super kleine deeltjes geeft ImageJ waarden terug over de vorm die een perfecte cirkel benaderen. In realiteit is dit niet het geval als er gekeken wordt naar de grotere deeltjes. Daarom dat enkel de vorm waarden van de grotere deeltjes worden meegenomen. Verder wordt de watershed IF convexity threshold ook verhoogd. Dit is mogelijk omdat voordien het algoritme kleine brokjes van grotere deeltjes wegnam, maar omdat nu de minimum particle size is verhoogd, is dit niet meer het geval en kan er nog nauwkeuriger gewerkt worden.

Met de bekomen resultaten wordt achteraf in Excel nog een filterstap uitgevoerd om luchtballen en emulsies verder te verwijderen. Eerder werd de circulariteit al verlaagd naar een waarde van 0,98. Dit verwijdert ballen en emulsies waarvan een scherp beeld is. Onscherpe ballen en emulsies kunnen verwijderd worden doordat de rondheid altijd een waarde van 0,95 of hoger teruggeeft, een waarde die de deeltjes nooit bereiken. Daarom worden alle resultaten met een waarde hoger dan 0,95 weggelaten door middel van de macro te zien in figuur 25.

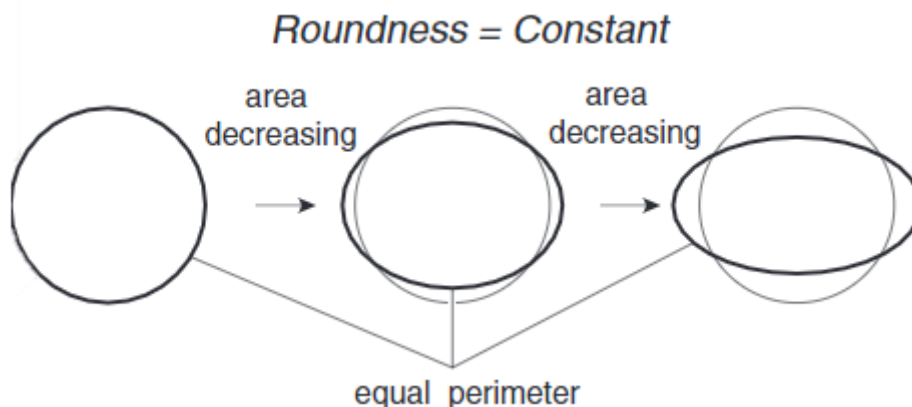
Figuur 25: Macro in excel voor het verwijderen van luchtbelllen en emulsies

Als resultaat wordt het oppervlak, de circulariteit, de aspect ratio, de diameter, enzovoort berekend. De diameter van de deeltjes is de equivalente sferische diameter en wordt in ImageJ berekend uit de oppervlakte van de deeltjes. Er wordt aangenomen dat elk deeltje rond is en dat daarom de diameter kan worden berekend met $diameter = \sqrt{\frac{4 * oppervlakte}{\pi}}$. Bekomen resultaten worden in een Excel template gekopieerd gemaakt door de schrijver van de code van ImageJ (<https://github.com/ArneVancleef/ImageJ-Particle-detection-and-analysis>) en hieruit wordt de nodige informatie voor deze thesis gehaald.

3.2.3 Correctie op de rondheid van ImageJ

Takashimizu et al. hebben ondervonden dat de rondheid die ImageJ berekent, niet correct is voor de definitie die zij aan rondheid geven, namelijk de aan- of afwezigheid van onregelmatigheden in de rand van een deeltje. In hun onderzoek stellen ze een nieuwe rondheidsparameter voor op basis van circulariteit. Circulariteit is gedefinieerd in de literatuurstudie onder 2.2.3 voor door vergelijking (5).

Dit geeft aan dat circulariteit van een deeltje op twee manieren kan worden veranderd: door veranderingen in oppervlakte en door veranderingen in omtrek. Uitgaande van een perfecte cirkel, als de omtrek constant wordt gehouden en de oppervlakte afneemt, wordt een ellips bekomen zoals figuur 26 aangeeft. Tijdens deze transformatie blijft rondheid volgens de definitie redelijk constant.



Figuur 26: Transformatie van een perfecte cirkel naar een ellips door de omtrek constant te houden en de oppervlakte te verminderen [40].

Met dit principe kan een formule worden opgesteld die rondheid bijschrijft:

$$\text{rondheid} = \text{circulariteit} + (\text{circulariteit}_{\text{perfecte cirkel}} - \text{circulariteit}_{\text{aspect ratio}}) \quad (14)$$

Waarbij circulariteit berekend wordt m.b.v. vergelijking 1, $\text{circulariteit}_{\text{perfecte cirkel}}$ de maximumwaarde van circulariteit in ImageJ is en $\text{Circulariteit}_{\text{aspect ratio}}$ de circulariteit bekomen op basis van de aspect ratio. Deze laatste twee parameters werden bepaald door een dataset van verschillende ellipsen met een aspect ratio variërende van 1 tot 10 door ImageJ te laten verwerken. De maximum circulariteit in ImageJ voor een perfecte cirkel komt overeen met een waarde van 0,913. Voor de circulariteit bekomen op basis van de aspect ratio, geeft men volgende polynomiaal van de zesde macht :

$$C_{AR} = 0,826261 + 0,337479 * AR - 0,335455 * AR^2 + 0,103642 * AR^3 - 0,0155562 * AR^4 + 0,00114582 * AR^5 - 0,0000330834 * AR^6 \quad (15)$$

Door deze formules toe te passen, zal de rondheid van ellipsvormige deeltjes verbeteren ten opzichte van de resultaten verkregen uit ImageJ. Opmerking: doordat de methode is opgesteld voor ellipsen met een aspect ratio van 1 tot 10, kan deze correctie enkel toegepast worden op deeltjes met een aspect ratio kleiner dan 10 [40].

3.3 Stromingseigenschappen

De stromingseigenschappen worden bepaald aan de hand van een Granudrum en een tap dichtheid tester. De Granudrum geeft de cohesieve index en de dynamische angle of repose terug. Uit de resultaten van de tap dichtheid tester kan de Hausner ratio en de samendrukbaarheidsindex berekend worden. Voor beide metingen is wel eerst een staalvoorbereiding noodzakelijk om de deeltjes neutraal geladen te maken.

3.3.1 Staalvoorbereiding

Zoals eerder vermeld in de literatuurstudie kan tijdens de behandeling van een poeder door wrijving elektrische lading uitgewisseld worden waardoor de deeltjes elektrostatisch opladen. Een verhoogde elektrostatische lading heeft een negatief effect op de stromingseigenschappen en op het bepalen van deze eigenschappen. Zo kunnen de deeltjes aan het glas van de Granudrum (zie 3.3.2) of de maatcilinder van de tap dichtheid tester (zie 3.3.3) blijven plakken. Om dit te vermijden worden de deeltjes voor een geruime tijd in contact gebracht met de lucht, waardoor ze kunnen ontladen. Hoe hoger de vochtigheid van de lucht, hoe efficiënter de ontlading kan gebeuren. Uit de literatuurstudie bleek een RH van 45% perfect geschikt te zijn.

Om een constante RH van +/- 45% te bekomen, werd een exsiccator gevuld met een verzadigde kaliumcarbonaat-oplossing. Greenspan et al heeft namelijk onderzocht wat de relatieve lucht van verschillende verzadigde zout oplossingen bedroeg en kaliumcarbonaat gaf bij een temperatuur tussen 0 en 25 °C een RH van 43% terug [41]. Vervolgens werd er een zeef eigenhandig gefabriceerd met een poriëngrootte van 1 µm zodat lucht door kan maar de poeders niet. Op deze zeef werden de verschillende stalen geplaatst, elk afgeschermd in een eigen filterpapier.

3.3.2 Cohesieve index en dynamische angle of repose

Het reologische gedrag van de verschillende stalen wordt geëvalueerd met de GranuDrum (GranuTools, Awans, België). Het instrument is een geautomatiseerde meettechniek voor de

vloeibaarheid van poeder op basis van het roterende trommelprincipe. Een horizontale cilinder met verticale glazen zijwanden en een totaal volume van 20 ml (= reductiecel) wordt voor de helft gevuld met het poedermonster. De trommel draait om zijn as met een hoeksnelheid tussen 2 toeren per minuut tot 40 toeren per minuut. Een CCD-camera maakt momentopnamen (40 beelden gescheiden door 0,25 s) bij elke hoeksnelheid. Het grensvlak tussen lucht en poeder wordt op elke momentopname gedetecteerd met een randdetectie algoritme. Daarna worden de gemiddelde interfacepositie en de fluctuaties rond deze gemiddelde positie berekend. Vervolgens wordt voor elke draaisnelheid de dynamische angle of repose berekend uit de gemiddelde interfacepositie en de dynamische cohesie-index wordt gemeten uit de interfacefluctuaties. De interfacefluctuaties worden immers geïnduceerd door de cohesiekrachten tussen de korrels. Deze dynamische cohesie-index ligt dicht bij nul voor niet-cohesieve poeders en neemt toe wanneer de cohesiekrachten toenemen.

Elektrostatische ladingen spelen een grote rol bij deze meting. Als de ladingen te hoog oplopen, blijven de deeltjes aan de glazen wand plakken waardoor de interface niet meer waargenomen kan worden door het algoritme. Om de invloed van elektrostatisch lading te beperken, werden eerst een reproduceerbare meetmethode opgesteld. De poeders moesten voor een meting minstens 24 uur de staalvoorbereiding ondergaan waarbij het poeder wordt blootgesteld aan een RH van 43%. Ook dient de meetcilinder gespoeld te worden met water en nadien een tiental minuten blootgesteld worden aan de atmosfeer. Zo zijn er zo goed als geen elektrostatisch ladingen aanwezig in het begin van de meting. Het aantal meetpunten en de duur van één meetpunt dient ook beperkt gehouden te worden zodat er minder tijd is voor het opwekken van elektrostatische ladingen tijdens de meting. Er werd geopteerd voor 4 meetpunten, drie meetpunten bij een laag toerental van 2, 6 en 10 toeren per minuut en één meetpunt bij een hoog toerental van 40 toeren per minuut. Indien er toch nog deeltjes beginnen te plakken aan de glazen wand, kunnen de lichtinstellingen van de Granudrum zo ingesteld te worden dat deze deeltjes niet gedetecteerd worden. Dit was voor alle metingen het geval bij een *CamGain* van 30, een *CamExposureMs* van 3 en een *BWThreshold* van 160.

3.3.3 Samendrukbaarheidsindex en Hausner Ratio

De verhouding tussen de tap dichtheid en de oorspronkelijke bulk dichtheid levert de Hausner-ratio en de samendrukbaarheidsindex door respectievelijk vergelijking 10 en 11 in te vullen. Hoe hoger de Hausner-ratio, hoe lager de vloeibaarheid van het poeder. De tap en bulk dichtheden werden verkregen met een tap dichtheid tester (sotax td1) met een maatcilinder van 25 ml. De cilinder werd gevuld met een hoeveelheid poeder tussen de 20 en 25 ml poeder en vervolgens gedurende 6 minuten afgetapt aan een frequentie van 252 taps per minuut. Na het vullen kan het bulk volume worden afgelezen en na het tappen het tap volume tot op 0,2 ml nauwkeurig. Voor de meting dient ook het gewicht van het poeder gemeten te worden.

Ook hier spelen elektrostatische ladingen een rol bij de meting. Doordat het poeder plakt aan het glas van de cilinder, wordt het moeilijker om het volume nauwkeurig af te lezen. Om dit tegen te gaan, zijn gelijkaardige handelingen nodig als bij de Granudrum. Zo dient het staal andermaal de staalvoorbereiding minstens 24 uur te ondergaan. Ook dient de maatcilinder na elke meting gespoeld te worden met water en vervolgens een tiental minuten blootgesteld te worden aan de atmosfeer.

3.4 Correlatie

Een belangrijk onderdeel van dataverwerking is het bepalen welke variabelen in een model moeten worden opgenomen. Hoewel het verleidelijk kan zijn om alle beschikbare gegevens in het model te gooien en te hopen dat het geselecteerde algoritme het doorheeft, zijn er een aantal voordelen verbonden aan het gebruik van selectietechnieken om de gegevens die in het model worden opgenomen te beperken. Enkele van deze voordelen zijn: een verbeterde trainingstijd, een verminderde kans op overfitting doordat de complexiteit afneemt en een verhoogde interpreteerbaarheid. Voor dit onderzoek wordt gebruikt gemaakt van Pearson en Kendall als selectietechniek [42].

3.4.1 Pearson correlatie

Dit is de meest voorkomende vorm van correlatie. De Pearson correlatiecoëfficiënt geeft altijd een waarde tussen -1 en 1. Hoe verder de waarde van 0 af ligt, hoe sterker het verband. Een waarde van 1 betekent een perfect positief lineair verband (d.w.z. als de ene variabele met een eenheid toeneemt, neemt de andere toe met een overeenkomstige bekende hoeveelheid en die hoeveelheid verandert niet) terwijl -1 een perfect negatief lineair verband betekent (d.w.z. als de ene variabele toeneemt, neemt de andere af) en 0 staat voor geen verband.

Alvorens gebruik te maken van Pearson's moeten een aantal veronderstellingen worden geverifieerd. Beide variabelen moeten continue variabelen zijn. De twee variabelen waartussen je de correlatie controleert moeten beide normaal verdeeld zijn. De relatie tussen de twee variabelen moet lineair zijn. Ten slotte moeten uitschieters van tevoren worden behandeld, omdat ze de correlatiecoëfficiënt die wordt verkregen sterk kunnen beïnvloeden. Als aan alle bovenstaande voorwaarden zijn voldaan, dan kan Pearson gebruikt worden als selectietechniek. De volgende formule wordt gebruikt om de Pearson r-correlatie te berekenen:

$$r_{xy} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} \quad (16)$$

Waarbij r_{xy} gelijk is aan de Pearson r correlatie coefficient tussen x en y, n het aantal observaties, x_i de waarde van x voor de i-de waarneming en y_i de waarde van y voor de i-de waarneming. De Pearson correlatie kan makkelijk in Excel berekend worden door de functie =CORRELATIE(matrix1; matrix2) [43].

3.4.2 Kendall rang correlatie

Terwijl Pearson een lineair verband tussen twee variabelen meet, meet Kendall het monotone verband. Terwijl lineaire relaties betekenen dat twee variabelen in een constante snelheid samen bewegen, denk aan een rechte lijn, meten monotone relaties hoe waarschijnlijk het is dat twee variabelen in dezelfde richting bewegen, maar niet noodzakelijk in een constante snelheid. De opwaartse exponentiële curve zou een strikt positieve monotoniteit hebben omdat als x toeneemt y ook altijd toeneemt, maar de gebogen lijn is niet lineair omdat de snelheid waarmee y verandert varieert bij verschillende waarden van x. Net als Pearson's correlatie zal Kendall's een waarde tussen -1 en 1 teruggeven waarbij -1 een strikt negatieve monotone relatie is (de variabelen zijn omgekeerd evenredig), 1 een strikt positieve monotone relatie, en 0 staat voor geen relatie.

Kendall's wordt vaak gebruikt wanneer gegevens niet voldoen aan één van de vereisten van Pearson's correlatie. Kendall's vereist ook geen continue gegevens. Omdat zij gebaseerd is op de gerangschikte waarden van elke variabele, werkt zij met continue gegevens, maar zij kan ook worden gebruikt met ordinale gegevens. Ordinale gegevens hebben een rangorde, maar de intervallen tussen de rangen zijn niet noodzakelijk consistent. Voorbeelden zijn opleidingsniveaus (middelbare school, universiteit, master, Ph.D.) of een zelfevaluatie van vaardigheden (beginner, gemiddeld, expert). De volgende formule wordt gebruikt om de waarde van de Kendall Rang correlatie te berekenen:

$$\tau = \frac{C-D}{C+D} \quad (17)$$

Waarbij C gelijk is aan het aantal concordante paren en D het aantal discordante paren. De Kendall rang correlatie kan in Excel berekend worden door eerste de concordante en discordante paren te bepalen met =AANTALLEN.ALS(Matrix1;">"&variabele1;Matrix2;">"&variabele2) voor de concordante paren en =AANTALLEN.ALS(Matrix1;">"&variabele1;Matrix2;"<"&variabele2) voor de discordante paren. Vervolgens kan vergelijking 17 ingevuld worden[43].

