

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIJEL VIDEČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIJEL VIDEČ

**ŠTUDIJ SFERIČNE KRISTALIZACIJE LAKTOZE S
PRISTOPOM NAČRTOVANJA EKSPERIMENTOV**

**STUDY OF LACTOSE SPHERICAL
CRYSTALLIZATION WITH THE DESIGN OF
EXPERIMENTS APPROACH**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorstvom asist. Dejana Lamešića, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku, mag. farm. in somentorju asist. Dejanu Lamešiću, mag. farm. za ves čas, trud, usmerjanje, strokovne nasvete, diskusije in svobodo pri eksperimentalnem delu. Posebno zahvalo namenjam tudi vsem družinskim članom in Moniki, ki so me ves čas študija podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorja asist. Dejana Lamešića, mag. farm.

Danijel Videc

KAZALO

KAZALO	I
SEZNAM OKRAJŠAV	III
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
1. UVOD	1
1.1. KRISTALIZACIJA	2
1.1.1. Prenasičenje	2
1.1.2. Jedrenje	3
1.1.3. Rast kristalov	6
1.2. SFERIČNA KRISTALIZACIJA	7
1.2.1. Sferična aglomeracija	11
1.2.2. Difuzija topila iz kvaziemulzije	11
1.3. NAČRTOVANJE EKSPERIMENTOV	12
1.3.1. Dokončni presejalni načrt	13
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.2. APARATURE	17
3.3. METODE DELA	18
3.3.1. Sferična kristalizacija	18
3.3.2. Laserska difrakcija	19
3.3.3. Pretočne lastnosti	20
3.3.4. Izguba po sušenju	20
3.3.5. Svetlobna mikroskopija	20
3.3.6. Slikovna analiza	20
3.3.7. Elektronska vrstična mikroskopija	21
3.3.8. Prava gostota	21
3.3.9. Specifična površina	21
3.3.10. Dokončni presejalni načrt	22
3.3.11. Analiza dokončnega presejalnega načrta	24

3.3.12.	Metoda glavnih komponent	27
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	28
4.1.	IZBIRA NETOPILA	28
4.2.	DOLOČANJE EKSTREMNIH VREDNOSTI FAKTORJEV	30
4.3.	DSD	31
4.3.1.	Izkoristek	32
4.3.2.	D10	40
4.3.3.	D50	43
4.3.4.	D90	45
4.3.5.	Porazdelitev velikosti delcev	48
4.3.6.	Ovalnost.....	50
4.3.7.	Hrapavost.....	53
4.3.8.	Hausnerjevo razmerje	55
4.3.9.	Povzetek rezultatov statističnega vrednotenja DSD-ja.....	57
4.4.	PRAVA GOSTOTA.....	61
4.5.	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	61
4.6.	SPECIFIČNA POVRŠINA	66
5.	SKLEP	67
6.	LITERATURA.....	69

SEZNAM OKRAJŠAV

a - velika polos v elipsi, ki obkroža delec

AICc – Akaike informacijski kriterij s korekcijo

ang. – angleško

ANOVA – analiza variance

BET – Brunauer-Emmett-Teller

BIC – Bayesovski informacijski kriterij

CCA – kristalo-ko-aglomeracija

CV – koeficient variacije

CV(RMSE)_{DOD} – koeficient variacije korena srednje kvadratne napake za dodatne eksperimente

CV(RMSE)_{DSD} – koeficient variacije korena srednje kvadratne napake za eksperimente DSD-ja

DOE – načrtovanje eksperimentov

DSD – dokončni presejalni načrt

EMS – učinkovita izbira modela

FSR – postopna vključitvena regresija

HR – Hausnerjevo razmerje

J – hitrost jedrenja

Konc. lakt. – koncentracija laktoze v raztopini laktoze

KS – kristalizacijski sistem

m_{aglo} – masa vseh pridobljenih aglomeratov

m_{lak} – masa raztopljene laktoze

N – število eksperimentov

NQPRD – normalni kvantilni graf za porazdelitev rezidualov

p – število faktorjev

PCA – metoda glavnih komponent

PEG – polietilen glikol

PSD – porazdelitev velikosti delcev

QESD – difuzija topila iz kvaziemulzije

RMSE – koren srednje kvadratne napake

S – prenasičenje

SA – sferična aglomeracija

S_C – konveksna površina

SC – sferična kristalizacija

SEM – vrstični elektronski mikroskop

SSA – specifična površina

SSD – standardni presejalni načrti

SWT – Shapiro-Wilk-ov test normalnosti

$t(\text{dod.meš})$ – čas mešanja po celotnem dodatku raztopine laktoze

Temp. – temperatura kristalizacijskega sistema

V razmerje – volumsko razmerje med netopilom in celotnim kristalizacijskim sistemom

$v(\text{dod})$ – hitrost dodajanja raztopine laktoze v netopilo

$v(\text{meš})$ – hitrost mešanja

V_{nas} – nasipni volumen

V_{zbi} – zbiti volumen

Y – izkoristek

γ – medfazna napetost

$\Delta G'$ – aktivacijska energija

μ – kemijski potencial

v – molski volumen

ρ_{nas} – nasipna gostota

ρ_{zbi} – zbita gostota

POVZETEK

Sferična kristalizacija je metoda načrtovanja delcev, s katero lahko izboljšamo pretočne lastnosti delcev in njihovo stisljivost. Kljub prednostim, sferična kristalizacija še vedno ni pogosto uporabljena v farmacevtski industriji. Možen razlog je pomanjkanje razumevanja procesa. Znanje o procesu lahko najučinkoviteje pridobimo z načrtovanjem eksperimentov, pri čemer je dokončni presejalni načrt (ang. »definitive screening design«; DSD) priporočljiv pristop. V naši študiji smo načrtovali DSD za proces sferične kristalizacije laktoze, pri čemer smo kot netopilo uporabili aceton. Proučevali smo vplive koncentracije raztopine laktoze (Konc. lakt.), volumskega razmerja med netopilom in celotnim kristalizacijskim sistemom (V razmerje), temperature kristalizacijskega sistema (Temp.), hitrosti dodajanja raztopine v netopilo ($v(\text{dod})$), hitrosti mešanja ($v(\text{meš})$) in časa mešanja po celotnem dodatku raztopine ($t(\text{dod.meš})$) (faktorji) na izkoristek procesa, parametre velikosti delcev D10, D50, D90, porazdelitev velikosti delcev (PSD), morfološke lastnosti (ovalnost in hrapavost delcev) in Hausnerjevo razmerje, ki podaja informacijo o pretočnih lastnostih delcev (odzivi). S pomočjo dobljenih rezultatov smo določili faktorje z največjim vplivom na posamezne odzive in za vsak odziv naredili statistični model. Na izkoristek procesa imajo največji vpliv faktorji Konc. lakt. (negativen kvadratni učinek), V razmerje (z višanjem povečuje izkoristek) in Temp. (z višanjem zmanjšuje izkoristek). Vsi aktivni faktorji so v medsebojnih interakcijah, ki bistveno vplivajo na izkoristek. Na D10 in PSD najbolj vpliva $v(\text{meš})$ (z višanjem znižuje D10 in zvišuje PSD), na D50 pozitiven kvadratni učinek Konc. lakt., na D90 pa interakcije posameznih faktorjev. Ovalnost delcev se z zviševanjem Konc.lakt. povečuje, z zviševanjem $t(\text{dod.meš})$ znižuje, pomemben vpliv pa imajo tudi interakcije med faktorji. Na hrapavost delcev vplivata Temp. in V razmerje, ki jo z zviševanjem znižujeta. Hausnerjevo razmerje se z zviševanjem Temp. znižuje in z zviševanjem V razmerja zvišuje, pomemben vpliv pa ima še dvofaktorska interakcija. Vplive faktorjev lahko razlagamo z njihovim vplivom na prenasičenje in na sile, ki delujejo na delce v kristalizacijskem sistemu. Glede na obliko osnovnih kristalov smo sferične aglomerate razdelili v štiri morfološke skupine (Prizme, Piramide, Iglice in Ostali). Ugotovili smo, da obstaja določen trend vrednosti nekaterih procesnih parametrov pri Prizmah in Iglicah ter da oblika osnovnih kristalov lahko vpliva na strukturo sferičnih aglomeratov in posledično na njihove lastnosti.

Ključne besede: sferična kristalizacija, laktoza, načrtovanje eksperimentov, definitive screening design, statistični model

ABSTRACT

Spherical crystallization is a method for particle engineering, which enables the improvement of flowability and compressibility of particles. However, despite advantages spherical crystallization is still not very common in the pharmaceutical industry. A possible reason could be lack of process understanding. Process knowledge is most efficiently obtained by implementing design of experiments approach, among which definitive screening design (DSD) has gained considerable attention in recent time. In our study, we designed DSD for the process of spherical crystallization, wherein acetone was used as antisolvent. We studied the effects of lactose solution concentration (Conc. lact.), volume ratio between antisolvent and the whole crystallization system (V ratio), temperature of the crystallization system (Temp.), velocity of the lactose solution addition to the antisolvent (v(add)), agitation speed (v(agi)) and agitation time after the complete addition of the lactose solution (t(add.agi)) (factors) on process yield, particle size parameters D10, D50, D90, particle size distribution (span), morphological properties (roundness, solidity) and Hausner ratio, which gives us information about the flowability of the particles (responses). We determined the factors with the largest influence on individual responses and made a statistical model for each response. The greatest influence on yield have factors Conc. lact. (negative quadratic effect), V ratio (with increasing increases yield) and Temp. (with increasing decreases yield). All mentioned factors are in reciprocal interactions, which also have a major effect on the yield. The largest influence on D10 and span has v(agi) (with increasing decreases D10 and increases span), on D50 positive quadratic effect of Conc. lact. and on D90 interactions between factors. Roundness increases with increasing Conc. lact., decreases with increasing t(add.agi), important are also interactions between factors. Solidity decreases with increasing Temp. and V ratio. Hausner ratio decreases with increasing Temp. and decreases with increasing V ratio, important influence has also two-factor interaction. Based on the crystal habit, we classified spherical agglomerates into four morphological groups (Prisms, Pyramids, Needles and Others). We observed a certain trend in values of some process parameters in Prisms and Needles and that the crystal habit can influence the structure of the spherical agglomerates and consequently also their properties.

Keywords: spherical crystallization, lactose, design of experiments, definitive screening design, statistical model

1. UVOD

Tablete so najbolj zaželena farmacevtska oblika v farmacevtski industriji (1). Razlog je v relativno nizkih stroških proizvodnje, pakiranja in transporta, v manj zahtevnih administracijskih postopkih med proizvodnjo in dobri stabilnosti. Prav tako je aplikacija tablet peroralna, kar je najpogostejši način dostave zdravilne učinkovine. Preferenčna metoda izdelave tablet je direktno tabletiranje, saj je stroškovno učinkovitejše in je validacija procesa enostavnejša v primerjavi s preostalimi procesi preoblikovanja delcev pred končnim stiskanjem zmesi v tableto (mokra ali suha granulacija ...) Direktno tabletiranje aktivnih učinkovin je možno, ko ima tabletirna zmes dobre pretočne in kompresibilne lastnosti, kar je problem pri mnogih zdravilnih učinkovinah (1). Na te sekundarne fizikalno-kemijske lastnosti vplivajo primarne fizikalno-kemijske lastnosti, kot so velikost, porazdelitev velikosti, oblika, gostota, poroznost in morfologija delcev (2). Običajno lahko te lastnosti zdravilne učinkovine izboljšamo z dodatkom ustreznih pomožnih snovi ali z inženiringom delcev, pri čemer je najpogostejša metoda mokro granuliranje. Dodatek polnil (pomožna snov) v preveliki količini ni najboljša metoda, ker prinaša veliko končno maso tablete, kar ni zaželeno (1). Mokro granuliranje je energetsko potratno, prav tako pa lahko vpliva na stabilnost učinkovin, ki so občutljive na vlago ali povišano temperaturo (3).

Sferična kristalizacija je metoda, ki omogoča doseganje želene velikosti delcev, izboljšanje pretočnih in kompresibilnostnih lastnosti delcev, vplivamo pa lahko tudi na profil sproščanja zdravilne učinkovine (3). Najpogosteje jo uporabljamo za izboljšanje lastnosti aktivnih učinkovin, saj omogoča aglomeracijo kristalov direktno v reaktorju, kjer lahko kontroliramo tudi lastnosti nastalih aglomeratov. Poleg tega pa jo lahko uporabimo tudi za izdelavo delcev pomožnih snovi, ki imajo boljše mehanske lastnosti (kompresibilnost in kompaktilnost) kot delci, pripravljene z drugimi metodami (npr. granulacija, sušenje z razprševanjem ...) (4). Kljub naštetim prednostim sferična kristalizacija še vedno ni pogosto uporabljena metoda v farmacevtski industriji. Izboljšanje razumevanja procesa in vpliva procesnih parametrov na pridobljene delce lahko olajša implementacijo v industriji (5). Željeno znanje najenostavneje pridobimo z izvedbo ustrezno zastavljenih eksperimentov (6). Z načrtovanjem eksperimentov (ang. »Design of Experiments«; DOE) lahko proučujemo lastnosti sistema, postavimo in ovrednotimo meje sistema glede na želene lastnosti produkta, hkrati pa pridobimo največ statistično relevantnih podatkov za ustrezno načrtovanje želenih

lastnosti sistema. V uporabi je veliko različnih metod DOE-a, relativno nova in vedno bolj priporočljiva metoda za ugotavljanje vpliva čim več procesnih parametrov na merjen odziv s čim manj eksperimenti pa je dokončni presejalni načrt (ang. »Definitive Screening Design«; DSD) (7).

1.1. KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je definirana kot fazna sprememba, v kateri iz raztopine dobimo kristalinično snov (8). Kristal je homogena, anizotropna trdna snov, katere gradniki (atomi, ioni ali molekule) so urejeni v osnovno celico, ki se ponavlja po celotni kristalni mreži (9,10).

Da kristalizacija poteče, je najprej potrebno prenasíčenje raztopine, temu sledi jedrenje in na koncu kristalna rast.

1.1.1. Prenasičenje

Nasičena raztopina je pri določeni temperaturi v termodinamičnem ravnotežju s trdno fazo. Kljub temu lahko s počasnim ohlajanjem nasičene raztopine brez mešanja pripravimo raztopino, v kateri je raztopljeno več topljenca kot v nasičeni raztopini. Takšne raztopine so prenasíčene (11).

Prenasičenje (S) je gonilna sila kristalizacije in je nujno za njen potek. Definiramo ga lahko kot razliko med kemijskim potencialom topljenca v prenasíčeni raztopini in kemijskim potencialom topljenca v nasičeni raztopini ($\Delta\mu$), ki je v termodinamičnem ravnotežju s trdno fazo (enačba 1):

$$S = e^{\frac{\Delta\mu}{RT}} \quad \text{enačba 1}$$

pri čemer je R plinska konstanta, T pa temperatura merjenja v kelvinih (11).

Čeprav je enačba 1 termodinamično natančnejša, se za opis prenasíčenja zaradi praktičnih razlogov pogosteje uporabljajo naslednje enačbe (8,11):

- Razlika v koncentraciji (Δc) med prenasíčeno raztopino (c) in nasičeno raztopino (c^*) (enačba 2)

$$\Delta c = c - c^* \quad \text{enačba 2}$$

- Količnik med koncentracijo prenasíčene in nasičene raztopine (enačba 3)

$$S = \frac{c}{c^*} \quad \text{enačba 3}$$

- Relativno prenasíčenje (σ) (enačba 4)

$$\sigma = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 \quad \text{enačba 4}$$

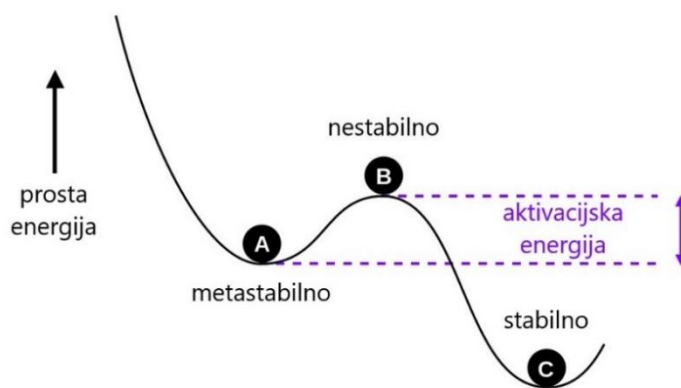
Prenasičenje lahko ustvarimo na naslednje načine (8):

- Sprememba temperature (največkrat ohlajanje)
- Izparevanje topila
- Spreminjanje sestave topila (dodatek netopila)
- Kemijska reakcija

Pri procesu kristalizacije je stopnja prenasíčenja izrednega pomena, ker določa kritični polmer jedra, hitrost jedrenja in hitrost rasti kristalov posledično pa tudi obliko, velikost in porazdelitev velikosti nastalih kristalov (8,11).

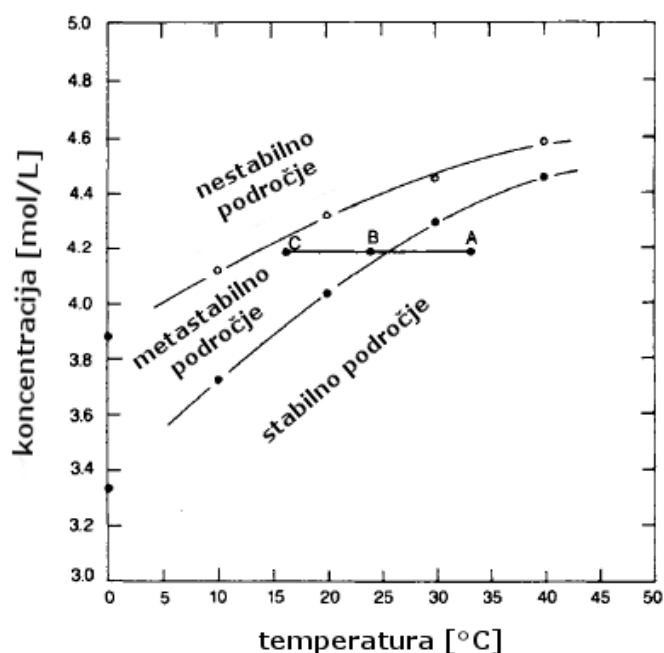
1.1.2. Jedrenje

Prenasičene raztopine so lahko metastabilne ali nestabilne. Metastabilno ravnotežje pomeni, da ima sistem energijo, ki je enaka lokalnemu minimumu, ni pa to najmanjša možna prosta energija v sistemu (slika 1). Manjše spremembe v metastabilnem ravnotežju vodijo v povečanje proste energije, zato se sistem povrne v prvotno stanje. Če pa je sprememba večja (potrebna je aktivacijska energija), sistem preide v stabilno ravnotežje. Ko je sistem v nestabilnem ravnotežju, že vsaka najmanjša sprememba vodi do spremembe termodinamskega ravnotežja (8).



Slika 1: Shematska predstavitev termodinamskih ravnotežij

Zgoraj opisane spremembe termodinamskih ravnotežij pri kristalizaciji lahko ponazorimo s topnostnim diagramom na sliki 2. V točki A je sistem nenasičen in je v stabilnem področju. Če sistem ohlajamo, dosežemo najprej stanje nasičenosti (spodnja meja metastabilnega področja) in pozneje prenasičenosti. V točki B je sistem rahlo prenasičen in se nahaja v metastabilnem področju. V tej točki je malo verjetno, da bo poteklo spontano (homogeno) jedrenje oz. bi moralo za to preteči več dni. Če sistem ohlajamo dalje, pridemo do točke C, kjer je spontano jedrenje bolj verjetno in bi poteklo v krajšem času. Ko dosežemo zgornjo mejo metastabilnega področja, preidemo v nestabilno področje. Tam poteče spontano jedrenje takoj. Jedrenje in poznejša rast kristalov sta tako mehanizma, s katerima sistem preide nazaj v stabilno stanje, ki je energetsko ugodnejše (8,11).

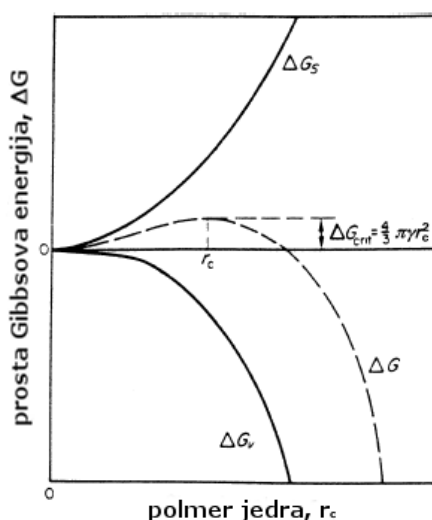


Slika 2: Primer topnostnega diagrama

Samo doseženo stanje prenasičenja torej ni zadosten razlog, da začne sistem kristalizirati. Preden lahko nastanejo kristali, morajo biti v raztopini prisotna jedra, ki delujejo kot centri kristalizacije. Proces nastajanja kristalizacijskega jedra imenujemo jedrenje (11). Nastane lahko z več različnimi mehanizmi. Lahko je primarno (poteče brez prisotnosti kristalov topljenca v raztopini) ali sekundarno (poteče v prisotnosti kristalov topljenca ali drugih kristalov v raztopini). Ti kristali delujejo kot katalizatorji jedrenja, zato to poteče pri nižjem prenasičenju kot primarno (8). Primarno jedrenje lahko poteče po homogenem mehanizmu (spontano, odvisno samo od stopnje prenasičenja) ali po heterogenem mehanizmu (sproženo

s prisotnostjo nečistot, tujih delcev ali hrapavosti površin reakcijskih posod) (12). Prosta energija, potrebna za jedrenje je pri heterogenem mehanizmu nižja, kar pomeni, da jedrenje poteče pri nižjem prenasičenju. Sekundarno jedrenje je lahko posledica abrazije večjih kristalov zaradi hitrega mešanja, trkov kristalov v sistemu (kontaktna nukleacija) ali gojenja, kjer v nasičeno raztopino dodamo kristale snovi, ki bo kristalizirala. Gojenje je lahko namerno ali nenamerno. Namerno je zelo pogosta metoda v industriji, ker omogoča boljši nadzor procesa, po drugi strani pa nenamerno pogosto povzroča številne težave (npr. nastajanje neželenega polimorfa) (11).

Čeprav je homogeno jedrenje redko in v praksi težko dosegljivo, večina nukleacijskih teorij razlaga prav to. Sicer mehanizem jedrenja še ni natančno poznan, najbolj verjetno pa je, da se molekule topljenca ena za drugo združujejo v jedro, ki tako raste. Proces poteka zelo hitro in se dogaja predvsem v območjih večje prenasičenosti (energija sistema je pri konstantnih pogojih sicer konstantna, kljub temu pa znotraj sistema prihaja do nihanj energije, kar privede do lokalnih območij, ki so bolj ali manj prenasočena). Številna jedra ne zrastejo dovolj, da bi postala stabilna, zato se raztopijo. Če pa jedro zraste do kritične velikosti, postane stabilno tudi v povprečnih pogojih in pozneje zraste v kristal. Slika 3 prikazuje diagram proste energije jedrenja. Kritični polmer je meja, ko z rastjo jedra prosta energija začne padati, kar je energetsko ugodno in je nadaljnja rast posledično spontan proces. Pri velikostih, manjših od kritičnega polmera pa je rast jedra energetsko neugodna, zato se jedra raztopijo. S tem lahko razložimo tudi obstoj metastabilnega območja pri prenasošinih raztopinah.



Slika 3: Diagram proste energije jedrenja

Velikost kritičnega polmera (r_c) lahko zapišemo z enačbo 5 (11):

$$r_c = \frac{2\gamma v}{kT \ln S} \quad \text{enačba 5}$$

kjer je γ medfazna napetost med površino jedra in kristalizacijskim topilom, v molski volumen topljenca in k Boltzmannova konstanta. Prav tako predpostavimo, da je jedro popolna krogla. Iz tega je razvidno, da so za manjši kritični polmer (bolj ugodno za jedrenje) bolj ugodni večje prenasíčenje, višja temperatura in manjša medfazna napetost.

Hitrost jedrenja (J) je število jeder, ki se ustvarijo na enoto časa na enoto volumna. Lahko jo opišemo z enačbo 6 (11):

$$J = Ae^{-\frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3k^3 T^3 (\ln S)^2} + \frac{\Delta G'}{kT}} \quad \text{enačba 6}$$

kjer je A predeksponentni faktor in $\Delta G'$ aktivacijska energija za molekulsko gibanje do nastajajočega jedra. Pri normalni viskoznosti medija prevladuje prvi eksponentni člen, kar pomeni, da so za višjo hitrost jedrenja bolj ugodni večje prenasíčenje, višja temperatura in manjša medfazna napetost. Hitrost jedrenja pa se z večanjem prenasíčenja ne viša v nedogled, saj je na določeni točki viskoznost medija tako velika (zelo velik $\Delta G'$), da je oteženo gibanje molekul do nastajajočega jedra in posledično začne hitrost jedrenja padati. V enačbi 6 vidimo, da je ob velikem prenasíčenju prvi eksponentni člen zelo majhen in posledično postane dominanten drugi eksponentni člen, kar privede do nižje hitrosti jedrenja (11).

