

Strategien zur kristallisationsbasierten Aufreinigung von pharmazeutisch relevanten Naturstoffen und organischen Mehrkomponentengemischen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin
(Dr.-Ing.)**

von

Dipl.-Ing. Elena Horosanskaia

geb. am 29.03.1984 in Chişinău, Moldawien

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission:

Prof. Dr.-Ing. habil.	Andreas Seidel-Morgenstern	(Vorsitz)
Apl. Prof. Dr. rer. nat.	Heike Lorenz	(Gutachter)
Assoc. Prof. Dr.-Ing.	Nguyen Minh Tan	(Gutachter)
Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c.	Joachim Ulrich	(Gutachter)

eingereicht am: 22.09.2018

Promotionskolloquium am: 18.01.2019

suchen wissen von Ernst Jandl, 1976

ich was suchen

ich nicht wissen was suchen

ich nicht wissen wie wissen was suchen

ich suchen wie wissen was suchen

ich wissen was suchen

ich suchen wie wissen was suchen

ich wissen ich suchen wie wissen was suchen

ich was wissen

Kurzfassung

Aufgrund der geringen Selektivität von Extraktion oder organischen Synthesen führen diese Herstellungsverfahren nicht direkt zum reinen Zielprodukt. Im Endprodukt dieser Verfahren liegt die Zielkomponente gewöhnlich im Gemisch mit einer Vielzahl ihrer strukturell sehr ähnlich gebauten Nebenkomponenten vor. Entsprechend der Qualitätsanforderung der jeweiligen finalen Anwendung an das Zielprodukt, ist weitere Aufreinigung erforderlich.

Das Hauptziel dieser Forschungsarbeit war die Erarbeitung einer innovativen und breit anwendbaren Strategie zur Aufreinigung pharmazeutisch relevanter Substanzen aus natürlichen Pflanzenextrakten oder Produktlösungen organischer Synthesen möglichst innerhalb einer Trennstufe. Als Beispiele dienten dabei das semi-synthetisch hergestellte Artemisinin sowie die mittels Phytoextraktion isolierte Rutin und Curcumin. Mit dem Ziel der Bereitstellung dieser Komponenten in reiner und kristalliner Form im Endprodukt, stand das thermische Trennverfahren der geimpften Kühlungskristallisation im besonderen Fokus dieser Arbeit.

Um die kristallisationsbasierte Aufreinigung einer Komponente aus einem flüssigen Mehrkomponentengemisch zu erzielen, sind einerseits Kenntnisse grundlegender Fest/flüssig-Lösungsgleichgewichte, sowie andererseits des Rekristallisations- und Festphasenverhaltens der Zielkomponente allein und in Gegenwart der Hauptverunreinigung erforderlich. Die auf dieser Grundlage konzipierte geimpfte Kühlungskristallisation im Batch-Modus ermöglichte die selektive Trennung der jeweiligen reinen Zielkomponente aus dem zugehörigen Rohgemisch innerhalb einer Stufe.

Basierend auf den vorgestellten Untersuchungsergebnissen wurde eine allgemeine Vorgehensweise bei der Gewinnung von reinen kristallinen Substanzen aus flüssigen Mehrkomponentengemischen erarbeitet. Die vorgeschlagene Strategie bietet eine geeignete Grundlage zur Lösung ähnlicher Trennprobleme an.

Abstract

Due to the low selectivity of plant extraction or organic synthesis, these processes do not lead directly to the pure target compound. The final product of these processes usually contains near the target great variety of structurally very similar byproducts. In dependence of the quality requirements for the final application, further purification of the target compound is frequently required.

The main objective of this research was to develop of an innovative and widely applicable strategy for the purification of pharmaceutically relevant substances from plant extracts or organic syntheses mixtures, preferably within one separation step. The examined substances were the semi-synthetically produced artemisinin and by means of plant extraction isolated rutin and curcumin. In order to provide these components in pure and crystalline form in the final product, the seeded cooling crystallization as a sophisticated separation technique was applied.

In order to achieve the crystallization-based isolation of a single compound from a complex solution, knowledges of basic solution equilibria as well as of the recrystallization and solid phase behavior of the pure target compound and in the presence of impurities are required. The seeded batch cooling crystallization designed enabled the selective separation of the target from the raw mixture with high purity within a single crystallization step.

Based on presented results, a general approach for recovery of pure crystalline compound from a complex solution was developed. The proposed procedure provides a suitable basis for solving similar separation problems.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	III
1 Einleitung, Motivation und Ziel der Arbeit	1
1.1 Motivation und Ziel der Arbeit	1
1.2 Struktur der Arbeit	2
<i>Literatur zum Kapitel</i>	
2 Naturstoffe	5
2.1 Definition, Vorkommen und Bedeutung	5
2.2 Möglichkeiten zur Isolierung der Naturstoffe	7
<i>Literatur zum Kapitel</i>	
3 Kristallisation als thermisches Trennverfahren	11
3.1 Gibbs'sche Phasenregel	11
3.2 Binäre Schmelz-Phasendiagramme - Anwendung der Phasenregel	12
3.3 Thermodynamische Betrachtung des Fest/flüssig-Phasenübergangs	16
3.4 Löslichkeitsgleichgewicht eines binären Stoffsystems	17
3.4.1 Löslichkeitsdiagramm eines binären Stoffsystems	18
3.4.2 Übersättigung als Triebkraft für Kristallkeimbildung und -wachstum	20
3.4.3 Möglichkeiten zur Erzeugung der Übersättigung	21
3.4.4 Kristallisation aus metastabiler Lösung	23
3.5 Grundlagen von Polymorphie und Solvatbildung	24
3.5.1 Bedeutung und Begriffserklärung	24
3.5.2 Ostwald'sche Stufenregel	26
3.5.3 Thermodynamische Beziehung zwischen polymorphen Phasenpaaren	29
3.5.4 Ableitung physikalischer Eigenschaften polymorpher Phasenpaare aus thermodynamischen Beziehungen	31
3.5.5 Besonderheiten der Solvatbildung	34
3.5.6 Analytische Methoden zur Untersuchung polymorpher und Solvatphasen	35
3.6 Lösungskristallisation als Aufreinigungsverfahren	36
3.6.1 Einbau von Verunreinigungen in das kristalline Produkt	37
3.6.2 Bedeutung des Animpfens	39
3.6.3 Bewertung der kristallisationsbasierten Aufreinigung	39
<i>Literatur zum Kapitel</i>	
4 Untersuchte Substanzen	45
4.1 Semi-synthetischer Analogon des Naturstoffs Artemisinin	45
4.2 Naturstoff Rutin	49
4.3 Naturstoff Curcumin	52
<i>Literatur zum Kapitel</i>	

5	Verwendete Substanzen und Analytik	61
5.1	Verwendete Substanzen	61
5.2	Eingesetzte Analytik	62
5.2.1	Bestimmung der Löslichkeit und Überlöslichkeit	62
5.2.2	Instrumentelle Analytik zur Charakterisierung der flüssigen Phasen	65
5.2.3	Instrumentelle Analytik zur Charakterisierung der festen Phasen	68
	<i>Literatur zum Kapitel</i>	
6	Aufreinigung von Artemisinin aus der Produktlösung organischen Synthese ausgehend von DHAA	73
6.1	Charakterisierung der Synthesemischung und Ableitung der Trennaufgabe	73
6.2	Wahl des Prozesslösungsmittels	75
6.3	Aufreinigungsprozess: Auslegung, Durchführung und Ergebnisse	79
6.4	Diskussion der Ergebnisse	96
	<i>Literatur zum Kapitel</i>	
7	Aufreinigung von Rutin aus dem Pflanzenextrakt der <i>Sophora japonica</i> L.	99
7.1	Charakterisierung des Trockenextrakts und Ableitung der Trennaufgabe	100
7.2	Wahl des Prozesslösungsmittels	103
7.3	Aufreinigungsprozess: Auslegung, Durchführung und Ergebnisse	110
7.4	Diskussion der Ergebnisse	123
	<i>Literatur zum Kapitel</i>	
8	Aufreinigung von Curcumin aus dem Pflanzenextrakt der <i>Curcuma longa</i> L.	125
8.1	Charakterisierung des Rohextrakts und Ableitung der Trennaufgabe	125
8.2	Wahl des Prozesslösungsmittels	131
8.3	Aufreinigungsprozess: Auslegung und Durchführung	136
8.4	Ergebnisse und Diskussion	142
	<i>Literatur zum Kapitel</i>	
9	Schlussfolgerungen zu den Trennproblemen und Erarbeitung einer Vorgehensweise zur Aufreinigung von Mehrkomponentengemischen	155
	Zusammenfassung	163
	Anhang	169
	Symbolverzeichnis	183
	Abbildungsverzeichnis	185
	Tabellenverzeichnis	191