3.4.3 Statistische significantie

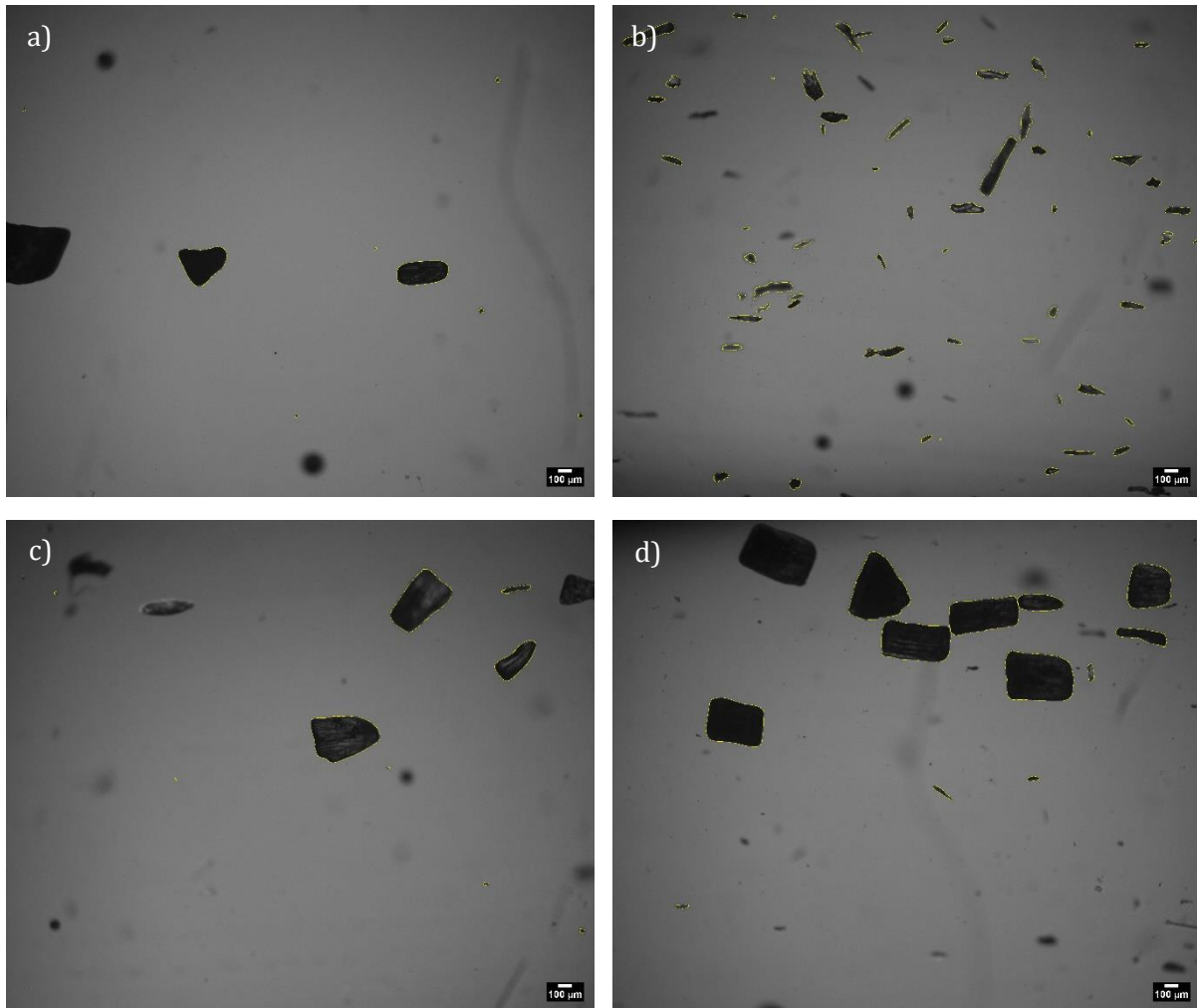
Statistische significantie betekent dat het gevonden resultaat (waarschijnlijk) niet op toeval berust. De nauwkeurigheid van een statistisch significant resultaat wordt weergegeven door een p-waarde. De p-waarde is een maat voor de kans dat de nulhypothese ten onrechte is verworpen. Met behulp van een statistische toets wordt een waarde tussen 0 en 1 bepaald. Is de waarde gelijk aan 1, dan berust het gevonden resultaat op toeval. Is de waarde gelijk aan 0, dan berust het gevonden resultaat niet op toeval en duidt het op een werkelijk verband. Als grens voor statistische significantie neemt men meestal $p=0,05$. Indien $p \leq 0,05$, dan is de kans dat het gevonden resultaat aan het toeval te wijten is kleiner of gelijk aan 5%. Voor zowel Pearson als Kendall wordt de p-waarde berekend.

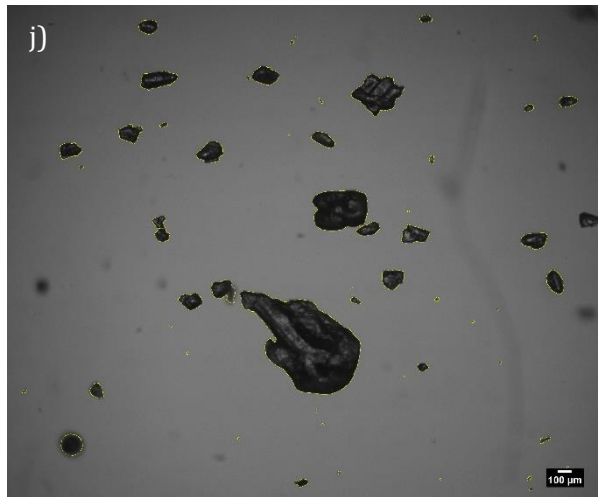
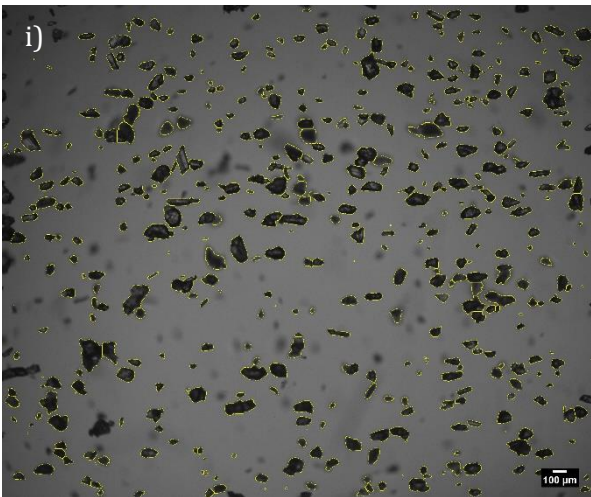
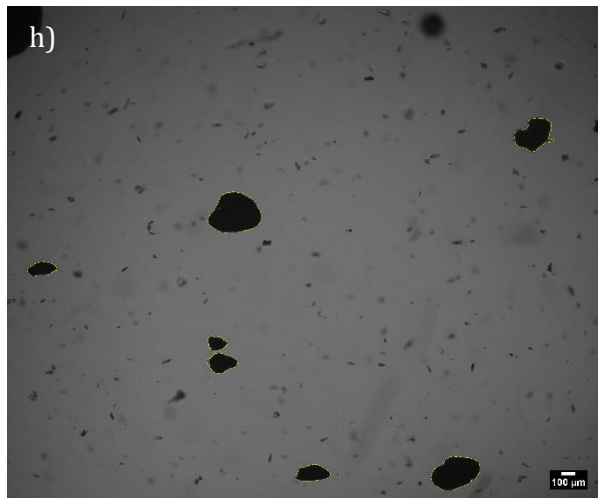
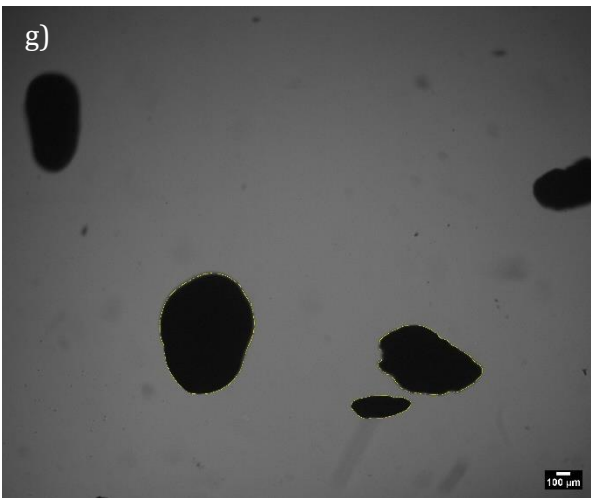
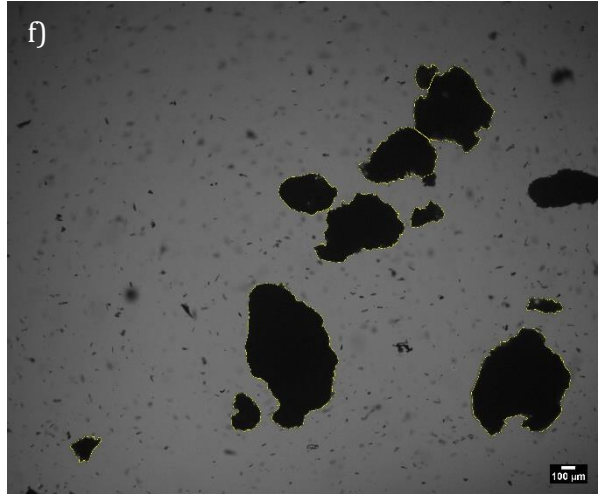
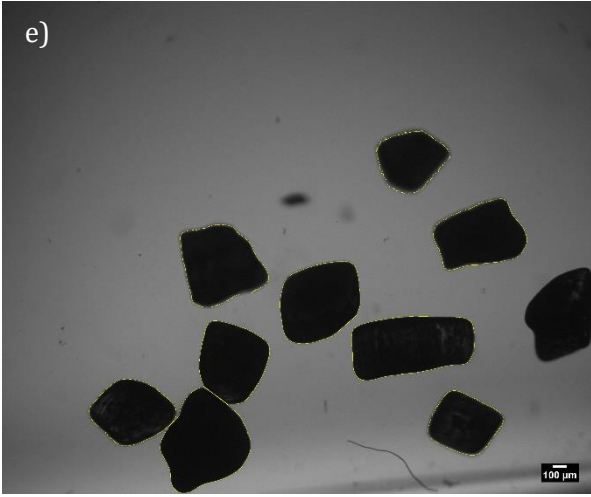
4 Resultaten en discussie

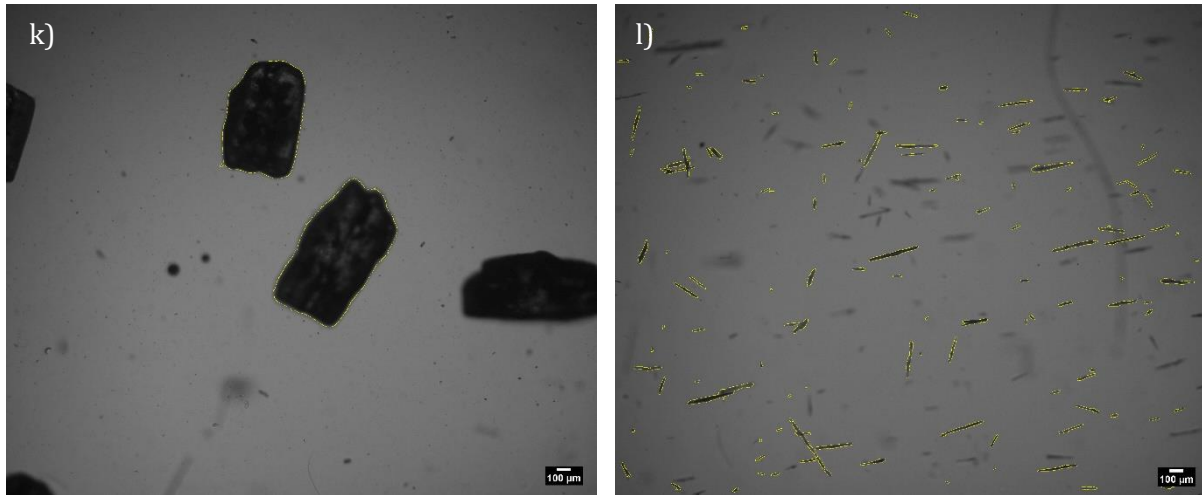
4.1 Materiaaleigenschappen

4.1.1 *Inline microscoop beelden*

De beelden van de verschillende poeders die met de inline microscoop bij een vergroting van 40X zijn verkregen, zijn te zien in figuur hieronder.





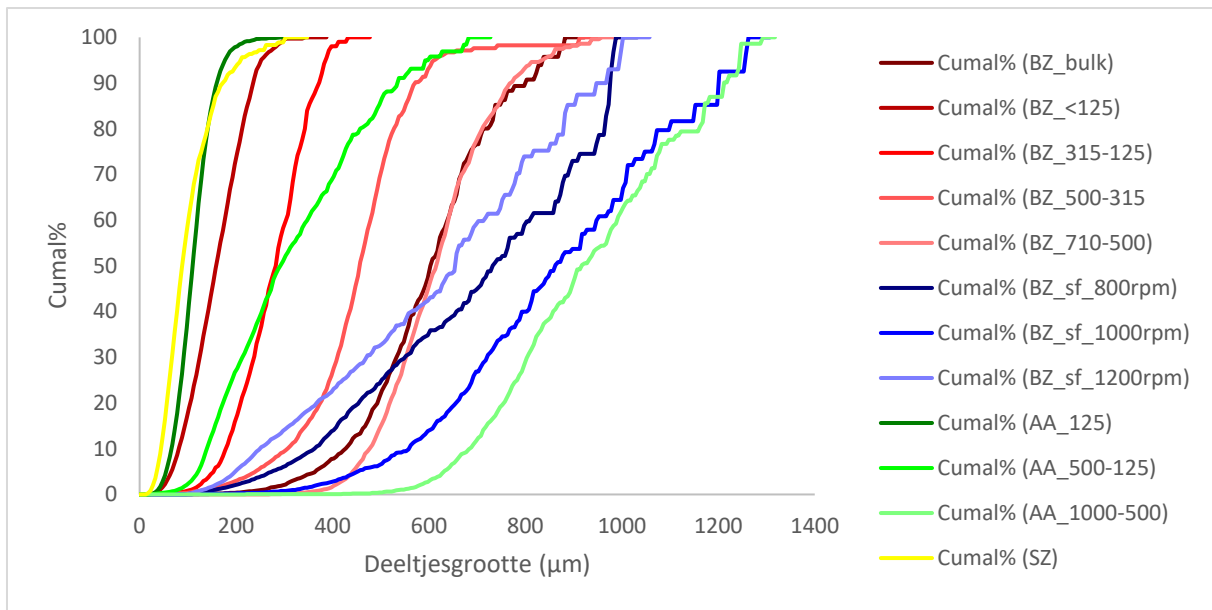


Figuur 27: :inline microscoopbeelden verwerkt in ImageJ: a) BZ_bulk, b) BZ_<125, c) BZ_315-125, d) BZ_500-315, e) BZ_710-500, f) BZ_sf_800rpm, g) BZ_BZ_sf_1000rpm, h) BZ_sf_1200rpm i) AZ<125, j) AZ_500-125, k) AZ_1000-500 en l) SZ_naaldjes.

Uit de beelden kan worden opgemaakt dat de poeders verschillende vormen en afmetingen vertonen. De bulk (a) ligt qua grootte ergens tussen al de fracties (b-e) in. De kleinste fractie van benzoëzuur (b) zijn langgerekte deeltjes met scherpe hoeken. De grotere fracties zijn eerder vierkant met afgeronde hoeken. Bij de beelden van de sferische agglomeraten (f-h), zijn er in de achtergrond veel kleine deeltjes aanwezig. Dit zijn afgebroken kristallen van de agglomeraten. Gedurende de meting nam de hoeveelheid afgebroken kristallen niet toe. De kristallen aan het oppervlak van de agglomeraten zijn dus niet stabiel, maar de kern blijft wel samen. Qua vorm zijn de agglomeraten geproduceerd bij een toerental van 1000 en 1200 redelijk gelijkaardig, namelijk bolvormig. De agglomeraten geproduceerd bij een toerental van 800 zijn ook bolvormig, maar bevatten veel onregelmatigheden in hun oppervlak. Deze zouden al voor de analyse aanwezig kunnen zijn, maar ook kunnen ontstaan zijn tijdens het uitvoeren van de proef om een video op te nemen. De agglomeraten bij een toerental van 1200 zijn ook beduidend kleiner dan de andere twee. De kristallen van adipinezuur (i-k) hebben minder afgeronde randen ten opzichte van benzoëzuur en de vorm blijft min of meer constant voor elke fractie. Salicylzuur bestaat duidelijk uit naaldvormige deeltjes.

4.1.2 Deeltjesgrootte

De cumulatieve grootteverdeling van de verschillende poeders, opgesteld aan de hand van de beeldanalyse in ImageJ, is weergegeven in figuur 28.



Figuur 28: cumulatieve grootteverdeling van de verschillende poeders.