1.1.3. Rast kristalov

Takoj po nastanku stabilnih kristalnih jeder začnejo ti rasti v kristale vidnih velikosti (11). Rast kristalov skupaj z jedrenjem pomembno vpliva na velikost, porazdelitev velikosti, čistost in morfologijo kristalov. Med rastjo kristalov poteka več procesov, ki jih razlagajo številne teorije, zaradi kompleksnosti pa ni še nobena uveljavljena kot najbolj pravilna. Najbolj verjetno je, da je možnih več različnih možnosti in kombinacij procesov, ki so odvisne od pogojev kristalizacije, topila in snovi, ki kristalizira. Vseeno lahko kristalno rast v grobem razdelimo na prenos gradnikov (molekul topljenca) do kristala in vgradnje v kristalno rešetko. Oboje vpliva tudi na hitrost rasti kristala, ki jo lahko merimo s spremembo dolžine določene dimenzije kristala (linearna rast) ali s spremembo mase kristala na enoto časa (8,11). Procesni parametri, ki vplivajo na hitrost rasti kristala, so stopnja prenasíčenja, temperatura, hitrost mešanja (vpliva na prenos gradnikov do kristala) in prisotnost nečistot. Kot že omenjeno, obstaja več teorij rasti kristalov, ki jih lahko združimo v tri skupine (11,12):

- Teorije površinske napetosti, ki predpostavljajo, da je oblika rastočega kristala posledica iskanja najnižjega energetskega stanja. Te teorije se sicer vedno bolj opuščajo.
- Difuzijske teorije, ki trdijo da je omejujoč dejavnik kristalne rasti difuzija topljenca do površine kristala.
- Adsorpcijske teorije, ki trdijo, da je vključitev molekule topljenca na površino kristala proces, ki najbolj vpliva na hitrost kristalne rasti.

1.2. SFERIČNA KRISTALIZACIJA

Sferična kristalizacija (ang. »spherical crystallization«; SC) je proces, s katerim med kristalizacijo pridobimo večje, sferične kompaktne delce, imenovane sferični aglomerati (3). Prva sta koncept leta 1974 razvila Kawashima in Capes (13), kot novo tehniko za izboljšanje fizikalnih lastnosti kristalnega praška. Z njo lahko pripravimo delce, z izboljšanimi pretočnimi lastnostmi in dobro stisljivostjo, kar sta najpomembnejši lastnosti tabletirne zmesi za uspešno tabletiranje. Prednosti in slabosti metode so našteje v preglednici I. V sistemu hkrati potekajo nastanek in rast kristalov ter aglomeracija le-teh (14). Proces rasti sferičnih aglomeratov lahko razdelimo na štiri zaporedne stopnje, ki so: območje flokulacije (ang. »flocculation zone«), območje ničte rasti (ang. »zero growth zone«), območje hitre rasti (ang. »fast growth zone«) in območje konstantne velikosti (ang. »constant size zone«). V območju flokulacije vezivna tekočina izpodrine tekočino na površini nastalih kristalov in jih s tvorbo pendularnih tekočinskih mostičkov poveže v rahle flokule. V območju ničte rasti se rahli flokuli preoblikujejo v tesno zbite aglomerate, pri čemer se iz flokulov iztisne preostala tekočina. Tako na površini aglomeratov in v porah ostane le vezivna tekočina. Gonilna sila preoblikovanja so strižne sile, povzročene z mešanjem, ki povzročajo trke peleta-peleta in peleta-mešalo. Območje ničte rasti je stopnja, ki določa hitrost procesa in jo lahko nadzorujemo s hitrostjo mešanja. Temu sledi območje hitre rasti, ko se nastali aglomerati združujejo ob trkih (koalescenca). Pogoji za uspešno združitev je dovolj vezivne tekočine na površini aglomeratov. V območju konstante velikosti sferični aglomerati prenehajo rasti ali pa se njihova velikost malo zmanjša. Razlog je v vzpostavitvi ravnotežja med koalescenca in razpadom sferičnih aglomeratov, ki poteka zaradi strižnih sil v sistemu (1,15).

Preglednica I: Prednosti in slabosti sferične kristalizacije

Prednosti	Slabosti
• izboljšanje pretočnih lastnosti delcev, zaradi sferičnih delcev. (3,15–17) • izboljšana kompaktilnost in kompresibilnost delcev (3) • možnost vpliva na profil sproščanja (3) • relativno hitra in enostavna izvedba (3,16) • možnost prekrivanja okusa (15,18) • možnost združitve več procesov (sinteza, kristalizacija, ločevanje, aglomeracija) v en proces (16) • lahko se uporabi tudi za pripravo mikrospužev (ang. »microsp sponge«), mikrosfer, nanosfer, nanodelcev in mikropolet (18)	• trenutno še ni dovolj sistematičnega znanja o vseh procesih, ki potekajo, kar pomeni vsaj delni razvoj z metodo poskusov in napak (5) • težavna izbira primernih topil (18) • težavna optimizacija procesnih parametrov (18) • velika poraba organskih topil (19)

Proces sferične kristalizacije poteče pri pravih eksperimentalnih pogojih (sestava topila, temperatura sistema, stopnja prenasajenja, hitrost mešanja) (3). V preglednici II so naštetih vplivi različnih procesnih parametrov na lastnosti dobljenih sferičnih aglomeratov, ki so bili ugotovljeni v preteklih raziskavah. V oklepaju so zapisane metode sferične kristalizacije, pri katerih je bil omenjen vpliv opažen.

Preglednica II: Vpliv procesnih parametrov na lastnosti sferičnih aglomeratov.

Procesni parameter	Vpliv na lastnost sferičnih aglomeratov
Hitrost mešanja	Z večanjem hitrosti mešanja se zaradi večjih strižnih sil viša hitrost rasti in manjša velikost delcev. Prav tako nastajajo manj porozni aglomerati, ki so bolj odporni proti mehanskim obremenitvam. (SC, SA, QESD) (1,13,15–17,20,21). Pri nižjih hitrostih mešanja lahko nastajajo bolj nepravilne sfere. (SC) (1) Pri višjih hitrostih mešanja nastajajo manjši delci, bolj nepravilnih oblik. (QESD) (14) S hitrejšim mešanjem se poveča nasipna gostota. (QESD) (17)

T₁ - T₂ (T₁ = temperatura raztopine substance; T₂ = temperatura netopila)	Večja je razlika, manjši aglomerati nastajajo. (SA) (16) Razmerje vpliva na obliko in strukturo. (QESD) (14) Manjša je razlika, hitrejši je masni transport topil, pride tudi do večjih aglomeratov. Prav tako je skorja votlih sferičnih aglomeratov bolj debela, sferični aglomerati so posledično bolj gosti. (QESD) (20) Pri nižji razliki so ploskve kristalov v delcih zaznavne, pri višji pa so ploskve poševne in neorganizirane. (QESD) (20)
Količinsko razmerje med topilom in netopilom	Več je topila, manjšo nasipno gostoto imajo aglomerati. Razlog je v tem, da so aglomerati večji in bolj podolgovati, kar jim daje slabše pretočne lastnosti. (SA) (22) Več je topila, večji kristali nastajajo in sferični aglomerati so bolj kristalinični. Posledično se zniža hitrost raztapljanja. (SA) (22) Več je topila, manjši delci nastajajo, ker je difuzija topil zaradi boljšega mešanja topil hitrejša (QESD) (17) Več je topila, večji delci nastajajo, sferičnost je manjša, nastaja tudi več nevtlih sferičnih aglomeratov, ki so vedno bolj gosti. Razlog za nasproten učinek deleža topila na velikost delcev med tem in zgornjim primerom bi lahko bil v drugačni izbiri topila in netopila (pri tem primeru se topilo in netopilo mešata v vseh razmerjih, pri zgornjem pa ne, zato je pri tem primeru difuzija pri večjem deležu topila počasnejša, saj jo določa razlika v koncentraciji topil in ne hitrost mešanja) (QESD) (20) Več je topila, večji delci nastajajo, ker topilo deluje kot vezivo. Prav tako so delci bolj sferični, a je vpliv mali. Posledično se izboljšujejo tudi pretočne lastnosti, na neki točki večanja količine dobrega topila pa se začnejo poslabševati, ker so površine delcev vedno bolj hrapave. (CCA) (23)
Temperatura sistema	Vpliva na obliko, velikost in teksturo sferičnih aglomeratov. (SC) (21) Pri nižjih temperaturah nastajajo večji delci. (SC) (1)
Količina dodanega emulgatorja	Emulgatorji preprečujejo preveliko koalescenco in posledično dobimo manjše delce. V kolikšni meri preprečujejo koalescenco,

	je odvisno od vrednosti HLB (želimo, da je čim bližje substanci, ki kristalizira in aglomerira). Vpliv ima tudi lipofilnost netopila. Koalescenco bolje preprečujejo emulgatorji z manjšo molsko maso, ker hitreje difundirajo do površine aglomeratov. (QESD) (5) Dodan emulgator zmanjšuje izkoristek. Razlog je povečana topnost in večje lepljenje na stene zaradi lepljivega polimernega ovoja. (QESD) (5) Z visokim deležem emulgatorja nastajajo večji delci, ki imajo nižjo nasipno gostoto. (QESD) (20) Pri večjih koncentracijah emulgatorja nastajajo večji delci, s širšo porazdelitvijo velikosti. (QESD) (24)
Količina vezivne tekočine	Manj je vezivne tekočine, manjši so aglomerati. (SA) (16) Če je vezivne tekočine premalo, aglomeracija ne poteče, če je je preveč, nastajajo kepe. (QESD) (14) Če se doda vse naenkrat, nastanejo kristali nepravilnih oblik, če se dodaja postopoma pa nastanejo sferični aglomerati (QESD) (14) Več kot je dodanega polimera (PEG), večji delci nastajajo, ker lahko PEG deluje kot vezivo. Prav tako so delci bolj sferični, ker se PEG adsorbira na površino aglomeratov in kontrolira oz. blokira rast kristalov. (CCA) (23)
Čas procesa	Vpliva na odpornost sferičnih aglomeratov na mehanski stres. (SC) (21) Dlje kot proces traja, večji delci nastajajo. (SC, QESD) (1,24) Če proces prekinemo prehitro, ne nastanejo sferični aglomerati. (QESD) (14)
Velikost kapljice nasičene raztopine	Povprečna velikost delca sovpada z velikostjo kapljice nasičene raztopine. Velikost kapljice je odvisna od polmera kapilare, kar pomeni, da večji kot je polmer kapilare, večji so dobljeni delci (QESD) (20,25)

Hitrost dodajanja raztopine substance v netopilo	Nasipna in zbita gostota se zmanjšujeta z večjo hitrostjo dodajanja. (QESD) (20)
Koncentracija substance v dobrem topilu	Ko se zniža, se zmanjša delež primarnih kristalov (QESD). (20)

Najpogostejši metodi sferične kristalizacije sta sferična aglomeracija (ang. »spherical agglomeration«; SA) in difuzija topila iz kvaziemulzije (ang. »quasi-emulsion solvent diffusion«; QESD). Pri obeh procesih imamo dobro in slabo topilo oz. netopilo. Dobro topilo raztopi spojino, ki jo želimo sferično kristalizirati, netopilo pa zmanjša topnost topljenca in povzroči prenasíčenje (3). Ostali tehniki sferične kristalizacije sta še kristalo-ko-aglomeracija (ang. »crystal-co-agglomeration«; CCA) in sistem z difuzijo amonijaka (ang. »ammonia diffusion system«), ki sta redkeje uporabljeni izpeljanki prvih dveh (3).

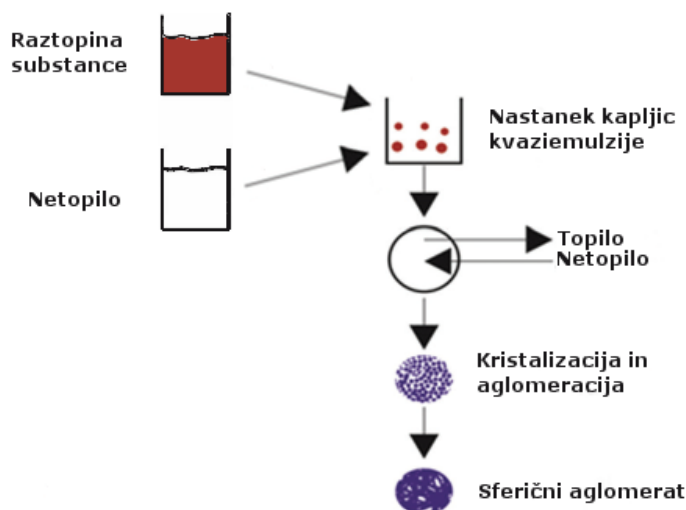
1.2.1. Sferična aglomeracija

V procesu sferične aglomeracije najprej raztopimo izbrano spojino v dobrem topilu, dobljeno raztopino pa nato postopno dodajamo v netopilo, ki se mora mešati z dobrim topilom. Afiniteta med obema topiloma mora biti večja kot afiniteta med dobrim topilom in izbrano spojino, kar omogoči hiter nastanek prenasíčenja in takojšnjo precipitacijo kristalov. Dodamo še vezivno tekočino (ang. »bridging liquid«), ki deluje kot vezivo in spodbuja aglomeracijo. Veže po mehanizmu tvorbe tekočinskih mostičkov, ki nastanejo zaradi kapilarnih sil in medfazne napetosti med trdno in tekočo fazo. Pri tem je pomembno, da se vezivna tekočina ne meša z netopilom in da dobro moči nastale kristale. (3)

1.2.2. Difuzija topila iz kvaziemulzije

Pogoj za to metodo je, da so interakcije med izbrano spojino in dobrim topilom večje, kot interakcije med dobrim topilom in netopilom. V postopku najprej raztopimo izbrano spojino v dobrem topilu, dobljeno raztopino pa postopoma dispergiramo v netopilo, kjer nastajajo kvaziemulzijske kapljice, kljub temu da se lahko dobro topilo in netopilo mešata. Razlog za nastanek nestabilne emulzije so velike medfazne napetosti med dobrim topilom in netopilom. Dobro topilo postopoma difundira iz kapljic v netopilo, hkrati pa netopilo difundira v kapljice, kjer zniža topnost spojine in povzroči prenasíčenje, kar privede do kristalizacije

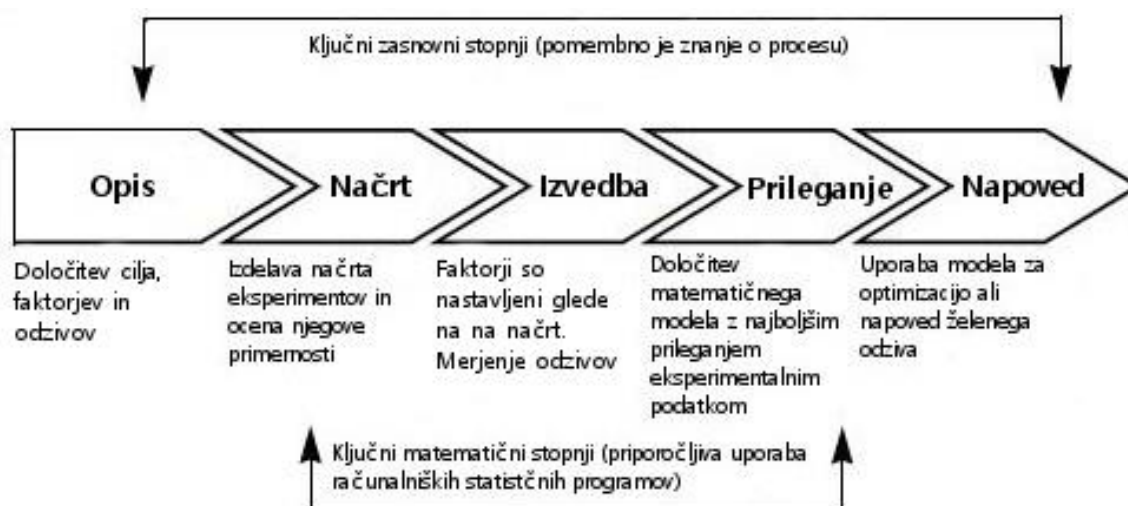
spojine v kapljici (slika 4). Poleg masnega transporta topil prenasíčenje povzroča tudi toplotni transport (20). Zaostanek dobrega topila v kapljici deluje kot vezivna tekočina, ki nastale kristale veže v aglomerat. Če je potrebno, lahko v sistem dodamo emulgator, ki zagotavlja potrebno stabilnost kvaziemulzije za ustrezno difuzijo netopila v dispergirane kapljice. (3)



Slika 4: Proces difuzije topila iz kvaziemulzije

1.3. NAČRTOVANJE EKSPERIMENTOV

Načrtovanje eksperimentov je proces načrtovanja, oblikovanja in analiziranja eksperimentov, z namenom uspešnega in učinkovitega pridobivanja veljavnega ter objektivnega rezultata (26). Za izboljšavo procesov in zagotavljanje stalne kakovosti produkta je nujno razumevanje vpliva glavnih procesnih parametrov (faktorjev) na lastnosti končnega produkta (odzivi). Pri tem nam je DOE lahko v veliko pomoč kot zelo uporabna statistična metoda, ki jo lahko uporabljamo pri odkrivanju novih procesov ali pri izboljšanju razumevanja že obstoječih procesov. Temu lahko sledi še optimizacija, s katero dosežemo najboljšo možno učinkovitost procesa. DOE je tako lahko koristno orodje pri razvoju izdelkov z vgrajeno kakovostjo (ang. »Quality by Design«). Glavna prednost DOE-a pred alternativno metodo poskusov in napak je, da običajno pridemo do želenih in kvalitetnih informacij z manj poskusi, s čimer privarčujemo čas in denar (26). Na sliki 5 je prikazan splošni postopek DOE-a.



Slika 5: Splošni postopek DOE-a

V uporabi so številni tipi eksperimentalnih načrtov, osredotočili pa se bomo na dokončni presejalni načrt.

1.3.1. Dokončni presejalni načrt

DSD spada med presejalne načrte, ki se uporabljajo predvsem na začetku eksperimentalnega dela za določanje faktorjev, ki imajo največji učinek na merjen odziv (7). DSD sta leta 2011 predstavila Jones in Nachtsheim (27). Gre za majhen načrt (vsebuje malo število eksperimentov za študijo relativno veliko faktorjev), ki omogoča nedvoumno določitev aktivnih glavnih učinkov (ang. »main effect«), aktivnih kvadratnih učinkov (ang. »quadratic effect«) in aktivnih dvofaktorskih interakcij (ang. »two-factor interactions«) v prisotnosti zmernega principa redkosti učinka (ang. »sparsity of effects«) (27). Uporabljamo ga lahko za vse kombinacije zveznih (ang. »continuous«) ali opisnih (ang. »categorical«) faktorjev na dveh nivojih, najbolj učinkovit pa je, ko imamo večino zveznih faktorjev. Načrt je zasnovan na treh nivojih zveznih faktorjev, kar nam omogoča tudi določitev kvadratnih učinkov. Če so vsi faktorji zvezni, lahko število eksperimentov (N) izračunamo po enačbi 7 za sodo število faktorjev (p) in po enačbi 8 za liho število faktorjev (7). V primeru, da imamo prisotne tudi opisne faktorje, se število eksperimentov poveča za 1 (28).

$$N = 2p + 1 \quad \text{enačba 7}$$

$$N = 2p + 3 \quad \text{enačba 8}$$

Načrt pri zasnovi uporablja konferenčne matrike (ang. »conference matrices«) (29). Predpogoj, da metoda deluje, je sodo število faktorjev. Če je število faktorjev p v raziskavi liho, uporabimo konferenčno matriko za $p + 1$ faktorjev in zberemo zadnji stolpec. Struktura

DSD-ja za 12 faktorjev je prikazana na sliki 6. Če želimo imeti randomiziran načrt, je treba vrstice naključno premešati (29). Priporočljivo je tudi dodajanje dodatnih eksperimentov (ang. »Extra Runs«; ER) v načrt, saj lahko samo z nekaj dodatnimi eksperimenti z veliko verjetnostjo določimo veliko več učinkov, prav tako pa lahko izračunamo tudi varianco brez ponavljanja centralnih eksperimentov (7,30). Dodatni eksperimenti so ustvarjeni s pomočjo navideznih faktorjev (ang. »fake factors«). Postopek je podoben kot pri ustvarjanju načrta za liho število faktorjev. Za vsak dodan navidezni faktor sta v načrt dodana dva dodatna eksperimenta. Omeniti je treba še, da so načrti za 4 ali manj faktorjev oblikovani po osnovi načrta za 5 faktorjev. Razlog je v slabši ločljivosti učinkov drugega reda (7,27).

	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	x_{11}	x_{12}
C	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
	1	1	-1	0	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
	1	1	-1	-1	0	1	-1	1	1	1	-1	-1
	1	1	1	-1	-1	0	1	1	-1	-1	1	-1
	1	-1	-1	1	1	-1	0	1	1	-1	1	-1
	1	1	1	1	-1	-1	-1	0	1	-1	-1	1
	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0	1	1	-1
	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	0	-1	1
	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0	1
	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	0
-C	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	-1	0	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
	-1	-1	0	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
	-1	-1	1	0	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1
	-1	-1	1	1	0	-1	1	-1	-1	-1	1	1
	-1	-1	-1	1	1	0	-1	-1	1	1	-1	1
	-1	1	1	-1	-1	1	0	-1	-1	1	-1	1
	-1	-1	-1	-1	1	1	1	0	-1	1	1	-1
	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	0	-1	-1	1
	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0	1	-1
	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0	-1
	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Slika 6: Strukura DSD-ja (D) za 12 faktorjev

DSD je alternativa standardnim presejalnim načrtom (ang. »Standard Screening Designs«; SSD), med katerimi sta pogosto uporabljena delni faktorski načrt (ang. »fractional factorial design«) in Plackett-Burmanov načrt (ang. »Plackett-Burman design«) (27). Glavne prednosti DSD-ja pred SSD-ji so prikazane v preglednici III:

Preglednica III: Glavne prednosti DSD-ja pred SSD-ji (7):

	DSD	SSD
Med glavnimi učinki in dvofaktorskimi interakcijami ni mešanja	Vedno	Velja samo za načrte z ločljivostjo IV ali višje
Med glavnimi učinki in kvadratnimi učinki ni mešanja	Vedno	Kvadratnih učinkov ne moremo določiti
Med dvema dvofaktorskima interakcijama ni popolnega mešanja	Vedno, lahko pa sta v korelaciji	Velja samo za načrte z ločljivostjo V ali višje
Med dvofaktorskimi interakcijami in kvadratnimi učinki ni popolnega mešanja	Vedno, lahko pa sta v korelaciji	Kvadratnih učinkov ne moremo določiti
V modelu, ki vsebuje samo glavne in kvadratne učinke, lahko določimo vse kvadratne učinke	Vedno	Nikoli

Kot je razvidno iz preglednice III, je lahko pri SSD-jih pogosto prisotno mešanje (ang. »confounding«). Mešanje pomeni, da med seboj ne moremo razločiti dveh učinkov (npr. glavnega učinka faktorja med učinkom dvofaktorske interakcije) na merjen odziv. Stopnjo mešanja opisuje ločljivost (26). Če so učinki, ki jih ne moremo razločiti, precej veliki, so potrebni dodatni eksperimenti, kar je lahko časovno in finančno potratno. Pri DSD-ju se temu izognemo. Mešanje je sicer pri SSD-jih z višjo ločljivostjo manj pogosto, a se z višanjem ločljivosti hitro veča tudi število eksperimentov (7).

Zvezni faktorji imajo pri SSD običajno samo dva nivoja (nižji in višji), bolje pa bi bilo, da bi imeli tri nivoje (nižji, srednji in višji), kot jih imajo pri DSD-ju. Težava faktorjev z dvema nivojema je, da ne morejo zaznati nelinearnosti, ki je v realnosti pogosta. Sicer se lahko doda centralne točke, s katerimi je možno nelinearnost zaznati, še vedno pa ne moremo določiti faktorjev, ki so za nelinearnost odgovorni (ne moremo določiti kvadratnih učinkov) (7).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je poglobitev znanja in razumevanja o procesu sferične kristalizacije. To bomo storili s pristopom načrtovanja eksperimentov, s pomočjo katerih želimo čim boljše ovrednotiti vpliv posameznih procesnih parametrov sferične kristalizacije (koncentracija raztopine laktoze (Konc. lakt), volumsko razmerje med netopilom in celotnim sistemom (V razmerje), temperatura kristalizacijskega sistema (Temp.), hitrost dodajanja raztopine laktoze v netopilo ($v(\text{dod})$), hitrost mešanja ($v(\text{meš})$), čas mešanja po celotnem dodatku raztopine laktoze ($t(\text{dod.meš.})$) na lastnosti dobljenih sferičnih aglomeratov laktoze (velikost, porazdelitev velikosti, oblika, pretočne lastnosti, specifična površina in morfologija).