Einleitung, Motivation und Ziel der Arbeit

Unabhängig davon, ob ein gewünschter Naturstoff durch eine Extraktion aus der Pflanze oder auf dem semi-synthetischen Weg erhalten wurde, führen beide Herstellungsverfahren nicht direkt zum reinen Zielprodukt. Vielmehr stellt das Endprodukt solcher Prozesse oft ein komplexes organisches Mehrkomponentengemisch dar, bestehend entweder aus im Lösungsmittel löslichen Pflanzenmetaboliten oder während der chemischen Synthese gebildeten Zwischen- bzw. Nebenprodukten, aber auch aus nicht umgesetzten Ausgangsstoffen. Diese unerwünschten, oft technisch unvermeidbaren Mischungsbestandteile weisen häufig verwandte Molekülstrukturen und damit ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften auf. Üblicherweise zeigt nur eine Komponente der Produktmischung die gewünschte bzw. stärkste pharmakologische Wirkung auf den menschlichen Körper und sollte möglichst in reiner Form von den restlichen Bestandteilen isoliert werden (Handa et al. 2008). Da die endgültige Reinheit des gewonnenen Wirk- bzw. Zusatzstoffs eine entscheidende Rolle für die weitere Anwendung in der Pharma- und Nahrungsmittelindustrie, aber auch in Kosmetik- und Körperpflegeprodukten spielt, ist der Einsatz weiterer Aufreinigungstechniken unbedingt notwendig (Sattler and Feindt 1995). Um ein Produkt bereitzustellen, das den Anforderungen der jeweiligen Anwendung entspricht, kann eine Kombination von mehreren Trenntechniken, z. B. Kristallisation und Chromatographie, in Betracht gezogen werden.

1.1 Motivation und Ziel der Arbeit

Das Hauptziel dieser Forschungsarbeit ist die Erarbeitung einer innovativen und breit anwendbaren Strategie zur Aufreinigung einer Zielkomponente aus einem organischen Mehrkomponentengemisch und deren Bereitstellung in kristalliner Form. Damit steht das thermische Trennverfahren der Kristallisation im besonderen Fokus dieser Arbeit.

Als Beispiele dienen dabei drei pharmazeutisch relevante Substanzen, die entweder Bestandteile eines Pflanzenextraktes oder einer Produktlösung der semi-synthetischen Reaktion sind:

- (a) *Artemisinin*, ein semi-synthetisches Analogon des Naturstoffs, vorkommend in der in China heimischen Pflanze *Artemisia annua* L. (Einjähriger Beifuß),

(b) *Rutin*, natürlicher Bestandteil der in Vietnam wachsenden Pflanze *Sophora japonica* L. (Japanischer Schnurbaum)

sowie

(c) *Curcumin*, natürlicher Bestandteil der in Vietnam wachsenden Pflanze *Curcuma longa* L. (Kurkuma).

Im Vordergrund der experimentellen Arbeiten steht, basierend auf den zu ermittelnden grundlegenden Fest/flüssig-Lösungsgleichgewichten, die Auslegung und Durchführung eines Kristallisationsverfahrens zur selektiven Gewinnung der reinen kristallinen Zielkomponente aus dem flüssigen Rohgemisch, möglichst innerhalb einer Trennstufe.

1.2 Struktur der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt gegliedert: **Kapitel 1** dient zur Einführung in die Problematik, der Formulierung der Motivation und des Ziels sowie zur Vorstellung der Gliederung der Arbeit. Im **Kapitel 2** wird eine allgemeine Definition der Naturstoffe als Sekundärmetabolite der lebenden Organismen gegeben. Mit besonderem Fokus auf Naturstoffe pflanzlichen Ursprungs wird zunächst auf deren charakteristische strukturelle und funktionelle Merkmale sowie auf die daraus resultierende Bedeutung der Naturstoffe für die Menschen eingegangen. Ein kurzer Einblick in die Schwächen und Stärken bestehender Trenntechniken zur Naturstoffisolierung leitet zum nächsten Kapitel über. Im **Kapitel 3** wird das Verfahren der Lösungskristallisation als eine vielversprechende Trenntechnik zur Reindarstellung einer Zielkomponente aus organischen Mehrkomponentengemischen behandelt. Die grundlegenden Kenntnisse zur Lage von Fest/flüssig-Phasengleichgewichten sowie zum Kristallisationsverhalten sind für die Auslegung und Durchführung eines kristallisationsbasierten Trennprozesses essentiell. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei der Polymorphie und Solvatbildung im kristallinen Zustand. Die darauffolgenden Kapitel 4 bis 8 stellen den Kern der durchgeführten praktischen Arbeiten dar. In **Kapitel 4 und 5** werden die drei untersuchten Substanzen eingeführt sowie ein Überblick über die verwendeten experimentellen und instrumentellen Analysemethoden gegeben. In den **Kapiteln 6, 7 und 8** werden die Arbeiten zur kristallisationsbasierten Aufreinigung der jeweiligen Zielkomponente (Artemisinin (Kapitel 6), Rutin (Kapitel 7) und Curcumin (Kapitel 8)) aus dem vorliegenden organischen Mehrkomponentengemisch vorgestellt. Dabei werden zuerst die Ergebnisse der Voruntersuchungen zum Lösungsmittelscreening für jede Substanz separat vorgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Festphasenverhalten (Polymorphe und Solvatphasen) sowie zur Stabilität der auftretenden kristallinen Phasen werden ausführlich erläutert. Nach der Wahl des

geeigneten Prozesslösungsmittels werden die Fest/flüssig-Phasendiagramme für das jeweilige System (Reinstoff-Lösungsmittel sowie Mischung-Lösungsmittel) erstellt. Unter Berücksichtigung der Breite des metastabilen Bereichs und nach der Ableitung einer geeigneten Kristallisationsstrategie werden die Ergebnisse der durchgeführten Trennexperimente dargestellt und diskutiert. Im **Kapitel 9** werden die Ergebnisse der gesamten Studie vergleichend erörtert. Darauf basierend wird eine allgemeine Vorgehensweise zur Gewinnung von reinen kristallinen Substanzen aus flüssigen Mehrkomponentengemischen erarbeitet. Im abschließenden werden allgemeine Schlussfolgerungen gezogen.

Literatur zum Kapitel 1

- Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. ICS-UNIDO, Trieste, Italy
- Sattler K, Feindt HJ (1995) Extraction Thermal Separation Processes: Principles and Design. VCH Verlagsgesellschaft mbH, p 393-473

Naturstoffe

2.1 Definition, Vorkommen und Bedeutung

Organische Verbindungen, die von lebenden Organismen, z. B. Pflanzen, Tieren, Meeres- oder Mikroorganismen, produziert werden, bezeichnet man als Naturstoffe. Diese Verbindungen können in drei unabhängige Gruppen eingeteilt werden (Abb. 2-1).