De benzoëzuurfracties zijn redelijk gelijkaardig qua grootteverdeling, enkel de bulk heeft een bredere verdeling zoals verwacht. De bulk kan dus vergeleken worden met de andere fracties om te kijken wat de invloed is van de grootteverdeling. De bekomen sferische agglomeraten hebben een grotere deeltjesgrootte dan de verschillende fracties. Opvallend is dat de agglomeraten gemaakt bij een roersnelheid van 800 toeren per minuut kleiner zijn dan deze gemaakt bij een roersnelheid van 1000 toeren per minuut. De literatuur zegt namelijk dat hoe hoger de roersnelheid, hoe kleiner de agglomeraten [3]–[5]. De grafiek bevestigt ook de bredere verdeling van de adipinezuur fracties t.o.v. de benzoëzuurfracties. De kleinste fractie van adipinezuur (AZ_<125) bevat kleinere deeltjes dan benzoëzuur (BZ_<125). De grootste fractie van adipinezuur (AZ_1000-500) bevat de grootste deeltjes van alle poeders, wat logisch is aangezien dit de enige fractie is die tot 1000 µm gaat. Tot slot heeft salicylzuur de kleinste verdeling. Dit is logisch aangezien de diameter wordt berekend aan de hand van de oppervlakte van een deeltje en naaldjes hebben een zeer klein oppervlak omdat ze zo nauw zijn. Een overzicht van de grootte en grootteverdeling is terug te vinden in tabel 3.

Tabel 3: overzicht grootte en grootteverdeling van de verschillende poeders.

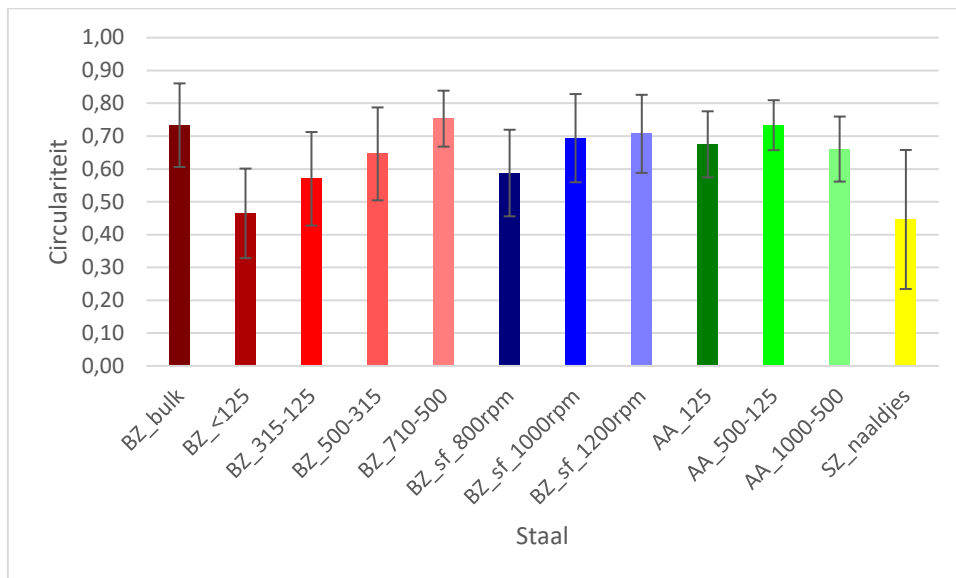
Component	Fractie	Gemiddelde D4,3 (µm)	d10 (µm)	d50 (µm)	d90 (µm)	Span	Breedte spreiding
Benzoëzuur	bulk	572	418	593	789	0,62	3,71
	<125	156	82	159	233	0,95	1,51
	315-125	260	229	276	288	0,21	0,59
	500-315	436	303	454	563	0,57	2,60
	710-500	604	476	606	754	0,46	2,78
	800rpm	688	327	668	898	0,86	5,71
Adipinezuur	1000rpm	864	461	671	856	0,59	3,95
	1200rpm	636	232	614	952	1,17	7,20
	<125	113	68	111	161	0,84	0,94
Adipinezuur	500-125	295	139	290	505	1,26	3,66
	1000-500	867	643	803	964	0,40	3,21
Salicylzuur	naaldjes	97	46	89	170	1,40	1,24

Hierbij is de span gelijk aan $(d90 - d10)/d50$. Dit geeft echter geen goed beeld van de verdeling. Volgens deze definitie heeft de bulk van benzoëzuur een nauwere verdeling dan de <125 fractie van benzoëzuur. Dit komt omdat bij grotere fracties d50 een grotere waarde heeft en delen door

deze waarde sterk doorweegt. Daarom dat een nieuwe parameter wordt geïntroduceerd voor de spreiding, de breedte spreiding, en deze is gelijk aan $d_{90}-d_{10}$. Met definitie heeft de bulk de breedste spreiding t.o.v. de benzoëzuurfracties.

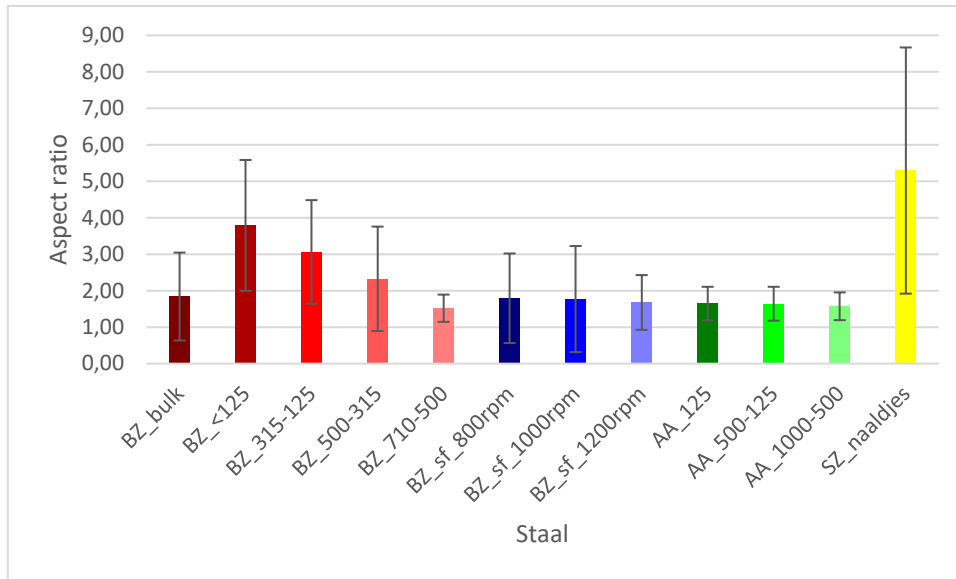
4.1.3 Deeltjesvorm

De deeltjesvorm wordt gekarakteriseerd aan de hand van de volgende vier vormeigenschappen: de circulariteit, de aspect ratio, de rondheid en de robuustheid. De resultaten voor deze vier parameters zijn gegeven in figuur 29-32.



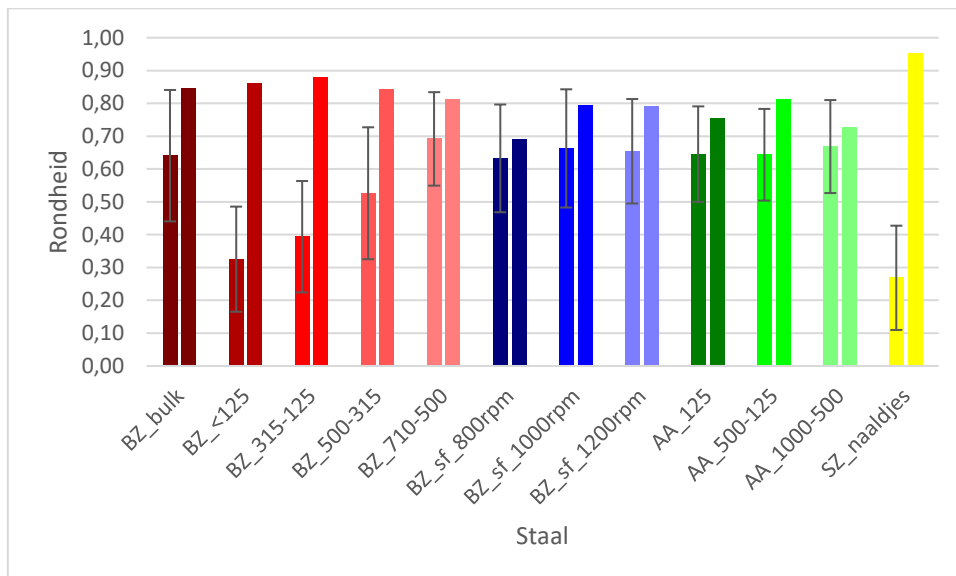
Figuur 29: De circulariteit van de verschillende poederstalen

Uit de analyse van de beelden werd al geconcludeerd dat de kleinste fractie van benzoëzuur langgerekte deeltjes waren en dat naarmate de grootte van de fracties toenam, de deeltjes vierkantiger werden met afgeronde hoeken. Figuur 31 geeft dit duidelijk ook weer met een stijging van de circulariteit van 0,46 (voor de kleinste fractie) naar 0,74 (voor de grootste fractie). De sferische agglomeraten scoren gemiddeld voor de circulariteit. In theorie zou verwacht worden dat deze hoger zouden scoren, maar in de praktijk is het niet eenvoudig om perfect sferische deeltjes te maken. De agglomeraten gemaakt bij een roersnelheid van 800 toeren per minuut hebben een lage circulariteit van 0,59, wat verklaard kan worden wegens hun vele onregelmatigheden in hun rand. Ook werd geconcludeerd uit de beelden dat de adipinezuur fracties qua vorm redelijk gelijkaardig waren. Ook dit wordt bevestigd door de resultaten van de circulariteit met een verschil van amper 0,07 tussen de uitersten. Salicylzuur met zijn naaldvormige deeltjes scoort het slechts voor de circulariteit. Dit is ook te verwachten als naar de definitie voor circulariteit (vergelijking 5) wordt gekeken. Voor naaldvormige deeltjes ligt de verhouding omtrek/oppervlak veel hoger dan bij sferische deeltjes waardoor de circulariteit afneemt.



Figuur 30: De aspect ratio van de verschillende poederstalen.

De resultaten van de aspect ratio geven gelijkaardige resultaten als de resultaten van de circulariteit met betrekking tot de vorm van de deeltjes. Zo hebben salicylzuur en de kleinere fracties van benzoëzuur de hoogste waarden qua aspect ratio, terwijl ze ook al de laagste waarden qua circulariteit hebben. De rest van de resultaten liggen zeer kort bij elkaar. De agglomeraten gemaakt bij een roersnelheid van 800 toeren per minuut zelfs gelijkaardig met de andere twee agglomeraten. Dit komt omdat de aspect ratio geen rekening houdt met de onregelmatigheden in de rand.



Figuur 31: De rondheid van de verschillende poederstalen. Links zijn de resultaten bekomen uit ImageJ en rechts zijn de resultaten na correctie gebaseerd op de circulariteit.

Op de resultaten van de rondheid moet eerst nog een correctie uitgevoerd worden zoals vermeld in 3.2.3. Deze correctie is ook nodig als we naar de resultaten kijken van de rondheid door ImageJ voor salicylzuur. Salicylzuur scoort zeer slecht op de rondheid volgens ImageJ. Indien gekeken wordt naar de beelden van salicylzuur, zou salicylzuur juist redelijk goed moeten scoren qua rondheid aangezien dit mooi afgeronde deeltjes zijn. Ook scoort benzoëzuur gemaakt bij een

roersnelheid van 800 toeren per minuut evengoed op de rondheid als de andere twee agglomeraten. Volgens de beelden zou deze waarden veel verder uit elkaar moeten liggen.

Voor salicylzuur wordt de correctie helemaal uitgewerkt. Eerst dient de circulariteit op basis van de aspect ratio bepaald worden a.d.h.v. vergelijking 15. De gemiddelde aspect ratio van salicylzuur is gelijk aan 5,29 dus wordt C_{AR} :

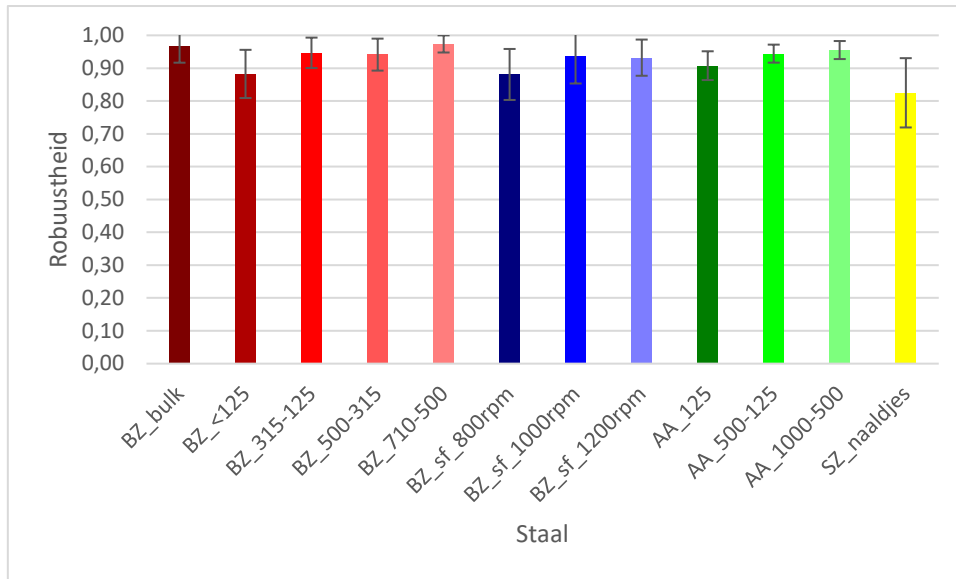
$$C_{AR} = 0,826261 + 0,337479 * 5,29 - 0,335455 * 5,29^2 + 0,103642 * 5,29^3 - 0,0155562 * 5,29^4 + 0,00114582 * 5,29^5 - 0,0000330834 * 5,29^6 = 0,41$$

De gemiddelde circulariteit van salicylzuur volgens ImageJ is gelijk aan 0,45 dus na kan vergelijking 14 voor de correctie op de rondheid ingevuld worden.

$$rondheid = 0,45 + (0,913 - 0,41) = 0,95$$

Als de resultaten van de correctie worden vergeleken met de beelden blijkt dat deze correctie een verbetering geeft van de rondheid volgens de opgelegde definitie. Toch liggen niet alle waarden binnen de verwachting. Uit de beelden kan geconcludeerd worden dat de kleinste fractie van benzoëzuur, benzoëzuur gemaakt bij een roersnelheid van 800 toeren per minuut en alle drie de fracties van adipinezuur redelijk slecht moeten scoren op rondheid aangezien ze veel onregelmatigheden bevatten. Maar deze stalen scoren na correctie nog beter op rondheid dan voordien en deze waarden liggen dicht bij de waarden van andere deeltjes die wel rond zijn. Andersom zou benzoëzuur fractie 710-500 één van de beste waarden moeten geven voor rondheid maar ook dit is niet het geval. De rondheid wordt hierdoor niet meegenomen om verdere correlatie te leggen.

Enkele theorieën werden onderzocht wat de fout op de correctie veroorzaakt. Mogelijk geeft het gebruik van een andere macro voor het analyseren van de deeltjes een fout. In het artikel werd voor een perfecte cirkel met een diameter van 100 pixels slechts een circulariteit van 0,913 bekomen terwijl een waarde van 1 wordt verwacht. Dit is dus een apart resultaat, maar de macro gebruikt in dit onderzoek geeft voor eenzelfde cirkel ook slechts een circulariteit van 0,916. Een andere mogelijkheid is dat de correctie enkel kan toegepast worden op ellipsvormige deeltjes. Voor het opstellen van de correctieformule werden enkel perfect ellipsvormige deeltjes gebruikt waardoor de correctieformule mogelijk niet kan toegepast worden voor andere vormen. Dit is onderzocht door de correctie toe te passen op een stervormig figuur waarvan een lage rondheid wordt verwacht. Voor deze ster geeft ImageJ een rondheid van 0,999 wat niet klopt volgens de definitie. De correctie geeft wel een mogelijk correcte waarde van 0,318. Ook deze verklaring is dus ontkracht.