Uporabili bomo metodo dokončnega presejalnega načrta. Želimo dobiti statistični model s čim boljšo napovedno vrednostjo, s katerim bi lahko napovedali vrednosti procesnih parametrov za izdelavo sferičnih aglomeratov laktoze z želenimi lastnostmi, ki so lahko potencialno uporabni v farmacevtski industriji.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge so bili uporabljeni naslednji materiali:

- Laktoza NF 200 mesh, FrieslandCampina, Nizozemska
- 100 % aceton, Merck, Nemčija
- 96 % etanol, Merck, Nemčija
- 100 % izopropanol, Merck, Nemčija
- Filter za filtracijo, Sartorius Stedim 388, Sartorius, Nemčija
- Prečiščena voda

3.2. APARATURE

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge so bile uporabljene naslednje aparature:

- pretočna črpalka, notranji premer cevke 2 mm, IKA, Nemčija
- termostat, Julabo F12-ED, Nemčija
- mehansko mešalo, IKA Eurostar power control-visc P1, Nemčija
- turbinsko mešalo (4 lopatice, premer mešala = 5 centimetrov, naklon lopatic = 30°, širina lopatic = 7 mm)
- grelnik z magnetnim mešalom, IKA RCT basic, Nemčija
- analizna tehtnica, A&D GH-300 (320 g; 0,1 mg), Japonska
- tehtnica, Kern PFB (1200 g; 0,01 g), Nemčija
- 1000 mL čaša, premer dna 10 cm
- sistem za vakuumsko filtracijo, Sartorius, Nemčija
- laboratorijski sušilnik SP-45, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
- sejalna sita (1,14 mm, 1 mm, 800 μ m, 500 μ m, 250 μ m, 200 μ m, 80 μ m), Retsch, Nemčija
- naprava za določanje zbitega volumna, VanKel model 50-1100, ZDA
- plastični 100 mL merilni valj za določanje zbitega volumna (notranji premer = 28 mm, višina do oznake 100 mL = 17,7 mm)

- svetlobni mikroskop, Olympus SZX12, Japonska
- fotoaparat na svetlobnem mikroskopu, Olympus XC50, Japonska
- laserski difraktor, Malvern Mastersizer S, Velika Britanija
- termo-gravimetrična tehtnica, Büchi moisture analyser B-302, Švica
- vrstični elektronski mikroskop SEM Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija
- naprava za analizo specifične površine praškov (Micromeritics TriStar 3000, USA
- helijev piknometar, AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA

3.3. METODE DELA

3.3.1. Sferična kristalizacija

Postopek sferične kristalizacije smo priredili glede na predhoden postopek, razvit v našem laboratoriju (4). Gre za metodo difuzije topila iz kvaziemulzije. Predpisano maso laktoze smo raztopili v čaši med segrevanjem v predpisanem volumnu prečiščene vode. Raztopino smo celoten čas eksperimenta mešali z magnetnim mešalom. V 1000 mL čašo smo vlili predpisano količino netopila in čašo namestili v termostat, ki je vzdrževal želeno temperaturo. V čašo smo na predpisano višino namestili še mehansko mešalo s turbinskim nastavkom, ki smo ga nastavili na želeno hitrost vrtenja. Raztopino laktoze smo v čašo z netopilom dodajali pri temperaturi 65 – 75 °C. Po vsej dodani raztopini laktoze smo dodatno mešali še predpisan čas, nato pa smo proces ustavili in suspenzijo vakuumsko filtrirali. Dobljene sferične aglomerate smo sušili na pladnju v laboratorijskem sušilniku (Kambič SP-45) približno 105 minut pri 40 °C. Pred meritvijo fizikalnih lastnosti smo delce ročno presejali skozi sito 1000 µm, da smo ločili med seboj sprijete delce. Preostanek na situ smo pri izračunu izkoristka upoštevali, pri nadaljnjih meritvah preostanka na situ nismo upoštevali.

3.3.1.1. Proučevanje vpliva različnih netopil

Najprej smo izvedli sferično kristalizacijo pod enakimi pogoji (zaradi težav s pretočno črpalko nam je sicer variirala hitrost dodajanja raztopine laktoze v netopilo) v različnih netopilih in primerjali lastnosti nastalih sferičnih aglomeratov. Pogoje smo povzeli po literaturi, kjer so izvajali sferično kristalizacijo v 96 % etanolu (4). Vrednosti procesnih parametrov in izbira netopil so prikazani v preglednici IV.

Preglednica IV: Vrednosti procesnih parametrov pri eksperimentih z različnimi netopili

Procesne spremenljivke	100 % izopropanol	96 % etanol	100 % Aceton	96 % aceton
m(laktoza) [g]	50	50	50	50
V(prečiščena voda) [mL]	220	220	220	220
V(netopilo) [mL]	500	500	500	500
Temperatura KS-ja [°C]	10	10	10	10
Hitrost dodajanja raztopine laktoze v netopilo [mL/min]	4,2	3,6	3,3	1,8
Hitrost mešanja [obratov/min]	350	350	350	350
Položaj mešala nad dnem [cm]	4,5	4,5	4,5	4,5
Čas mešanja po celotnem dodatku raztopine laktoze [min]	30	30	30	30

3.3.2. Laserska difrakcija

Sferičnim aglomeratom smo z lasersko difrakcijo (Malvern Mastersizer S) izmerili premere D10, D50 in D90. D10/D50/D90 pomeni premer delca, od katerega ima manjši premer 10/50/90 % delež delcev v merjenem vzorcu. Iz pridobljenih podatkov smo po enačbi 9 izračunali tudi porazdelitev velikosti delcev (PSD). Nižja, kot je dobljena vrednost, ožja oz. bolj enakomerna je porazdelitev. V mokro celico za analizo vzorca smo nalili izopropanol do ustrezne višine in vanj vsuli primerno količino vzorca. Mešalo v mokri celici za analizo vzorca smo nastavili na 1500 obratov na minuto. Kot gostoto laktoze smo vnesli vrednost 1,55 g/mL, za refrakcijski indeks laktoze vrednost 1,356, za izopropanol pa 1,33. Po minuti dispergiranja vzorca smo izmerili iskane vrednosti. Za vsak vzorec smo izmerili 3 meritve in izračunali povprečje.

$$PSD = \frac{D90 - D10}{D50} \quad \text{enačba 9}$$

3.3.3. Pretočne lastnosti

Delcem smo najprej določili nasipno (ρ_{nas}) in zbito gostoto (ρ_{zbi}). Znano maso vzorca smo s pomočjo prepognjenega lista papirja počasi pod kotom vsuli v plastični 100 mL merilni valj. Pri tem smo pazili, da postopek poteka s čim manj tresljaji. Nasipni volumen (V_{nas}) smo odčitali na 0,5 mL natančno. Nato smo merilni valj postavili v napravo za določanje zbitega volumna (VanKel model 50-1100) in ga stresali s 1250 udarci s hitrostjo 250 udarcev/min. Po stresanju smo odčitali zbiti volumen (V_{zbi}) na 0,5 mL natančno. Meritve vsakega vzorca smo izvedli v treh ponovitvah in izračunali povprečje. Iz pridobljenih podatkov smo po enačbah 10 in 11 izračunali nasipno in zbito gostoto ter po enačbi 12 (31) Hausnerjevo razmerje.

$$\rho_{nas} = \frac{m}{V_{nas}} \quad \text{enačba 10}$$

$$\rho_{zbi} = \frac{m}{V_{zbi}} \quad \text{enačba 11}$$

$$HR = \frac{\rho_{zbi}}{\rho_{nas}} \quad \text{enačba 12}$$

3.3.4. Izguba po sušenju

Za določanje izgube vlage po sušenju smo uporabili termo-gravimetrično tehtnico (Büchi moisture analyser B-302). Natehtali smo 1-2 grama posameznega vzorca in 15 minut sušili pri 85 °C. Med sušenjem topilo izhlapeva iz vzorca, kar zniža maso na tehtnici. Rezultat je bil prikazan kot odstotek znižane mase.

3.3.5. Svetlobna mikroskopija

Vsak vzorec smo pogledali pod svetlobnim mikroskopom (Olympus SZX12) v dveh nanosih. Vsak nanos smo po celotni površini pregledali pod 16-, 40- in 90-kratno povečavo. Pri vsaki povečavi smo s fotoaparatom, ki je bil povezan z mikroskopom (Olympus XC50), zajeli nekaj slik.

3.3.6. Slikovna analiza

Slike, zajete pod svetlobnim mikroskopom, smo analizirali s programsko opremo za slikovno analizo Fiji. Vse slike, ki smo jih analizirali, so bile zajete pod 40-kratno povečavo. Za vsak vzorec smo analizirali točno 100 delcev, pri čemer so bile uporabljene slike različnih

nanosov vzorca. Vsaka slika je bila v celoti pregledana, pri čemer smo iz analize odstranili vse delce, ki niso bili izolirani oz. ki so se z drugim delcem stikali ali prekrivali. Da smo se izognili analizi primarnih delcev, smo analizirali samo delce, ki so bili večji od $5000 \mu\text{m}^2$ ali od $7000 \mu\text{m}^2$ na določenih slikah. Program je po enačbah 13 in 14 (32) izmeril ter izračunal ovalnost in hrapavost vsakega posameznega delca. Rezultat za posamezen vzorec smo podali kot povprečno vrednost stotih izmerjenih delcev.

$$\text{Ovalnost} = 4 * \frac{S}{\pi * a^2} \quad \text{enačba 13}$$

pri čemer je S površina, a pa velika polos v elipsi, ki obkroža delec.

$$\text{Hrapavost} = \frac{S}{S_c} \quad \text{enačba 14}$$

pri čemer je S_c konveksna površina (površina, ki jo obsega konveksna ogrinjača).

3.3.7. Elektronska vrstična mikroskopija

Morfologijo sferičnih aglomeratov smo opazovali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Supra 35 VP, Carl Zeiss) in zajeli slike reprezentativnih delcev. Delci so bili naneseni na dvostranski ogljikov lepilni trak. Uporabljali smo 200-, 250- in 500-kratno povečavo pri pospeševalni napetosti 1,00 kV, delovna razdalja pa je variirala med 2,9 in 5,6 mm.

3.3.8. Prava gostota

Pravo gostoto izbranih sferičnih aglomeratov smo določili s helijevim piknometrom (AccuPyc 1330, Micromeritics). Prazno kalibrirano celico za vzorec smo napolnili do dveh tretjin z natančno znano maso vzorca. Helijev piknometer določi volumen vzorca v celici in nato na podlagi znane mase poda pravo gostoto vzorca. Pri vsakem vzorcu je piknometer izvedel iz tri meritve in izračunal povprečje.

3.3.9. Specifična površina

Izbranim vzorcem smo izmerili specifično površino po Brunauer-Emmett-Teller (BET) (33) metodi. Adsorpcijske in desorpcijske izoterme dušika smo pridobili pri temperaturi 77 K in relativnem tlaku med 0,03 in 0,3. Pred meritvijo so bili vzorci čez noč sušeni v sušilniku pri 90 °C.

3.3.10. Dokončni presejalni načrt

Pred izdelavo načrta smo s pomočjo literature in preliminarne eksperimentov določili 6 procesnih parametrov (faktorjev), katerih vpliv na fizikalne lastnosti sferičnih aglomeratov bomo preverjali (preglednica V). Prav tako smo določili maksimalne in minimalne vrednosti faktorjev, pri katerih še vedno v vsaki možni kombinaciji nastavljenih vrednosti dobimo sferične aglomerate (preglednica V). Nato smo postavili dokončni presejalni načrt s pomočjo statistične programske opreme JMP 13 (preglednica VI).

Preglednica V: Izbrani faktorji in njihove ekstremne vrednosti

Faktor	-1	0	1
Koncentracija laktoze v raztopini laktoze [g/ml raztopine]	0,2	0,25	0,3
Volumsko razmerje med netopilom in celotnim KS-jem	0,3	0,5	0,7
Temperatura KS-ja [°C]	5	15	25
Hitrost dodajanja raztopine laktoze v netopilo [mL/min]	2,1	5,9	9,7
Hitrost mešanja [obratov/min]	300	550	800
Čas mešanja po celotnem dodatku raztopine laktoze [min]	40	80	120

Preglednica VI: Dokončni presejalni načrt

Eksperiment	Konc. lak. [g/mL]	V razmerje	Temp [°C]	v(dod) [mL/min]	v(meš) [obraci/min]	t(dod. meš) [min]
DSD001	0,2	0,3	5	9,7	300	120
DSD002	0,2	0,7	15	2,1	300	120
DSD003	0,3	0,5	25	9,7	300	120
DSD004	0,3	0,7	5	9,7	300	40
DSD005	0,25	0,3	5	2,1	300	40
DSD006	0,2	0,7	5	9,7	800	80
DSD007	0,2	0,7	25	5,9	300	40
DSD008	0,3	0,7	5	2,1	550	120
DSD009	0,3	0,3	25	2,1	300	80

DSD010	0,3	0,3	15	9,7	800	40
DSD011	0,3	0,7	25	2,1	800	40
DSD012	0,3	0,3	5	5,9	800	120
DSD013	0,2	0,3	25	2,1	800	120
DSD014	0,25	0,5	15	5,9	550	80
DSD015	0,2	0,5	5	2,1	800	40
DSD016	0,25	0,7	25	9,7	800	120
DSD017	0,2	0,3	25	9,7	550	40

Postavili smo naslednje pogoje kristalizacije, ki smo jih ohranjali pri vseh nadaljnjih eksperimentih. Končni volumen kristalizacijskega sistema (KS) je bil 750 mL, kot netopilo smo uporabili 95 % aceton. Zaradi različnih začetnih višin gladine netopila v KS, ki so posledica različnih volumskih razmerij, je bila želena končna višina mešala v nekaterih primerih neustrezna (nad začetno gladino netopila), zato smo morali začetno višino ustrezno prilagoditi (preglednica VII). Končna višina mešala je bila nastavljena na sredino višine gladine KS, saj so takrat strižne sile pri gladini in na dnu čaše primerljive.

Preglednica VII: Višina mešala glede na V razmerje

V razmerje	Višina mešala* na začetku eksperimenta [mm]	Višina mešala* po dodani celotni količini raztopine laktoze [mm]
0,3	22,2	50,5
0,5	36,3	50,5
0,7	50,5	50,5

* višina mešala je merjena od dna čaše, do najvišje točke mešala

Pri dobljenih sferičnih aglomeratih smo preverjali vpliv procesnih parametrov na naslednje odzive:

- Izkoristek
- D10
- D50
- D90

- Porazdelitev velikosti delcev
- Hausnerjevo razmerje (HR)
- Ovalnost (ang. »Roundness«)
- Hrapavost (ang. »Solidity«)

3.3.11. Analiza dokončnega presejalnega načrta

Literatura predlaga analizo dokončnega presejalnega načrta z metodo učinkovita izbira modela (ang. »effective model selection for DSDs«; EMS) ali postopna vključitvena regresija (ang. »forward stepwise regression«; FSR) (7,27,28,30). Ker EMS bolje izkoristi strukturo DSD-ja, je to metoda prvega izbora (7,30). V primeru, da je aktivnih učinkov manj kot polovica števila eksperimentov, sta prisotni največ dve dvofaktorski interakciji in največ en kvadratni učinek, pa je tudi FSR primerljiv (7). Ti pogoji so bili izpolnjeni pri večini naših odzivov (izjema je izkoristek).

Za vsako lastnost oz. odziv sferičnih aglomeratov laktoze smo rezultate meritev analizirali z obema metodama in ustvarili statistični model. Dobljene statistične modele smo analizirali in rezultate med seboj primerjali. Pri odzivih, kjer so rezultati analize namigovali na potrebo po transformaciji podatkov (slabo prileganje modela eksperimentalnim podatkom, vzorec lijaka pri analizi rezidualov, Box-Cox transformacija z vrednostjo best λ , ki ni blizu 1 (34)) smo le-te predhodno transformirali z ustrežno metodo (transformacija, ki popravi prileganje modela eksperimentalnim podatkom, dobimo ustrežno analizo rezidualov in Box-Cox transformacija ima vrednost best λ okoli 1) in jih prav tako z obema metodama analizirali in ustvarili ter analizirali statistični model. Rezultate analiz statističnih modelov smo na koncu med seboj primerjali in na podlagi tega izbrali najboljši statistični model za posamezen odziv. Izbrane modele smo na koncu uporabili tudi za optimizacijo izbranega odziva.

3.3.11.1. Učinkovita izbira modela

Analizo smo izvedli s programsko opremo JMP 13. Postopek smo povzeli po literaturi (7). Pri metodi EMS velja učinek dednosti (ang. »heredity effect«), kar pomeni, da v primeru, da je v model vključen učinek drugega reda (dvofaktorska interakcija ali kvadratni učinek), morajo biti v model vključeni tudi vsi učinki prvega reda, ki so vsebovani v učinkih drugega reda. Primer: Če je v model vključena dvofaktorska interakcija Konc. lakt.*Temp. morata biti v model vključena tudi glavna učinka Konc. lakt. in Temp. Metoda nam za vsak učinek

poda p-vrednost, ki je izračunana s pomočjo razmerja med oceno velikosti učinka in standardno napako ter s pomočjo prostostnih stopenj za napako. Aktivni učinki so vsi, ki imajo p-vrednost nižjo od mejne vrednosti 0,05. Iz izbranih učinkov smo izločili vse učinke, ki so imeli p-vrednost večjo kot 0,05 (razen določenih glavnih učinkov zaradi učinka dednosti) in iz preostalih učinkov naredili statistični model. (7).

3.3.11.2. Postopna vključitvena regresija

Analizo smo izvedli s programsko opremo JMP 13. Pogoje za izvedbo smo povzeli po literaturi (7). Za *Stopping Rule* smo izbrali *Minimum AICc*, za *Rules* pa *Combine*. S *Stopping Rule* določimo kriterij, po katerih se izbere model. V primeru, ko izberemo *Minimum AICc*, se v model vključijo učinki z najnižjo vrednostjo Akiake informacijskega kriterija s korekcijo (ang. »Akaike information criterion with correction«; AICc), ki je kazalec, ki se uporablja za primerjavo kvalitete statističnih modelov (nižji kot je, boljši je model) (35,36). Možnost *Combine* pomeni, da velja učinek dednosti. Metoda nam za vsak učinek poda tudi p-vrednost, ki predstavlja stopnjo značilnosti, pridobljeno s f-testom z ničelno hipotezo. Ničelna hipoteza pravi, da je resnična vrednost učinka enaka 0, alternativna hipoteza pa, da resnična vrednost učinka ni enaka 0 in je torej učinek aktiven. p-vrednosti ne smemo jemati kot čisto točne stopnje značilnosti, ker podatki nimajo F-porazdelitve. Kljub temu literatura FSR priporoča kot eno od metod za določanje aktivnih učinkov pri DSD-ju (37). Iz izbranih učinkov smo izločili vse učinke, ki so imeli p-vrednost večjo kot 0,05 (razen določenih glavnih učinkov zaradi učinka dednosti) in iz preostalih učinkov naredili statistični model.

3.3.11.3. Analiza statističnih modelov

Analizo statističnih modelov smo izvedli s programsko opremo JMP 13. Pri izbiri najboljšega modela smo želeli, da se izbran model čim bolj prilega eksperimentalnim podatkom in da je njegova analiza rezidualov čim bolj ustrezna, kar kaže na primernost izbranega modela. Vsak model smo analizirali grafično in numerično. Opravili smo naslednje analize (37):

- Test neskladnosti (ang. »lack of fit test«)
- Box-Cox transformacija (ang. »Box-Cox transformation«) (38)
- R^2

- Prilagojen R^2 (»ang. R^2 adjusted«) - poda nam oceno za prileganje modela eksperimentalnim podatkom. V idealnem modelu bi imel vrednost 1. Sicer gre za boljšo oceno prileganja modela kot R^2 , saj nima lažno višjih vrednosti na račun nesignifikantnih spremenljivk, ki so vključene v model.
- Povprečni odziv
- Koren srednje kvadratne napake (ang. »Root mean square error«; RMSE)
- Analiza variance (ANOVA) (39)
- AICc
- Bayesovski informacijski kriterij (ang. Bayesian information criterion; BIC) - podobno kot AICc, je tudi BIC kazalec, ki se uporablja za primerjavo kvalitete statističnih modelov. Nižji kot je, boljši je model (37,40))
- Durbin-Watson test (41,42)
- Graf dejanskih v odvisnosti od napovedanih vrednosti (ang. »Actual by predicted plot«)
- Graf rezidualov v odvisnosti od napovedanih vrednosti (ang. »Residual by predicted plot«)
- Studentizirani reziduali (ang. »Studentized residuals«)
- Graf rezidualov v odvisnosti od zaporedja eksperimenta (ang. »Residual by row plot«)
- Porazdelitev rezidualov
- Shapiro-Wilk-ov test normalnosti (SWT) (43)
- Normalni kvantilni graf za porazdelitev rezidualov (ang. »Normal quantile plot for residual distribution«) (44)

3.3.11.4. Optimizacija in preverjanje modela

Po izvedenem DSD-ju smo glede na rezultate analiz DSD-ja izvedli še tri eksperimente, s katerimi smo preverjali ustreznost izbranih modelov (preglednica VIII). Dva eksperimenta sta bila hkrati tudi optimizaciji (optimizacija 1 in 2). Pri optimizaciji 1 smo optimizirali samo izkoristek, pri drugem pa smo z enako pomembnostjo hkrati optimizirali izkoristek in D10

(želeli smo čim manjšega). Nastavljene vrednosti faktorjev za optimizacijo 1 in 2 (preglednica VIII) smo dobili s pomočjo programske opreme JMP 13.

Preglednica VIII: Nastavljene vrednosti faktorjev pri eksperimentih optimizacije

Eksperiment	Konc. lakt.	V razmerje	Temp	v(dod)	v(meš)	t(dod. meš)
Optimizacija 1*	0,239	0,7	5	5,9	550	80
Optimizacija 2*	0,255	0,7	5	5,9	800	40
Eksperiment 3*	0,29	0,4	20	7,8	450	40

Vrednosti, ki so v preglednici VIII zapisane ležeče, predstavljajo vrednosti faktorjev, za katere smo ugotovili, da signifikantno vplivajo na želen odziv. Pri eksperimentu optimizacija 1, smo nesignifikantne faktorje nastavili na srednje vrednosti, pri optimizaciji 2 pa smo faktor v(dod) nastavili na srednjo vrednost, t(dod.meš) pa na nižjo vrednost, da smo skrajšali čas celotnega procesa. Vrednosti faktorjev pri eksperimentu 3 smo določili tako, da so bile na drugi strani območja spreminjanja vrednosti faktorjev kot pri optimizaciji 1 in 2, saj smo tako lahko preverili pravilnost modelov pri čim bolj različnih vrednostih faktorjev.