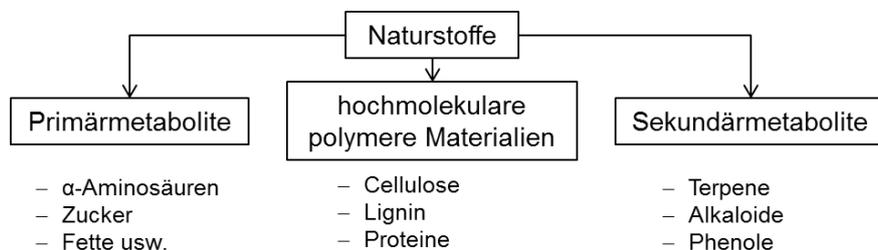


Abb. 2-1: Einteilung der Naturstoffe in drei Gruppen. Die Abbildung ist erstellt nach (Hanson 2003; Haslam 1986).

Die erste Gruppe, die sogenannten Primärmetabolite, umfasst α-Aminosäuren aus Proteinen, Zucker, Fette, Purine und Pyrimidine. Diese treten in allen lebenden Zellen auf und sind für den Zellstoffwechsel und die Reproduktion zwingend erforderlich. Die zweite Gruppe der Naturstoffe ist für die Ausbildung zellulärer Strukturen verantwortlich und umfasst hochmolekulare polymere Materialien, wie Cellulose, Lignin und Proteine. Zur letzten und größten Gruppe von Naturstoffen werden sogenannte Sekundärmetabolite zusammengefasst. Diese sind für Mikroorganismen und insbesondere für das Pflanzenreich sehr charakteristisch (Hanson 2003; Haslam 1986).

Pflanzen dienen als autotrophe, Photosynthese betreibende Organismen der Grundlage für die Ernährung von fast allen heterotrophen Organismen. Aufgrund ihrer standortbezogenen evolutionären Anpassung an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen, wie Temperatur, Sonneneinstrahlung und Wasserversorgung, entwickelten Pflanzen eine besondere Überlebensstrategie: die Produktion von chemischen Verbindungen. Diese sind für das primäre Wachstum und die Entwicklung der Pflanze nicht essentiell und werden im Organismus inaktiv bis zum Auftreten von Extremsituationen, wie z. B. Verwundung, Infektion oder Angriff von Viren, Parasiten oder natürlichen Fressfeinden, gelagert. Diese Sekundärmetabolite der Pflanzen sind artspezifisch und zeichnen sich durch

strukturelle Diversität und vielseitige Funktionalität aus. Von geschätzten 500.000 auf dem Planeten vorhandenen Pflanzenarten wurden bisher etwa 100.000 pflanzliche Sekundärmetabolite in geringen Konzentrationen (0,01% - 3% des Trockengewichts) erfasst (Rates 2001; Wink 2008; Wink 2011).

Einteilung der sekundären Pflanzenmetabolite

Basierend auf der chemischen Struktur und biosynthetischen Herkunft werden sekundäre Pflanzenmetabolite in drei Hauptgruppen eingeteilt: Terpene, Phenole und Alkaloide. Die Terpene, mit mehr als 25.000 isolierten chemischen Verbindungen, stellen die reichste und weitverbreitete Klasse der Naturstoffe in Pflanzen dar. Einige dieser Verbindungen sind toxisch für zahlreiche Insekten oder Parasiten der Pflanzenfresser. Sie werden häufig angereichert in der Rinde, den Zweigen, dem Stamm, den Früchten oder Blättern von Koniferen oder Laubpflanzen gefunden. Andere flüchtige Terpenoide haben insektenabweisende Eigenschaften und befinden sich demzufolge in den Drüsenhaaren auf der Pflanzenoberfläche.

Weitere 8.000 pflanzliche Naturstoffe werden aufgrund der in die Molekülstruktur eingebauten Phenylgruppe zu Phenolen zusammengefasst. Die einfachen Phenole, wie die Zimt-, Cumarin- oder Koffeinsäure, schützen die Pflanze vor Insektenfressern und Pilzen. Die Flavonoide, zu denen ein Großteil der Blütenfarbstoffe gehört, repräsentieren die zahlreichste Untergruppe von Pflanzenphenolen. Diese Farbstoffe sind häufig in pflanzlichen Spezies enthalten, die ständig starken Sonneneinstrahlungen ausgesetzt sind. Sie schützen die Pflanzen einerseits durch die Absorption der UV-B-Strahlen vor übermäßiger Strahlung, andererseits sind sie für die Anlockung von Insekten und Tieren zur Blütenbestäubung verantwortlich (Taiz and Zeiger 2002).

Die letzte Gruppe pflanzlicher Naturstoffe wird, aufgrund des im Kohlenstoffring als Heteroatom eingebautem Stickstoffatoms, zu Alkaloiden zusammengefasst. In 20 % der Gefäßpflanzen wurden insgesamt 21.000 stickstoffhaltige Naturstoffe gefunden. Alkaloide dienen der Pflanze hauptsächlich zur Stickstoffspeicherung. Aufgrund des bitteren Geschmacks und der allgemeinen Toxizität von Alkaloiden haben sie außerdem eine schützende Funktion der Pflanzen vor Schädlingen und natürlichen Fressfeinden (Wink 2008).

Bedeutung der Naturstoffe für die Menschen

Bereits in der Antike profitierten Menschen vom Reichtum der Pflanzenwelt und nutzten lokal verfügbare Pflanzen für ihre Ernährung, Kleidung, als Farb- und Aromastoffe und vor allem zur Behandlung von Krankheiten oder zur Unterstützung der Gesundheit. Jedoch erst im späten 18. Jhd., mit der Einführung der modernen Chemie begannen Chemiker die einzelnen pflanzlichen Bestandteile aus Extrakten gezielt zu isolieren, um ihre Wirkung auf den menschlichen Körper genau zu untersuchen (Houghton 2001). Ende der

neunziger Jahre waren bereits 60 % der auf dem Markt befindlichen Antitumor- und Antiinfektionsmittel pflanzlichen Ursprungs (Rates 2001). Bis heute wurden rund 70.000 Sekundärmetabolite pflanzlichen Ursprungs auf eine pharmakologische Wirkung hin untersucht und bei mehr als 10.000 wurde bereits nachgewiesen, dass sie eine medizinische Verwendung haben. Mehr als 90 % der zurzeit im Handel erhältlichen Medikamente enthalten naturstoffbasierte Wirkstoffe (McChesney 2007; Veeresham 2012).

Im Gegensatz zu den hohen wirtschaftlichen und technologischen Standards der westlichen Welt leben mehr als 80 % der Weltbevölkerung in den ärmsten Regionen der Entwicklungsländer. Dabei stellen Zubereitungen aus lokal verfügbaren Pflanzen häufig die einzige und am einfachsten zugängliche Quelle zur allgemeinen gesundheitlichen Versorgung der Bevölkerung dar (Kamboj 2000). Das stetige Bevölkerungswachstum, insbesondere Afrika und Asien, hat mangelnde Ernährung, eingeschränkten Zugang zu frischem Trinkwasser und unhygienische Lebensbedingungen zur Folge (UNO 2015). Die daraus resultierende zunehmende Verbreitung von übertragbaren Krankheiten hat eine steigende Nachfrage nach bezahlbaren Arzneimitteln zur Konsequenz (Ariyawardana et al. 2009; UNO 2004). Im Vergleich zur konventionellen kostenaufwendigen Herstellung synthetischer Wirkstoffe bietet die Nutzung von wild wachsenden bzw. zweckmäßig angebauten Heilpflanzen einen alternativen Weg zur Bereitstellung von pharmazeutisch relevanten Substanzen in ausreichender Menge und zu einem zugänglichen Preis (Rates 2001). Mit diesem Hintergrund sind es die tropischen Länder, insbesondere Indien, China und Vietnam, mit ihren altbewährten traditionellen pflanzlichen Heilmitteln, die zur Gesundheitsförderung in der modernen Welt beitragen können (Wahlberg 2006). Allerdings sind dazu eine globale Standardisierung der Prozesse zur Naturstoffisolierung und -aufreinigung sowie Implementierung sicherer, effektiver und kostengünstiger Herstellungswege erforderlich (WHO 2013).