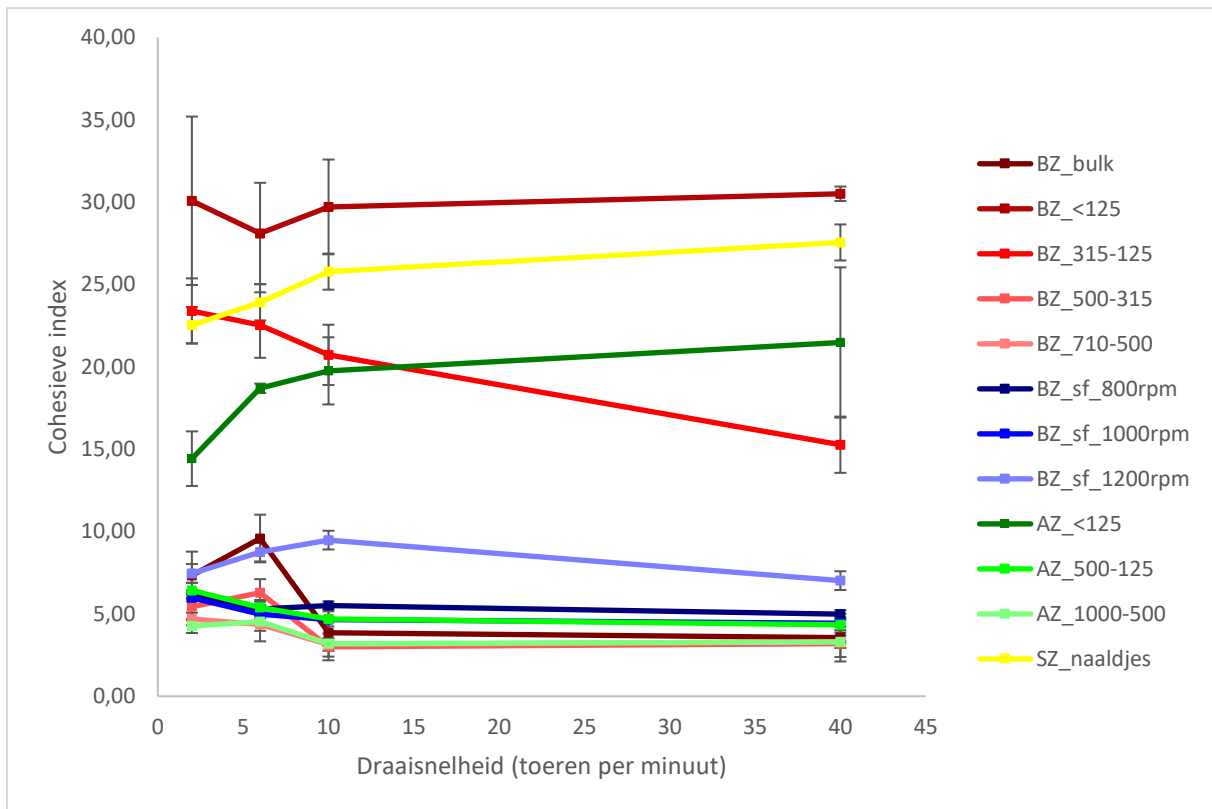
Figuur 32: De robuustheid van de verschillende poederstalen.

De robuustheid van alle deeltjes is redelijk vergelijkbaar op enkel uitzonderingen na. Zo heeft salicylzuur een lagere waarde van 0,82 doordat enkele naaldjes op de beelden elkaar kruisen. Deze kruisingen hebben een heel grote convex hull oppervlakte ten opzichte van de oppervlakte waardoor de robuustheid afneemt. In de analyse kunnen deze kruisende deeltjes ook niet gesplitst worden van elkaar door de watershed te verhogen want dan worden te veel naaldjes die niet overlappen gefragmenteerd waardoor een grote fout wordt gemaakt in de analyse. Een oplossing zou geweest zijn om een minder deeltjes toe te voegen, waardoor de kans op overlapping verminderd. In dat geval zouden er wel extra frames moeten opgenomen worden. Ook BZ_<125 en BZ_sf_800rpm scoren onder de 0,9 door hun vele kleine inhammen.

4.2 Stromingseigenschappen

4.2.1 Cohesieve index en dynamische angle of repose

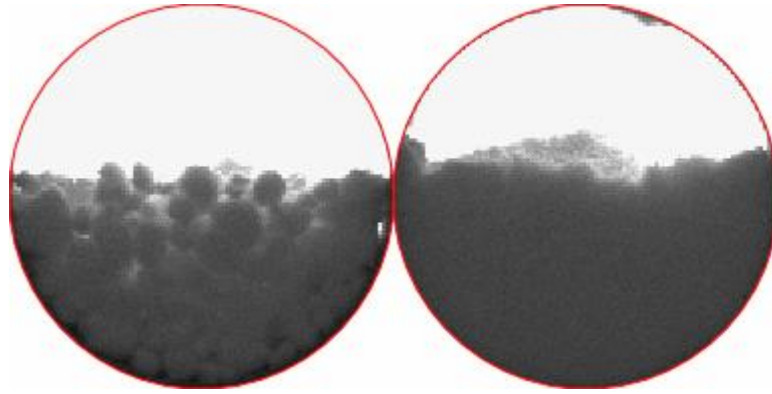
In figuur 33 en 35 zijn de resultaten voor de cohesieve index en dynamische angle of repose bekomen uit de Granudrum weergegeven bij rotatiesnelheden van 2, 5, 10 en 40 toeren per minuut.



Figuur 33: cohesieve index voor de verschillende stalen bij een toerental van 2, 6, 10 en 40 toeren per minuut.

Uit figuur 33 kan geconcludeerd worden dat fracties met kleine deeltjes een hoge cohesieve index hebben, en andersom fracties met grote deeltjes een lage cohesieve index hebben. Dit kan verklaard worden door te kijken naar de drijvende en slepende krachten die op de poederdeeltjes werken en de poederstroom in de trommel bepalen. De drijvende kracht voor de vloeibaarheid is de zwaartekracht. De zwaartekracht is groter voor grotere deeltjes en voor deeltjes met een hogere dichtheid. Sleepkrachten daarentegen omvatten de cohesieve krachten die bestaan uit van der Waal krachten, vloeistofbruggen en elektrostatische krachten. De grootte van deze krachten hangt af van de aard van het materiaal en van het beschikbaar oppervlak. De cohesieve krachten zullen dus groter zijn voor kleinere deeltjes, aangezien het beschikbaar oppervlak ten opzichte van het volume voor deze deeltjes groter is. Janssen et al. bevestigt dit resultaat, vier dezelfde lactosepoeders met een gemiddelde deeltjesgrootte variërende van 20 μm tot 240 μm werden onderzocht en hierbij hadden de kleinste deeltjes ook de hoogste cohesieve index[27].

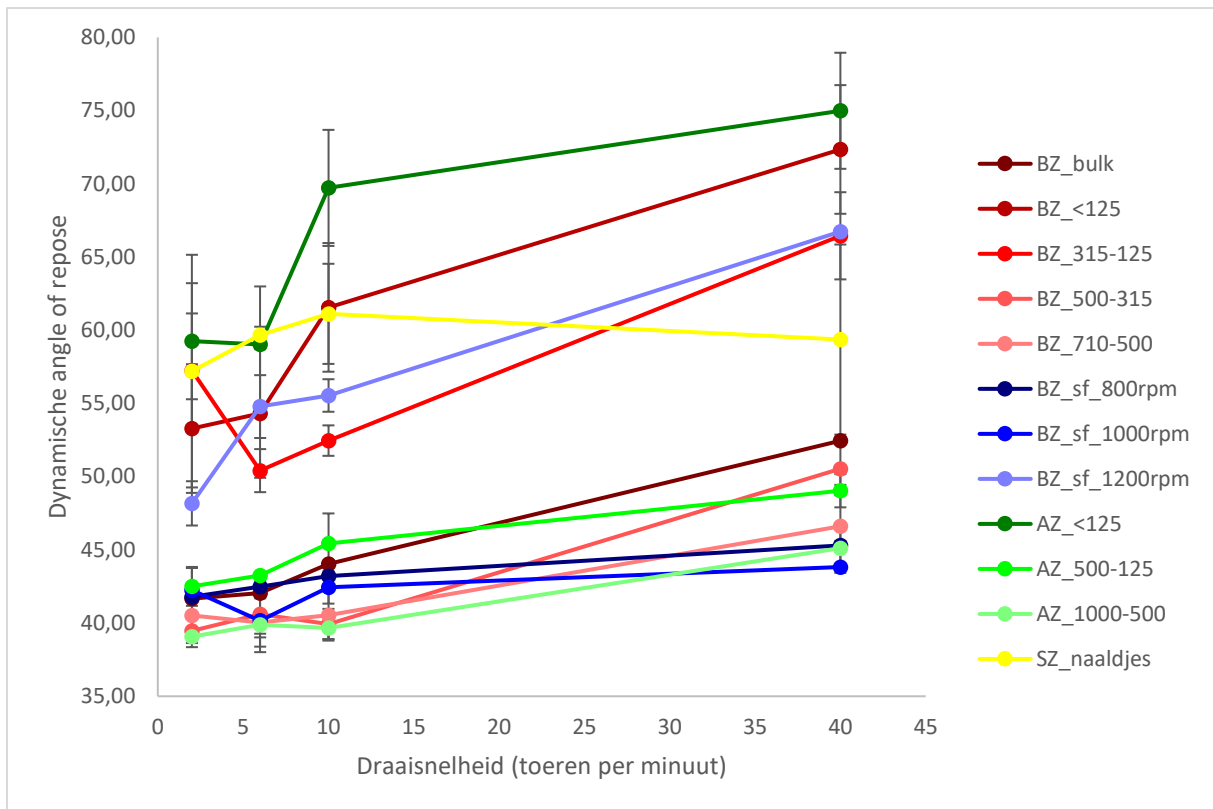
De deeltjes met een volume-gemiddelde diameter groter dan 295 μm hebben een gelijkaardige cohesieve index variërende tussen 3 en 5,5. Deeltjes met een kleinere diameter verschillen wel merkwaardig. BZ_<125 heeft de slechtste cohesieve index met een waarde van 29,7. AZ_<125 heeft een gelijkaardige grootte als BZ_<125, maar heeft een lagere cohesieve index met 19,7. Het is op dit moment onduidelijk of dit komt door de aard van de componenten of door de vorm of andere materiaaleigenschappen. Salicylzuur heeft cohesieve index van 25,8. Opvallend bij deze component is wel dat het agglomeraten vormt tijdens de meting (zie figuur 34). Het is de enigste component waarbij dit fenomeen voorkomt. De drijvende kracht voor het vormen van agglomeraten zijn opnieuw van der Waal en elektrostatische krachten. Doordat salicylzuur bestaat uit naaldvormige deeltjes, kunnen de deeltjes elkaar dichter naderen waardoor deze krachten groot zijn tussen de deeltjes. Deze agglomeraten zijn wel groter dan de originele naaldvormige deeltjes. Hierdoor is de cohesieve index lager dan initieel verwacht wordt [44].



Figuur 34: salicylzuur (links) die agglomeraten vormt in de Granudrum. Benzoëzuur (rechts) heeft een gelijkaardige deeltjesgrootte, maar vormt geen agglomeraten.

In sommige gevallen toont een poeder shear thickening gedrag en in andere gevallen shear thinning. Volgens Janssen et al. is dit gedrag component specifiek [27]. Echter toont AZ_ <125 duidelijk shear thickening gedrag, terwijl AZ_500-125 en AZ_1000-500 ligt shear thinning gedrag vertonen. Mogelijk speelt de opbouw van elektrostatische ladingen een rol, ook al is dit niet visueel te zien op de afbeeldingen van de meting. Anderzijds zouden andere factoren ook nog een rol kunnen spelen.

Als er gekeken wordt naar de variatie op de verschillende meetpunten, kan geconcludeerd worden dat deze het minst varieert bij een toerental van 10 toeren per minuut. Dit komt omdat bij een hoger toerental de afschuiving op deeltjes toeneemt, waardoor ze minder vrijheid hebben om op een andere manier te stromen. Daarom is deze waarde voor de cohesieve index verder gebruikt voor het bepalen van een eventuele correlatie. Bij een toerental van 40 toeren per minuut zou dit fenomeen nog groter moeten zijn, maar hier ondervond de meting soms interferentie van elektrostatische ladingen.

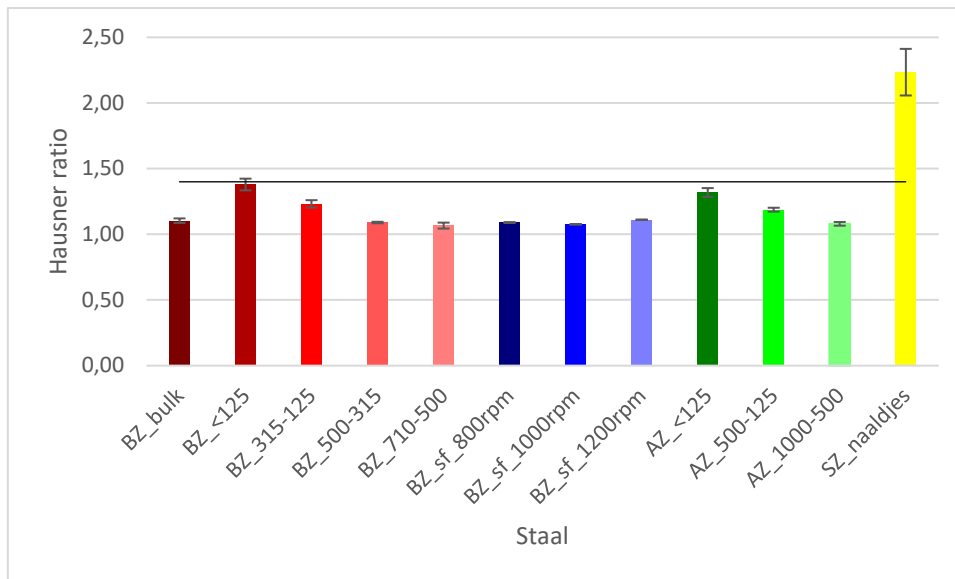


Figuur 35: dynamische angle of repose

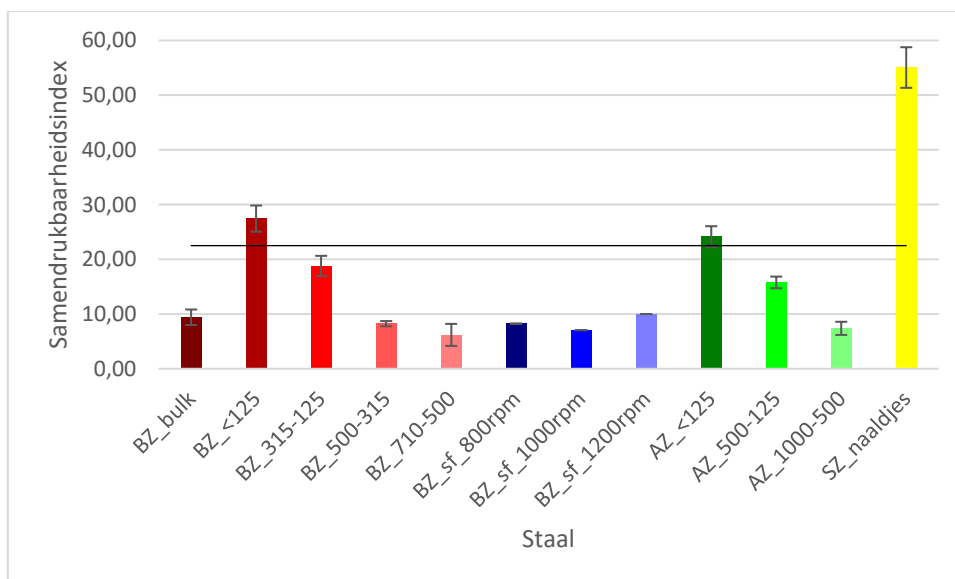
De dynamische angle of repose geeft redelijk gelijkaardige resultaten als de cohesieve index aangezien hier dezelfde drijvende en slepende krachten werken. Een opvallende verschil is dat adipinezuur nu de slechste stromingseigenschap vertoont. Dit komt omdat de cilinder van de Granudrum bij adipinezuur minder gevuld was dan bij benzoëzuur. Tijdens het uitvoeren van deze metingen is er geen rekening gehouden dat de cilinder elke keer exact even veel gevuld werd. De dynamische angle of repose is dus niet interessant om mee te nemen naar verdere correlatie.

4.2.2 Hausner ratio en samendrukbaarheidsindex

Figuur 36 en 37 tonen respectievelijk de Hausner ratio met als grenswaarde 1,4 voor cohesieve poeders en de samendrukbaarheidsindex met als grenswaarde 22,5% voor niet-vrijstromende poeders. Deze grenswaarde zijn overgenomen van Bodhmagie et al. [14].



Figuur 36: Hausner ratio van de verschillende poederstalen.



Figuur 37: samendrukbaarheidsindex van de verschillende poederstalen.