3.3.12. Metoda glavnih komponent

Metoda glavnih komponent (ang. »Principal Component Analysis«; PCA) je statistična metoda, ki zmanjša število spremenljivk, pri čemer ohrani čim več variance, ki jo spremenljivke povzročajo (23). Z vpeljavo glavnih komponent nam omogoča lažjo grafično predstavitev podatkov in njihovo lažje razumevanje. PCA smo naredili s pomočjo programske opreme JMP 13, pri čemer smo uporabili metodo korelacije, ki nam standardizira podatke, kar je potrebno v našem primeru, ker imamo različne povprečne vrednosti vključenih spremenljivk (npr. 553 μm pri D90 in 0,74 pri ovalnosti) (45).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. IZBIRA NETOPILA

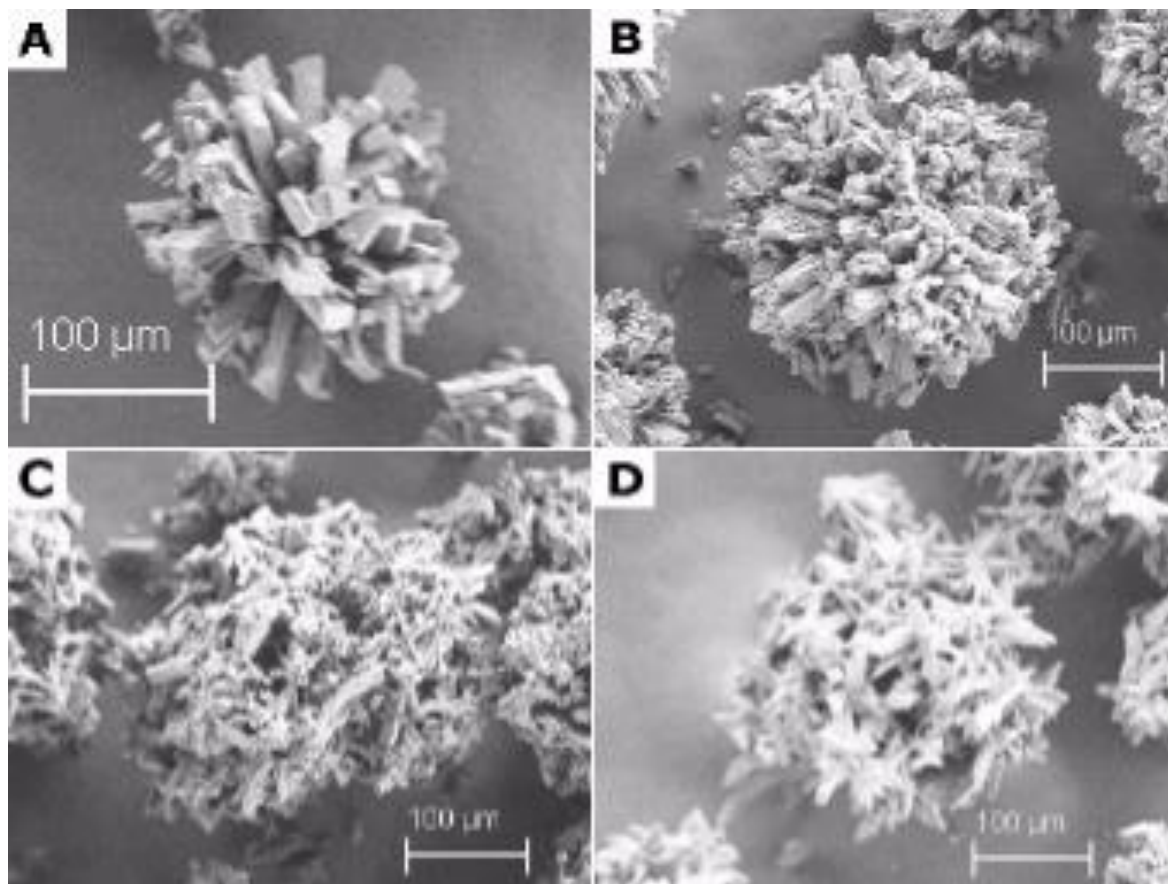
Netopilo pri procesu sferične kristalizacije vpliva na prenasičenje substance, ki kristalizira, možen pa je tudi vpliv na morfologijo in druge lastnosti sferičnih aglomeratov. Za netopila smo izbrali 96 % etanol, izopropanol, aceton in 96 % aceton. Razlogi za izbiro so bili, da se vsa izbrana netopila v vseh razmerjih mešajo z vodo (46), da je topnost laktoze v izbranih topilih zelo slaba in med seboj primerljiva (12,35,36) ter da so izbrana topila ena najpogostejše uporabljenih organskih topil v farmacevtski industriji, prav tako so po ICH Q3C smernicah (regulatorni dokument s smernicami za farmacevtsko industrijo) vsa uvrščena v III. skupino topil. To pomeni, da je dovoljena dnevna izpostavljenost teh topil največ 50 mg, prav tako so se topila pokazala kot manj strupena pri kratkotrajnih študijah in kot negativna pri genotoksičnih študijah. Ko so vsa uporabljena topila v proizvodnji iz III. skupine, se lahko za analizo zaostalih topil v vzorcu uporabi metoda izgube po sušenju, kar je hiter, poceni in enostaven proces (19,24,49). Po izvedbi kristalizacije v različnih netopilih smo izračunali izkoristek procesa, ovrednotili smo velikost dobljenih sferičnih aglomeratov (preglednica IX) in opazovali njihovo morfologijo z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Slika 7).

Preglednica IX: Lastnosti sferičnih aglomeratov pri različnih netopilih

Parameter	100 % izopropanol	96 % etanol	100 % aceton	96 % aceton
Izkoristek [%]	31,30	39,60	27,89	30,03
D10 [µm]	64,83	125,07	56,43	142,77
D50 [µm]	207,42	228,65	237,04	274,71
D90 [µm]	427,82	343,26	371,40	389,07
PSD	1,75	0,95	1,33	0,90

Pri uporabi vseh izbranih netopil smo dobili sferične aglomerate. Njihove lastnosti so bile primerljive. Največji izkoristek pri uporabljenih pogojih kristalizacije smo dobili pri 96 % etanolu, najširšo porazdelitev velikosti smo izmerili delcem, dobljenim pri uporabi 100 % izopropanola. Sicer bi pri vseh netopilih glede na topnost laktoze pričakovali bistveno višje

izkoristke (višje od 95 %) iz česar lahko zaključimo, da na izkoristek vplivajo še druge spremenljivke poleg topnosti.



Slika 7: Slika sferičnih aglomeratov laktoze pod elektronskim mikroskopom, ki so bili pridobljeni z uporabo različnih netopil: A) 100 % izopropanol; B) 96 % etanol; C) 100 % acetone; D) 96 % acetone

Morfologija sferičnih aglomeratov se med posameznimi eksperimenti vidno razlikuje (slika 7). Pri vseh je sicer vidna sferična oblika, najbolj sferični delci pa so nastali pri uporabi 96 % etanola. Glavne razlike so v usmerjenosti in obliki primarnih kristalov. Kristali pri 100 % izopropanolu in 96 % etanolu so z najdaljšo stranico približno vzporedni s polmerom sferičnega aglomerata, medtem ko so kristali pri obeh koncentracijah acetona z najdaljšo stranico približno pravokotni na polmer sferičnega aglomerata. Kristali pri 100 % izopropanolu so v obliki 4-strane prizme, ki ima osnovno ploskev, podobno pravokotniku. Kristali so relativno veliki, prav tako jih je večina podobne velikosti, kar otežuje dobro zapolnitev sfere in s tem povečuje intrapartikularno poroznost sferičnih aglomeratov. Kristali pri 96 % etanolu so v obliki 4-strane prizme, ki ima osnovno ploskev, podobno pravokotniku. V primerjavi s kristali pri 100 % izopropanolu so manjši, posledično pa lahko

bolje zapolnijo prostor v sferičnem aglomeratu, kar se kaže v manjši intrapartikularni poroznosti kot pri 100 % izopropanolu. Pri 100 % acetonu so kristali v obliki na eni strani rahlo zašiljene 4-strane prizme, ki ima osnovno ploskev, podobno kvadratu, pri 96 % acetonu pa so kristali še bolj zašiljeni in posledično v obliki 4-strane piramide, ki ima osnovno ploskev, podobno kvadratu. V obeh primerih, ko je bil za netopilo uporabljen aceton, so nastali sferični aglomerati z manjšo intrapartikularno poroznostjo.

Glede na zgornje ugotovitve lahko sklepamo, da ima netopilo pomemben vpliv predvsem na morfologijo sferičnih aglomeratov. Če primerjamo rezultate pri 100 % in 96 % acetonu, lahko vidimo, da lahko na morfologijo sferičnih aglomeratov vpliva tudi prisotnost vode v netopilu. Ker so bile na sferičnih aglomeratih laktoze z uporabo 96 % etanola kot netopila že izvedene raziskave (4), smo se odločili, da raziskave nadaljujemo z acetonom, saj so bile opazne največje razlike glede na 96 % etanol. Koncentracijo uporabljenega acetona smo določili z dodatnimi preliminarnimi eksperimenti.

4.2. DOLOČANJE EKSTREMNIH VREDNOSTI FAKTORJEV

Pri načrtovanju DSD-ja je bilo treba določiti maksimalne in minimalne vrednosti faktorjev, pri katerih še vedno v vsaki možni kombinaciji nastavljenih vrednosti dobimo sferične aglomerate. Pri DSD-ju je zaradi majhnega števila eksperimentov to še posebno pomembno, saj vsak eksperiment, pri katerem ne moremo izmeriti želenega odziva, bistveno zmanjša statistično moč načrta.

Pri procesu sferične kristalizacije dobimo sferične aglomerate samo pri ustreznih pogojih. Pri določanju ekstremnih vrednosti sta bila faktorja $v(\text{dod})$ in $t(\text{dod.meš})$ vedno nastavljena na 9,7 mL/min in 30 min, saj ta faktorja v okviru zastavljenih vrednosti nimata ključnega vpliva na izvedljivost procesa. Ostale faktorje smo nastavili tako, da smo dobili zgornje in spodnje ekstremne pogoje (preglednica X) ter iskali njihove ekstremne vrednosti. Dobljene ekstremne vrednosti faktorjev so prikazane v preglednici V.

Pri zgornjih ekstremnih pogojih smo opazili, da se je vsa oborjena laktoza prijela na stene čaše in na mešalo, lahko smo dobili tudi velike sprijete kepe. Razlog bi lahko bil v prevelikem prenasičenju KS-ja ali v prepočasnem mešanju, ki ni povzročilo dovolj velikih strižnih sil, da se delci ne bi mogli adherirati na stene čaše.

Preglednica X: Vrednosti faktorjev pri zgornjih in spodnjih ekstremnih pogojih

Faktor	Zgornji ekstremni pogoji	Spodnji ekstremni pogoji
Koncentracija laktoze v raztopini laktoze	1	-1
Volumsko razmerje med netopilom in celotnim KS-jem	1	-1
Temperatura KS-ja	-1	1
Hitrost mešanja	-1	1

Pri spodnjih ekstremnih pogojih pa zaradi premajhnega prenasíčenja laktoza sploh ni kristalizirala. Opazili smo tudi, da je kristalizacija lažje potekla pri počasnejšem mešanju, kar je presenetljivo, saj naj bi hitrejšje mešanje povzročalo hitrejšo nukleacijo zaradi več mehanskih motenj v KS-ju in hitrejšo rast kristalov zaradi hitrejšega prenosa gradnikov do kristalov. Razlog, da hitrejšje mešanje otežuje kristalizacijo, bi lahko bil, da mešanje povzroča razgradnjo nastajajočega jedra. Podoben pojav sta opisala že Mullin in Raven (1962) (11,50).

Med preliminarimi eksperimenti smo spreminjali tudi koncentracijo acetona (netopilo). Koncentracija netopila skupaj s temperaturo in koncentracijo raztopine laktoze vpliva na stopnjo prenasíčenja. Ugotovili smo, da je sistem bolj robusten pri uporabi 95 % acetona, zato smo za DSD izbrali to koncentracijo.

4.3. DSD

Rezultati DSD-ja so podani ločeno glede na vpliv faktorjev na posamezen odziv. Za vsak odziv je na kratko predstavljena primerjava analiz statističnih modelov in izbira najboljšega modela. Pri vsakem odzivu so predstavljeni tudi vsi aktivni učinki faktorjev na odziv in možna razlaga zanje. Razvrščeni so glede na oceno velikosti vpliva, ki je hkrati tudi koeficient učinka v enačbi statističnega modela. Predznak ocene nam pove, ali je učinek pozitiven ali negativen.

Glavni učinek je učinek faktorja na odziv, ki ne upošteva učinkov ostalih faktorjev. Če je glavni učinek faktorja (npr. Konc. lakt.) pozitiven, pomeni, da z večanjem faktorja odziv raste. Obratno velja, če je glavni učinek negativen. Če je pri nekem faktorju prisoten tudi kvadratni učinek (npr. Konc. lakt.*Konc. lakt.), pomeni, da je funkcija, ki ponazarja vpliv

faktorja na odziv, kvadratna. Če je kvadratni učinek pozitiven, ima kvadratna funkcija minimum in je konkavna, če pa je negativen, ima maksimum in je konveksna. Če je med dvema faktorjema prisotna interakcija (npr. Konc. lakt.*Temp.), pomeni, da je vpliv prvega faktorja na odziv, odvisen od vrednosti drugega faktorja in obratno.

Za lažjo primerjavo velikosti učinkov med različnimi odzivi lahko pogledamo relativno oceno, ki jo izračunamo po enačbi 15:

$$\text{Relativna ocena} = \frac{\text{Ocena}}{\text{Povprečni odziv}} \quad \text{enačba 15}$$

Pri vsakem učinku je prikazana tudi p-vrednost, ki jo lahko pridobimo različno glede na analizo metodo (EMS ali FSR), kot je to razloženo v poglavjih 3.3.11.1. in 3.3.11.2. Predstavljena je še prilagojena moč, ki predstavlja retrospektivno moč testa za dani učinek. Pove nam, kakšna je verjetnost, da bo učinek statistično signifikanten, če naredimo enak test na novem vzorcu z enako variabilnostjo, ki je vzet iz populacije, ki ima enake statistične lastnosti kot naš vzorec. Če je prilagojena moč večja kot 0,50 pomeni, da bi bil učinek ponovno signifikanten, kar nam daje dodatno zaupanje v verodostojnost analize (37). Na koncu ovrednotimo napovedno moč modela za posamezen odziv še na praktičnem primeru. Pri vsakem odzivu je prikazana primerjava napovedane in dejanske vrednosti odziva, ki smo jo dobili z dodatnimi tremi eksperimenti za preverjanje modela.

4.3.1. Izkoristek

Izkoristek (Y) je zelo pomemben v vsaki proizvodnji, saj nam boljši izkoristek zagotavlja boljšo ekonomičnost procesa. Slab izkoristek je lahko tudi podatek, ki nam pokaže, da je trenutni proces možno še izboljšati.

Izkoristek smo izračunali z enačbo 16:

$$Y = \frac{m_{aglo}}{m_{lak}} \quad \text{enačba 16}$$

pri čemer je m_{aglo} masa vseh pridobljenih aglomeratov in m_{lak} masa raztopljene laktoze.

4.3.1.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Po analizah netransformiranih podatkov z EMS in FSR je bil boljši model, ki je bil narejen z metodo FSR. Poleg tega so rezultati Box-Cox transformacije ($\text{best } \lambda_{EMS} = 0,594$, $\text{best } \lambda_{FSR} = 0,732$) in graf rezidualov v odvisnosti od napovedanih vrednosti (vzorec lijaka) namigovali

na transformacijo s kvadratnim korenom, ki smo jo tudi izvedli. S transformiranimi podatki z metodo FSR nismo dobili nobenega signifikantnega učinka, z metodo EMS pa smo dobili relativno dober model. Po primerjavi modela s transformiranimi (EMS) in netransformiranimi (FSR) podatki smo lahko transformacijo tudi upravičili, saj smo imeli pri modelu s transformiranimi podatki bistveno boljše prileganje eksperimentalnim podatkom (nižja AICc in BIC ter višja R^2 in prilagojen R^2), dobili smo več signifikantnih odzivov (pri netransformiranih podatkih samo enega, kar je v nasprotju s pričakovanji in teoretsko razlago), nižji RMSE in ustrezen Durbin-Watson test (merilo avtokorelacije), ki je bil pri netransformiranih podatkih neustrezen. Edina slabost transformiranega modela je bila, da je bila distribucija rezidualov manj normalna kot pri netransformiranem (SWT, NQPRD), še vedno pa je bila na meji normalne porazdelitve (SWT 0,05). Ker smo ugotovili, da so v modelu prisotne tri dvofaktorske interakcije, lahko zaključimo, da metoda FSR ni enako dobra kot EMS. Tako smo za najboljši statistični model izbrali model, ki je bil narejen z metodo EMS in ki je imel podatke transformirane s kvadratnim korenom.

4.3.1.2. Aktivni učinki

V preglednici XI so podani aktivni glavni učinki Konc. lakt., V razmerje in Temp, njihov vpliv na izkoristek pa lahko razložimo z njihovim vplivom na prenasíčenje v kristalizacijskem sistemu (večje prenasíčenje praviloma izboljšuje izkoristek). Konc. lakt. vpliva na prenasíčenje neposredno, V razmerje in Temp. pa posredno z vplivom na topnost laktoze. Identificirali smo tudi negativni kvadratni učinek Konc. lakt.*Konc. lakt. To pomeni, da ima funkcija odvisnosti izkoristka od faktorja Konc. lakt. maksimum in je izkoristek najboljši pri določeni vmesni vrednosti faktorja. Razlog za padanje izkoristka ob povečevanju faktorja Konc. lakt. po doseženi določeni točki bi lahko bil, da je sistem že preveč prenasíčen in se začnejo sferični aglomerati lepiti na stene čaše in na mešalo. Kot je vidno na grafih D, E, F, G, H in I na sliki 8, je kvadratni efekt bolj izražen pri nižjih vrednostih faktorja Temp. in višjih vrednostih faktorja V razmerje, saj je takrat prenasíčenje večje. Z večanjem faktorja V razmerje se izboljšuje izkoristek, saj se s tem povečuje delež acetona, ki v kristalizacijskem sistemu deluje kot netopilo in laktozi posledično znižuje topnost. Večji je delež acetona, nižja je topnost laktoze, posledično se prenasíčenje veča, kar izboljša tudi izkoristek. Z večanjem faktorja Temp. se izkoristek poslabšuje, saj je topnost laktoze odvisna od temperature. Pri višjih temperaturah je topnost laktoze večja, kar privede do manjšega prenasíčenja in posledično do nižjega izkoristka.

Preglednica XI: Aktivni učinki faktorjev na izkoristek

Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
Konc. lakt.*Konc. lakt.	-1,53	-0,3120	0,041	0,3792
V razmerje*Temp.	-1,02	-0,2071	0,0079	0,7119
Konc. lakt.	0,93	0,1892	0,0048	0,7918
V razmerje	0,91	0,1848	0,0055	0,7712
Konc. lakt.*Temp.	0,84	0,1704	0,0146	0,5942
Konc.lakt.*V razmerje	-0,77	-0,1575	0,0212	0,5174
Temp.	-0,75	-0,1525	0,0151	0,5865

Ker vsi glavni učinki vplivajo na prenasíčenje, so vsak z vsakim tudi v dvofaktorski interakciji. Interakcije imajo velik vpliv na celokupen učinek faktorjev na izkoristek, zaradi česar ta zelo variira glede na vrednosti treh signifikantnih faktorjev. Predviden izkoristek najlažje prikažemo z grafi odzivne površine (ang. »response surface«) (slika 8). Pri grafih na sliki 8 je treba biti pozoren na skalo, saj izkoristek zaradi boljše ločljivosti ni vedno prikazan na enaki skali, prav tako pa je graf odzivne površine ekstrapoliran do še bolj ekstremnih vrednosti, kot so bile uporabljene pri DSD-ju (Konc. lakt. (0,19 – 0,31); Temp. (2,5 – 27,5); V razmerje (0,25 – 0,75). Če je ekstrapolacija res upravičena, bi bilo treba preveriti eksperimentalno, grafe pa bomo komentirali samo v okviru ekstremnih vrednosti, ki so bile uporabljene pri DSD-ju.

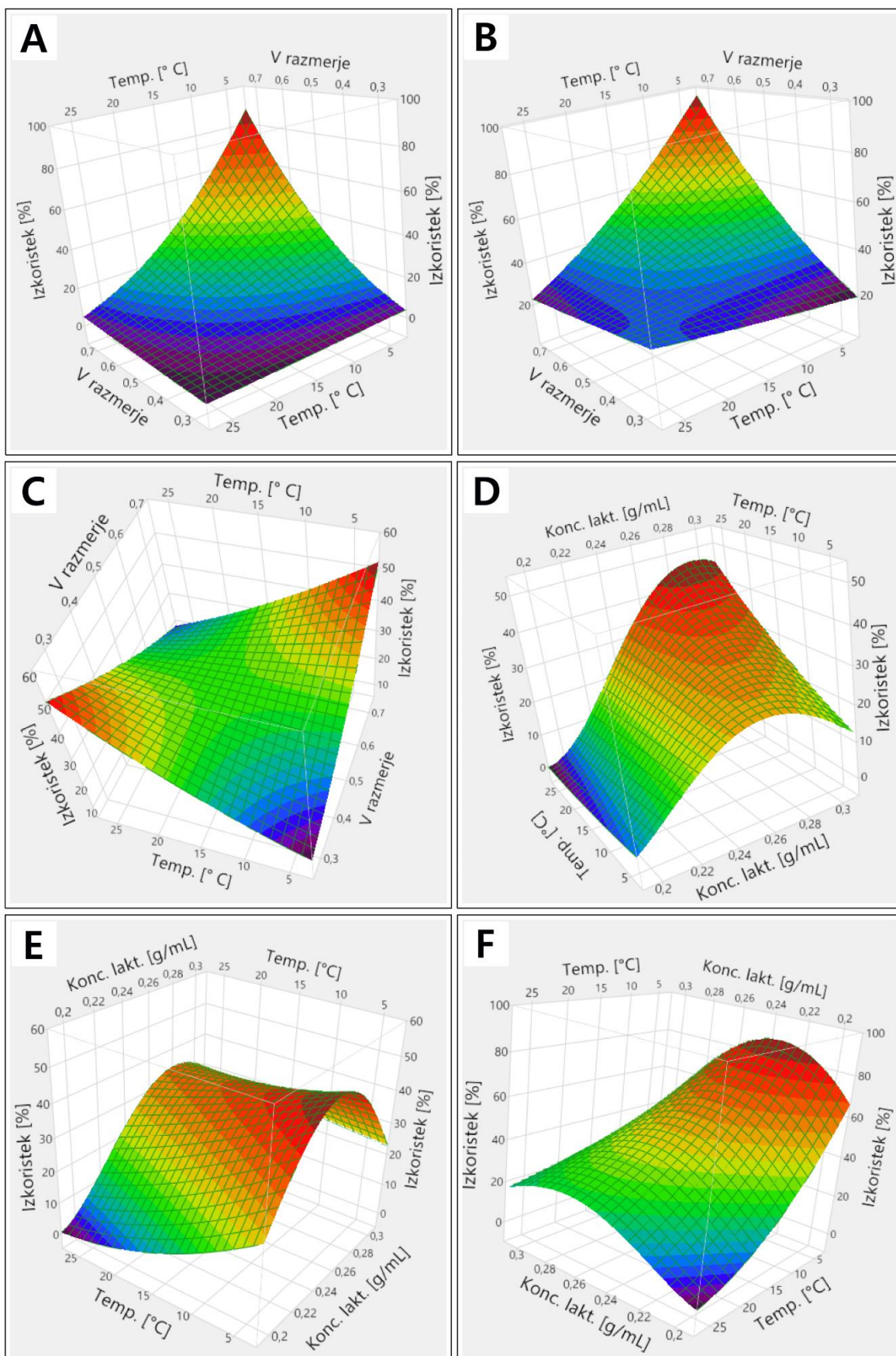
Na grafu A vidimo, da je najvišji izkoristek (64 %) pri V razmerju 0,7 in Temp. 5 °C, najnižji (2 %) pa pri V razmerju 0,3 in Temp. 25 °C. To si lahko razlagamo s spremembami v prenasíčenju. Na grafu B vidimo, da je najvišji izkoristek (78 %) pri V razmerju 0,7 in Temp. 5 °C, najnižji (25 %) pa pri V razmerju 0,3 in Temp. 25 °C. Tudi tukaj si graf lahko razlagamo s spremembami v prenasíčenju. Graf B je zelo podoben grafu A, le da ima višje izkoristke zaradi večje Konc. lakt. Na grafu C vidimo obliko sedla, z najvišjima izkoristkoma pri V razmerju 0,7 in Temp. 5 °C (44 %) ter pri V razmerju 0,3 in Temp. 25 °C (43 %) in najnižjima izkoristkoma pri V razmerju 0,3 in Temp. 5 °C (19 %) ter V razmerju 0,7 in Temp. 25 °C (23 %). Graf C se po obliki zelo razlikuje od grafov A in B, razlog za to pa je, da so interakcije med faktorjem Konc. lakt. in ostalima faktorjema veliko manj izražene pri Konc. lakt. 0,3 g/mL, kot pa pri 0,25 ali pri 0,2 g/mL (slika 9). Možna razlaga bi lahko bila, da je

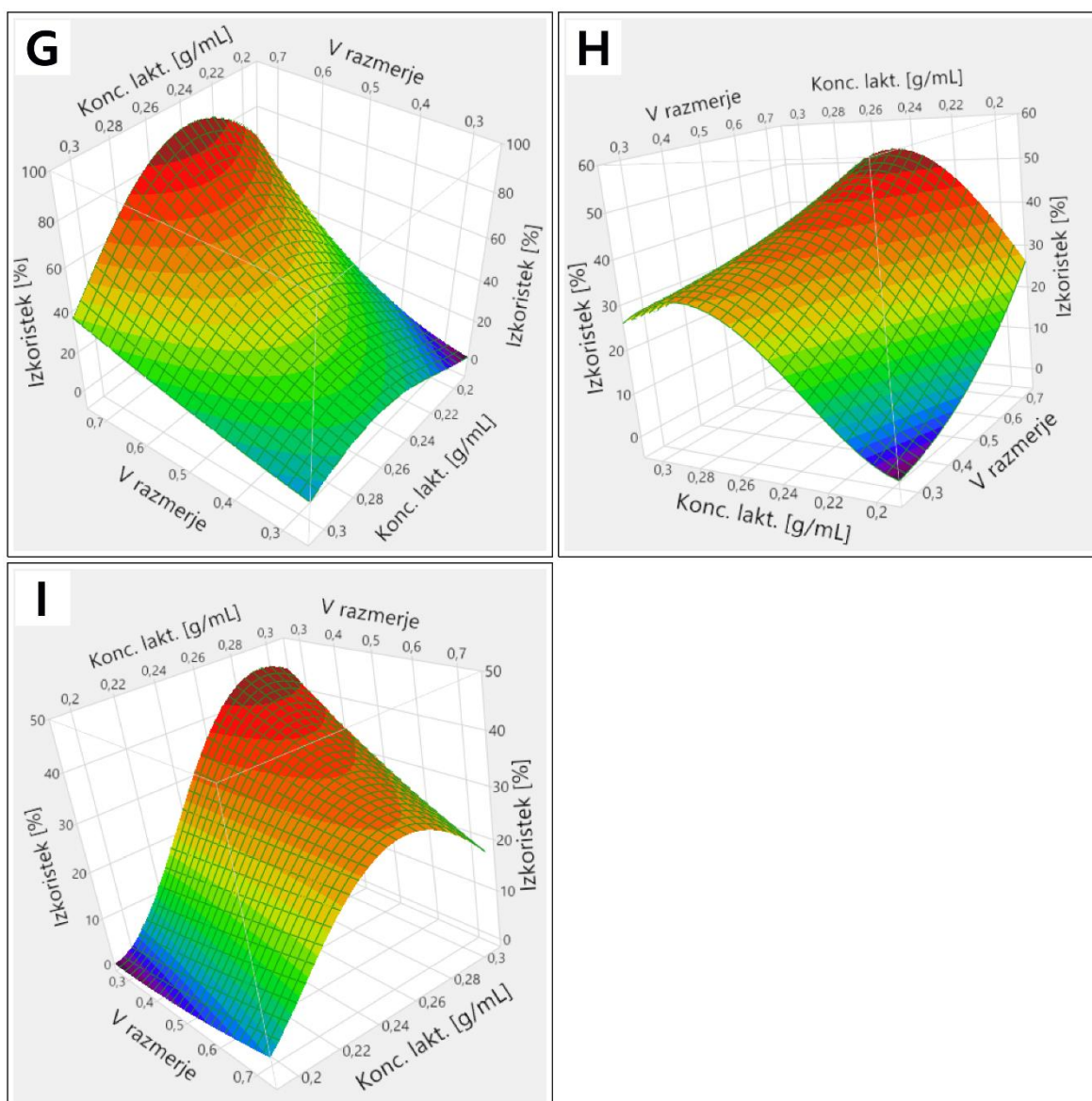
količina laktoze, vnesene v kristalizacijski sistem pri vrednosti faktorja Konc. lakt. 0,3 g/mL, tako velika, da ni potrebe po dodatnem zniževanju topnosti. Dosežen je plato vpliva Konc. lakt. na izkoristek. Pri nižjih vrednostih Konc. lakt. faktorja V razmerje in Temp. vplivata na vpliv Konc. lakt. na izkoristek in ga z znižanjem topnosti (zviševanje V razmerja in zniževanje Temp.) izenačita z vplivom pri vrednosti faktorja Konc. lakt. 0,3 g/mL. Obratno velja za zviševanje topnosti (zniževanje V razmerja in zviševanje Temp.).