2.2 Möglichkeiten zur Isolierung der Naturstoffe

Es bestehen zwei Möglichkeiten Naturstoffe aus der Ursprungspflanze zu isolieren und dabei die oft komplizierte und kostenaufwendige Totalsynthese des pharmazeutischen Wirkstoffs umzugehen (Bart 2011):

- 1) Isolierung des Naturstoffs aus der Ursprungspflanze mittels Extraktion
oder
- 2) Isolierung der pflanzlichen Vorstufe des Wirkstoffs mittels Extraktion als Ausgangsmaterial für die anschließende Herstellung des sog. semi-synthetischen Analogon des Naturstoffs.

In beiden Varianten spielt das bereits in der Antike zur Herstellung pflanzlicher Wirkstoffe, Parfüme, Farbstoffe und Wachse angewendete Verfahren der Fest/flüssig-Extraktion eine entscheidende Rolle (Levey 1959).

Das Extraktionsprinzip wurde erstmals 1879 vom deutschen Agrochemiker Franz von Soxhlet zum Quantifizieren des Fettgehalts in getrockneten Lebensmitteln erfunden. Das nach ihm genannte Verfahren „Soxhlet-Extraktion“ fand eine breite Anwendung in der Lösungsmittelbasierten Fest/flüssig-Trennung von Naturstoffen aus Pflanzen, insbesondere als Modellprozess zum Vergleich und zur Bewertung moderner Extraktionsmethoden (Azmir et al. 2013). Dabei werden mit Hilfe von Lösungsmitteln die löslichen Bestandteile aus der pflanzlichen Quelle in die flüssige Phase durch selektive Auflösung überführt. Die gewonnene flüssige Phase, das sog. Extrakt, enthält zusammen mit der gewünschten Verbindung andere leicht lösliche Pflanzenbestandteile. Das unlösliche Pflanzengewebe verbleibt im festen Rückstand, dem sog. Raffinat (Sattler and Feindt 1995).

Obwohl in den letzten 50 Jahren eine bemerkenswerte Weiterentwicklung der klassischen Soxhlet-Extraktion zur Naturstoffisolierung in Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Prozesses, Erhöhung der Selektivität und des Durchsatzes von behandeltem Pflanzenmaterial stattgefunden hat, gewinnt der semi-synthetische Weg zur Bereitstellung der Präparate mit einer einzelnen pharmakologischen Wirkung immer mehr an Bedeutung. Heutzutage sind über 25 % der weltweit in Arzneimitteln eingesetzten pharmazeutischen Substanzen von pflanzlichen Naturstoffen abgeleitet (Azmir et al. 2013; Handa et al. 2008). Beispiele der zurzeit am häufigsten in Arzneimitteln verwendeten semi-synthetisch hergestellter Naturstoffe sind das Antikrebsmittel Paclitaxel, gewonnen aus der Rinde der pazifischen Eibe, das krampflösende Mittel Atropin, ein natürlicher Bestandteil der Schwarzen Tollkirsche sowie das Schmerzmittel Morphin, isoliert aus dem Milchsaft des Schlafmohns (Lubbe and Verpoorte 2011).

Beide Varianten der Naturstoffisolierung führen nicht direkt zum reinen Wirkstoff. Vielmehr stellt das Endprodukt dieser oft eine verdünnte Lösung komplexer Komponentenzusammensetzung dar, aus welcher die Zielsubstanz in nachgeschalteten Trennprozessen in die für die jeweilige pharmazeutische Anwendung geeignete Form überführt werden muss.

Literatur zum Kapitel 2

- Ariyawardana A, Govindasamy R, Simon JE (2009) The Natural Products Industry: A Global and African Economic Perspective. In: Juliani H (ed) African Natural Plant Products: New Discoveries and Challenges in Chemistry and Quality. vol 1021. American Chemical Society: Washington, DC, ACS Symposium Series, p 7-28
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117(4):426-436 doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Bart H-J (2011) Industrial Scale Natural Products Extraction. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. ICS-UNIDO, Trieste, Italy
- Hanson JR (2003) The classes of natural product and their isolation Natural Products : The Secondary Metabolites. vol 17. E. W. Abel, p 1-34
- Haslam E (1986) Secondary Metabolism - Fact and Fiction. *Natural Product Reports* 3(3):217-249 doi:DOI 10.1039/np9860300217
- Houghton PJ (2001) Old yet new - Pharmaceuticals from plants. *Journal of Chemical Education* 78(2):175-184
- Kamboj VP (2000) Herbal medicine. *Current Science* 78(1):35-39
- Levey M (1959) Chemistry and Chemical Technology in Ancient Mesopotamia. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Lubbe A, Verpoorte R (2011) Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34(1):785-801 doi:10.1016/j.indcrop.2011.01.019
- McChesney JD (2007) Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68(14):2015-22 doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.032
- Rates SMK (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon* 39(5):603-613 doi:Doi 10.1016/S0041-0101(00)00154-9
- Sattler K, Feindt HJ (1995) Extraction Thermal Separation Processes: Principles and Design. VCH Verlagsgesellschaft mbH, p 393-473
- Taiz L, Zeiger E (2002) Plant Physiology, 3rd edn. Sinauer Associates
- UNO (2004) Globalization of food systems in developing countries: impact on food security and nutrition. *Food and Nutrition Paper* 83:107
- UNO (2015) World Population Prospects: The Revision 2015, Key Findings and Advance Tables Department of Economic & Social Affairs. United Nations New York, 2015, p 66
- Veeresham C (2012) Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Technol Res* 3(4):200-1 doi:10.4103/2231-4040.104709
- Wahlberg A (2006) Bio-politics and the promotion of traditional herbal medicine in Vietnam. *Health (London)* 10(2):123-47 doi:10.1177/1363459306061784
- WHO (2013) WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. WHO Library Cataloging-in-Publication Data, WHO Press, World Health Organization
- Wink M (2008) Ecological Roles of Alkaloids Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. WILEY-VCH Verlag GmbH & co. KGaA, Weinheim, p 3-24
- Wink M (2011) Occurrence and Function of Natural Products in Plants *Phytochemistry and Pharmacognosy*.

Kristallisation als thermisches Trennverfahren

Um die Trennung eines beliebigen homogenen Mehrkomponentengemisches (Dampf, Flüssigkeit oder Feststoff) zu erzielen, ist die Schaffung einer zweiten, mit der Ausgangsmischung nicht mischbaren Phase im System eine gängige und weit verbreitete industrielle Praxis (Seader and Henley 2006). Wird dabei ein kristalliner Feststoff als neue Phase gebildet, wird der Trennvorgang als Kristallisation bezeichnet. Ist die Ausgangsphase der Kristallisation eine Flüssigkeit, so unterscheidet man zwischen der Schmelz- und der Lösungskristallisation (Mersmann et al. 2011). Nach (Ulrich and Özoguz 1988) darf der Begriff der Lösungskristallisation nur bei einem Kristallisationsvorgang verwendet werden, wenn der Wärmetransport gegenüber dem Stofftransport vernachlässigbar klein ist.

In dieser Arbeit wurde das Trennverfahren der Lösungskristallisation zur Aufreinigung von pharmazeutisch aktiven Substanzen aus organischen flüssigen Mehrkomponentengemischen (Pflanzenextrakte oder Syntheselösung) verwendet.