Uit de resultaten van de Hausner ratio blijkt dat salicylzuur een cohesief poeder is, want het komt als enige boven de grenswaarde van 1,4 uit. Dit was te verwachten aangezien salicylzuur al agglomeraten heeft gevormd wanneer de bulk dichtheid bepaald wordt, deze grotere agglomeraten nemen een groter volume in aangezien er meer ruimte is tussen de deeltjes. Door de tapfrequentie zullen deze agglomeraten bestaande uit zwakke verbindingen uiteenvallen en zal salicylzuur zich zeer compact gaan stapelen wat resulteert in een lage tap dichtheid. Opvallend is dat de benzoëzuur agglomeraten wel intact blijven tijdens de meting. Deze zijn dus veel stabiel. De kleinste fractie van benzoëzuur haalt net de grenswaarde niet met een ratio van 1,38. Toch kan ook dit poeder gezien worden als cohesief. Daarna volgen AZ_<125, BZ_315-125 en AZ_500-125 met respectievelijke een ratio van 1,32, 1,23 en 1,19. Voor de rest liggen de waarden weer zeer kort bij elkaar variërende tussen 1,11 en 1,07.

De samendrukbaarheidsindex geeft redelijk gelijkaardige resultaten als de Hausner ratio wat logisch is want ze baseren zich beide op de bulk en tap dichtheid. Zowel de kleinste fractie van benzoëzuur als adipinezuur en salicylzuur komen boven de grenswaarde van een niet vrij-

stromend poeder. Naar correlatie toe (in deel 4.4) wordt er enkel nog gekeken naar de Hausner ratio.

4.3 Overzicht van de materiaal- en stromingseigenschappen

Tabel 5 geeft een overzicht van de materiaal- en stromingseigenschappen voor de verschillende stalen.

Tabel 4: Samenvattende tabel van materiaal- en stromingseigenschappen.

Staal	Materiaaleigenschappen				Stromingseigenschappen		
	Gemiddelde D4,3 (µm)	Span	Circularity	AR	Solidity	Cohesieve index (bij 10 rpm)	Hausner ratio
BZ_bulk	572	3,71	0,73	1,84	0,97	3,85	1,10
BZ_125	156	1,51	0,46	3,79	0,88	29,71	1,38
BZ_315-125	260	0,59	0,57	3,06	0,95	20,73	1,23
BZ_500-315	436	2,60	0,65	2,33	0,94	3,00	1,09
BZ_710-500	604	2,78	0,75	1,52	0,97	3,14	1,07
BZ_sf_800rpm	688	5,71	0,59	1,79	0,88	5,51	1,09
BZ_sf_1000rpm	864	3,95	0,69	1,77	0,94	4,65	1,08
BZ_sf_1200rpm	636	7,20	0,71	1,68	0,93	9,48	1,11
AA_125	113	0,94	0,68	1,65	0,91	19,75	1,32
AA_500-125	295	3,66	0,73	1,64	0,94	4,70	1,19
AA_1000-500	867	3,21	0,66	1,57	0,96	3,19	1,08
SZ_naaldjes	97	1,24	0,45	5,29	0,82	25,78	2,23

Enkele opmerking bij bovenstaande tabel. Ten eerste, moet salicylzuur in deze dataset met voorzichtigheid bekeken worden aangezien de cohesieve index en de Hausner ratio van deze component beïnvloed zijn door het vormen van agglomeraten. Toch is dit een zeer interessant component om mee te nemen in de dataset omdat het als enige bestaat uit naaldvormige deeltjes. Ten tweede zijn de deeltjes die een niet-sferische vorm bevatten, voornamelijk kleine deeltjes ten opzicht van de sferische agglomeraten. Zo kan mogelijk niet goed onderzocht worden welke eigenschap nu het zwaarst doorweegt. Tot slot, zijn er maar 12 stalen getest in dit onderzoek waardoor de dataset zeer beperkt is en het moeilijk wordt om een betrouwbaar statistisch model of correlatie te leggen.

4.4 Correlatie

In dit deel wordt een correlatie gelegd tussen de materiaaleigenschappen en de stromingseigenschappen. In het eerste deel wordt de sterkte en richting van het verband tussen één materiaaleigenschap en één stromingseigenschap gemeten aan de hand van een Pearson correlatie die de mate van een lineair verband tussen twee variabelen meet en een Kendall rang correlatie die de mate van een monotoon verband tussen twee variabelen meet. Beide correlaties worden uitgevoerd op de volledige dataset en op een ingekorte dataset van enkel benzoëzuur zodat intermoleculaire krachten geen rol spelen. Uit deze correlaties kan bepaald worden welke materiaaleigenschappen een significante invloed hebben op de stromingseigenschappen. In het tweede deel wordt een model opgesteld waarbij enkel de materiaaleigenschappen, die in het eerste deel een significante invloed toonden op de stromingseigenschappen, gebruikt worden.

4.4.1 Pearson correlatie

De resultaten voor de Pearson r correlatie op de volledige dataset en op de dataset waarbij enkel benzoëzuur is opgenomen zijn terug te vinden in tabel 5. De p-waardes zijn ook berekend en de significante waarden staan in het vet gedrukt.

Tabel 5: resultaten voor de Pearson r correlatie voor de volledige dataset (boven) en de ingekorte dataset met enkel benzoëzuur (onder).

		D4,3 (µm)	Breedte spreiding	Span	Circulariteit	Aspect ratio	Robuustheid
Correlatie	Cohesieve index	-0,79	-0,60	0,32	-0,81	0,78	-0,68
	Hausner ratio	-0,64	-0,46	0,58	-0,72	0,89	-0,81
P-waarde	Cohesieve index	0,002	0,039	0,314	0,002	0,003	0,014
	Hausner ratio	0,024	0,129	0,050	0,008	0,000	0,001
Correlatie	Cohesieve index	-0,80	-0,50	0,11	-0,84	0,92	-0,49
	Hausner ratio	-0,85	-0,55	0,12	-0,85	0,95	-0,50
P-waarde	Cohesieve index	0,016	0,207	0,791	0,010	0,001	0,213
	Hausner ratio	0,008	0,158	0,773	0,007	0,000	0,209

Volgens de correlatie op zowel de volledige dataset als de ingekorte dataset met enkel benzoëzuur zou een nauwere span, een negatieve invloed hebben op de stromingseigenschappen. In de literatuur toonden Liu et al. en Bodhmag A et al. aan dat een nauwere deeltjesgrootteverdeling juist een positief effect zou moeten hebben op de stromingseigenschappen [2], [14]. Er zijn twee mogelijkheden om dit resultaat te verklaren. Een eerste mogelijkheid is dat de breedte spreiding (d90 - d10) geen correcte weergave geeft over de spreiding. De span ((d90 - d10) / d50) daarentegen geeft wel een positief verband. Met deze definitie wordt dan ook verder gewerkt. Een tweede mogelijkheid is dat de deeltjesgrootte en vorm zo een grote invloed hebben, dat deze parameters de invloed van de span manipuleren. Dit wordt ook bevestigd door de p-waarde die zegt dat breedte spreiding geen significant verband heeft met de stromingseigenschappen. De deeltjesgrootte, circulariteit en aspect ratio zijn voor beide dataset significante parameters. Hieruit kan geconcludeerd worden dat kleine, naaldvormige deeltjes een negatieve effect hebben op de stromingseigenschappen. Dit is al meerdere malen ondervonden door verschillende onderzoeken [30], [35], [45]-[47].

Doordat voor alle parameters (buiten de span) een significant lineair verband aanwezig is, zal verderop het model opgesteld worden op basis van meervoudige lineair regressie. Dit is een uitbreiding van de enkelvoudige regressie waarbij twee of meer verklarende variabelen worden gebruikt om de afhankelijke variabele te voorspellen of verklaren. Kendall's correlatie zou normaal gezien dezelfde parameters moeten aanduiden als significant. Maar doordat sommige waarden zo kort op elkaar liggen en deze correlatie gebaseerd is op rangorde, kunnen sommige parameters toch nog afvallen voor het uiteindelijke model.

4.4.2 Kendall rang correlatie

De resultaten voor de Kendall rang correlatie op de volledige dataset en op de ingekorte dataset zijn terug te vinden in tabel 6. Wederom zijn de p-waardes berekend en staan de significante waarden in het vet gedrukt.

Tabel 6: resultaten voor de Kendall Rang correlatie voor de volledige dataset (boven) en de ingekorte dataset met enkel benzoëzuur (onder).

		D4,3 (µm)	Span	Circulariteit	Aspect ratio	Robuustheid
Correlatie	Cohesieve index	-0,45	0,36	-0,31	0,39	-0,52
	Hausner ratio	-0,45	0,36	-0,45	0,39	-0,52
P-waarde	Cohesieve index	0,040	0,100	0,161	0,075	0,020
	Hausner ratio	0,040	0,100	0,040	0,075	0,020
Correlatie	Cohesieve index	-0,21	0,36	-0,57	0,29	-0,43
	Hausner ratio	-0,57	0,29	-0,50	0,64	-0,21
P-waarde	Cohesieve index	0,458	0,216	0,048	0,322	0,138
	Hausner ratio	0,048	0,322	0,083	0,026	0,458

Voor beide datasets komt de deeltjesgrootte terug als een significante parameter. Dit lijkt dan ook de belangrijkste materiaaleigenschap voor de vloeibaarheid van een poeder. De significantie van de vorm-parameters verschilt voor de volledige dataset en de ingekorte dataset. De vorm heeft zeker een invloed op de stromingseigenschappen, maar welk vormkenmerk het meest doorweegt, is moeilijk te zeggen. Het doel van dit onderzoek is een algemeen verband te zoeken tussen de materiaaleigenschappen en stromingseigenschappen. Daarom zal voor het modelleren van de data de significante parameters van de gehele dataset genomen worden. Dit zijn dus de volume-gemiddelde diameter D[4,3], de circulariteit en de robuustheid.

4.4.3 Modelleren: meervoudige lineaire regressie

Voordat er gemodelleerd kan worden, dient eerst de data genormaliseerd te worden. Dit is nodig zodat elk parameter een evenredige bijdrage heeft op de afhankelijke variabele. Het is eveneens belangrijk voor het opstellen van de verliesfunctie bij *machine learning*. De herschaling van de data gebeurt zo dat de genormaliseerde waarde tussen 0 en 1 ligt. De gebruikte formule is gegeven als:

$$x' = \frac{x - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

Waarbij x de oorspronkelijke waarde is en x' de genormaliseerde waarde. De dataset voor het modelleren is gegeven door tabel 7 waarbij de volume-gemiddelde diameter D[4,3], de circulariteit en de robuustheid de inputparameters zijn en de cohesieve index de output parameter is.

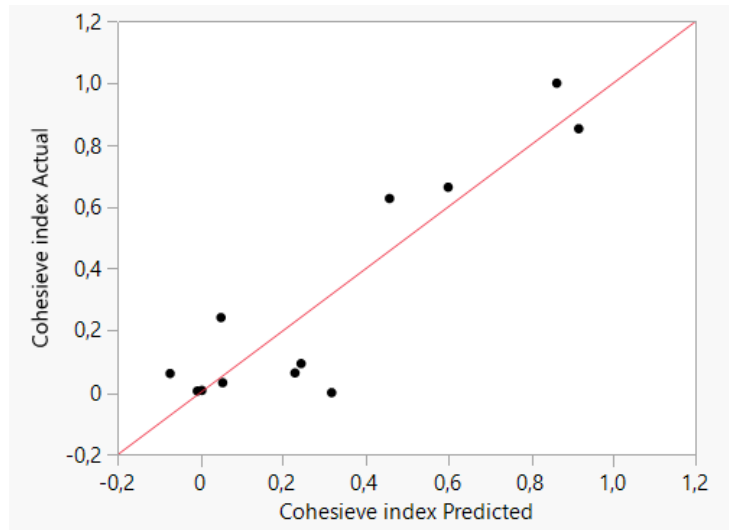
Tabel 7: data voor het modelleren

D4,3 (µm)	Circularity	Robuustheid	Cohesieve index
0,62	0,94	0,96	0,03
0,08	0,06	0,39	1,00
0,21	0,40	0,82	0,66
0,44	0,65	0,78	0,00
0,66	1,00	1,00	0,01
0,77	0,46	0,38	0,09
1,00	0,81	0,75	0,06
0,70	0,85	0,72	0,24
0,02	0,75	0,56	0,63
0,26	0,94	0,80	0,06
1,00	0,70	0,87	0,01
0,00	0,00	0,00	0,85

Door meervoudige lineaire regressie toe te passen op deze data, is volgende vergelijking opgesteld voor het voorspellen van de cohesieve index:

$$\text{cohesieve index} = -0,52 * D[4,3] - 0,65 * \text{circulariteit} + 0,07 * \text{robuustheid} + 0,92$$

Als de voorspelde waarde vergeleken wordt met de eigenlijke waarde zoals weergegeven in figuur 38, dan blijkt dat het model een R^2 -score haalt van 0,83.



Figuur 38: voorspelde waarde cohesieve index VS eigenlijke waarde cohesieve index

Het is logisch dat het model een goede R^2 -score haalt aangezien duidelijk op de figuur is weergegeven dat er twee clusters van datapunten zijn. Twee clusters van datapunten zullen altijd een lineair verband teruggeven. De dataset voor het opstellen van een model dient dus uitgebreid te worden met data die een cohesieve index hebben tussen deze twee clusters. De p-waarde van volume-gemiddelde diameter $D[4,3]$, de circulariteit en de robuustheid voor dit model zijn respectievelijk 0,02, 0,06 en 0,84. Ook hieruit blijkt de grootte van de deeltjes een significante invloed heeft op de stromingseigenschappen. Er kan dus geconcludeerd worden dat de deeltjesgrootte de belangrijkste parameter is voor de vloeibaarheid van een poeder.

5 Besluit

Het doel van dit onderzoek was de relatie tussen de stromingseigenschappen en de materiaaleigenschappen van een poeder te achterhalen. De stromingseigenschappen werden gekwantificeerd met behulp van twee technieken: de Granudrum waarmee de cohesieve index werd bepaald en de tap dichtheid tester waaruit de Hausner ratio berekend kon worden. Bij beide technieken speelden elektrostatische ladingen een grote rol. Om de invloed van elektrostatisch lading te beperken, werden eerst een reproduceerbare meetmethode opgesteld. Deze omvat dat

- De poeders minstens 24 uur moeten ontladen worden voor een meting door blootstelling aan een relatieve luchtvochtigheid van 40%.
- Na elke meting het meettoestel spoelen met water.
- Lichtinstellingen van de Granudrum zo instellen dat de deeltjes die blijven plakken aan de glazen wand een onvoldoende contrast hebben waardoor het algoritme voor het bepalen van de interface deze deeltjes niet waarneemt
- Het aantal meetpunten en de tijd van één meetpunt beperkt worden zodat er minder tijd is voor het opwekken van elektrostatische ladingen

De dynamische angle of repose is ook een interessante stromingseigenschap. Deze kon in dit onderzoek niet gebruikt worden omdat de cilinder van de Granudrum niet uniform gevuld werd waardoor de angle of repose sterk varieerde. Naar volgende metingen toe dient altijd exact 10 ml poeder afgemeten te worden. Voor niet-cohesieve poeders kan dit gemakkelijk met een maatcilinder. Voor cohesieve poeders kan best gewerkt worden met de bulkdichtheid om zo de nodige massa (rechtstreeks in de cilinder van de Granudrum) af te wegen.

De materiaaleigenschappen werden gekwantificeerd door middel van een beeldanalyse. Dit is een gemakkelijke en nauwkeurige methode om verschillende deeltjeskenmerken te definiëren. Belangrijk voor het opnemen van een video voor een beeldanalyse, is de keuze van het solvent waar de deeltjes niet mogen in oplossen. Een lage oplosbaarheid is noodzakelijk, alsook mag het solvent agglomeratie van de deeltjes niet bevorderen. De waardes die ImageJ teruggeeft voor vorm en grootte komen overeen met de beelden. Enkel de rondheid geeft twijfelende waardes terug. Deze parameter moet naar verdere onderzoeken opnieuw worden bekeken of een andere parameter moet opgesteld worden voor het bepalen van onregelmatigheden in de rand van een deeltje.

De bekomen correlaties moeten met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. De gebruikte dataset is namelijk te klein en te onvolledig om statistisch correcte conclusies uit te trekken. In deze dataset zijn de kleinste deeltjes ook de deeltjes met de meest onregelmatige vorm. De dataset moet dus aangevuld worden met kleine deeltjes met een regelmatige vorm en met grote deeltjes met een onregelmatige vorm. Verder zijn er momenteel twee clusters van datapunten rond een cohesieve waarde van 5 en 25. Er dienen dus ook extra datapunten toegevoegd te worden tussen deze waardes. Toch kan gesteld worden dat de deeltjesgrootte de voornaamste invloed heeft op de vloeibaarheid van een poeder. De volume-gemiddelde diameter kwam bij elke correlatie terug als een significante parameter. Ook de vorm heeft duidelijk een invloed, maar welk vormkenmerk het meest doorweegt, kan niet gezegd worden. Daarbij blijkt dat salicylzuur, gekenmerkt door zeer naaldevormige deeltjes, agglomeraten gaat vormen die de stroming gaan verbeteren, maar zeer ongewenst zijn voor downstreamstrappen als filtratie en finale API dosering omdat ze de uniformiteit sterk negatief beïnvloeden.