Zaradi manjše prisotnosti interakcij s faktorjem Konc. lakt. je tudi razlika med najmanjšim in največjim izkoristkom na grafu C veliko manjša kot na grafih A in B. Zanimivo je, da dobimo največja izkoristka pri dveh različnih ekstremih, ki ustvarjajo stanje največjega (V razmerje 0,7 in Temp. 5 °C) in najmanjšega (V razmerje 0,3 in Temp. 25 °C) prenasíčenja. Možna razlaga je, da je pri največjem prenasíčenju sistem že preveč prenasíčen in se sferični aglomerati prijemajo na stene čaše in na mešalo, kar znižuje izkoristek, še vedno pa je ta relativno velik. Pri najmanjšem prenasíčenju pa je izkoristek vseeno zadovoljiv, ker Konc. lakt. 0,3 g/mL že sama ustvari zadostno prenasíčenje. Pri vmesnih vrednostih prenasíčenja (V razmerje 0,3 in Temp. 5 °C ter V razmerje 0,7 in Temp. 25 °C) je izkoristek najmanjši. Razlog so interakcije med faktorjema V razmerje in Temp. (slika 9). Pri vrednostih faktorja V razmerje 0,7 naraščanje faktorja Temp. bistveno zmanjša vpliv faktorja V razmerje na izkoristek, posledično se ta znižuje. Interakcijo si lahko razlagamo s tem, da pri višjih temperaturah netopila to manj zniža topnost laktoze in ima posledično manjši vpliv na prenasíčenje in izkoristek. Obratno velja za nižje temperature netopila. Pri vrednostih faktorja V razmerje 0,3 ta interakcija nima tako velikega vpliva, saj je netopila manj in ima že v osnovi manjši vpliv, posledično se tudi vpliv Temp. nanj manj pozna. Pri vrednostih faktorja Temp. 5 °C, zniževanje faktorja V razmerje bistveno zmanjša vpliv faktorja Temp. na izkoristek, posledično se ta znižuje. Možna razlaga za interakcijo bi lahko bila naslednja. Na začetku procesa je v kristalizacijskem sistemu, ki ima temperaturo uravnano s pomočjo termostata, samo 95 % aceton. Ko v sistem dodajamo vročo raztopino laktoze, temperatura sistema rahlo naraste. Temperatura bolj naraste pri nižjem volumskem razmerju, saj je tam na začetku manj netopila, prav tako dodamo več vroče raztopine, ki je termostat ne more ohladiti takoj. Zato ima pri nižjem V razmerju Temp. bistveno manjši vpliv na izkoristek, obratno pa velja pri višjem V razmerju. Pri vrednostih faktorja Temp. 25 °C, ta interakcija nima tako velikega vpliva, možen razlog bi lahko bil, da temperaturna razlika med kristalizacijskim sistemom in raztopino laktoze ni tako velika.

Na grafu D vidimo, da je najvišji izkoristek (43 %) pri Temp 25 °C in Konc. lakt. 0,29 g/mL, najnižji (2 %) pa pri Konc. lakt. 0,2 g/mL in Temp. 25 °C. Pri nižjih vrednostih faktorja Temp. je vedno bolj prisoten tudi kvadratni učinek Konc. lakt.*Konc. lakt., kar je na grafu razvidno kot ukrivljenost. Vidimo, da Temp. nima velikega vpliva na izkoristek in je ta odvisen predvsem od Konc. lakt. Razlog je v interakciji med V razmerjem in Temp. (slika 9), saj ima Temp. pri V razmerju 0,3 bistveno manjši vpliv na izkoristek kot pri višjih vrednostih (razlaga interakcije je podana pri razlagi grafa C). Na grafu E vidimo, da je najvišji izkoristek (48 %) pri Temp. 5 °C in Konc. lakt. 0,25 g/mL, najnižji (5 %) pa pri enakih vrednostih faktorjev Temp. in Konc. lakt. kot pri grafu D. Lepše kot na grafu D je viden kvadratni učinek Konc. lakt.*Konc. lakt, kar lahko vidimo tudi z znižanjem optimalne vrednosti Konc. lakt. v primerjavi z vrednostjo pri grafu D. Na grafu F vidimo, da je najvišji izkoristek (79 %) pri Temp. 5 °C in Konc. lakt. 0,24 g/mL, kar je tudi najvišji napovedan izkoristek v vseh kombinacijah pogojev v zastavljenih okvirjih. Razlog za to lahko iščemo v izredno pozitivnem vplivu interakcije med faktorjema Temp. in V razmerjem na izkoristek pri takšnih nastavljenih vrednostih (slika 9). Razlaga interakcije je podana pri razlagi grafa C. Najnižji izkoristek (2 %) je pri enakih vrednostih faktorjev Temp. in Konc. lakt. kot pri grafu D in E. V primerjavi z grafoma D in E je lepo viden povečan vpliv faktorja Temp. Razlog je že omenjeni interakciji z V razmerjem. Ker so pogoji bolj ekstremni je tudi kvadratni učinek Konc. lakt.*Konc. lakt. bolj izražen, kar lahko vidimo tudi z znižanjem optimalne vrednosti Konc. lakt. v primerjavi z vrednostjo pri grafih D in E. Da so pri grafih D, E in F najnižje vrednosti izkoristka pri enakih pogojih, si lahko razložimo z interakcijo med Temp. in Konc. lakt. pri vrednosti 0,2 g/mL (zviševanje Temp. znižuje vpliv faktorja Konc. lakt. pri vrednosti 0,2 g/mL na izkoristek). Interakcija je podrobneje razložena pri razlagi grafa C.

Na grafu G lahko vidimo, da najvišji izkoristek (79 %) pri V razmerju 0,7 in Konc. lakt. 0,24 g/mL, kar so enaki pogoji kot pri najvišjem izkoristku pri grafu F. Najnižji izkoristek (7 %) je pri V razmerju 0,3 in Konc. lakt. 0,2 g/mL. Na grafu H vidimo, da je najvišji izkoristek (50 %) pri V razmerju 0,7 in Konc. lakt. 0,25 g/mL, najnižji izkoristek (4 %) pa je pri enakih vrednostih faktorjev V razmerje in Konc. lakt. kot pri grafu G. Če primerjamo najvišja izkoristka pri grafih G in H, vidimo, da je izkoristek pri grafu H nižji zaradi višje vrednosti Temp. Ostala faktorja imata podobne vrednosti, vrednost Konc. lakt. je pri grafu H malo višja, ker pogoji niso tako ekstremni in je kvadratni učinek Konc. lakt.*Konc. lakt. malo manj izražen. Na grafu I vidimo, da je najvišji izkoristek (43 %) pri V razmerju 0,3 in Konc.

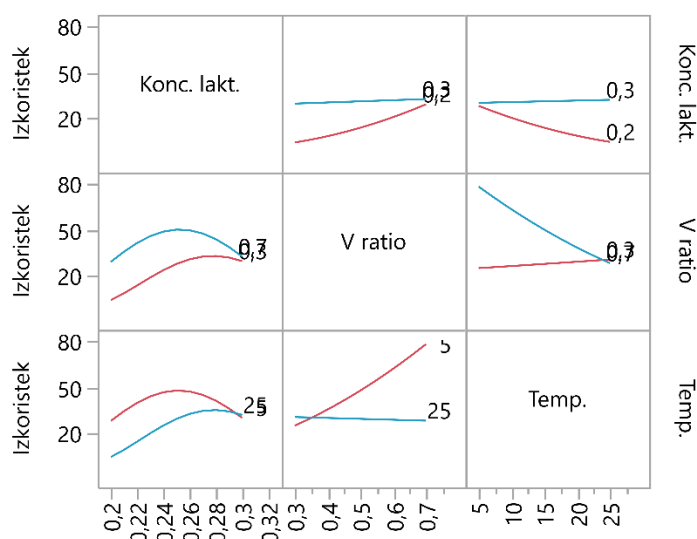




Slika 8: Grafi odzivne površine za izkoristek: A, B, C) Odvisnost izkoristka od faktorjev Temp. in V razmerje pri določeni vrednosti faktorja Konc. lakt.: A) Konc. lakt. = 0,2 g/mL; B) Konc. lakt. = 0,25 g/mL; C) Konc. lakt. = 0,3 g/mL; D, E, F) Odvisnosti izkoristka od faktorjev Temp. in Konc. lakt. pri določeni vrednosti faktorja V razmerje: D) V razmerje = 0,3; E) V razmerje = 0,5; F) V razmerje = 0,7; G, H, I) Odvisnost izkoristka od faktorjev V razmerje in Konc. lakt. pri določeni vrednosti faktorja Temp.: G) Temp. = 5 °C; H) Temp. = 15 °C; I) Temp. = 25 °C

lakt. 0,3 g/mL, najnižji izkoristek (2 %) pa je pri enakih vrednostih faktorjev V razmerje in Konc. lakt. kot pri grafih G in H. Najvišji izkoristek je tokrat pri V razmerju 0,3, razlog je v prej razloženi interakciji med V razmerjem in Temp (slika 9). Pri grafih G, H in I so najnižji izkoristki pri enakih vrednostih faktorjev V razmerje in Konc. lakt. (0,3 in 0,2 g/mL). Razlog

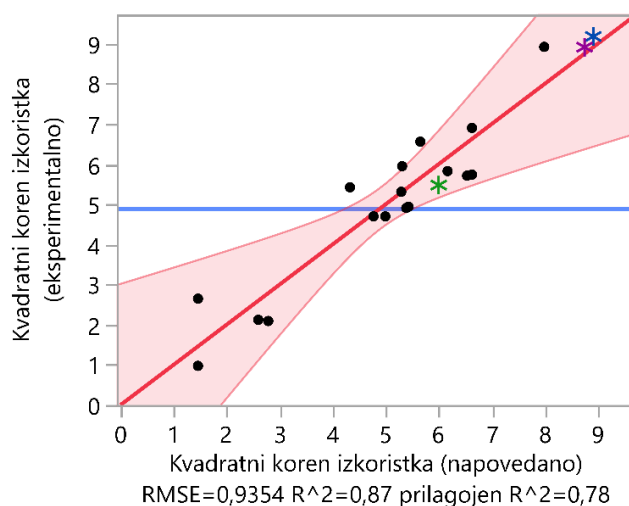
je v interakciji med V razmerjem in Konc. lakt. pri vrednosti 0,2 g/mL (zniževanje V razmerja znižuje vpliv Konc. lakt. pri vrednosti 0,2 g/mL na izkoristek), ki je podrobneje razložena pri razlagi grafa C.



Slika 9: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na izkoristek.

4.3.1.3. Napovedna moč modela

Na sliki 10 je graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih in napovedanih vrednosti kvadratnega korena izkoristka. Rdeča premica na grafu predstavlja scenarij popolnega ujemanja (želimo, da so točke na grafu čim bližje tej premici), modra premica pa scenarij, ko vsi učinki, ki so vključeni v model, na merjen odziv nimajo vpliva (želimo, da so točke



Slika 10: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti kvadratnega korena izkoristka od napovedanih vrednosti kvadratnega korena izkoristka. Rdeča premica

predstavlja scenarij popolnega ujemanja, modra premica scenarij, ko vsi učinki, ki so vključeni v model, na merjen odziv nimajo vpliva. Modra premica leži na višini y osi, ki predstavlja povprečen odziv. Modra zvezdica predstavlja eksperiment Optimizacija 1, vijolična eksperiment Optimizacija 2 in zelena Eksperiment 3.

od te premice oddaljene bolj kot od rdeče). Modra premica leži na višini y osi, ki predstavlja povprečen odziv. Na grafu so prikazane tudi vrednosti, dobljene z dodatnimi eksperimenti za preverjanje modela. Modra zvezdica predstavlja eksperiment Optimizacija 1, vijolična eksperiment Optimizacija 2 in zelena Eksperiment 3. S pomočjo teh točk lahko ocenimo napovedno moč modela, s pomočjo točk iz DSD-ja lahko ocenimo prileganje modela eksperimentalnim vrednostim. Vidimo, da je ujemanje rezultatov DSD-ja dobro, prav tako vse tri zvezdice ležijo praktično na rdeči premici, kar nakazuje na zelo dobro napovedno moč modela. Optimizacija izkoristka je uspela, dobili smo 84 % izkoristek, kar je dobro. Tudi optimizacija izkoristka pri eksperimentu optimizacija 2 je uspela, sicer smo tukaj pričakovano dobili nekoliko nižji izkoristek (79 %) saj smo hkrati optimizirali še D10.

4.3.2. D10

4.3.2.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Po analizah podatkov z EMS in FSR je bil boljši model, ki je bil narejen z metodo FSR, saj so eksperimentalni podatki bolje prilegali modelu (nižja AICc in BIC ter višja R^2 in prilagojen R^2), nižja varianca (nižji RMSE), bolj normalna porazdelitev rezidualov (pri porazdelitvi rezidualov ni osamelca, kot pri EMS analizi). Rezultati analize ne namigujejo na transformacijo, zato je nismo izvedli.

4.3.2.2. Aktivni učinki

Aktivni učinki faktorjev na D10 so prikazani v preglednici XII. Aktivni glavni učinki so v(meš) in V razmerje, Konc. lakt. In Temp. Z večanjem faktorja v(meš), D10 pada. Razlog je v večjih strižnih silah v kristalizacijskem sistemu, ki nastanejo ob hitrejšem mešanju. Delci posledično z večjo hitrostjo trčijo v druge delce ali ob mešalo in stene čaše, pri čemer lahko pride do abrazije ter nastanka manjših delcev, prav tako je verjetno, da se poveča sila upora, ki deluje na delce. Zaradi hitrejšega mešanja so lahko delci tudi bolj konsolidirani, kar prav tako zmanjša njihovo velikost.

Z večanjem faktorja V razmerje D10 pada. Z večanjem V razmerja povečujemo prenasíčenje, pri čemer faza jedrenja v kristalizacijskem sistemu bolj pripomore pri vzpostavitvi ravnotežnega stanja kot sama rast kristalov. Nastane veliko kristalizacijskih jeder, a vsa ne zrastejo do velike velikosti, ker zmanjka gradnikov za rast kristalov. Posledično imamo v sistemu veliko majhnih kristalov, ki tvorijo tudi manjše sferične aglomerate.

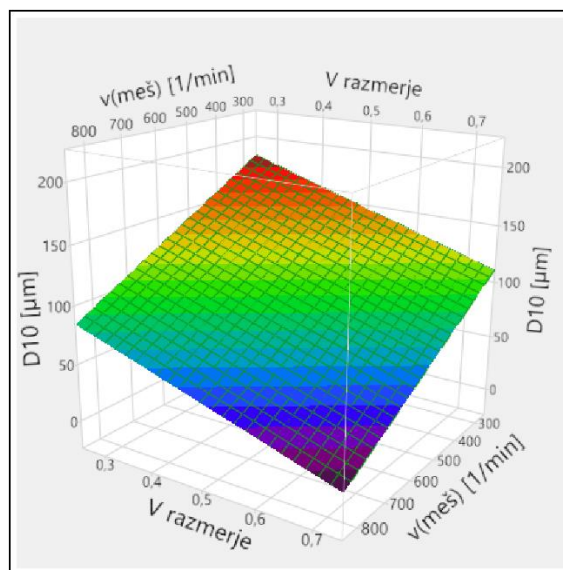
Z večanjem faktorja Konc. lakt., D10 narašča, saj imamo v sistemu več laktoze in lahko delci zrastejo do večje velikosti. Faktor Temp. je kot glavni učinek vključen predvsem zaradi učinka dednosti, njegov glavni vpliv na D10 pa se kaže v dvofaktorski interakciji Konc. lakt.*Temp.

Preglednica XII: Aktivni učinki faktorjev na D10

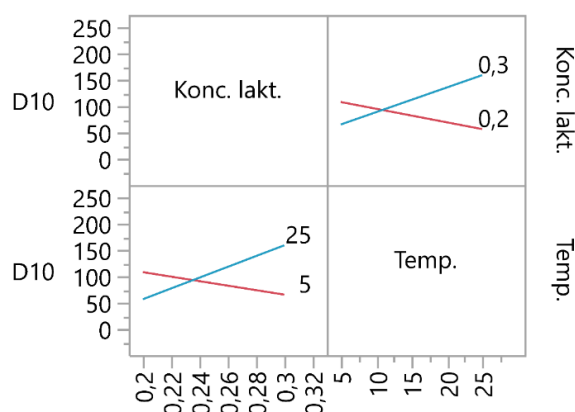
Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
v(meš)	-41,00	-0,4184	0,0002	0,9920
Konc. lakt.*Temp.	36,01	0,3675	0,0010	0,9408
V razmerje	-28,74	-0,2933	0,0029	0,8519
Konc. lakt.	14,81	0,1512	0,0749	0,2696
Temp.	10,48	0,1070	0,1914	0,1078

Na sliki 11 je prikazan graf odzivne površine za D10 v odvisnosti od v(meš) in V razmerja, ki sta najbolj signifikantna glavna učinka. Vidimo, da največji D10 (168 μm) dobimo pri V razmerju 0,3 in v(meš) 300 obratov/min, najmanjši D10 (28 μm) pa pri V razmerju 0,7 in v(meš) 800 obratov/min, kar sovпада z zgornjimi ugotovitvami. Na velikost D10 ima vpliv tudi dvofaktorska interakcija Konc. lakt.*Temp. (slika 12). Pri Konc. lakt. 0,2 g/mL višanje Temp. manjša D10, pri Konc. lakt. 0,3 g/mL pa ga večja. Interakcijo si lahko razložimo z vplivom obeh faktorjev na prenasíčenje. Pri Konc. lakt. 0,3 g/mL višanje faktorja Temp. zmanjšuje prenasíčenje, zaradi česar se manj laktoze prijema na stene čaše in na mešalo, posledično pa je več laktoze na voljo za rast sferičnih aglomeratov. Pri Konc. lakt. 0,2 g/mL, pa višanje Temp. že tako zniža prenasíčenje, da je gradnikov za rast vedno manj, kar je razlog za nastanek manjših sferičnih aglomeratov. Enako razlago lahko podamo za vpliv Konc. lakt. na vpliv Temp. na D10, saj so dvofaktorske interakcije vzajemne. Največji D10 tako dobimo pri V razmerju 0,3, v(meš) 300 obratov/min, Konc. lakt. 0,3 g/mL in Temp. 25

°C. Najmanjši D10 pa dobimo pri vrednostih V razmerja 0,7, v(meš) 800 obratov/min, Konc. lakt. 0,2 g/mL in Temp. 25 °C.



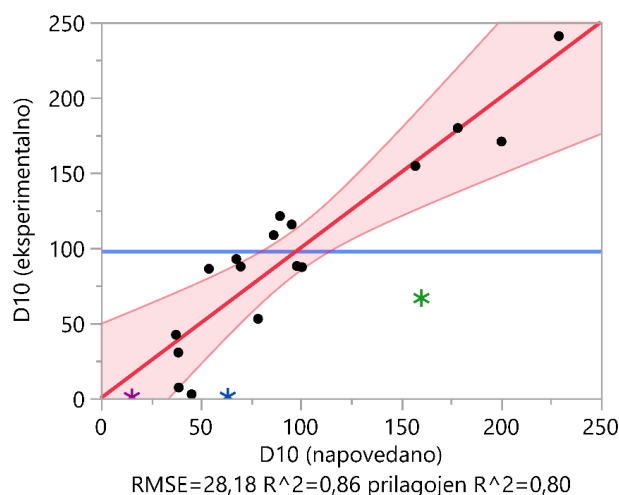
Slika 11: Graf odzivne površine za parameter velikosti D10 v odvisnosti od v(meš) in V razmerja (Konc. lakt = 0,25 g/mL, Temp. = 15 °C)



Slika 12: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na D10

4.3.2.3. Napovedna moč modela

Na sliki 13 lahko vidimo graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti D10 od napovedanih vrednosti D10. Vrednosti, dobljene z DSD-jem relativno dobro sovpadajo z rdečo črto, kar kaže na dobro prileganje podatkov. Vidimo, da smo za Optimizacijo 2 relativno dobro napovedali vrednost D10, pri Optimizaciji 1 in Eksperimentu 3 pa je bila napoved veliko previsoka. Zanimivo je, da sta bili vrednosti D10 pri obeh eksperimentih optimizacije zelo podobni (0,84 in 0,62 μm). Mogoče so razlog za tako nizek D10 v obeh primerih ekstremni pogoji, ki smo jih ustvarili, da bi dobili čim večji izkoristek.



Slika 13: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti D10 od napovedanih vrednosti D10

4.3.3. D50

4.3.3.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Boljši model smo dobili z metodo FSR, ker smo z metodo EMS lahko v model vključili samo en učinek, zaradi česar se model ni dobro prilegal eksperimentalnim podatkom. Z metodo FSR smo dobili višja R^2 in prilagojen R^2 , nižjo varianco (nižji RMSE), in bolj ustrezno analizo rezidualov (bolj normalna porazdelitev rezidualov in lepši graf rezidualov v odvisnosti od napovedanih vrednosti). Ker porazdelitev rezidualov pri metodi EMS ni bila normalna in je rezultat Cox-Box transformation (best $\lambda = -0,867$) namigoval na inverzno transformacijo, smo to transformacijo tudi izvedli. Rezultati analize modela iz transformiranih podatkov niso bili bistveno boljši od netransformiranih, zato smo za najboljši model izbrali model po metodi FSR.