In diesem Kapitel werden theoretische Grundlagen dargelegt, die zum Verständnis der Lösungskristallisation als thermischem Trennverfahren hilfreich sind. Unter anderem wird auf folgende thermodynamische und kinetische Aspekte der Kristallisation eingegangen: Gibbs'sche Phasenregel und Fest/flüssig-Phasengleichgewichte, Löslichkeit und Übersättigung als Triebkraft der Kristallisation, Bedingungen für die Ausbildung und Stabilität von kristallinen Phasen (Polymorphe bzw. Solvate).

3.1 Gibbs'sche Phasenregel

Während eines Kristallisationsvorgangs innerhalb eines Systems erzeugt man aus einer homogenen gasförmigen, flüssigen oder amorphen Phase eine zweite in sich homogene kristalline Phase, welche zur Ausgangsphase verschiedene physikalische Eigenschaften aufweist. Nun ist das System heterogen und besteht aus zwei homogenen voneinander räumlich abgegrenzten Phasen. Die sog. Gibbs'schen Phasenregel beschreibt die zum Bestehen des Phasengleichgewichts im System notwendige Voraussetzungen (Körper 1926).

Die 1875 von Gibbs abgeleitete und 1887 von Roozeboom verallgemeinerte Phasenregel (Gl. 3.1.1) besagt, wie viele unabhängige Zustandsvariablen (Druck, Temperatur und Konzentration/Zusammensetzung) zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts im System führen. Dabei soll das System aus N unabhängigen Komponenten und P koexistierenden Phasen aufgebaut sein (Findlay 1911):

$$F = N + 2 - P \quad 3.1.1$$

F beschreibt den Freiheitsgrad des Systems, d. h. die Anzahl der intensiven Zustandsvariablen (Druck, Temperatur und Zusammensetzung), die variiert werden können, ohne dass sich die Anzahl der Phasen ändert.

Die graphische Darstellung der Gleichgewichtszustände erfolgt durch die Auftragung der Gleichgewichtsdrücke, -temperaturen und -konzentrationen im sog. Phasendiagramm. Betrachtet man das thermodynamische Gleichgewicht zwischen einer festen und flüssigen Phase in Abhängigkeit von allen drei Variablen, so müsste das Phasendiagramm in einem dreidimensionalen p - T - c -Raum dargestellt werden, wobei den drei zueinander im rechten Winkel stehenden Achsen drei variable Zustandsgrößen zugeordnet werden.

Während Kristallisationsvorgängen aus einer Lösung/Schmelze bei Umgebungsdrücken sind die auftretenden Druckänderungen im System vernachlässigbar klein (Lorenz 2013). Entsprechend der Annahme $\Delta p = 0$, verliert das System einen Freiheitsgrad. In diesem Fall reduziert sich die Phasenregel auf die Gl. 3.1.2 und das Fest/flüssig-Phasendiagramm kann zweidimensional in einem T - c -Graph aufgetragen werden:

$$F = N + 1 - P \quad 3.1.2$$

Unter Betrachtung eines binären Stoffsystems bestehend aus $N = 2$ Komponenten reduziert sich die Phasenregel auf die Gl. 3.1.3 (Lorenz 2013):

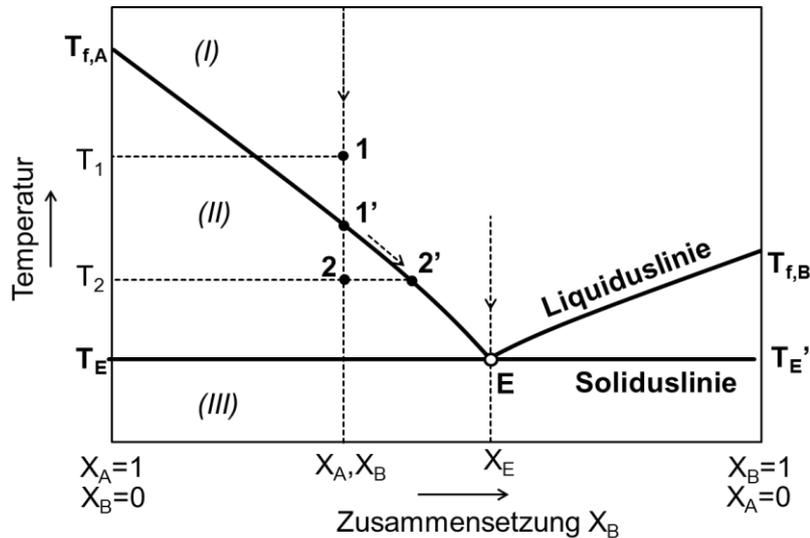
$$F = 3 - P \quad 3.1.3$$

Zur Vereinfachung der Kristallisationsprozessauslegung wurden die im Laufe dieser Arbeit untersuchten Stoffsysteme als pseudobinär, bestehend aus der Zielkomponente in der jeweiligen komplexen Lösung, betrachtet.

3.2 Binäre Schmelz-Phasendiagramme - Anwendung der Phasenregel

Die Anwendung der reduzierten Phasenregel (Gl. 3.1.3) wird im Folgenden mit Hilfe des in der Abb. 3-1 dargestellten Fest/flüssig-Gleichgewichtsdigramms eines binären, einfach eutektischen Gemisches erläutert. Unter der Annahme

konstanten Druckes kann das Phasendiagramm als Temperatur-Zusammensetzungs-Graph skizziert werden.



Charakteristische Gebiete im Phasendiagramm		
(I)	1-Phasengebiet	Lösung (A+B) _L
(II)	2-Phasengebiet	Lösung (A+B) _L und kristallines A _S
(III)	2-Phasengebiet	kristalline A _S und B _S
E (Eutektikum)	3-Phasen Koexistenz	Lösung X _E und kristalline A _S und B _S

Abb. 3-1: Phasendiagramm eines binären Gemisches, dargestellt auf dem Temperatur-Zusammensetzungs-Plot bei konstantem Druck. Die zwei Komponenten A und B bilden ein Eutektikum mit vollständiger Mischbarkeit in der flüssigen und vollständigen Unmischbarkeit in der festen Phase. Indizes: X_i Molenbruch der Komponente i , $T_{f,i}$ Schmelztemperatur der reinen Komponente i , E das Eutektikum bei der eutektischen Zusammensetzung X_E und Temperatur $T_E = T_{E'}$, L=liquid, S=solid. Die Abbildung ist abgeleitet von (Findlay 1911).

Die Ecken des Diagramms stellen die reinen Komponenten A und B mit zugehörigen Schmelztemperaturen $T_{f,A}$ und $T_{f,B}$ dar. Bei einer eutektischen Temperatur $T_E = T_{E'}$ und einer binären Zusammensetzung X_E (bestehend aus $X_A, X_B = 1 - X_A$) weist das System ein einfaches Eutektikum im Punkt E auf. Die Komponenten zeigen eine unbegrenzte Mischbarkeit in der flüssigen Phase und vollständige Unmischbarkeit in der festen Phase (keine Mischkristallbildung). Die charakteristischen Linien im Phasendiagramm stellen zwei Liquiduslinien ($T_{f,A} E$), und ($T_{f,B} E$), auch Schmelzkurven genannt, sowie die horizontale Soliduslinie ($T_E T_{E'}$), dar. Oberhalb der beiden Liquiduslinien an jedem beliebigen Punkt des Phasendiagramms liegt nur eine flüssige Phase, d. h. homogene Schmelze/Lösung der jeweiligen Zusammensetzung, vor. Unterhalb der Soliduslinie stellt das System ein Gemenge aus den reinen festen Phasen A_S und B_S dar. Am Eutektikum E im Phasendiagramm liegen drei Phasen im Gleichgewicht vor, zwei feste Phasen A_S und B_S sowie eine flüssige Phase der eutektischen Zusammensetzung X_E .