Referentielijst

- [1] M. J. Nachajski, A. Bazela, M. Zarzycka, A. Broszczyk, A. Kołba, and M. K. Kołodziejczyk, "Effect of API on Powder Flowability, Direct Compression and Properties of Orally Disintegrating Tablets: A Preformulation Study," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, no. 3, pp. 489–495, May 2019, doi: 10.36468/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.534.
- [2] L. X. Liu, I. Marziano, A. C. Bentham, J. D. Litster, E.T.White, and T. Howes, "Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 362, no. 1–2, pp. 109–117, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.06.023.
- [3] P. M. Orlewski, B. Ahn, and M. Mazzotti, "Tuning the particle sizes in spherical agglomeration," *Crystal Growth and Design*, vol. 18, no. 10, pp. 6257–6265, Oct. 2018, doi: 10.1021/acs.cgd.8b01134.
- [4] D. Amaro-González and B. Biscans, "Spherical agglomeration during crystallization of an active pharmaceutical ingredient," *Powder Technology*, vol. 128, no. 2–3, pp. 188–194, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0032-5910(02)00196-1.
- [5] J. Katta and Å. C. Rasmuson, "Spherical crystallization of benzoic acid," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 348, no. 1–2, pp. 61–69, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.07.006.
- [6] N. O. Lindberg *et al.*, "Flowability measurements of pharmaceutical powder mixtures with poor flow using five different techniques," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 30, no. 7, pp. 785–791, 2004, doi: 10.1081/DDC-120040343.
- [7] "Manufacture of Pharmaceutical Tablets - Pharmapproach.com." <https://www.pharmapproach.com/manufacture-of-pharmaceutical-tablets/> (accessed Apr. 18, 2022).
- [8] "API Synthesis - Solutions / BOC Sciences." <https://www.solutions.bocsci.com/api-synthesis.htm> (accessed Apr. 02, 2022).
- [9] A. Vancleef, S. Seurs, J. Jordens, T. van Gerven, L. C. J Thomassen, and L. Braeken, "Reducing the Induction Time Using Ultrasound and High-Shear Mixing in a Continuous Crystallization Process", doi: 10.3390/cryst8080326.
- [10] "THEORIE2021_ACOUSTICPROCESSING".
- [11] "Kristallisatie - Een belangrijke processtap in de productie van een vaste-stof damp reactor".
- [12] G. Perini, F. Salvatori, D. R. Ochsenbein, M. Mazzotti, and T. Vetter, "Filterability prediction of needle-like crystals based on particle size and shape distribution data," *Separation and Purification Technology*, vol. 211, pp. 768–781, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.SEPPUR.2018.10.042.
- [13] "Drying | Basicmedical Key." <https://basicmedicalkey.com/drying/> (accessed Apr. 18, 2022).
- [14] A. Bodhmagé, "Correlation between physical properties and flowability indicators for fine powders," 2006.

- [15] A. Nitsure, D. Patel, and S. Wairkar, "Improved processability of ethambutol hydrochloride by spherical agglomeration," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 25, no. 3, pp. 376–384, Mar. 2020, doi: 10.1080/10837450.2019.1705487.
- [16] "Size and Properties of Particles".
- [17] M. A. Wirth, "Shape Analysis & Measurement," 2004.
- [18] M. J. Zdilla, S. A. Hatfield, K. A. McLean, L. M. Cyrus, J. M. Laslo, and H. W. Lambert, "Circularity, solidity, axes of a best fit ellipse, aspect ratio, and roundness of the foramen ovale: a morphometric analysis with neurosurgical considerations," *J Craniofac Surg*, vol. 27, no. 1, p. 222, Jan. 2016, doi: 10.1097/SCS.0000000000002285.
- [19] H. Barjat *et al.*, "Demonstration of the Feasibility of Predicting the Flow of Pharmaceutically Relevant Powders from Particle and Bulk Physical Properties," *Journal of Pharmaceutical Innovation*, vol. 16, no. 1, pp. 181–196, Mar. 2021, doi: 10.1007/s12247-020-09433-5.
- [20] "Horsey, Problems of Powder Flow in Tabletting Processes."
- [21] R. Holdich, "Continuous functional particle production by membrane emulsification View project Settling of particles: hindered; flocculent and free View project." [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/26099029814Powderflowstoragechapter10>
- [22] "Heat Trace and Hoppers | ETI | Network ETI." <https://www.networketi.com/heat-trace-hoppers/> (accessed Apr. 04, 2022).
- [23] H. M. Beakawi Al-Hashemi and O. S. Baghabra Al-Amoudi, "A review on the angle of repose of granular materials," *Powder Technology*, vol. 330, pp. 397–417, May 2018, doi: 10.1016/J.POWTEC.2018.02.003.
- [24] "Bulk Solids Handling: An Introduction to the Practice and Technology - C.R. Woodcock, J.S. Mason - Google Boeken." <https://books.google.be/books?hl=nl&lr=&id=WM0h8TeOwWIC&oi=fnd&pg=PA4&dq=Bulk+Solids+Handling:+An+Introduction+to+the+Practice+and+Technology&ots=i6raTSysix&sig=J0KWaf5B8BjJNGPMXnQ1E9Tflt4#v=onepage&q=Bulk%20Solids%20Handling%3A%20An%20Introduction%20to%20the%20Practice%20and%20Technology&f=false> (accessed Apr. 04, 2022).
- [25] F. Boschini, V. Delaval, K. Traina, N. Vandewalle, and G. Lumay, "Linking flowability and granulometry of lactose powders," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 494, no. 1, pp. 312–320, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.030.
- [26] H. Shi, G. Lumay, and S. Luding, "Stretching the limits of dynamic and quasi-static flow testing on cohesive limestone powders," *Powder Technology*, vol. 367, pp. 183–191, May 2020, doi: 10.1016/j.powtec.2020.03.036.
- [27] P. H. M. Janssen, S. Depaifve, A. Neveu, F. Francqui, and B. H. J. Dickhoff, "Impact of powder properties on the rheological behavior of excipients," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13081198.
- [28] "How to run measurements and make data interpretation with Fast guide." [Online]. Available: www.GranuTools.com
- [29] "Perfecting Food Packaging Through Measurement of Tapped Density." <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=21057> (accessed Apr. 25, 2022).

- [30] H. Hou and C. C. Sun, "Quantifying effects of particulate properties on powder flow properties using a ring shear tester," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 9, pp. 4030–4039, 2008, doi: 10.1002/jps.21288.
- [31] T. Freeman, K. Brockbank, and B. Armstrong, "Measurement and quantification of caking in powders," in *Procedia Engineering*, 2015, vol. 102, pp. 35–44. doi: 10.1016/j.proeng.2015.01.104.
- [32] H. Shi *et al.*, "Effect of particle size and cohesion on powder yielding and flow," *KONA Powder and Particle Journal*, vol. 2018, no. 35, pp. 226–250, 2018, doi: 10.14356/kona.2018014.
- [33] H. P. Goh, P. W. S. Heng, and C. V. Liew, "Comparative evaluation of powder flow parameters with reference to particle size and shape," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 547, no. 1–2, pp. 133–141, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2018.05.059.
- [34] Y. Kudo, M. Yasuda, and S. Matsusaka, "Effect of particle size distribution on flowability of granulated lactose," *Advanced Powder Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 121–127, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.appt.2019.10.004.
- [35] X. Fu, D. Huck, L. Makein, B. Armstrong, U. Willen, and T. Freeman, "Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders," *Particuology*, vol. 10, no. 2, pp. 203–208, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.PARTIC.2011.11.003.
- [36] T. Horio, M. Yasuda, and S. Matsusaka, "Effect of particle shape on powder flowability of microcrystalline cellulose as determined using the vibration shear tube method," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 473, no. 1–2, pp. 572–578, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2014.07.040.
- [37] H. Lu, X. Guo, Y. Jin, and X. Gong, "Effect of moisture on flowability of pulverized coal," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 133, pp. 326–334, May 2018, doi: 10.1016/J.CHERD.2018.03.023.
- [38] G. Lumay *et al.*, "Effect of relative air humidity on the flowability of lactose powders," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 35, pp. 207–212, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.JDDST.2016.04.007.
- [39] L. Samiei, K. Kelly, L. Taylor, B. Forbes, E. Collins, and M. Rowland, "The influence of electrostatic properties on the punch sticking propensity of pharmaceutical blends," *Powder Technology*, vol. 305, pp. 509–517, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.POWTEC.2016.10.018.
- [40] Y. Takashimizu and M. Iiyoshi, "New parameter of roundness R: circularity corrected by aspect ratio," *Progress in Earth and Planetary Science*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2016, doi: 10.1186/S40645-015-0078-X/TABLES/3.
- [41] L. Greenspan, "Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions."
- [42] "Data Science Stats Review: Pearson's, Kendall's, and Spearman's Correlation for Feature Selection | Tessellation." <https://www.tessellationtech.io/data-science-stats-review/> (accessed Jun. 07, 2022).
- [43] "Correlation (Pearson, Kendall, Spearman) - Statistics Solutions." <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/correlation-pearson-kendall-spearman/> (accessed May 28, 2022).

- [44] A. A. Fytopoulos, M. E. Kavousanakis, T. van Gerven, A. G. Boudouvis, G. D. Stefanidis, and C. Xiouras, "Crystal Growth, Dissolution, and Agglomeration Kinetics of Sodium Chlorate," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 60, no. 19, pp. 7367–7384, May 2021, doi: 10.1021/acs.iecr.1c00595.
- [45] N. Sandler and D. Wilson, "Prediction of granule packing and flow behavior based on particle size and shape analysis," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 2, pp. 958–968, 2010, doi: 10.1002/jps.21884.
- [46] D. Sunkara and M. Capece, "Influence of Material Properties on the Effectiveness of Glidants Used to Improve the Flowability of Cohesive Pharmaceutical Powders," *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 4, pp. 1920–1930, May 2018, doi: 10.1208/S12249-018-1006-3/FIGURES/8.
- [47] M. Capece, R. Ho, J. Strong, and P. Gao, "Prediction of powder flow performance using a multi-component granular Bond number," *Powder Technology*, vol. 286, pp. 561–571, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.powtec.2015.08.031.

Appendix A

```
macro "Particle detection and analysis" {

setBatchMode(true);

var inNumberScale = 0.650; //scale in pixel/μm:
must be calculated from calibration image then go to ImageJ toolbar → Analyze → Set scale...
var ChoiceType = "Preview (press ok for preview)"; //This is the type of analysis that has to be done, either a preview of
the analysis, a single image, a map with maps of images or a map with videos (avi).
var ChoiceBackground = "Rolling ball from single image"; //Which method for background subtraction, the rolling ball method generates a
background image, background image can also be opened and called "background.tif" or can be generated from the median of pixel values if map of videos
or map of map of images is selected.
var inNumberEdgeHighThreshold = 3; //High threshold value for the
edge detection, typically between 2 or 15, depends on image/compute smoothing and unsharp mask, higher thresholds mean lower sensitivity
var inNumberEdgeLowThreshold = 1; //Low threshold value for the
edge detection, typically around 1, depends on image/compute smoothing and unsharp mask: high mean, higher thresholds mean lower sensitivity
var inNumberEdgeComputeSmoothing = 2; //Smoothing before finding edge detection,
typically 1, 2 or 3. Higher values mean lower sensitivity
var inNumberEdgeUnsharpMask = 0.40; //Extra sharpening that can be
done before edge detection, high: higher sensitivity, low: lower sensitivity
var FramesForBackground = 30; //Amount of images used for
calculating the background if median method is selected
var HistogramBinerization = true; //Adds a second method for finding particles:
intensity thresholding, if particles are dark enough they will be detected
var OnlyHistogramBinerization = false; //Discards edge detection
var GaussianBlurBeforeIntensityThresholding = 0; //GaussianBlur.
var ClosingCycles = 2;
var inNumberClosingCycles = 0; //Closing cycles (dilation +
erosion) after putting together the intensity thresholding
var FOVcfYesOrNo = true; //Boolean: use a field
of view correction factor in the analysis
var AddScaleBar = false;
//Boolean: add scale bars to the original images after analysis
var ShowProcessingStepsBoolean = false; //Boolean: Can be used to see all substeps in
the image analysis when only analyzing a single image
var WatershedBoolean = false; //Boolean: Use a standard
watershed: only recommended for circular particles
var WatershedIrregularFeaturesBoolean = true; //Boolean: use a watershed for irregular features,
recommended for irregular particles
var ErosionCycles = 3; //Erosion cycles for
watershed irregular features: see biovoxxel toolbox wiki
var WatershedConvexity = 0.9800; //Convexity
threshold for watershed irregular features: see biovoxxel toolbox wiki
var minCircularity = 0.00; //Minimum
circularity of a particle to be analyzed
var maxCircularity = 1.00; //Maximum
circularity of a particle to be analyzed
var minSize = 1;
//Minimum Size of a particle to be analyzed
var maxSize = 400;
var RowsRemovedFromEdges = 3;
var ExtendedResults = true;
run("Set Measurements...", "area perimeter bounding shape feret's stack display redirect=None decimal=8");

while (ChoiceType == "Preview (press ok for preview)")
{
setBatchMode(true);
Dialog.create("Analysis settings");
Dialog.addMessage("");
Dialog.addNumber("scale in pixels/μm", inNumberScale);
Dialog.addChoice("file type:", newArray("Preview (press ok for preview)", "Map of videos (avi)", "Single image", "Map with maps of images"));
Dialog.addChoice("Background image method:", newArray("Rolling ball from single image", "Median of multiple frames (videos/maps)", "Background is
open and named background.tif"));
Dialog.addNumber("Edge detection High Threshold", inNumberEdgeHighThreshold);
Dialog.addNumber("Edge detection Low Threshold", inNumberEdgeLowThreshold);
Dialog.addNumber("Edge detection Smoothing", inNumberEdgeComputeSmoothing);
Dialog.addSlider("Edge detection Sharpening", 0, 0.9, inNumberEdgeUnsharpMask);
Dialog.addNumber("Frames for background (videos/maps)", FramesForBackground);
Dialog.addCheckbox("Use additional intensity thresholding", HistogramBinerization);
Dialog.addCheckbox("Use only intensity thresholding", OnlyHistogramBinerization);
Dialog.addSlider("Gaussian Blur radius (intensity threshold)", 0, 10, GaussianBlurBeforeIntensityThresholding);
Dialog.addSlider("Closing cycles after edge detection", 0, 10, ClosingCycles);
Dialog.addSlider("Closing cycles after intensity thresholding", 0, 10, inNumberClosingCycles);
Dialog.addCheckbox("Field of View correction factor", FOVcfYesOrNo);
Dialog.addCheckbox("Add scalebar to input", AddScaleBar); //adds scalebar to input images after analysis
Dialog.addCheckbox("Show processing steps (single image)", ShowProcessingStepsBoolean);
Dialog.addSlider("minimum particle size in pixels", 1, 1000, minSize);
}
```



```

Dialog.addSlider("maximum particle size in pixels", 1, 10000, maxSize);
Dialog.addNumber("minimum particle circularity (0-1)", minCircularity);
Dialog.addNumber("maximum particle circularity (0-1)", maxCircularity);
Dialog.addCheckbox("watershed", WatershedBoolean);
Dialog.addCheckbox("watershed irregular features (IF)", WatershedIrregularFeaturesBoolean);
Dialog.addNumber("watershed IF erosion cycles", ErosionCycles);
Dialog.addNumber("watershed IF convexity threshold", WatershedConvexity);
Dialog.addCheckbox("Extended results", ExtendedResults);
Dialog.show();

// Once the Dialog is OKed the rest of the code is executed
// values are recovered in order of appearance
inNumberScale = Dialog.getNumber(); //Check
ChoiceType = Dialog.getChoice(); //Check
ChoiceBackground = Dialog.getChoice(); //Check
inNumberEdgeHighThreshold = Dialog.getNumber(); //Check
inNumberEdgeLowThreshold = Dialog.getNumber(); //Check
inNumberEdgeComputeSmoothing = Dialog.getNumber(); //Check
inNumberEdgeUnsharpMask = Dialog.getNumber(); //Check
FramesForBackground = Dialog.getNumber(); //check
HistogramBinerization = Dialog.getCheckbox(); //Check
OnlyHistogramBinerization = Dialog.getCheckbox();
if(OnlyHistogramBinerization == true) {
    HistogramBinerization == true;
}
GaussianBlurBeforeIntensityThresholding = Dialog.getNumber();
ClosingCycles = Dialog.getNumber();
inNumberClosingCycles = Dialog.getNumber(); //Check
FOVcfYesOrNo = Dialog.getCheckbox(); // Check
AddScaleBar = Dialog.getCheckbox();
ShowProcessingStepsBoolean = Dialog.getCheckbox();
minSize = 2*3.141*Math.sqrt(Dialog.getNumber())/4;
maxSize = 2*3.141*Math.sqrt(Dialog.getNumber())/4;
minCircularity = Dialog.getNumber();
maxCircularity = Dialog.getNumber();
WatershedBoolean = Dialog.getCheckbox();
WatershedIrregularFeaturesBoolean = Dialog.getCheckbox();
if(WatershedIrregularFeaturesBoolean == true)
{
    ErosionCycles = Dialog.getNumber();
    WatershedConvexity = Dialog.getNumber();
}
ExtendedResults = Dialog.getCheckbox();

//-----
// Analysis of a single image
//-----

if (ChoiceType == "Single image")
{
    if(ShowProcessingStepsBoolean == false){
        setBatchMode(true);
    } else {
        setBatchMode(false);
    }
}
roiManager("Reset");
OrigineleAfbeelding = getTitle();
run("8-bit");

//background subtraction: Voor deze stap is het noodzakelijk dat een achtergrondafbeelding met de naam
"background.tif" openstaat
if(ChoiceBackground == "Rolling ball from single image")
{
    makeRectangle(0, 0, getWidth(), getHeight());
    run("Duplicate...", "title=background.tif"); //Only used when also using histogram thresholding in
combination with canny edge detection
    run("Subtract Background...", "rolling=500 light create sliding");
    rename("background.tif");
} else {
    makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
    run("Add...", "value=255 slice");
    makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
    run("Subtract...", "value=255 slice");
}
imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", OrigineleAfbeelding, "background.tif");
run("8-bit");
rename("AfterBackgroundSubstraction");
run("Duplicate...", "title=AfterHistogramBinerization");