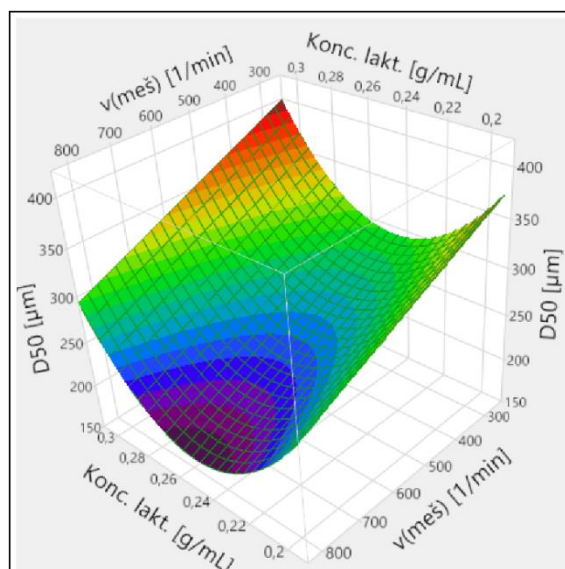
4.3.3.2. Aktivni učinki

Aktivni učinki faktorjev na D50 so prikazani v preglednici XIII. Aktivna glavna učinka sta v(meš) in Konc. lakt., pri čemer je Konc. lakt. kot glavni učinek vključen zaradi učinka dednosti, njegov glavni vpliv pa se kaže kot kvadratni učinek. Na sliki 14 je razvidno, da je prisoten pozitivni kvadratni učinek faktorja Konc. lakt. D50 v odvisnosti od Konc. lakt. je najnižji pri srednjih vrednostih Konc. lakt., pri obeh mejnih vrednostih pa je višji. Možna razlaga je, da pri nižjih koncentracijah laktoze v sistemu nastane manj jeder, ki pa potem zrastejo do večje velikosti in se povezujejo v večje sferične aglomerate v primerjavi z višjimi

Preglednica XIII: Aktivni učinki faktorjev na D50

Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
Konc. lakt.*Konc. lakt.	68,03	0,2314	0,0450	0,3775
v(meš)	-44,16	-0,1502	0,00450	0,7892
Konc. lakt.	7,431	0,02527	0,574	0,0500

koncentracijami, kjer nastane več jeder in je na voljo manj gradnikov, da bi delci zrastle do enakih velikosti, verjetno pa dobimo večje število manjših sferičnih aglomeratov. Ko se koncentracija laktoze še naprej povečuje, očitno spet začne prevladovati kristalna rast, čeprav se prenasíčenje povečuje in bi pričakovali, da bi še bolj prevladovalo jedrenje. To si lahko razložimo z vplivom kvadratnega učinka Konc. lakt na izkoristek (preglednica XI), kjer je učinek nasproten (negativen) kot pri D50. Razlaga za nižje izkoristke pri večjem faktorju Konc. lakt. je, da je sistem že preveč prenasíčen in se začnejo sferični aglomerati lepiti na stene čaše in na mešalo. Verjetno se na ta način tudi izgubljajo prosta jedra v sistemu in dobimo podobno razmerje med številom jeder in koncentracije laktoze v sistemu kot pri nižjih koncentracijah laktoze. Zanimivo je, da kvadratni učinek Konc. lakt. pri odzivu D10 ni prisoten in se D10 z zviševanjem Konc. lakt. povečuje. To kaže, da so vplivi Konc. lakt. različni na delce različnih velikosti.

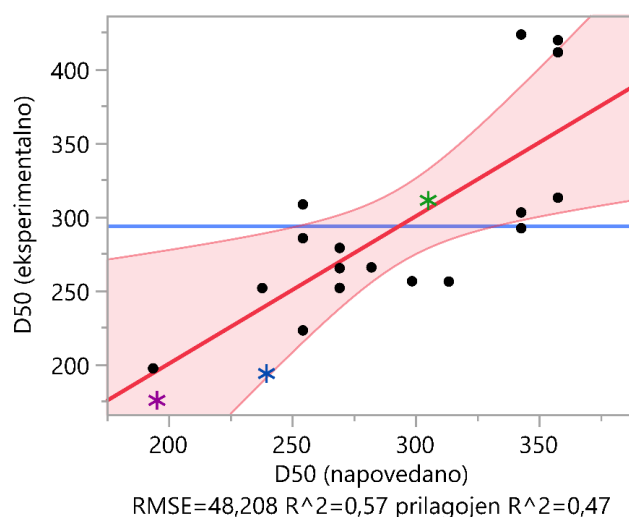


Slika 14: Graf odzivne površine za parameter velikosti D50 v odvisnosti od v(meš) in Konc. lakt.

Z večanjem faktorja $v(\text{meš})$ velikost D50 pada. To lahko razložimo podobno kot pri vplivu faktorja $v(\text{meš})$ na D10. S hitrejšim mešanjem pride do povečanja strižnih sil v kristalizacijskem sistemu, kar povzroči, da delci z večjo hitrostjo trčijo v druge delce ali v mešalo in steno čaše, poveča se tudi sila upora na delce. Pri tem pride do abrazije delcev (nastanejo novi, manjši delci, kar vpliva na D10) in posledičnega zmanjšanja velikosti prvotnega delca.

4.3.3.3. Napovedna moč modela

Na sliki 15 lahko vidimo, da vse točke iz treh dodatnih eksperimentov za preverjanje modela relativno dobro sovpadajo z modelom. Sicer smo pri obeh eksperimentih optimizacije napovedali rahlo previsoko vrednost, pri Eksperimentu 3 pa se napoved točno ujema z rezultatom. Razvidno je tudi, da je prilaganje modela podatkom, pridobljenih iz DSD-ja slabše kot pri modelih za odziva D10 in izkoristek.



Slika 15: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti D50 od napovedanih vrednosti D50

4.3.4. D90

4.3.4.1. Izbira najboljšega statističnega modela

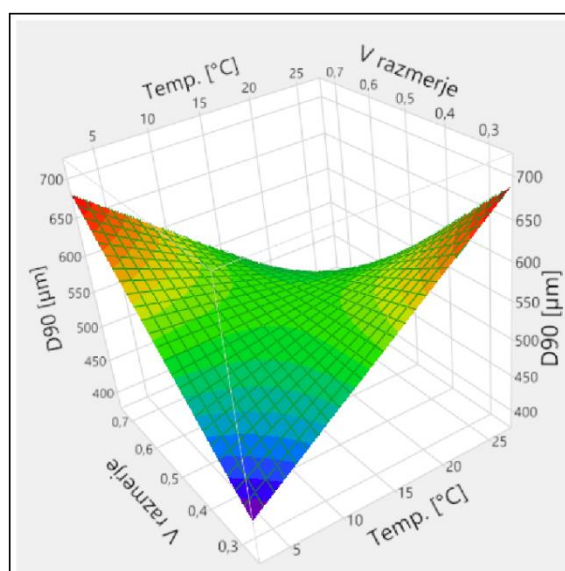
Boljši model smo pridobili po metodi FSR, ker se lepše prilega eksperimentalnim podatkom (višji R^2 in prilagojen R^2 , višji BIC, vendar nižji AICc), ima nižjo varianco (nižji RMSE) in ima bolj ustrezen graf rezidualov v odvisnosti od zaporedja eksperimenta. Slabost modela je, da ima rahlo pozitivno avtokorelacijo (Durbin-Watson test = 1,25). Rezultati analiz na transformacijo niso namigovali, zato je nismo izvedli.

4.3.4.2. Aktivni učinki

V preglednici XIV so vidni faktorji, ki so vključeni v model. Vsi glavni učinki (Konc. lakt., V razmerje in Temp.) so nesignifikantni in so vključeni zaradi učinka dednosti. Največji vpliv na D90 ima interakcija V razmerje*Temp. (sliki 16 in 17). Pri V razmerju 0,7 zviševanje Temp. znižuje D90, pri V razmerju 0,3 pa ga zvišuje. Možna razlaga je, da pri V razmerju 0,7 zviševanje Temp. znižuje prenasíčenje, zaradi česar je v sistemu na voljo manj laktoze za rast sferičnih aglomeratov. Pri V razmerju 0,3 pa se prenasíčenje že tako zniža, da je rast kristalov bolj favorizirana kot jedrenje, in nastane manj kristalizacijskih jeder, ki zrastejo do večjih kristalov ter se povezujejo v večje sferične aglomerate. Enako lahko razložimo tudi vpliv V razmerja na Temp. saj sta interakciji vzajemni.

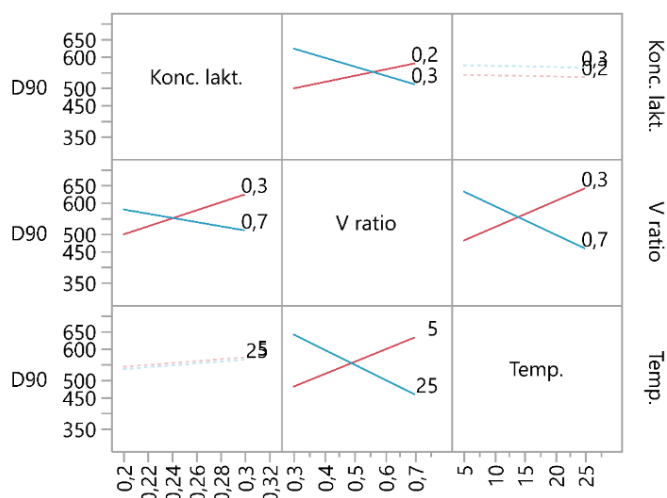
Preglednica XIV: Aktivni učinki faktorjev na D90

Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
V razmerje*Temp.	-84,15	-0,1522	0,0011	0,9378
Konc. lakt.*V razmerje	-46,90	-0,08485	0,0322	0,4387
Konc. lakt.	14,65	0,02651	0,4195	0,05
V razmerje	-8,316	-0,01504	0,6434	0,05
Temp.	-3,596	-0,006505	0,8407	0,05



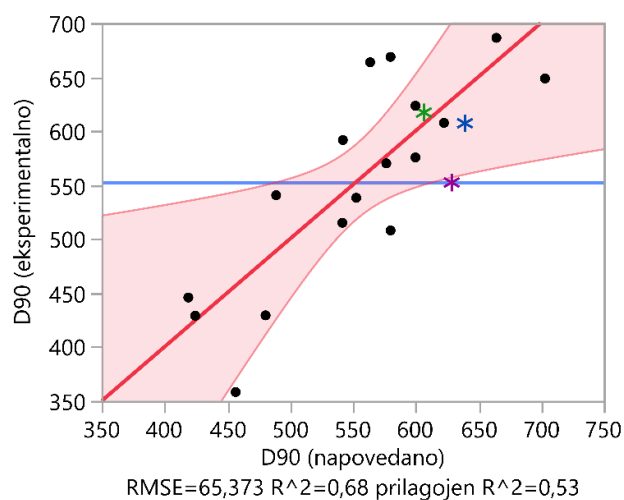
Slika 16: Graf odzivne površine za parameter velikosti D90 v odvisnosti od Temp. in V razmerja (Konc. lakt. = 0,25 g/mL)

Na D90 signifikantno vpliva tudi interakcija Konc. lakt.*V razmerje (sliki 16 in 17). Pri Konc. lakt. 0,2 g/mL zviševanje V razmerja zvišuje D90, pri Konc. lakt. 0,3 g/mL pa ga znižuje. Možna razlaga bi lahko bila, da je sistem pri Konc. lakt. 0,3 g/mL že tako prenasičen, da zviševanje V razmerja preveč prenasichi sistem in se začne laktoza prijemati na stene čaše in na mešalo. Posledično imamo manj gradnikov za rast sferičnih aglomeratov, možno pa je tudi, da se najbolj prijemajo največji delci, zaradi česar se zmanjša D90. Pri Konc. lakt. 0,2 g/mL pa prenasičenje še ni preveliko, zviševanje V razmerja pa ga poveča, kar povzroči, da je na voljo več laktoze za rast sferičnih aglomeratov. Enako lahko razložimo vpliv Konc. lakt. na V razmerje, saj sta interakciji vzajemni.



Slika 17: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na D90

4.3.4.3. Napovedna moč modela



Slika 18: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti D90 od napovedanih vrednosti D90

Na sliki 18 vidimo prileganje modela vrednostim pridobljenim z DSD-jem in dodatnimi eksperimenti. Vrednosti, pridobljene z DSD-jem, sicer jasno kažejo trend ob modelu, vseeno pa so določene točke od modela relativno oddaljene. Vidimo, da je model dobro napovedal vse vrednosti, pridobljene z dodatnimi eksperimenti, iz česar lahko sklenemo, da ima dobro napovedno moč.

4.3.5. Porazdelitev velikosti delcev

4.3.5.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Model, pridobljen po metodi EMS, je imel samo en signifikanten učinek ($v(\text{meš})$), zaradi česar je imel model, pridobljen po metodi FSR boljše prileganje eksperimentalnim podatkom (nižja AICc in BIC ter višja R^2 in prilagojen R^2), prav tako pa tudi nižjo varianco (nižji RMSE) in bolj primerno grafično analizo podatkov (graf dejanskih v odvisnosti od napovedanih vrednosti in graf rezidualov v odvisnosti od napovedanih vrednosti). Glede na rezultate analiz transformacija ni bila potrebna.

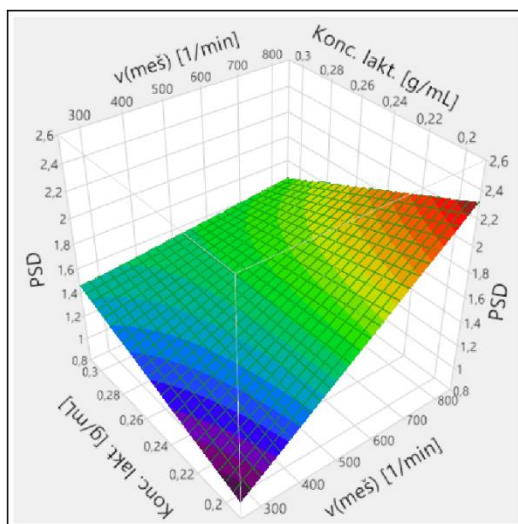
4.3.5.2. Aktivni učinki

Aktivni učinki faktorjev na PSD so prikazani v preglednici XV. Edini signifikantni glavni učinek je bil faktor $v(\text{meš})$, faktorja Temp. in Konc. lakt. pa sta kot glavna faktorja vključena zaradi učinka dednosti. Z višjo hitrostjo mešanja se PSD širi. Verjeten razlog je v tem, da se z večanjem faktorja $v(\text{meš})$ znižujemo D10 (razlaga podana pri razlagi aktivnih učinkov faktorjev na D10), na D90 pa ne vplivamo, zaradi česar se PSD širi. S hitrejšim mešanjem povzročimo tudi hitrejšo rast kristalov in sferičnih aglomeratov, kar privede do večjih razlik v velikosti delcev kot pri počasnejšem mešanju. Večji kristali in večji sferični aglomerati namreč rastejo hitreje kot manjši.

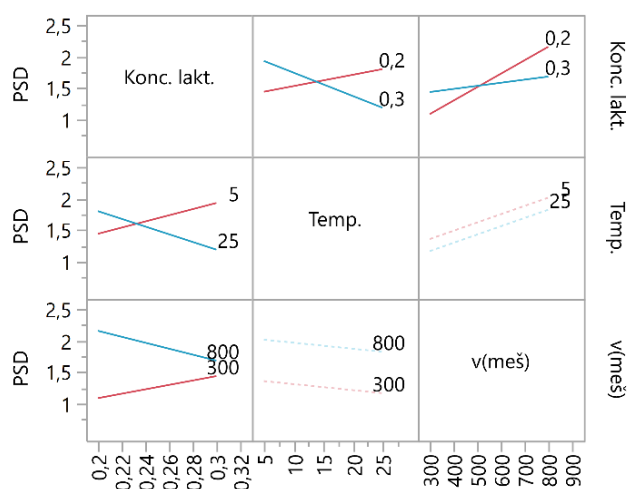
Preglednica XV: Aktivni učinki faktorjev na PSD

Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
$v(\text{meš})$	0,3273	0,2056	0,0001	0,9972
Konc. lakt.*Temp.	-0,2741	-0,1722	0,0009	0,9473
Konc. lakt.*$v(\text{meš})$	-0,2050	-0,12877	0,0063	0,7438
Temp.	-0,09532	-0,05989	0,1147	0,1912
Konc. lakt.	-0,03051	-0,01917	0,5944	0,05

Na PSD vplivata tudi dve dvofaktorski interakciji in sicer Konc. lakt*Temp. ter Konc. lakt*v(meš) (sliki 19 in 20). Pri Konc. lakt. 0,2 g/mL višanje Temp. viša PSD (niža D10), pri Konc. lakt. 0,3 g/mL pa ga niža (veča D10). Ponovno je razlog za vpliv interakcije na PSD vpliv na D10, kjer je prisotna enaka interakcija (razlaga interakcije je podana pri razlagi aktivnih učinkov faktorjev na D10). Če pogledamo interakcijo Konc. lakt.*v(meš) vidimo, da višanje hitrosti mešanja pri Konc. lakt. 0,3 g/mL počasneje dviguje PSD kot pri Konc. lakt. 0,2 g/mL. Možna razlaga bi lahko bila, da je pri višji koncentraciji laktoze v sistemu na voljo več gradnikov in lahko drobni delci, ki nastajajo z abrazijo zaradi hitrega mešanja bolj zrastejo kot pri Konc. lakt 0,2 g/mL. Enako lahko razložimo vpliv Konc. lakt. na v(meš), saj so dvofaktorske interakcije vzajemne.



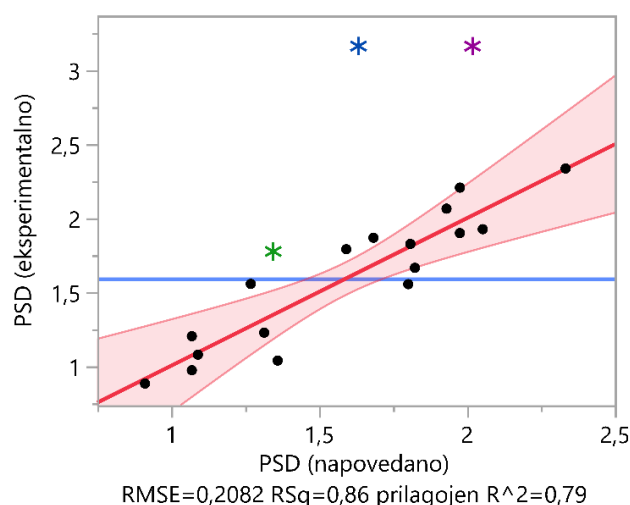
Slika 19: Graf odzivne površine za PSD v odvisnosti od v(meš) in Konc. lakt. (Temp. = 15 °C)



Slika 20: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na PSD

4.3.5.3. Napovedna moč modela

Čeprav so bili prilaganje modela eksperimentalnim vrednostim (slika 21) in prilagojene moči aktivnih faktorjev (preglednica XV) za PSD zelo dobri, smo vrednosti PSD pri obeh eksperimentih optimizacije zelo slabo napovedali. V obeh primerih je bil PSD veliko višji kot napovedano, razlog je v nižjih D10 in D50. Ker smo pri Eksperimentu 3 podali solidno napoved, pri eksperimentih optimizacije pa zelo slabo, lahko sklepamo, da model ne more posnemati ekstremnih pogojev, pri katerih sta bila izvedena eksperimenta optimizacije.



Slika 21: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti za PSD od napovedanih vrednosti za PSD

4.3.6. Ovalnost

4.3.6.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Z metodo EMS nismo dobili nobenega aktivnega učinka, z metodo FSR pa smo ustvarili zadovoljiv model. Ker je rezultat Box-Cox transformacije ($\text{best } \lambda_{\text{FSR}} = 2$) namigoval na kvadratno transformacijo, smo to tudi izvedli, a je bil dobljen model praktično enak prvotnemu, zato smo ohranili model z netransformiranimi podatki.

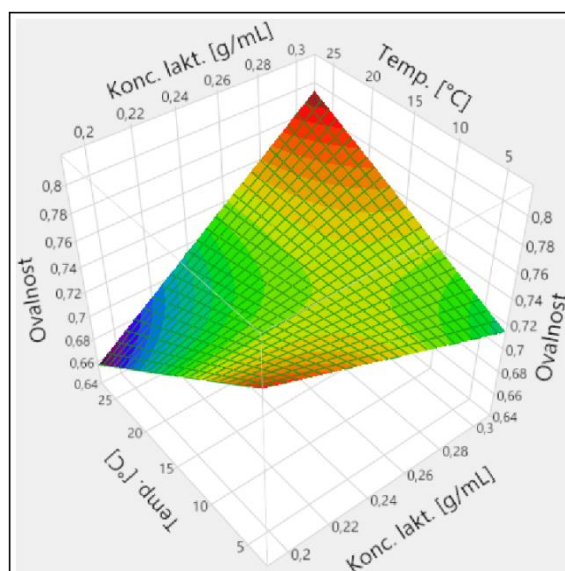
4.3.6.2. Aktivni učinki

V preglednici XVI so prikazani aktivni učinki faktorjev na ovalnost. Glavni učinki, ki smo jih vključili v model so $t(\text{dod.meš})$, Konc.lakt in Temp . Dlje časa kot dodatno mešamo kristalizacijski sistem po celotni dodatni raztopini laktoze, manj so delci ovalni. Na prvi pogled bi sicer z daljšim dodatnim mešanjem pričakovali bolj okrogle aglomerate, ampak

očitno ni tako. Možna razlaga je, da potovanje delcev ni povsem naključno, ampak se pri mešanju ustvari vrtinec, v katerem potujejo večino časa. Očitno potem sile delujejo predvsem na stranske dele delca in ga naredijo bolj aerodinamičnega in posledično manj ovalnega. Višja je koncentracija laktoze, bolj so delci ovalni. Možna razlaga je naslednja. Ko je v kristalizacijski sistemu vnesene več laktoze, so sferični aglomerati številčnejši. Posledično je je v toku vrtinca ujet le manjši delež delcev in je gibanje delcev bolj neurejeno, zaradi česar so delci povprečno bolj ovalni. Glavni učinek Temp. ni signifikanten in je v model vključen zaradi učinka dednosti.

Preglednica XVI: Aktivni učinki faktorjev na ovalnost

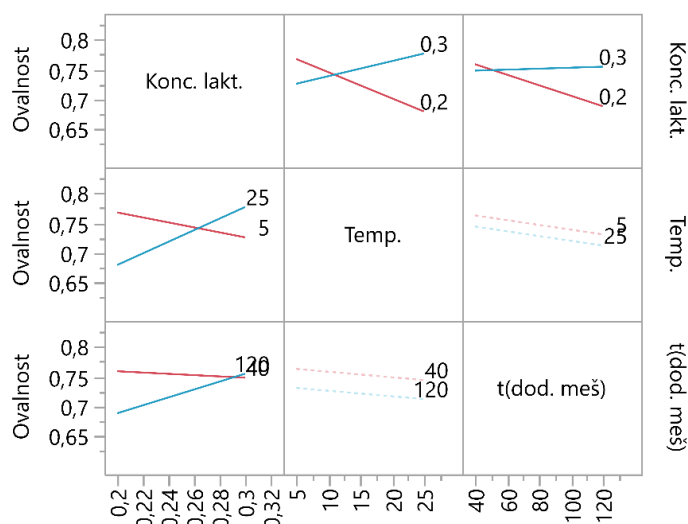
Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
Konc. lakt.*Temp.	0,03460	0,04692	0,0004	0,9825
Konc. lakt.*t(dod. meš)	0,01920	0,02603	0,0167	0,571
t(dod. meš)	-0,01590	-0,02156	0,0266	0,4776
Konc. lakt.	0,01381	0,01873	0,0482	0,3568
Temp.	-0,009304	-0,01261	0,1626	0,1329



Slika 22: Graf odzivne površine za ovalnost v odvisnosti od Konc. lakt. in Temp. (t(dod.meš) = 80 min)

Največji vpliv na ovalnost imata interakciji Konc. lakt.*Temp. in Konc. lakt.*t(dod. meš) (sliki 22 in 23). Pri Konc. lakt. 0,3 g/mL se z zviševanjem Temp. ovalnost povečuje, pri

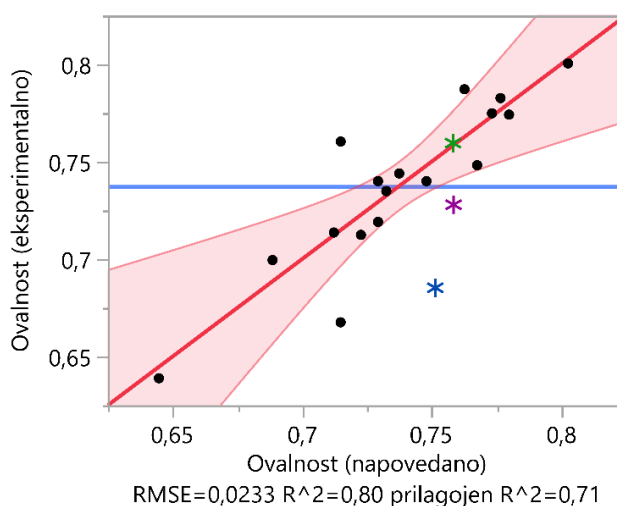
Konc. lakt. 0,2 g/mL pa se znižuje. Za razlago interakcije bi bile potrebne dodatne raziskave glede gibanja delcev med sferično kristalizacijo in silah, ki vplivajo nanje. Pri Konc. lakt. 0,3 g/mL, t(dod.meš) nima vpliva na ovalnost, pri Konc. lakt. 0,2 g/mL pa jo z zviševanjem znižuje. Interakcija je logična, če pogledamo razlage glavnih učinkov Konc. lakt. in t(dod.meš).