Mit Hilfe der Gibbs'schen Phasenregel (Gl. 3.1.3) kann veranschaulicht werden, ob und wie sich die Phasenzusammensetzung im System ändert, wenn man sich von einem beliebigen Punkt auf eine andere Position des Diagramms bewegt. So z. B. ist das System im Punkt 1 bei der Temperatur T_1 und Zusammensetzung X_A, X_B einphasig flüssig. Hier beträgt die Anzahl der im System existierenden Phasen $P = 1$. Somit hat das System $F = 2$ Freiheitsgrade und ist *bivariant*. Das bedeutet, dass innerhalb dieses Phasengebietes sowohl die Temperatur als auch die Zusammensetzung des Systems verändert werden können, ohne dass eine zusätzliche Phase im System auftritt oder eine verschwindet.

Kühlt man das System der Zusammensetzung 1 ab, so bewegt man sich im Phasendiagramm auf derselben Isoplethe (senkrechte gestrichelte Linie) in Richtung abnehmender Temperatur. Beim Überqueren der Löslichkeitslinie der Komponente A im Punkt 1' geht das System aus dem 1- in das 2-Phasengebiet über und hat einen Freiheitsgrad von $F = 1$. Es ist also *monovariant*. Das heißt, zum Aufrechterhalten des Systemgleichgewichts erzwingt jede Änderung, z. B. der Temperatur, auch eine Änderung der Zusammensetzung und umgekehrt. So führt eine Temperaturniedrigung von T_1 auf T_2 zur Änderung der Zusammensetzung der flüssigen Phase von 1' auf 2', wobei sich festes A_S aus der Schmelze/Lösung abscheidet. Im Punkt 2' steht eine an Komponente A verarmte flüssige Phase der Zusammensetzung 2' mit festem A_S im thermodynamischen Gleichgewicht. Bei der eutektischen Temperatur T_E stehen im System drei Phasen im Gleichgewicht. Demnach ist das System an diesem Punkt mit $F = 0$ Freiheitsgraden *invariant*. Weiteres Abkühlen über die T_E hinaus führt zum Erstarren des Systems als Ganzes. Das System wird wieder zweiphasig, wobei festes A_S neben dem festen B_S mit der Zusammensetzung (X_A, X_B) vorliegt.

Neben den binären Systemen mit Unmischbarkeit in der festen Phase, kann begrenzte oder vollständige Mischkristallbildung im festen Zustand auftreten (Rittner and Steiner 1985). Nach (Matsuoka 1991) gehören ca. 14% der organischen Systeme zur Gruppe mischkristallbildender Systeme. In der Abb. 3-2 sind Fest/flüssig-Phasendiagramme zwei binärer Systeme mit vollständiger Mischbarkeit in der flüssigen Phase und partieller (Abb. 3-2, links) oder vollständigen (Abb. 3-2, rechts) Mischbarkeit im festen Zustand dargestellt.

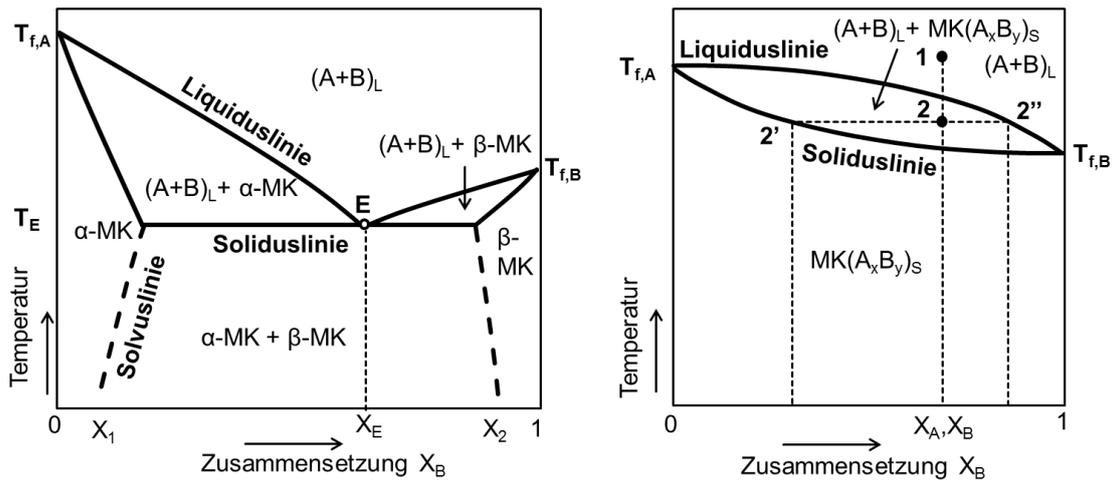


Abb. 3-2: Phasendiagramme binärer Gemische, dargestellt auf dem Temperatur-Zusammensetzungs-Plot bei konstantem Druck. Links: die Komponenten A und B bilden ein Eutektikum mit vollständiger Mischbarkeit in der flüssigen und beschränkter Mischbarkeit in der festen Phase. Rechts: die Komponenten A und B zeigen vollständige Mischbarkeit in flüssiger und fester Phase. Indizes: X_i Molenbruch der Komponente i , $T_{f,i}$ Schmelztemperatur der reinen Komponente i , E das Eutektikum mit eutektischer Zusammensetzung X_E und Temperatur T_E . Abkürzungen: L=liquid, S=solid, MK=Mischkristall. Die Abbildung ist abgeleitet von (Findlay 1911).

Oberhalb der jeweiligen Liquiduslinie sind beide Systeme einphasig, hier liegt eine homogene Schmelze $(A+B)_L$ vor. Der Bereich zwischen der Liquidus- und Soliduslinie ist jeweils zweiphasig, bestehend aus festen Mischkristallen der jeweiligen Komponentenzusammensetzung in Gleichgewicht mit der flüssigen Schmelze.

Für das System in Abb. 3-2 rechts ist in dem Bereich unter der Soliduslinie die lückenlose Mischkristallbildung $\text{MK}(A_xB_y)_S$ der Komponenten A und B im festen Zustand charakteristisch. Kühlt man die im Punkt 1 des Phasendiagramms vorliegende Schmelze der Zusammensetzung X_A, X_B über die Liquiduslinie hinaus ab, so spaltet sich das System entsprechend des Hebelgesetzes in eine flüssige Phase der Zusammensetzung 2'' und eine feste Phase, bestehend aus Mischkristallen $(A_xB_y)_S$ der Zusammensetzung 2' auf. Diese Phasen können voneinander getrennt und einzeln weiter aufgearbeitet werden (fraktionierte Kristallisation).

Im Phasendiagramm des Systems mit partieller Mischkristallbildung (Abb. 3-2 links) bei Temperaturen unter $T_{f,i}$ und Molenbrüchen nahe der reinen Komponenten ist das System einphasig fest und bildet zwei Arten von Mischkristallen, $\alpha\text{-MK}$ und $\beta\text{-MK}$, aus. Abhängig von der Seite im Phasendiagramm ist im Kristallgitter der jeweiligen Hauptkomponente (A oder B) eine begrenzte Menge der Nebenkomponente (B oder A) gelöst. Im gezeigten Beispiel nimmt mit sinkender Temperatur der Anteil der jeweiligen gelösten Nebenkomponente im Kristallgitter der Hauptkomponente entlang der sog. Solvuslinie ab. Bei solchen Systemen findet die Mischkristallbildung nicht bei jeder beliebigen

Komponentenzusammensetzung statt. Wie in der Abb. 3-2 links zwischen X_1 und X_2 dargestellt, existiert hier eine Mischungslücke, innerhalb welcher ein Kristallgemisch aus Mischkristallen α -MK und β -MK vorliegt. Am Eutektikum koexistieren drei Phasen im Gleichgewicht, eine flüssige $(A+B)_L$ und zwei feste Phasen, gesättigte α -MK und β -MK.