```

```

run("Duplicate...", "title=BeforeCannyEdgeDetection");
run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=inNumberEdgeUnsharpMask");

run("Feature| Edges", "compute smoothing="+inNumberEdgeComputeSmoothing+" suppress lower="+inNumberEdgeLowThreshold+"
higher="+inNumberEdgeHighThreshold);
rename("AfterCannyEdgeDetection");
selectImage("BeforeCannyEdgeDetection");
run("Close");
selectImage("AfterCannyEdgeDetection");
run("Duplicate...", "title=AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators");
run("8-bit");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=dilate");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, 0, getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0, getHeight-RowsRemovedFromEdges, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0, RowsRemovedFromEdges, getWidth, getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
run("Crop");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=dilate");
//run("Watershed Irregular Features", "erosion=3 convexity_threshold=0 separator_size=0-8");

//Steps for also doing a histogram based binerization
if(HistogramBinerization == true)
{
selectWindow("AfterHistogramBinerization");
if(GaussianBlurBeforeIntensityThresholding>0){
run("Gaussian Blur...", "sigma="+GaussianBlurBeforeIntensityThresholding);
}
setAutoThreshold("Default");
run("Convert to Mask");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, 0, getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0, getHeight-RowsRemovedFromEdges, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0, RowsRemovedFromEdges, getWidth, getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
run("Crop");
run("Duplicate...", "title=AfterHistogramBinerization2");
if(OnlyHistogramBinerization == false){
run("BinaryReconstruct", "mask=AfterHistogramBinerization2
seed=AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators create white");
rename("toClose");
run("Duplicate...", "title=AfterMerging");
selectImage("toClose");
run("Close");
selectImage("AfterMerging");
imageCalculator("OR", "AfterMerging", "AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators");
}
run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=dilate");

```

```

run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=erode");
run("Fill Holes");
run("Duplicate...", "title=AfterWatershed");

} else {
    selectImage("AfterHistogramBinerization");
    run("Close");
}
if(WatershedIrregularFeaturesBoolean == true){
convexity_threshold="+WatershedConvexity+" separator_size=0-Infinity");
run("Watershed Irregular Features", "erosion="+ErosionCycles+"
} else if (WatershedBoolean == true){
run("Watershed");
}
run("Duplicate...", "title=BeforeAnalysis");
rename(OrigineleAfbeelding); //regel!!
FinalHeightImage = getHeight(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
FinalWidthImage = getWidth(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
//Volgende stap bepaalt de schaal van de afbeelding, voeg hier de waarde in die opgegeven stonden bij de
kalibratieafbeelding (Distance in pixel = distance; known distance = known)
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
FinalHeightImage = getHeight(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
FinalWidthImage = getWidth(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
run("Analyze Particles...", "size="+minSize+"-"+maxSize+" pixel circularity="+minCircularity+"-"+maxCircularity+"
show=Nothing display include exclude summarize add");
close();
selectWindow(OrigineleAfbeelding);
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges, (getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges), (getHeight-RowsRemovedFromEdges-RowsRemovedFromEdges));
run("Crop");
run("ROI Manager...");
roiManager("Show All without labels");
//run("Flatten");
//roiManager("Reset");

selectWindow("Results");
Table.applyMacro("Diameter=sqrt(Area/3.14*4); Diameter3=Diameter*Diameter*Diameter; Diameter4=Diameter3*Diameter;
FOVcf=("+FinalWidthImage+"*"+FinalHeightImage+)/(("+FinalHeightImage+"-Height)*("+FinalWidthImage+"-Width))");

if(AddScaleBar==true){
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
run("Scale Bar...", "width=100 height=12 font=42 color=White background=Black location=[Lower Right]
bold overlay label");
}
if(ShowProcessingStepsBoolean == false){
close("AfterWatershed");
close("AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators");
close("AfterHistogramBinerization");
close("AfterBackgroundSubstraction");
close("AfterCannyEdgeDetection");
close("AfterMerging");
}
if(OnlyHistogramBinerization == true && ShowProcessingStepsBoolean == true){
close("AfterCannyEdgeDetection");
close("AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators");
}
}

//-----
//-----
// Analysis of maps with videos
//-----
//-----

if (ChoiceType == "Map of videos (avi.)")
{
dir = getDirectory("Choose a folder");
// processing video (.avi) files
list = getFileList(dir);

```

```

for (i = 0; i < list.length; i++)
{
    name = list[i];
    if(matches(name, ".*avi*.")) //only opening videofiles (in this
case .avi files)
    {
        //Splitting the video (.avi) file
        open(list[i]);
        // vv Removing .avi from name
        unwantedPartOfName = ".avi";
        len1=lengthOf(name);
        len2=lengthOf(unwantedPartOfName);
        len3=indexOf(name,unwantedPartOfName);
        string1=substring(name, len2+len3,len1);
        string2=substring(name, 0,len3);
        nameWithoutAvi=string2+string1;
        // ^^ Removing .avi from name
        NewDirInput= dir + nameWithoutAvi + " - Input";
        NewDirOutput= dir + nameWithoutAvi + " - Output";
        File.makeDirectory(NewDirInput);
        File.makeDirectory(NewDirOutput);
        //for (y = 1; y <= nSlices; y++) {
        //setSlice(y);
        // run("Duplicate...", "duplicate range=i use");
        // saveAs(nameWithoutAvi+i, NewDirInput "nameWithoutAvi+i");
        // saveAs("png", subdir2 + OrigineleAfbeelding);
        //list4 = getFileList(dir);
        // saveAs("png", NewDirInput + i);
        // saveAs("Results", subdir2 + videonaam2 + "Results.tsv");
        // run("Close");
        //}

        run("Image Sequence...", "format=png dir=["+NewDirInput+"] start=1");
        //run("Image Sequence...", "dir="" format=PNG digits=5 use");
        //run("Image Sequence...", "format=PNG start=1 digits=5 save=NewDirInput");

        //creating a background from videofile
        if(ChoiceBackground == "Median of multiple frames (videos/maps){
            run("Slice Keeper", "first=1 last=FramesForBackground increment=1");
            run("Z Project...", "projection=Median");
            rename("background.tif");
            saveAs("tif", NewDirOutput+"background");
            run("Close All");
        }
    }
}

listTwo = getFileList(dir);
listTwo = Array.sort(listTwo);
for (i = 0; i < listTwo.length; i++)
{
    showProgress(i+1, listTwo.length);
    mapname = listTwo[i];
    if(File.isDirectory(dir + File.separator + listTwo[i]) && matches(mapname, ".*Input*."))
    {
        subdir = dir + listTwo[i];
        subdir2 = dir + listTwo[i+1];
        listThree = getFileList(subdir);
        videonaam1 = listTwo[i];
        videonaam2 = replace(videonaam1, "Input/", "");
        for (n = 0; n < listThree.length; n++)
        {
            if(ChoiceBackground == "Median of multiple frames (videos/maps){
                open(videonaam2 +"Outputbackground.tif");
                rename("background.tif");
            }
            open(subdir+listThree[n]);
        }
    }
}

//-----
//Start of code that is actually used to process the image
//-----

OrigineleAfbeelding = getTitle();
run("8-bit");

```

```

makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
run("Subtract...", "value=255 slice");
if(ChoiceBackground == "Rolling ball from single image")
{
    makeRectangle(0, 0, getWidth(), getHeight());
    run("Duplicate...", "title=background.tif"); //Only used when also using histogram thresholding in combination with
canny edge detection
    run("Subtract Background...", "rolling=500 light create sliding");
    rename("background.tif");
}
imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", OrigineleAfbeelding, "background.tif");
run("8-bit");
if(HistogramBinerization == true)
{
    rename("BackgroundSubtractedImage"); //Only used when
also using histogram thresholding in combination with canny edge detection
    run("Duplicate...", "title=BackgroundSubtractedImage2"); //Only used when also using histogram thresholding in combination with canny
edge detection
}

//Volgende stap bepaalt de gevoeligheid van de analyse, hoe hoger de mask waarde (van 0 tot 0.9) hoe gevoeliger de analyse
run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=inNumberEdgeUnsharpMask");

run("FeatureJ Edges", "compute smoothing="+inNumberEdgeComputeSmoothing+" suppress lower="+inNumberEdgeLowThreshold+"
higher="+inNumberEdgeHighThreshold);

rename("BackgroundSubtractedImage3");
run("8-bit");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=dilate");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight());
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0,RowsRemovedFromEdges,getWidth,getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
run("Crop");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=dilate");

//Steps for also doing a histogram based binerization
if(HistogramBinerization == true)
{
    selectWindow("BackgroundSubtractedImage");
    if(GaussianBlurBeforeIntensityThresholding>0){
run("Gaussian Blur...", "sigma="+GaussianBlurBeforeIntensityThresholding);
}
setAutoThreshold("Default");
run("Convert to Mask");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight());
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);

```

```

run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0, RowsRemovedFromEdges, getWidth, getHeight - RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);

run("Crop");
if(OnlyHistogramBinerization == false){
run("BinaryReconstruct ", "mask=BackgroundSubtractedImage seed=BackgroundSubtractedImage3
create white");

rename("ReconstructedImage");
imageCalculator("OR", "ReconstructedImage", "BackgroundSubtractedImage3");
}
run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=dilate");
run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=erode");
run("Fill Holes");

}
if(WatershedIrregularFeaturesBoolean == true){
run("Watershed Irregular Features", "erosion="+ErosionCycles+"
convexity_threshold="+WatershedConvexity+" separator_size=0-Infinity");
} else if (WatershedBoolean == true){
run("Watershed");
}
}
rename(OrigineleAfbeelding);
//Volgende stap bepaalt de schaal van de afbeelding, voeg hier de waarde in die opgegeven stonden bij de
kalibratieafbeelding (Distance in pixel = distance; known distance = known)
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
FinalHeightImage = getHeight(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
FinalWidthImage = getWidth(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
run("Analyze Particles...", "size="+minSize+"-"+maxSize+" pixel circularity="+minCircularity+"-"+maxCircularity+"
show=Nothing display include exclude summarize add");
close();
selectWindow(OrigineleAfbeelding);
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges, (getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges), (getHeight-RowsRemovedFromEdges-RowsRemovedFromEdges));
run("Crop");

//-----
//end of code that is used to actually process the image
//-----

roiManager("Show All without labels");
run("Flatten");
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
run("Scale Bar...", "width=100 height=12 font=42 color=White background=Black

location=[Lower Right] bold overlay label");

roiManager("Reset");
close("\\Others"); //sluit alle andere afbeeldingen: memory
saveAs("png", subdir2 + OrigineleAfbeelding);
close();
}
selectWindow("Results"); //activate results table

//Getting necessary information out of results
if(FOVcfYesOrNo == false)
{
Table.applyMacro("Diameter=sqrt(Area/3.14*4); Diameter3=Diameter*Diameter*Diameter;
Diameter4=Diameter3*Diameter");

FOVcfMeasurements = newArray(nResults);
diameterMeasurements = newArray(nResults);
diameter3Measurements = newArray(nResults);
diameter4Measurements = newArray(nResults);
for(k=0; k<nResults; k++)
{
FOVcfMeasurements[k] = 1;
diameterMeasurements[k] = getResult("Diameter", k);
diameter3Measurements[k] = getResult("Diameter3", k);
diameter4Measurements[k] = getResult("Diameter4", k);
}
}
else if (FOVcfYesOrNo == true)
{

```

```

Diameter4=Diameter3*Diameter;   Table.applyMacro("Diameter=sqrt(Area/3.14*4); Diameter3=Diameter*Diameter*Diameter;
Width));                       FOVcf=("+FinalWidthImage+"*"+FinalHeightImage+")/(("+FinalHeightImage+"-Height)*("+FinalWidthImage+"-
                                Width));

                                FOVcfMeasurements = newArray(nResults);
                                diameterMeasurements = newArray(nResults);
                                diameter3Measurements = newArray(nResults);
                                diameter4Measurements = newArray(nResults);
                                for(k=0; k<nResults; k++)
                                {
                                    FOVcfMeasurements[k] = getResult("FOVcf", k);
                                    diameterMeasurements[k] = getResult("Diameter", k);
                                    diameter3Measurements[k] = getResult("Diameter3", k);
                                    diameter4Measurements[k] = getResult("Diameter4", k);
                                }
                                }
saveAs("Results", subdir2 + videonaam2 + "Results.tsv");
run("Close");

//Verwerken van summary data
selectWindow("Summary"); //activate summary table
IJ.renameResults("Results");
totalCount = 0;
if(FOVcfYesOrNo == true)
{
    for(m=0; m<nResults; m++)
    {
        D1som = 0;
        D4som = 0;
        D3som = 0;
        FOVcfsom = 0;
        SphericalVolume = 0;

        for(h=totalCount; h<totalCount+getResult("Count",m);h++)
        {
            D1som          =          D1som          +
            D4som          =          D4som          +
            D3som          =          D3som          +
            FOVcfsom += FOVcfMeasurements[h];
            SphericalVolume +=
            FOVcfMeasurements[h]*4*3.141*(diameterMeasurements[h]*diameterMeasurements[h]*diameterMeasurements[h])/(8*3);
        }
        totalCount += getResult("Count", m);
        setResult("D4.3", m, D4som/D3som);
        setResult("D1.0", m, D1som/getResult("Count", ,m));

        setResult("FOV corrected counts", m, FOVcfsom);
        setResult("Spherical Volume", m, SphericalVolume);
    }
}
else
{
    for(m=0; m<nResults; m++)
    {
        D1som = 0;
        D4som = 0;
        D3som = 0;
        for(h=totalCount; h<totalCount+getResult("Count",m);h++)
        {
            D1som += diameterMeasurements[h];
            D4som += diameter4Measurements[h];
            D3som += diameter3Measurements[h];
        }
        totalCount += getResult("Count", m);
        setResult("D4.3", m, D4som/D3som);
        setResult("D1.0", m, D1som/getResult("Count", ,m));
    }
}
saveAs("Results", subdir2 + videonaam2 + "Summary.tsv");

//
// Extended results
//

if(FOVcfYesOrNo == true && ExtendedResults == true)

```

```

totalCount = 0;
{
    for(m=0; m<nResults; m++)
    {
        f010 = 0;
        f1020 = 0;
        f2030 = 0;
        f3040 = 0;
        f4050 = 0;
        f5060 = 0;
        f6070 = 0;
        f7080 = 0;
        f8090 = 0;
        f90100 = 0;
        f100110 = 0;
        f110120 = 0;
        f120130 = 0;
        f130140 = 0;
        f140150 = 0;
        f150160 = 0;
        f160170 = 0;
        f170180 = 0;
        f180190 = 0;
        f190200 = 0;
        f200225 = 0;
        f225250 = 0;
        f250275 = 0;
        f275300 = 0;
        f300325 = 0;
        f325350 = 0;
        f350375 = 0;
        f375400 = 0;
        f400450 = 0;
        f450500 = 0;
        for(h=totalCount;
        {
            h<totalCount+getResult("Count",m);h++)

                if(diameterMeasurements[h]<10){
                    f010 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<20){
                    f1020 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<30){
                    f2030 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<40){
                    f3040 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<50){
                    f4050 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<60){
                    f5060 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<70){
                    f6070 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<80){
                    f7080 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<90){
                    f8090 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<100){
                    f90100 += FOVcfMeasurements[h];
                } else if
            (diameterMeasurements[h]<110){