Slika 23: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na ovalnost

4.3.6.3. Napovedna moč modela

Model se lepo prilega eksperimentalnim podatkom, pridobljenim z DSD-jem, in dodatnemu Eksperimentu 3 (slika 24). Pri analizi podatkov smo zaznali tudi 2 osamelca (DSD007 in



Slika 24: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti ovalnosti od napovedanih vrednosti ovalnosti

DSD017), ki pa smo ju pustili v modelu. Z odstranitvijo bi sicer izboljšali prileganje modela eksperimentalnim podatkom, pridobljenih z DSD-jem, ne bi pa to vplivalo na prileganje eksperimentalnim podatkom, pridobljenimi z dodatnimi eksperimenti. Cilj modela je, da se bo čim bolj prilegal čim več eksperimentom in ne samo tistim, s pomočjo katerih smo model ustvarili. Tudi oba eksperimenta optimizacije sta se pokazala kot osamelca, kar kaže na to, da naš model sicer lepo napoveduje ovalnost sferičnih aglomeratov v večjem delu območja eksperimentalnih vrednosti, na nekaterih območjih pa se napovedna moč poslabša.

4.3.7. Hrapavost

4.3.7.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Z obema metodama analize DSD-ja smo dobili ista aktivna učinka (preglednica XVII) in posledično isti model. Sicer se učinek V razmerje ni izkazal kot signifikanten ($p = 0,0723$), a smo ga izjemoma vseeno vključili v model, ker bi bil drugače v model vključen samo en učinek, kar bi povzročilo zelo slabo prileganje modela eksperimentalnim vrednostim. Ker je rezultat Box Cox transformation ($\text{best } \lambda = 2$) namigoval na kvadratno transformacijo, smo to tudi izvedli, a je bil dobljen model praktično enak prvotnemu, zato smo ohranili model z nespremenjenimi podatki.

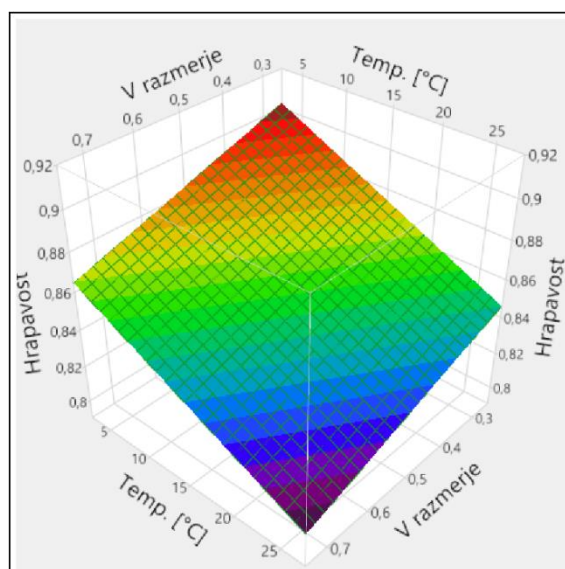
4.3.7.2. Aktivna učinka

Aktivna glavna učinka v modelu sta faktorja Temp. in V razmerje (preglednica XVII). Z višanjem Temp. dobimo bolj hrapave površine sferičnih aglomeratov (slika 25). To si lahko razložimo z vplivom temperature na viskoznost. Z višanjem temperature sistema pada viskoznost, s tem narašča Reynoldsovo število, s čimer pada sila upora tekočine na delce. Zaradi manjših strižnih sil, ki delujejo na delce, imajo ti bolj hrapavo površino. Največja verjetnost za abrazijo je ravno pri izrastkih na sferičnem aglomeratu, zato z večanjem strižnih sil na delec povzročimo, da ima ta manj hrapavo površino.

Preglednica XVII: Aktivna učinka faktorjev na hrapavost

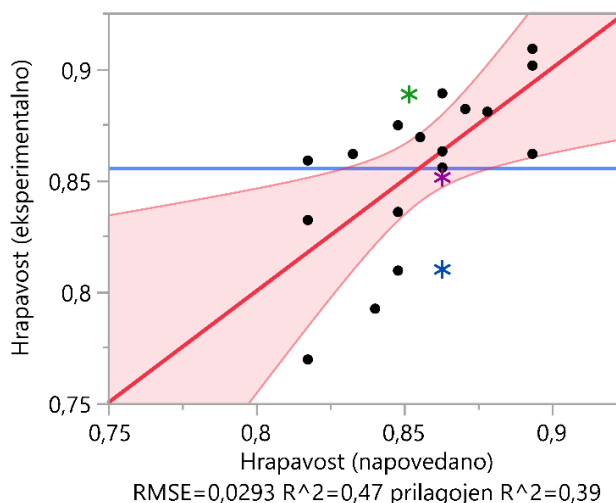
Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
Temp.	-0,02272	-0,02656	0,0177	0,5644
V razmerje	-0,01524	-0,01781	0,0723	0,2863

Z višanjem V razmerja dobimo bolj hrapave površine sferičnih aglomeratov (slika 25). Spet si lahko pojav razložimo z zmanjšanjem viskoznosti, saj ima aceton nižjo dinamično viskoznost kot voda (46).



Slika 25: Graf odzivne površine za hrapavost

4.3.7.3. Napovedna moč modela



Slika 26: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti hrapavosti od napovedanih vrednosti hrapavosti

Dobili smo model s slabšim prileganjem (nižji prilagojen R^2) eksperimentalnim vrednostim, pridobljenih z DSD-jem (slika 26). Če pogledamo napovedno moč modela, vidimo, da smo točno vrednost napovedali samo Optimizaciji 2, pri Optimizaciji 1 smo napovedali previsoko

vrednost, pri Eksperimentu 3 pa prenizko, iz česar lahko zaključimo, da je napovedna moč modela slabša.

4.3.8. Hausnerjevo razmerje

4.3.8.1. Izbira najboljšega statističnega modela

Ker smo pri treh eksperimentih dobili premalo produkta, analize rezultatov z metodo EMS nismo mogli izvesti, saj zahteva rezultate meritev vseh eksperimentov DSD-ja. Z metodo FSR smo dobili zadovoljiv model, transformacija podatkov ni bila potrebna.

4.3.8.2. Aktivni učinki

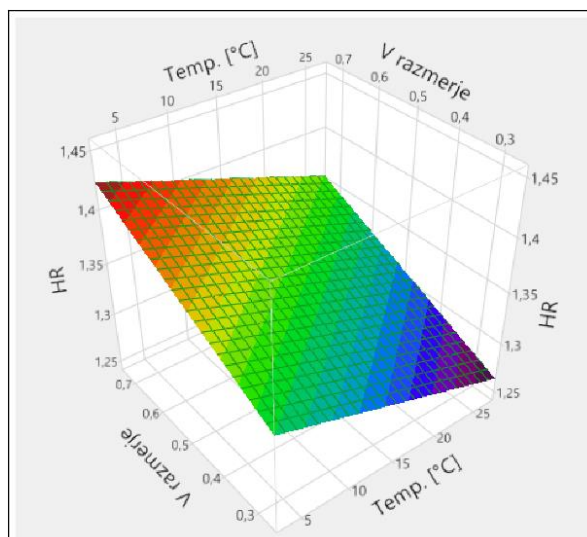
Aktivni učinki faktorjev na HR so prikazani v preglednici XVIII. Aktivna glavna učinka sta V razmerje in Temp, v model pa je zaradi učinka dednosti vključen še glavni učinek Konc. lakt. Vplive faktorjev na pretočne lastnosti si lahko razlagamo z vplivom na primarne fizikalne lastnosti delcev, ki potem vplivajo tudi na pretočne lastnosti delcev. Z večanjem V razmerja narašča HR, kar pomeni, da je razlika v nasipni in zbiti gostoti večja, kar nakazuje na slabše pretočne lastnosti praška. Pojav lahko razložimo z vplivom V razmerja na D10 in hrapavost. Z večanjem V razmerja se D10 zniža in poveča hrapavost. Zmanjšanje velikosti delcev običajno poslabša pretočne lastnosti, enak učinek ima tudi večja hrapavost, saj je med delci več trenja (51).

Z višanjem Temp. HR pada, kar nakazuje na boljše pretočne lastnosti delcev. Pojav si lahko razložimo z vplivom Temp. na D10 in hrapavost. Z višanjem Temp. hrapavost pada, kar naj bi poslabšalo pretočne lastnosti (51), hkrati pa D10 narašča, kar naj bi pretočne lastnosti izboljšalo. Očitno tukaj prevlada vpliv na D10.

Preglednica XVIII: Aktivni učinki faktorjev na HR

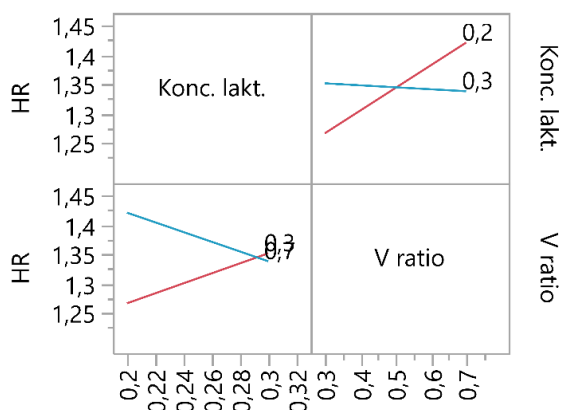
Učinek	Ocena	Relativna ocena	p-vrednost	Prilagojena moč
Konc. lakt.*V razmerje	-0,04186	-0,03098	0,0007	0,9724
V razmerje	0,03516	0,02601	0,0011	0,9495
Temp.	-0,02884	-0,02134	0,0026	0,8714
Konc. lakt.	0,0005772	0,0004270	0,9386	0,05

Na sliki 27 je prikazan graf odzivne površine za Hausnerjevo razmerje. Vidimo, da je najnižji HR (1,28) pri Temp. 25 °C in V razmerju 0,3, najvišji (1,41) pa pri Temp 5 °C in V razmerju 0,7, kar sovpada z zgornjimi ugotovitvami. Sicer je prisotna tudi interakcija Konc. lakt*V ratio (slika 28). Pri V razmerju 0,3 z naraščanjem Konc. lakt. HR narašča, pri V razmerju



Slika 27: Graf odzivne površine za Hausnerjevo razmerje (Konc. lakt = 0,25 g/mL)

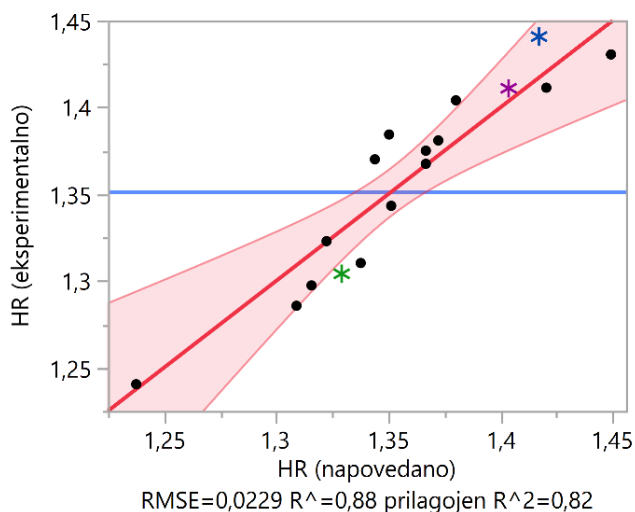
0,7 pa HR z naraščanjem Konc. lakt. pada. To interakcijo smo zasledili samo še pri vplivu faktorjev na izkoristek, pri vplivu faktorjev na velikost, porazdelitev velikosti ali obliko pa je nismo zasledili. Ker so te primarne fizikalno-kemijske lastnosti ključne pri razumevanju pretočnih lastnosti, interakcije Konc. lakt*V razmerje brez nadaljnjih študij ne moremo razložiti. Z optimiziranjem vrednosti faktorjev lahko računsko dobimo najnižji HR (1,24) pri Temp. 25 °C, V razmerju 0,3 in Konc. lakt 0,2 g/mL, s čimer bi dobili delce z zmernimi (angl. fair) pretočnimi lastnostmi (31). Najvišji HR (1,45) bi dobili pri Temp. 5 °C, V razmerju 0,7 in Konc. lakt 0,2 g/mL.



Slika 28: Interakcije med faktorji in njihov vpliv na Hausnerjevo razmerje

4.3.8.3. Napovedna moč modela

Kot lahko vidimo na sliki 29, smo dobili model z zelo dobrim prilaganjem vrednostim DSD-ja, prav tako smo za vse tri dodatne eksperimente zelo dobro napovedali vrednosti HR, iz česar lahko zaključimo, da ima model za HR dobro napovedno moč, kar smo glede na analize modela tudi pričakovali.



Slika 29: Graf odvisnosti eksperimentalno dobljenih vrednosti HR od napovedanih vrednosti HR

4.3.9. Povzetek rezultatov statističnega vrednotenja DSD-ja

Čeprav literatura predlaga EMS kot metodo analize DSD-ja prvega izbora, v preglednici XIX vidimo, da se je kot boljša metoda večkrat izkazal FSR. Glede na tri dodatne eksperimente in glede na ujemanje modela z eksperimentalnimi vrednostmi, pridobljenimi z DSD-jem, smo videli, da se je napovedna moč modelov razlikovala glede na odzive. V preglednici XIX je napovedna moč opisana opisno, s prilagojenim R^2 (upoštevajo eksperimente DSD-ja), s koeficientom variacije korena srednje kvadratne napake za eksperimente DSD-ja ($CV(RMSE)_{DSD}$) in s koeficientom variacije korena srednje kvadratne napake za dodatne eksperimente ($CV(RMSE)_{DOD}$). $CV(RMSE)$ nam poda normalizirano vrednost RMSE (delimo ga s povprečno vrednostjo odziva), kar nam omogoča lažjo primerjavo RMSE med odzivi. Idealen model bi imel prilagojen R^2 1 in $CV(RMSE)_{DSD}$ ter $CV(RMSE)_{DOD}$ 0.

Če upoštevamo relativno nizko število eksperimentov, ki smo jih izvedli za izdelavo modelov, smo lahko generalno gledano z modeli zadovoljni. Pri modelih s slabšo napovedno

močjo bi bilo smiselno izvesti dodatne eksperimente, da bi lahko naredili boljši model. Prav tako bi bilo treba za boljšo oceno napovedne moči modela izvesti več eksperimentov. Odzive bi bilo treba napovedovati pri čim bolj različnih vrednostih, kar je slabost naših dveh eksperimentov optimizacije, ki imata relativno podobne vrednosti faktorjev in posledično tudi podobne napovedane vrednosti.

Preglednica XIX: Povzetek izbranih najboljših statističnih modelov in napovedne moči modela pri posameznem odzivu

Odziv	Metoda	Napovedna moč	Prilagojen R^2	CV(RMSE) _{DSD}	CV(RMSE) _{DOD}
Izkoristek	EMS (transformacija s kvadratnim korenom)	Dobra	0,78	19,07	7,15
D10	FSR	Srednje dobra	0,80	28,76	67,03
D50	FSR	Srednje dobra	0,47	16,39	9,94
D90	FSR	Srednje dobra	0,53	11,83	8,75
PSD	FSR	Srednje dobra	0,79	13,08	71,13
Ovalnost	FSR	Srednje dobra	0,71	3,16	5,71
Hrapavost	FSR	Slaba	0,39	3,42	4,43
Hausnerjevo razmerje	FSR	Dobra	0,82	1,69	1,51

V preglednici XX je predstavljen povzetek celokupnih vplivov faktorjev na posamezen odziv. Celokupni vpliv faktorja na posamezen odziv predstavlja prispevek vseh učinkov, ki vsebujejo izbran faktor, na spreminjanje posameznega odziva. Rezultat je predstavljen kot razmerje vsote vseh učinkov, ki vsebujejo izbran faktor, in vsote vseh učinkov (tudi tistih, ki ne vsebujejo izbranega faktorja) na spreminjanje odziva (52). V zadnji vrstici je predstavljena tudi vsota celokupnih vplivov faktorja na vse odzive. S pomočjo vsote lahko faktorje razvrstimo glede na pomembnost za vse lastnosti hkrati.

Kot najpomembnejši za vse odzive so se izkazali Temp., Konc. lakt. in V razmerje, ki vsi vplivajo na prenasíčenje sistema. Posledíčno so se za proces kot pomembne velikokrat izkazale interakcije med njimi. V večini primerov se je pokazalo, da imajo interakcije celo večji vpliv na posamezen odziv, kot pa ga imajo glavni učinki. Za faktor Konc. lakt. smo pri odzivih izkoristek in D50 zaznali tudi kvadratni učinek, česar pri drugih faktorjih nismo zaznali. Četrty najpomembnejši faktor za vse odzive je faktor hitrost mešanja, ki vpliva na velikost, porazdelitev velikosti in obliko delcev, kar so logični vplivi. Hitrost mešanja je odvisna tudi od lastnosti mešala, ker bi mešalo drugačnih dimenzij povzročalo drugačne hidrodinamične sile in bi po vsej verjetnosti dobili drugačne delce ali pa vsaj drugačne vplive faktorja hitrosti mešanja. Faktor t(dod.meš) vpliva samo na ovalnost, faktor v(dod) pa v preiskovalnem območju nima signifikantnega vpliva na noben odziv. To si lahko razložimo tako, da faktor nima nobenega neposrednega vpliva na prenasíčenje, razmerje komponent v sistemu ali na strižne sile. Sicer vpliva na hitrost spreminjanja prenasíčenja in razmerja komponent v sistemu (kinetiko prenasíčenja), kar pa glede na naše rezultate ne igra pomembne vloge. Z vsako dodano kapljico se povečata koncentraciji laktoze in vode v sistemu. Večja koncentracija laktoze povečuje prenasíčenje, večja koncentracija vode pa ga zmanjšuje. Ali se sistem pomika v smer povečanja ali zmanjšanja prenasíčenja, je odvisno od faktorjev Konc. lakt. in V razmerja.

Preglednica XX: Povzetek celokupnih vplivov faktorjev na posamezen odziv

	Konc.lakt.	V razmerje	Temp.	v(dod)	v(meš)	t(dod.meš)
Izkoristek	0,399	0,573	0,531	/	/	/
D10	0,331	0,211	0,299	/	0,427	/
D50	0,314	/	/	/	0,684	/
D90	0,247	0,971	0,748	/	/	/
PSD	0,463	/	0,331	/	0,668	/
Ovalnost	0,806	/	0,586	/	0,436	0,310
Hrapavost	/	0,332	0,701	/	/	/
HR	0,413	0,773	0,234	/	/	/
Vsota	2,973	2,86	3,43	0	2,215	0,31

Tako faktor v(dod) kot faktor t(dod.meš) vplivata na celotno trajanje procesa, pri čemer je faktor v(dod) odvisen od faktorja V razmerje (nižje je V razmerje, večji vpliv na celotno

trajanje procesa bo imel v(dod)). Iz naših rezultatov lahko tako zaključimo, da trajanje procesa nima bistvenega vpliva na katerikoli merjen odziv. To si lahko razlagamo tako, da kristalizacija in poznejša tvorba aglomeratov potečeta dovolj hitro, da podaljševanje procesa, v primeru naših eksperimentalnih pogojev, na lastnosti sferičnih aglomeratov nima vpliva. Daljše trajanje procesa pomeni tudi daljše trajanje delovanja strižnih sil, ki lahko povzročajo abrazijo delcev ter nastanek manjših delcev. Ker pa trajanje na noben parameter velikost delcev (D10, D50, D90) ni imelo vpliva, lahko predvidevamo, da se med abrazijo in rastjo delcev vzpostavi ravnotežje. Treba je omeniti še, da smo tekom preliminarnih eksperimentov ugotovili, da je za potek celotnega procesa vseeno potreben nek minimalen čas, ki pa smo ga v primeru DSD-ja vedno presegli.

Če ocenimo DSD kot presejalni načrt, lahko vidimo, da smo z relativno malo eksperimenti zaznali precej aktivnih učinkov, pri čemer smo lahko podrobno tudi preučili interakcije in kvadratne učinke. Ugotovili smo, kateri faktorji imajo največji vpliv na lastnosti sferičnih aglomeratov, s pomočjo izbranih faktorjev smo naredili tudi statistične modele, pri katerih so bili določeni dobri, druge pa bi lahko še izboljšali. Iz tega lahko zaključimo, da je DSD v prvi vrsti še vedno presejalni načrt, za natančnejše modeliranje in preučevanje vpliva faktorjev pa so tudi tukaj potrebni dodatni poskusi z najpomembnejšimi faktorji (npr. polni faktorski načrt (ang. »Full factorial design«)). Z dodatnimi poskusi bi lahko tudi razširili preiskovalno območje.

Treba se je zavedati tudi omejitev, ki jih prinaša DOE na splošno. V magistrski nalogi so bile največje omejitve naslednje:

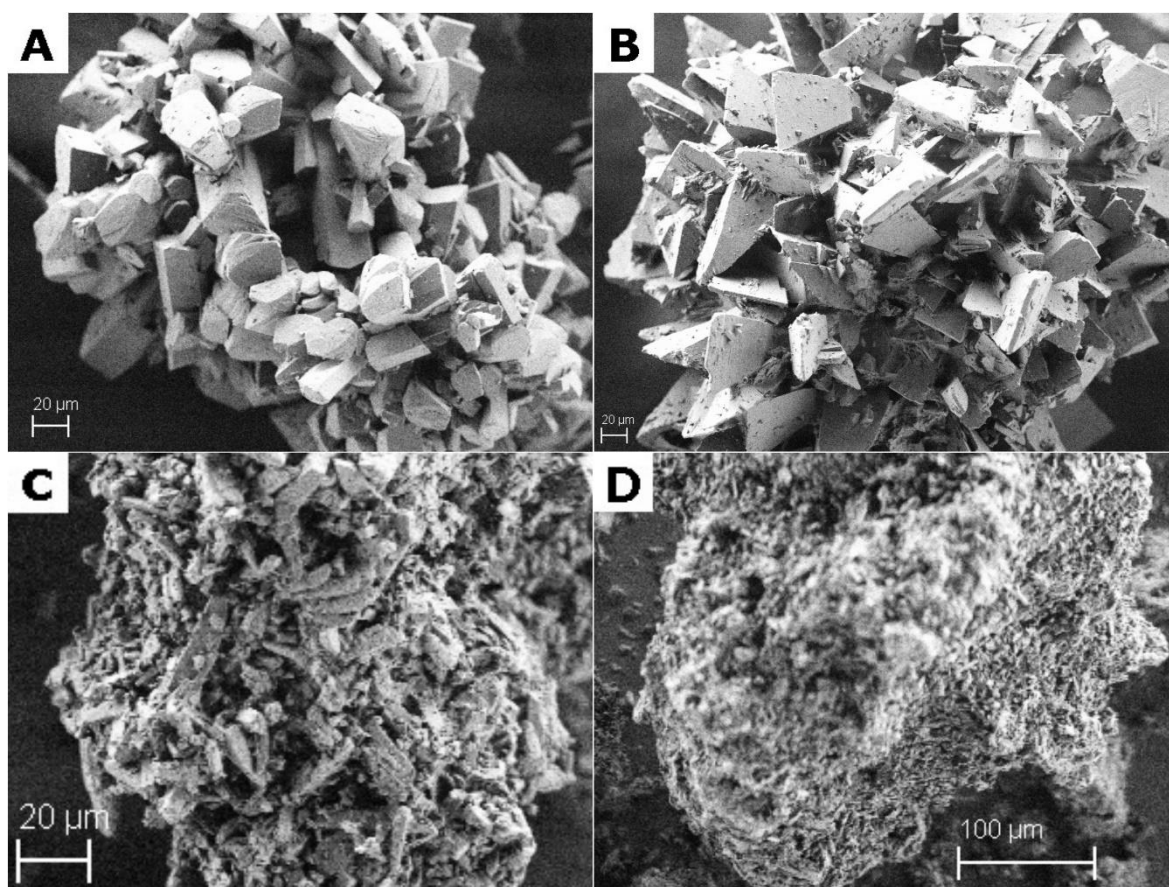
- treba je bilo postaviti ekstremne vrednosti faktorjev tako, da smo v vsaki kombinaciji faktorjev dobili sferične aglomerate, kar nam je precej zožilo preiskovalno območje
- za ustrezno postavljen DOE in interpretacijo rezultatov je treba precej statističnega znanja
- pojavi se težava, ko se želeni odziv težko natančno ovrednoti z eno številko (npr. slike SEM).

4.4. PRAVA GOSTOTA

Petim vzorcem, ki smo jih dobili pri DSD-ju, smo pomerili pravo gostoto s helijevim piknometrom. Povprečna prava gostota sferičnih aglomeratov iz laktoze je bila 1,556 g/mL (koeficient variacije (CV) = 1,08 %), kar je zelo blizu literaturni vrednosti prave gostote za laktozo (1,525) (53). Iz tega lahko zaključimo, da sferična kristalizacija in spreminjanje procesnih parametrov na pravo gostoto nima bistvenega vpliva.