3.3 Thermodynamische Betrachtung des Fest/flüssig-Phasenübergangs

Eine Zustandsänderung in jedem beliebigen System verläuft von Natur aus nach dem thermodynamischen Prinzip stets in Richtung des Gleichgewichts, welches das Niveau des Energieminimums für das System darstellt. Das Maß für die Triebkraft des Systems eine Zustandsänderung zu vollziehen, beschreibt die Zustandsfunktion G , die freie Gibbs-Enthalpie, bzw. ihre negative Änderung $\Delta G < 0$.

Die allgemeine Definitionsgleichung der freien Gibbs-Enthalpie lautet wie folgt (Atkins and de Paula 2006; Stephan 1999):

$$G = U - TS + pV \quad 3.3.1$$

Nach dem Differenzieren dieser Gleichung und dem Einsetzen der Gibbs'schen Fundamentalgleichung für die innere Energie dU kann das Differential der freien Gibbs-Enthalpie auch folgendermaßen geschrieben werden:

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_k \mu_k dn_k \quad 3.3.2$$

In einem System bei gegebenen konstantem Druck ($dp = 0$) und Temperatur ($dT = 0$) hängt die Änderung der freien Gibbs-Enthalpie nur von der stofflichen Zusammensetzung des Systems ab:

$$dG = \sum_k \mu_k dn_k \quad 3.3.3$$

Dabei ist μ_k das chemische Potential der k Komponenten im System. Das chemische Potential beschreibt ein Maß für den gerichteten Stoffmengenstrom n_k im System während eines Stoffaustausches, welches z. B. zu einer Zustandsänderung im System führt. Die Richtung des Stoffaustausches erfolgt dabei immer vom höheren zum niedrigeren chemischen Potential.

Während des Kristallisationsvorgangs der Komponente A geht ein Stoffmengenanteil Δn_A der Komponente A aus dem gelösten in den kristallinen Zustand über. Dabei nimmt die freie Gibbs-Enthalpie der flüssigen Phase um den Betrag $(-\mu_{A,l}\Delta n_A)$ ab und die der festen Phase um $(\mu_{A,s}\Delta n_A)$ zu. Somit entspricht die gesamte Änderung der freien Gibbs-Enthalpie im System folgendem Ausdruck:

$$\Delta G = (\mu_{A,s} - \mu_{A,l})\Delta n_A$$

3.3.4

Damit die Kristallisation freiwillig abläuft, muss dieser Fest/flüssig-Phasenübergang mit einer Abnahme der Gesamtenergie im System $\Delta G < 0$ begleitet werden. Das gilt für $(\mu_{A,s} - \mu_{A,l}) < 0$ bzw. $\mu_{A,s} < \mu_{A,l}$, wenn das chemische Potential der Komponente A in der Lösung $\mu_{A,l}$ höher als dem im kristallinen Zustand $\mu_{A,s}$ ist. Befindet sich das System bezüglich der Komponente A im Fest/flüssig-Phasengleichgewicht, ist das chemische Potential der Komponente im flüssigen Zustand gleich dem im kristallinen $\mu_{A,s} = \mu_{A,l}$. In diesem Fall ist die Änderung der freien Gibbs-Enthalpie des Systems gleich null $\Delta G = 0$.

3.4 Löslichkeitsgleichgewicht eines binären Stoffsystems

Für ein binäres Stoffsystem, bestehend aus einer Feststoffkomponente A im Lösungsmittel B, entspricht die im vorherigen Kapitel eingeführte Liquiduslinie der Komponente A (Abb. 3-1) der Löslichkeitskurve des Feststoffs A im Lösungsmittel B (Abb. 3-3). Die Löslichkeitskurve stellt eine Phasengrenze zwischen dem Ein- und Zweiphasengebiet des Systems im thermodynamischen Gleichgewicht dar und gibt die Sättigungskonzentration der Feststoffkomponente A in der Lösung für die jeweilige zugehörige Gleichgewichtstemperatur bei konstantem Druck an.

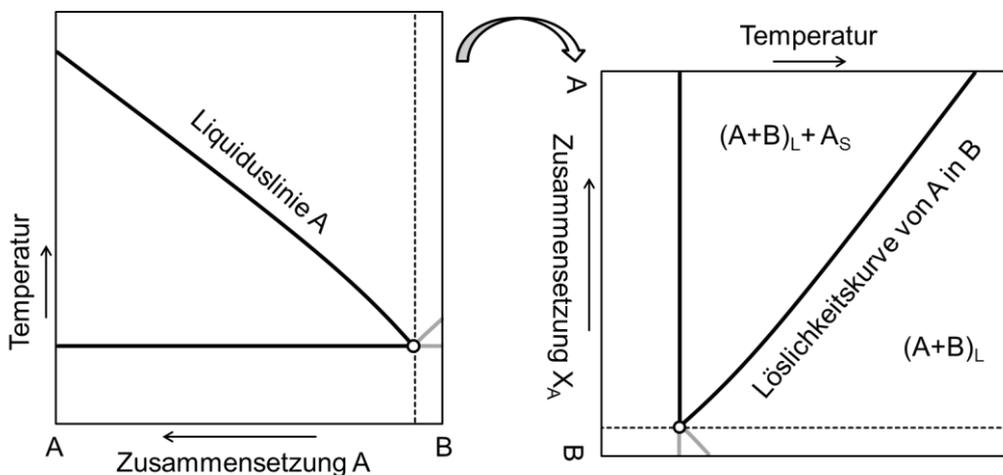


Abb. 3-3: Zusammenhang zwischen der Liquiduslinie der Komponenten A im binären Stoffsystem und der Löslichkeitskurve des Feststoffs A im Lösungsmittel B bei konstantem Druck. Abkürzungen: L=liquid, S=solid. Die Abbildung ist angepasst aus (Lorenz 2013).

Unter der Annahme von Idealität in der flüssigen Phase, darf der Aktivitätskoeffizient der Lösung γ gleich 1 gesetzt werden und der Verlauf der Löslichkeitskurve mit der vereinfachten Version der Schröder-van-Laar Gleichung (Gl. 3.4.1b) beschrieben werden:

$$\ln(a) = \frac{\Delta H_f}{R} \left(\frac{1}{T_f} - \frac{1}{T} \right), \quad 3.4.1a$$

mit $a = \gamma \cdot x$ und $\gamma = 1$ ergibt sich

$$\ln(x) = \frac{\Delta H_f}{R} \left(\frac{1}{T_f} - \frac{1}{T} \right), \quad 3.4.1b$$

mit x der Zusammensetzung der Komponente in der flüssigen Phase, R der idealen Gaskonstanten, ΔH_f der Schmelzenthalpie und T_f der Schmelztemperatur der reinen Komponente. Eine detaillierte Herleitung dieser Gleichung ist bei (Lorenz 2013; Lorenz and Seidel-Morgenstern 2002) ausführlich beschrieben.

Mithilfe der vereinfachten Version der Schröder-van-Laar Gleichung (Gl. 3.4.1b), unter Verwendung der analytisch (aus DSC-Messungen) oder aus der Literatur zugänglichen Schmelzdaten der reinen Komponente kann der Verlauf der Liquiduslinie als erste Näherung vorhergesagt werden. Stehen Schmelzdaten beider Systemkomponenten zur Verfügung, kann die eutektische Zusammensetzung des Systems im Phasendiagramm aus dem Schnittpunkt der zugehörigen Liquiduslinien abgeleitet werden.