```



```

    }
    totalCount += getResult("Count", m);
    setResult("0-10", m, f010);
    setResult("10-20", m, f1020);
    setResult("20-30", m, f2030);
    setResult("30-40", m, f3040);
    setResult("40-50", m, f4050);
    setResult("50-60", m, f5060);
    setResult("60-70", m, f6070);
    setResult("70-80", m, f7080);
    setResult("80-90", m, f8090);
    setResult("90-100", m, f90100);
    setResult("100-110", m, f100110);
    setResult("110-120", m, f110120);
    setResult("120-130", m, f120130);
    setResult("130-140", m, f130140);
    setResult("140-150", m, f140150);
    setResult("150-160", m, f150160);
    setResult("160-170", m, f160170);
    setResult("170-180", m, f170180);
    setResult("180-190", m, f180190);
    setResult("190-200", m, f190200);
    setResult("200-225", m, f200225);
    setResult("225-250", m, f225250);
    setResult("250-275", m, f250275);
    setResult("275-300", m, f275300);
    setResult("300-325", m, f300325);
    setResult("325-350", m, f325350);
    setResult("350-375", m, f350375);
    setResult("375-400", m, f375400);
    setResult("400-450", m, f400450);
    setResult("450-500", m, f450500);
}
saveAs("Results", subdir2 + videonaam2 + "ExtendedSummary.tsv");
}
run("Close");
print(diameterMeasurements[h-1]);
print(FOVcfMeasurements[h-1]*4*3.141*(diameterMeasurements[h-1]*diameterMeasurements[h-1]*diameterMeasurements[h-1]/(8*3));
print("Scale in scale in pixels/µm: "+inNumberScale);
print(ChoiceType);
print("Background image method: "+ChoiceBackground);
print("Edge detection High Threshold: "+inNumberEdgeHighThreshold);
print("Edge detection Low Threshold: "+inNumberEdgeLowThreshold);
print("Edge detection Smoothing: "+inNumberEdgeComputeSmoothing);
print("Edge detection Sharpening: "+inNumberEdgeUnsharpMask);
print("Frames for background subtraction: "+FramesForBackground);
print("Use additional histogram based binerization (1 = true, 0 = false): "+HistogramBinerization);
print("Closing cycles when using histogram binerization: "+inNumberClosingCycles);
print("Field of View correction factor (1 = true, 0 = false): "+FOVcfYesOrNo);
print("Add scalebar to input (1 = true, 0 = false): "+ AddScaleBar);
print("Show processing steps (single image)(1 = true, 0 = false): "+ ShowProcessingStepsBoolean);
print("minimum size: "+minSize);
print("maximum size: "+maxSize);
print("minimum circularity: "+minCircularity);
print("maximum circularity: "+maxCircularity);
print("watershed(1 = true, 0 = false): "+ WatershedBoolean);
print("watershed irregular features (1 = true, 0 = false): "+ WatershedIrregularFeaturesBoolean);
print("erosion cycles: "+ ErosionCycles);
print("Convexity threshold: "+ WatershedConvexity);
saveAs("Text", subdir2 + videonaam2 + "Settings");
run("Close");
}
}
if(AddScaleBar==true){
    for (t = 0; t < listThree.length; t++){
        open(subdir+listThree[t]);
        run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
        run("Scale Bar...", "width=100 height=12 font=42 color=White background=Black location=[Lower Right] bold overlay label");
        saveAs("png", subdir);
        run("Close");
    }
}
}
}
//-----
// Analysis of maps with maps of images

```

```

//-----

if (ChoiceType == "Map with maps of images" )
{
    setBatchMode(true);
    dir = getDirectory("Choose a folder");
    listTwo = getFileList(dir);
    listTwo = Array.sort(listTwo);
    for (i = 0; i < listTwo.length; i++)
    {
        showProgress(i+1, listTwo.length);
        if(File.isDirectory(dir + File.separator + listTwo[i]))
        {
            subdir = dir + listTwo[i];
            listThree = getFileList(subdir);
            NewDirOutput= subdir + "Output - ";

            if(ChoiceBackground == "Median of multiple frames (videos/maps){
                for(y = 0; y<(minOf(FramesForBackground,listThree.length)) ; y++){
                    open(subdir+listThree[y]);
                }
                run("Images to Stack", "name=background.tif title=[] use");
                run("Z Project...", "projection=Median");
                saveAs("tif", NewDirOutput+"background");
                close("\\Others");
                run("Close");
            }

            for (n = 0; n < listThree.length; n++)
            {
                if(ChoiceBackground == "Median of multiple frames (videos/maps){
                    open(subdir + "Output - background.tif");
                    rename("background.tif");
                }
                open(subdir+listThree[n]);
            }
        }
    }

//-----
//Start of code that is actually used to process the image
//-----

OrigineleAfbeelding = getTitle();
run("8-bit");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, 0, RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges);
run("Subtract...", "value=255 slice");
if(ChoiceBackground == "Rolling ball from single image")
{
    makeRectangle(0, 0, getWidth(), getHeight());
    run("Duplicate...", "title=background.tif"); //Only used when also using histogram thresholding in combination with
canny edge detection
    run("Subtract Background...", "rolling=500 light create sliding");
    rename("background.tif");
}
imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", OrigineleAfbeelding, "background.tif");
run("8-bit");
if(HistogramBinerization == true)
{
    rename("BackgroundSubtractedImage"); //Only used when
also using histogram thresholding in combination with canny edge detection
    run("Duplicate...", "title=BackgroundSubtractedImage2"); //Only used when also using histogram thresholding in combination with canny
edge detection
}

//Volgende stap bepaalt de gevoeligheid van de analyse, hoe hoger de mask waarde (van 0 tot 0.9) hoe gevoeliger de analyse
run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=inNumberEdgeUnsharpMask");

run("FeatureJ Edges", "compute smoothing="+inNumberEdgeComputeSmoothing+" suppress lower="+inNumberEdgeLowThreshold+"
higher="+inNumberEdgeHighThreshold);

rename("BackgroundSubtractedImage3");
run("8-bit");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=dilate");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight());

```

```

run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0,RowsRemovedFromEdges,getWidth,getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
run("Crop");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=erode");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=dilate");

//Steps for also doing a histogram based binerization
if(HistogramBinerization == true)
{
    selectWindow("BackgroundSubtractedImage");
    if(GaussianBlurBeforeIntensityThresholding>0){
run("Gaussian Blur...", "sigma="+GaussianBlurBeforeIntensityThresholding);
    }
    setAutoThreshold("Default");
run("Convert to Mask");
makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
run("Crop");
makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);
run("Add...", "value=255 slice");
setOption("BlackBackground", true);
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
makeRectangle(0,RowsRemovedFromEdges,getWidth,getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
run("Crop");
if(OnlyHistogramBinerization == false){
run("BinaryReconstruct ", "mask=BackgroundSubtractedImage seed=BackgroundSubtractedImage3
create white");
    rename("ReconstructedImage");
    imageCalculator("OR", "ReconstructedImage", "BackgroundSubtractedImage3");
    }
run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=dilate");
run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=erode");
run("Fill Holes");
}
if(WatershedIrregularFeaturesBoolean == true){
run("Watershed Irregular Features", "erosion="+ErosionCycles+"
convexity_threshold="+WatershedConvexity+" separator_size=0-Infinity");
} else if (WatershedBoolean == true){
run("Watershed");
}
rename(OrigineleAfbeelding);
//Volgende stap bepaalt de schaal van de afbeelding, voeg hier de waarde in die opgegeven stonden bij de
kalibratieafbeelding (Distance in pixel = distance; known distance = known)
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
FinalHeightImage = getHeight(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
FinalWidthImage = getWidth(); //deze zou nog ergens anders komen te staan zodat hij niet iedere
keer opnieuw moet worden bepaald
run("Analyze Particles...", "size="+minSize+"-"+maxSize+" pixel circularity="+minCircularity+"-"+maxCircularity+"
show=Nothing display include exclude summarize add");

```

```

close();
selectWindow(OrigineleAfbeelding);
makeRectangle(RowsRemovedFromEdges, RowsRemovedFromEdges, (getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges), (getHeight-RowsRemovedFromEdges-RowsRemovedFromEdges));
run("Crop");

//-----
//Start of code that is actually used to process the image
//-----

roiManager("Show All without labels");
run("Flatten");
run("Set Scale...", "distance="+inNumberScale+" known=1 pixel=1 unit=µm");
run("Scale Bar...", "width=100 height=12 font=42 color=White background=Black

location=[Lower Right] bold overlay label");

roiManager("Reset");
if(ChoiceBackground == "Background is open and named background.tif"){
saveAs("png", NewDirOutput + OrigineleAfbeelding);
selectImage("background.tif");
close("\\Others"); //sluit alle andere afbeeldingen: memory
} else {
close("\\Others"); //sluit alle andere afbeeldingen: memory
saveAs("png", NewDirOutput + OrigineleAfbeelding);
close();
}
}
selectWindow("Results"); //activate results table

//Getting necessary information out of results
if(FOVcfYesOrNo == false)
{
Table.applyMacro("Diameter=sqrt(Area/3.14*4); Diameter3=Diameter*Diameter*Diameter;
Diameter4=Diameter3*Diameter");

FOVcfMeasurements = newArray(nResults);
diameterMeasurements = newArray(nResults);
diameter3Measurements = newArray(nResults);
diameter4Measurements = newArray(nResults);
for(k=0; k<nResults; k++)
{
FOVcfMeasurements[k] = 1;
diameterMeasurements[k] = getResult("Diameter", k);
diameter3Measurements[k] = getResult("Diameter3", k);
diameter4Measurements[k] = getResult("Diameter4", k);
}
}
else if (FOVcfYesOrNo == true)
{
Table.applyMacro("Diameter=sqrt(Area/3.14*4); Diameter3=Diameter*Diameter*Diameter;
Diameter4=Diameter3*Diameter; FOVcf=( "+FinalWidthImage+"*"+FinalHeightImage+" )/( "+FinalHeightImage+"-Height )*( "+FinalWidthImage+"-
Width)");

FOVcfMeasurements = newArray(nResults);
diameterMeasurements = newArray(nResults);
diameter3Measurements = newArray(nResults);
diameter4Measurements = newArray(nResults);
for(k=0; k<nResults; k++)
{
FOVcfMeasurements[k] = getResult("FOVcf", k);
diameterMeasurements[k] = getResult("Diameter", k);
diameter3Measurements[k] = getResult("Diameter3", k);
diameter4Measurements[k] = getResult("Diameter4", k);
}
}
}
saveAs("Results", NewDirOutput + "Results.tsv");
run("Close");

//Verwerken van summary data
selectWindow("Summary"); //activate summary table
IJ.renameResults("Results");
totalCount = 0;
if(FOVcfYesOrNo == true)
{
for(m=0; m<nResults; m++)
{

```

```

D1som = 0;
D4som = 0;
D3som = 0;
FOVcfsom = 0;
SphericalVolume = 0;
for(h=totalCount; h<totalCount+getResult("Count",m);h++)
{
    D1som = D1som +
(diameterMeasurements[h]*FOVcfMeasurements[h]);
    D4som = D4som +
(diameter4Measurements[h]*FOVcfMeasurements[h]);
    D3som = D3som +
(diameter3Measurements[h]*FOVcfMeasurements[h]);
    FOVcfsom += FOVcfMeasurements[h];
    SphericalVolume +=
FOVcfMeasurements[h]*4*3.141*(diameterMeasurements[h]*diameterMeasurements[h]*diameterMeasurements[h])/(8*3);
}
totalCount += getResult("Count", m);
setResult("D4.3", m, D4som/D3som);
setResult("D1.0", m, D1som/getResult("Count",m));

setResult("FOV corrected counts", m, FOVcfsom);
setResult("Spherical Volume", m, SphericalVolume);
}
else
{
    for(m=0; m<nResults; m++)
    {
        D1som = 0;
        D4som = 0;
        D3som = 0;
        for(h=totalCount; h<totalCount+getResult("Count",m);h++)
        {
            D1som += diameterMeasurements[h];
            D4som += diameter4Measurements[h];
            D3som += diameter3Measurements[h];
        }
        totalCount += getResult("Count", m);
        setResult("D4.3", m, D4som/D3som);
        setResult("D1.0", m, D1som/getResult("Count",m));
    }
}
saveAs("Results", NewDirOutput + "Summary.tsv");
if(FOVcfYesOrNo == true && ExtendedResults == true)
    totalCount = 0;
    {
        for(m=0; m<nResults; m++)
        {
            f010 = 0;
            f1020 = 0;
            f2030 = 0;
            f3040 = 0;
            f4050 = 0;
            f5060 = 0;
            f6070 = 0;
            f7080 = 0;
            f8090 = 0;
            f90100 = 0;
            f100110 = 0;
            f110120 = 0;
            f120130 = 0;
            f130140 = 0;
            f140150 = 0;
            f150160 = 0;
            f160170 = 0;
            f170180 = 0;
            f180190 = 0;
            f190200 = 0;
            f200225 = 0;
            f225250 = 0;
            f250275 = 0;
            f275300 = 0;
            f300325 = 0;
            f325350 = 0;
            f350375 = 0;
            f375400 = 0;
            f400450 = 0;

```



```

run("8-bit");
run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=dilate");
    makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
    run("Add...", "value=255 slice");
    makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
    run("Add...", "value=255 slice");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Make Binary");
    run("Fill Holes");
    makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
    run("Crop");
    makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
    run("Add...", "value=255 slice");
    makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);
    run("Add...", "value=255 slice");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Make Binary");
    run("Fill Holes");
    makeRectangle(0,RowsRemovedFromEdges,getWidth,getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
    run("Crop");
    run("EDM Binary Operations", "iterations="+ClosingCycles+" operation=erode");
    run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=erode");
    run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=dilate");
    //run("Watershed Irregular Features", "erosion=3 convexity_threshold=0 separator_size=0-8");

//Steps for also doing a histogram based binerization
if(HistogramBinerization == true)
{
    selectWindow("AfterHistogramBinerization");
    if(GaussianBlurBeforeIntensityThresholding>0){
        run("Gaussian Blur...", "sigma="+GaussianBlurBeforeIntensityThresholding);
    }
    setAutoThreshold("Default");
    run("Convert to Mask");
    makeRectangle(0, 0, RowsRemovedFromEdges, getHeight);
    run("Add...", "value=255 slice");
    makeRectangle(getWidth-RowsRemovedFromEdges,0, RowsRemovedFromEdges,getHeight);
    run("Add...", "value=255 slice");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Make Binary");
    run("Fill Holes");
    makeRectangle(RowsRemovedFromEdges,0,getWidth-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges,getHeight);
    run("Crop");
    makeRectangle(0, 0, getWidth, RowsRemovedFromEdges);
    run("Add...", "value=255 slice");
    makeRectangle(0,getHeight-RowsRemovedFromEdges,getWidth,RowsRemovedFromEdges);
    run("Add...", "value=255 slice");
    setOption("BlackBackground", true);
    run("Make Binary");
    run("Fill Holes");
    makeRectangle(0,RowsRemovedFromEdges,getWidth,getHeight-RowsRemovedFromEdges-
RowsRemovedFromEdges);
    run("Crop");
    run("Duplicate...", "title=AfterHistogramBinerization2");
    if(OnlyHistogramBinerization == false){
        run("BinaryReconstruct", "mask=AfterHistogramBinerization2
seed=AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators create white");
        rename("toClose");
        run("Duplicate...", "title=AfterMerging");
        selectImage("toClose");
        run("Close");
        selectImage("AfterMerging");
        imageCalculator("OR", "AfterMerging", "AfterCannyEdgeDetectionAndMorphologicalOperators");
    }
    run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=dilate");
    run("EDM Binary Operations", "iterations=inNumberClosingCycles operation=erode");
    run("Duplicate...", "title=AfterWatershed");
} else {
    selectImage("AfterHistogramBinerization");
    run("Close");
}
if (WatershedBoolean == true){
    run("Watershed");
} else if(WatershedIrregularFeaturesBoolean == true){

```

```

run("Watershed Irregular Features", "erosion="+ErosionCycles+"
convexity_threshold="+WatershedConvexity+" separator_size=0-Infinity");
}

run("Duplicate...", "title=BeforePreview");
//
//run("BinaryKillBorders ", "top right bottom left white");
//
show=Masks include exclude");
run("Analyze Particles...", "size="+minSize+"-"+maxSize+" pixel circularity="+minCircularity+"-"+maxCircularity+"

selectImage("Mask of BeforePreview");
run("Invert");
run("Canvas Size...", "width="+OriginalWidth+" height="+OriginalHeight+" position=Center");
run("Create Selection");
roiManager("Reset");
setBatchMode(false);
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
close("Mask of BeforePreview");
selectWindow(OrigineleAfbeelding);
roiManager("Show All without labels");

}
}
}

```