4.5. VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Sferične aglomerate vsake serije smo slikali pod SEM in med seboj primerjali morfologijo delcev. Obliko in površino sferičnih aglomeratov smo sicer opisali že z odzivoma ovalnost in hrapavost pri DSD-ju, nismo pa podrobneje opisali strukture sferičnih aglomeratov, ker je to lastnost težko natančneje opisati z eno samo številko. Glede na prevladujočo obliko osnovnih gradnikov (kristalov) smo sferične aglomerate razdelili v štiri morfološke skupine (Prizme, Piramide, Iglice in Ostali; slika 30).



Slika 30: Primeri predstavnikov morfoloških skupin: A) Prizme; B) Piramide; C) Iglice; D) Ostali

Prizme imajo dve osnovni ploskvi in štiri stranske ploskve, piramide imajo eno osnovno ploskev, štiri stranske ploskve in zašiljen vrh, iglice pa imajo dva zašiljena vrha in štiri stranske ploskve. V skupino Ostali spadajo sferični aglomerati, ki jih zaradi nerazpoznavnosti osnovnih ploskev ali mešanega tipa nismo mogli uvrstiti nikamor. Za nadaljnje primerjave skupine Ostali nismo upoštevali. Predpostavili smo, da se zaradi različne oblike osnovnih gradnikov ti združujejo drugače, kar vodi do različnih lastnosti končnega sferičnega aglomerata.

Znotraj morfoloških skupin smo primerjali procesne pogoje, pod katerimi so bili delci proizvedeni (preglednica XXI). Z modro barvo so označene vrednosti posameznega faktorja, ki so pri posamezni morfološki skupini vse enake, z zeleno barvo pa so označene enake vrednosti posameznega faktorja, ki pri posamezni morfološki skupini predstavljajo vsaj 75 % vseh vrednosti. Trende smo ugotovili pri obeh ekstremnih oblikah, Prizmah in Iglicah. Pri Piramidah trenda nismo mogli izluščiti, ta skupina ima tudi največ predstavnikov, ki se med sabo najbolj razlikujejo, gre za nekakšno vmesno fazo med kvadri in iglicami, zato je tudi težko najti kakšen trend pri parametrih.

Preglednica XXI: Procesnih pogoji različnih morfoloških skupin

Eksperiment	Konc. lak.	V razmerje	Temp	v(dod)	v(meš)	t(dod. meš)
Prizme						
DSD001	0,2	0,3	5	9,7	300	120
DSD005	0,25	0,3	5	2,1	300	40
DSD010	0,3	0,3	15	9,7	800	40
DSD017	0,2	0,3	25	9,7	550	40
Piramide						
DSD009	0,3	0,3	25	2,1	300	80
DSD011	0,3	0,7	25	2,1	800	40
DSD012	0,3	0,3	5	5,9	800	120
DSD014	0,25	0,5	15	5,9	550	80
DSD015	0,2	0,5	5	2,1	800	40
DSD016	0,25	0,7	25	9,7	800	120
Iglice						
DSD002	0,2	0,7	15	2,1	300	120

DSD007	0,2	0,7	25	5,9	300	40
DSD008	0,3	0,7	5	2,1	550	120
DSD013	0,2	0,3	25	2,1	800	120

Pri Prizmah smo ugotovili, da je V razmerje v vseh primerih 0,3. To si lahko razlagamo s tem, da je prisotno manjše prenasíčenje, kar pomeni, da kristali rastejo počasneje in posledíčno bolj enakomerno v vse smeri. Pri treh od štirih primerov je $v(\text{dod})$ 9,7 mL/min. Hitro dodajanje raztopine laktoze v kristalizacijski sistem pomeni, da se hitreje pomikamo iz nestabilnega v metastabilno stanje oz. se veliko prenasíčenje hitreje níža, posledíčno kristali rastejo počasneje in bolj enakomerno. Ta úinek velja za naš primer (nížje koncentracije raztopine laktoze in omejitev víšanja hitrosti dodajanja raztopine laktoze). Če bi v sistem dodajali raztopino laktoze z večjo koncentracijo, bi bil vpliv redčenja netopila manjši od vpliva dodajanja laktoze v sistem in bi se prenasíčenje z dodajanjem zvíševalo. Ugotovili smo še, da je bil faktor $t(\text{dod.mes})$ pri treh od štirih primerov 40 min, za kar nimamo logíčne razlage.

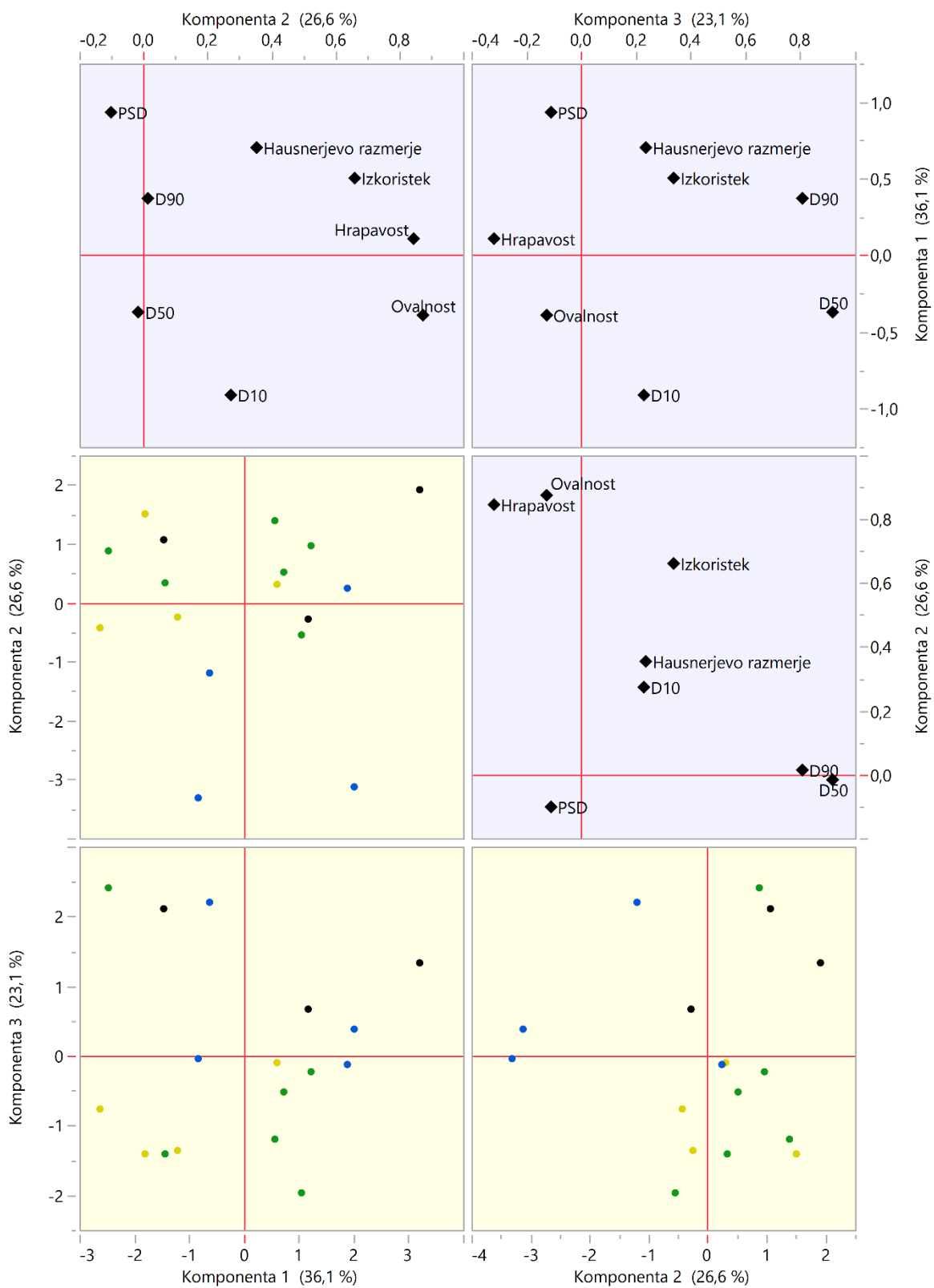
Pri Iglicah smo opazili, da so bili pri treh od štirih eksperimentov V razmerje 0,7, $v(\text{dod})$ 2,1 mL/min, $t(\text{dod.mes})$ 120 min in Konc. lakt. 0,2 g/mL. V razmerje, $v(\text{dod})$ in $t(\text{dod.mes})$ imajo vrednosti na drugem ekstremu kot pri Prizmah, kar je logíčno, glede na to, da je tudi morfologija osnovnih kristalov najbolj različna. V razmerje 0,7 si lahko razlagamo s povečanjem prenasíčenja in posledíčno hitro rastjo kristala, ki zaradi tega raste neenakomerno v vse smeri. Ker najbolj raste samo v eno smer, dobimo kristale v obliki iglic. Na podoben naín lahko razložimo tudi vrednost faktorja $v(\text{dod})$ 2,1 mL/min, saj s tem stanje velikega prenasíčenja traja dlje časa in kristali dlje časa preferenčno hitreje rastejo v eno smer. Vrednost faktorja $t(\text{dod.mes})$ 120 min, si podobno kot pri Prizmah še ne znamo razložiti. Glede na to, da se ta faktor pojavi pri Iglicah in Prizmah in da so vrednosti obratne, izgleda, da ima vpliv na morfologijo kristalov. Vrednost faktorja Konc. lakt. 0,2 g/mL s prenasíčenjem težko razlagamo; ker ta faktor pri kvadríh ní prisoten, je móžno tudi, da gre za naključje, saj imamo majhen vzorec.

Da bi potrdili našo predpostavko o tem, da oblika osnovnega kristala vpliva na lastnosti sferíčnih aglomeratov, smo naredili analizo glavnih komponent (ang. »Principal component analysis«, PCA), pri čemer smo lastnosti (odzive) sferíčnih aglomeratov združili v tri glavne

komponente, ki nam opišejo 85,8 % variacijo podatkov (slika 31). Rumene točke predstavljajo Prizme, zelene Piramide, modre Iglice in črne Ostale.

Na glavno komponento 1 imajo največji vpliv PSD, D10 in HR, na glavno komponento 2 ovalnost, hrapavost in izkoristek ter na glavno komponento 3 D90 in D50 (slika 31, modro ozadje). Tako nam glavna komponenta 1 v grobem predstavlja velikost najmanjših delcev in porazdelitev velikosti, glavna komponenta 2. obliko sferičnih aglomeratov, glavna komponenta 3 pa velikost večjih delcev. Na sliki 31 (rumeno ozadje) vidimo, da se sferični aglomerati iz naših morfoloških skupin po velikosti manjših delcev in porazdelitvi velikosti (glavna komponenta 1) ne združujejo v skupine. Po velikosti večjih delcev (glavna komponenta 3) lahko ločimo Iglice in Ostale (večje velikosti) od Prizem in Piramid. Ta ugotovitev namiguje na večjo sorodnost Ostalih z Iglicami kot s Prizmami ali Piramidami, kar je opazno tudi na SEM slikah (slika 30). Na sliki 31 (rumeno ozadje) je razvidno tudi, da po obliki (glavna komponenta 2) izstopajo sferični aglomerati iz morfološke skupine Iglice (so manj ovalne in bolj hrapave). To potrjuje našo domnevo, da lahko oblika osnovnega kristala vpliva tudi na morfološke lastnosti sferičnih aglomeratov. Med skupinama Prizme in Piramide ni vidnih razlik, saj so v dvorazsežnem prostoru relativno skupaj, kar si lahko razlagamo z manjšo razliko v obliki osnovnega kristala, ki se potem tudi v morfologiji sferičnih aglomeratov ne odraža.

Če primerjamo ugotovitve o vplivu faktorjev iz morfoloških skupin in iz DSD-ja, vidimo, da se precej razlikujejo. Pri DSD-ju faktorja $v(\text{dod})$ in $t(\text{dod.meš})$ nista imela aktivnega učinka pri niti enem odzivu, medtem ko pri morfoloških skupinah igrata pomembno vlogo. Prav tako je bil najpogostejši faktor z aktivnim učinkom pri DSD-ju Temp., pri morfoloških skupinah pa ni tako pomemben. Razlike si lahko razložimo s tem, da smo pri morfoloških skupinah gledali samo obliko osnovnega kristala, pri DSD-ju pa lastnosti sferičnih aglomeratov. Čeprav smo pokazali, da lahko oblika osnovnega kristala vpliva tudi na lastnosti sferičnih aglomeratov, se je treba zavedati, da so bili kriteriji za sprejem aktivnega učinka pri DSD-ju bistveno strožji, prav tako je bil vzorec večji, meritve pa so bile opravljene s pomočjo merilnih naprav (pri morfoloških skupinah smo obliko osnovnega kristala ocenili sami). Zato je treba rezultate, pridobljene s pomočjo morfoloških skupin, jemati z rezervo, vseeno pa smo dobili zanimive in logične ugotovitve, ki pa bi jih bilo za bolj gotove zaključke potrebno bolj raziskati.



Slika 31: Matrica projekcij vzorcev sferičnih aglomeratov v prostor prvih treh komponent (rumeno ozadje) in vpliv prvotnih spremenljivk na glavne komponente 1, 2 in 3 (modro ozadje)

4.6. SPECIFIČNA POVRŠINA

Štirim vzorcem iz različnih morfoloških skupin (dva iz skupine piramid) smo z metodo BET izmerili specifično površino (SSA) (preglednica XXII). Vse vzorce smo pred analizo presejali skozi siti 200 in 80 μm , na analizo pa smo dali frakcijo z velikostjo med 80 in 200 μm . Vzorci so imeli tako primerljive velikosti, torej lahko trdimo, da smo primerjali specifično površino glede na morfologijo delcev. Vidimo, da se SSA po morfoloških skupinah razlikuje. Najnižji SSA imajo sferični aglomerati iz morfološke skupine Prizme, najvišjega pa tisti iz morfološke skupine Iglice. Takšni rezultati so bili glede na SEM slike pričakovani, saj izgleda površina pri sferičnih aglomeratih iz morfološke skupine Prizme manj razgibana kot pri sferičnih aglomeratih iz morfološke skupine Iglice.

Preglednica XXII: SSA vzorcev iz različnih morfoloških skupin

Morfološka skupina	SSA [m^2/g]
Prizme (DSD005)	0,5580
Piramide (DSD009 in DSD016)	0,5608 in 0,8395
Iglice (DSD008)	1,2412

5. SKLEP

S pomočjo DSD-ja nam je uspelo narediti več statističnih modelov za proces sferične kristalizacije laktoze, s katerimi lahko načrtujemo in napovedujemo lastnosti dobljenih sferičnih aglomeratov, ki so lahko potencialno uporabni za različne aplikacije pri trdnih farmacevtskih oblikah.

Čeprav literatura predlaga EMS kot metodo prvega izbora pri analizi DSD, se je kot boljša metoda večkrat izkazal FSR. Dobili smo dva modela (izkoristek, Hausnerjevo razmerje) z dobrim ujemanjem vrednosti, pridobljenih z DSD-jem in hkrati z dobro napovedno močjo. Ostali modeli so bili slabši, zaradi česar bi bilo z namenom izboljšave smiselno izvesti dodatne eksperimente. Prav tako bi bilo treba za boljšo oceno napovedne moči modela izvesti več eksperimentov, pri katerih odzive napovedujemo, ti eksperimenti pa bi morali imeti nastavljene čim bolj različne vrednosti procesnih parametrov.

Glede na obliko osnovnih kristalov smo sferične aglomerate razdelili v štiri morfološke skupine (Prizme, Piramide, Iglice in Ostali). Ugotovili smo, da obstaja določen trend nastavitve nekaterih procesnih parametrov pri morfoloških skupinah Prizme in Iglice. Potrdili smo našo domnevo, da lahko oblika osnovnih kristalov vpliva na strukturo sferičnih aglomeratov in posledično tudi na njihove lastnosti.

Na koncu lahko ocenimo, da smo s pomočjo načrtovanja eksperimentov bolje spoznali proces sferične kristalizacije laktoze, kar je bil tudi cilj magistrske naloge. Za še bolj poglobljeno razumevanje procesa, bi bile potrebne nadaljnje študije. Nekteri predlogi so naslednji:

- Lahko bi naredili popolni faktorski načrt, pri čemer bi preverjali vpliv štirih faktorjev z največjim vplivom na proces (Konc. lakt, Temp., V razmerje, $v(\text{meš})$)
- Lahko bi optimizirali metodo sušenja, saj se uporabljena metoda ni izkazala za najboljšo
- Za izbrane procesne pogoje bi lahko določili točno topnost laktoze (med procesom) in širino metastabilnega območja laktoze.
- Kristalizacijo in aglomeracijo bi lahko spremljali že med procesom v različnih časovnih točkah in izračunali kinetiko rasti kristalov pri posameznih pogojih.

- Proces bi lahko dopolnili z recikliranjem acetona, s čimer bi izboljšali ekonomičnost.
- Lahko bi natančneje preučili gibanje delcev v sistemu in sile, ki nanje delujejo. Pri tem ima pomemben vpliv oblika mešala in njegov položaj, zato bi lahko podrobneje preučili tudi to.
- Proces bolje poznamo samo znotraj eksperimentalnih meja, zato bi lahko preverili, ali lahko rezultate tudi ekstrapoliramo.
- Lahko bi preučevali vpliv vezivne tekočine in emulgatorjev na proces.

6. LITERATURA

1. Chatterjee A, Gupta M, Srivastava B. Spherical crystallization: A technique use to reform solubility and flow property of active pharmaceutical ingredients. *Int J Pharm Investig.* 2017.;7:4–9.
2. Celik M, urednik. *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*. 2. izd. London: Informa Healthcare; 2011. 235.
3. Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O. Spherical crystallization of drugs. *Acta Pharm.* 2012.;62:1–14.
4. Lamešić D, Planinšek O, Lavrič Z, Ilić I. Spherical agglomerates of lactose with enhanced mechanical properties. *Int J Pharm.* 2017.; 516:247–57.
5. Maghsoodi M, Nokhodchi A. Agglomeration of celecoxib by quasi emulsion solvent diffusion method: Effect of stabilizer. *Adv Pharm Bull.* 2016.;6:607–16.
6. Wu JCF, Hamada MS. *Experiments: Planning, Analysis, and Optimization*. 2. izd. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009. 1-5.
7. SAS Institute Inc. *JMP® 13 Design of Experiments Guide*. 2. izd. Cary: SAS Institute Inc.; 2017. 225-272.
8. Myerson AS, urednik. *Handbook of Industrial Crystallization*. 2. izd. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2002. 1-65.
9. Housecroft CE, Constable EC. *Chemistry : An Introduction to Organic, Inorganic and Physical Chemistry*. 3. izd. Harlow: Pearson Education Limited; 2006. 308.
10. Hoffmann F. *Faszination Kristalle und Symmetrie*. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2016. 8.
11. Mullin JW, urednik. *Crystallization*. 4. izd. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2001. 123-132, 181-288.
12. Giulietti M, Bernardo A. Crystallization by antisolvent addition and cooling. V: Andreeta MRB, urednik. *Crystallization - Science and Technology*. Rijeka: InTech; 2012. 379–95.
13. Kawashima Y, Capes CE. An experimental study of the kinetics of spherical

- agglomeration in a stirred vessel. *Powder Technol.* 1974.;10:85–92.
14. Tapas AR, Kawtikwar PS, Sakarkar DM. Preparation of Carvedilol Spherical Crystals Having Solid Dispersion Structure by the Emulsion Solvent Diffusion Method and Evaluation of Its in vitro Characteristics. V: Mastai Y, urednik. *Advances in Crystallization Processes*. Rijeka: InTech; 2012. 633–48.
 15. Gupta MM, Srivastava B, Sharma M, Arya V. Spherical crystallization: a tool of particle engineering for making drug powder suitable for direct compression. *Int J Pharm Res Dev.* 2010.;1:1–10.
 16. Kawashima Y. Development of spherical crystallization technique and its application to pharmaceutical systems. *Arch Pharm Res.* 1984.;7:145–51.
 17. Kawashima Y, Cui F, Takeuchi H, Niwa T, Hino T, Kiuchi K. Parameters determining the agglomeration behaviour and the micromeritic properties of spherically agglomerated crystals prepared by the spherical crystallization technique with miscible solvent systems. *Int J Pharm.* 1995.;119:139–47.
 18. Garg J, Khattry S, Arora S. Spherical crystallization: An overview. *Int J Pharm Technol.* 2012.;4:1909–28.
 19. Grodowska K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm.* 2010.;67:3–12.
 20. Espitalier F, Biscans B, Laguérie C. Particle design. Part B: Batch quasi-emulsion process and mechanism of grain formation of ketoprofen. *Chem Eng J.* 1997.;68:103–14.
 21. Tiwari S, Verma P. Spherical crystallization – A novel drug delivery system. *Int J Pharm Life Sci.* 2011.;2:1065–8.
 22. Kawashima Y, Okumura M, Takenaka H, Kojima A. Direct preparation of spherically agglomerated salicylic acid crystals during crystallization. *J Pharm Sci.* 1984.;73:1535–8.
 23. Garala KC, Patel JM, Dhingani AP, Dharamsi AT. Quality by design (QbD) approach for developing agglomerates containing racecadotril and loperamide hydrochloride by crystallo-co-agglomeration. *Powder Technol.* 2013.;247:128–46.

24. Nocent M, Bertocchi L, Espitalier F, Baron M, Couarraze G. Definition of a solvent system for spherical crystallization of salbutamol sulfate by quasi-emulsion solvent diffusion (QESD) method. *J Pharm Sci.* 2001.;90:1620–7.
25. Teychené S, Sicre N, Biscans B. Is spherical crystallization without additives possible? *Chem Eng Res Des.* 2010.;88:1631–8.
26. Antony J. *Design of experiments for engineers and scientists.* 2. izd. London: Elsevier; 2014. 1-13.
27. Jones B, Nachtsheim CJ. A class of three-level designs for definitive screening in the presence of second-order effects. *J Qual Technol.* 2011.;43:1–15.
28. Jones B, Nachtsheim CJ. Definitive Screening Designs with Added Two-Level Categorical Factors. *J Qual Technol.* 2013.;45:121–9.
29. Xiao L, Lin DKJ, Bai F. Constructing definitive screening designs using conference matrices. *J Qual Technol.* 2012.;44:1–7.
30. Jones B, Nachtsheim CJ. Effective design-based model selection for definitive screening designs. *Technometrics.* 2017.;59:319–29.
31. The United States Pharmacopeia 35. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville; 2012. 802-803.
32. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide IJ 1.46r [Internet]. 2012 [citirano 9. januar 2018.]. 133. Dostopno: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html>
33. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc.* 1938.;60(2):309–17.
34. NIST/SEMATECH. Process Modeling. V: e-Handbook of Statistical Methods [Internet]. 2012. Dostopno: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/index.htm>, 8. 4. 2018
35. Akaike H. Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. V: Petrov BN, Csaki F, uredniki. Second International Symposium on Information Theory. Budapest: Akademiai Kiado; 1973. 267–81.
36. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans Automat*

- Contr. 1974.;19(6):716–23.
37. SAS Institute Inc. JMP® 13 Fitting Linear Models. 2. izd. An R Companion to Applied Regression. Cary: SAS Institute Inc.; 2017. 71-206, 231-262, 505-506.
 38. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. J R Stat Soc B. 1964.;26(January 1964):211–52.
 39. Anscombe FJ. The validity of comparative experiments. J R Stat Soc. 1948.;61(3):181–211.
 40. Schwarz G. Estimating the Dimension of a Model. Ann Stat. 1978.;6(2):461–4.
 41. Durbin J, Watson GS. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. I. Biometrika. 1950.;37(3/4):409–28.
 42. Durbin J, Watson GS. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. Biometrika. 1951.;38(1/2):159–78.
 43. Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). Biometrika. 1965.;52(3/4):591–611.
 44. Chambers JM, Cleveland WS, Kleiner B, Tukey PA. Assessing distributional assumptions about data. V: Graphical methods for data analysis. 1983. 191–242.
 45. SAS Institute Inc. Multivariate Methods. 2. izd. Cary: SAS Institute Inc.; 2015. 53-70.
 46. Smallwood IM, urednik. Handbook of organic solvent properties. London: Arnold; 1996. 65-67, 73-75, 171-173, 321-324.
 47. Brito ABN, Giulietti M. Study of lactose crystallization in water-acetone solutions. Cryst Res Technol. 2007.;42:583–8.
 48. Montañés F, Olano A, Ibáñez E, Fornari T. Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data. AIChE J. 2007.;53:2411–8.
 49. FDA. Q3C — Tables and list guidance for industry [Internet]. 2017. 301–827.
Dostopno:
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm%5Cnhttp://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

eRegulatoryInformation/Guidances/default.htm

50. Mullin JW, Raven KD. Influence of mechanical agitation on the nucleation of some aqueous salt solutions. *Nature*. 1962.;195:35–8.
51. Fu X, Huck D, Makein L, Armstrong B, Willen U, Freeman T. Effect of particle shape and size on flow properties of lactose powders. *Particuology*. 2012.;10:203–8.
52. SAS Institute Inc. JMP® 13 Profilers. Cary: SAS Institute Inc.; 2017. 74-76.
53. Lewis RJS, urednik. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007. 736.