Aus der Schröder-van-Laar-Gleichung für ein reales System (Gl. 3.4.1a) folgt, dass das Löslichkeitsverhalten kristalliner Stoffe einerseits von Reinstoffeigenschaften, wie Schmelzenthalpie und -temperatur, andererseits von der Zusammensetzung/Aktivität der flüssigen Phase abhängig ist. Die Aktivitätskoeffizienten charakterisieren reales Verhalten der flüssigen Phase und spiegeln sich in der Löslichkeit wieder.

3.4.1 Löslichkeitsdiagramm eines binären Stoffsystems

In der nachfolgenden Abb. 3-4 ist eine typische Löslichkeitskurve der Feststoffkomponente im Lösungsmittel in einem Konzentrations-Temperatur-Diagramm für einen gegebenen konstanten Druck eingezeichnet. Die Lage und der Verlauf der Löslichkeitskurve sind stoffspezifisch und charakteristisch für das jeweilige Stoffsystem.

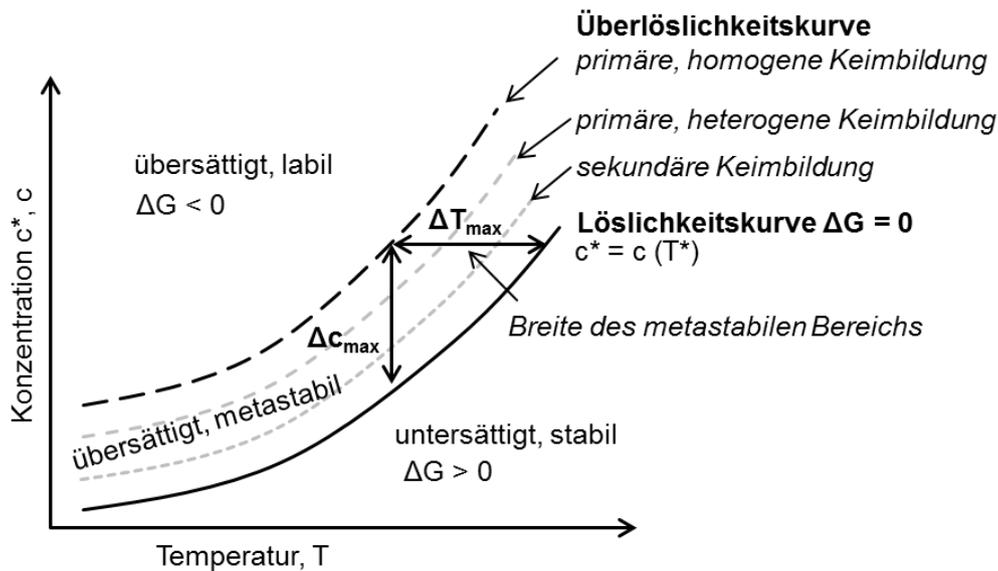


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der Stabilitätsbereiche einer binären Lösung in einem c-T-Phasendiagramm. Kennzeichnung der Breite des metastabilen Bereichs inklusive der Keimbildungsarten. Die Abbildung ist abgeleitet von (Stephan 1999)

Wie in Abb. 3-4 gezeigt, teilt die Löslichkeitskurve ($\Delta G = 0$) das Fest/flüssig-Phasendiagramm hinsichtlich der Lösungskonzentration in zwei charakteristische Bereiche ein: einen untersättigten, stabilen Bereich ($\Delta G > 0$) sowie einen übersättigten Bereich ($\Delta G < 0$).

In einer untersättigten Lösung findet weder Keimbildung noch Kristallwachstum statt, sie bleibt stabil einphasig sowohl bei einer Temperatur- als auch Zusammensetzungsänderung. Eine Feststoffzugabe zu dieser Lösung bei gegebener konstanter Temperatur führt lediglich zum Auflösen der Kristalle bis zur Sättigung.

Der übersättigte Bereich lässt sich mit der sog. Überlöslichkeitskurve in ein metastabiles und ein labiles Gebiet aufteilen. Nach (McCabe and Hsü 1934) geht die Einteilung des übersättigten Bereichs sowie die Existenz einer Überlöslichkeitskurve für jede Lösung auf Ostwald zurück. Die Überlöslichkeitskurve, auch Übersättigungsgrenze genannt, kennzeichnet die Instabilitätsgrenze einer bis zur Temperatur T unterkühlten Lösung, bei welcher spontan Kristalle ausfallen (Stephan 1999).

Der Bereich im Phasendiagramm zwischen der Löslichkeits- und Überlöslichkeitskurve wird nach (Ostwald 1897) als metastabil bzw. als metastabiler Bereich bezeichnet. Innerhalb dieses Bereichs ist eine spontane Ausbildung wachstumsfähiger Primärkeime des gelösten Stoffs sehr unwahrscheinlich. Nach (Ostwald 1897) verursacht ausschließlich die Berührung mit der kristallinen Phase eine Flüssig/fest-Phasenumwandlung in einer metastabilen Lösung. Demzufolge muss der Kristallisationsvorgang des gelösten Stoffs in einer metastabilen Lösung z. B. über die Impfkristallzugabe initiiert werden.

Wie in Abb. 3-4 gezeigt, kann die Breite des metastabilen Bereiches im Löslichkeitsdiagramm entweder als maximale Unterkühlung ΔT_{\max} bei konstanter Konzentration oder als maximale Übersättigung Δc_{\max} bei konstanter Temperatur dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde die Breite des metastabilen Bereichs als die maximale Unterkühlung einer Lösung bei vorgelegter Feststoffkonzentration bestimmt.

3.4.2 Übersättigung als Triebkraft für Kristallkeimbildung und -wachstum

Das Stattfinden eines Kristallisationsprozesses beruht auf dem Zusammenspiel von zwei aufeinanderfolgenden kinetisch angetriebenen Vorgängen: die Ausbildung eines stabilen Primärkristallkeims und das anschließende Heranwachsen zum eigentlichen Kristall. Die Ausbildung eines stabilen primären Kristallkeims in einer homogenen Lösung (sog. Primärkeimbildung) bedarf einer gerichteten Diffusion der gelösten Moleküle der zu kristallisierenden Komponente in der Lösung. Allein die Übersättigung bzw. der Übersättigungsgrad der Lösung entscheidet, ob die Primärkeimbildung stattfindet (Ostwald 1897).

Eine Übersättigung einer Lösung liegt vor, wenn das chemische Potential des Keimes kleiner ist, als das des gelösten Stoffs, $\mu_{A,s} < \mu_{A,l}$. Das chemische Potential eines gelösten Stoffs in einer realen Lösung ist definiert als (Mullin 2001):

$$\mu = \mu^0 + RT \cdot \ln a \quad 3.4.2.1$$

Wobei μ^0 das chemische Standardpotential des Stoffs in der flüssigen Phase, R die ideale Gaskonstante und a die Aktivität der flüssigen Phase sind. Im Allgemeinen stellt die Übersättigung einer Lösung eine Differenz der chemischen Potentiale zwischen der übersättigten μ und der gesättigten μ^* flüssigen Phasen dar:

$$\Delta\mu = \mu - \mu^* = \mu^0 + RT \cdot \ln a - \mu^0 - RT \cdot \ln a^* \quad 3.4.2.2$$

bzw.

$$\Delta\mu = RT \cdot \ln(a/a^*) \quad 3.4.2.3$$

oder

$$\frac{\Delta\mu}{RT} = \ln(a/a^*) = \ln S \quad 3.4.2.4$$

Mit a^* , der Aktivität der gesättigten Lösung und S , der Übersättigung.

Unter der Annahme einer idealen verdünnten Lösung mit $a = x$, hängt die Übersättigung S dieser Lösung nur von ihrer Zusammensetzung x bzw. Konzentration c ab:

$$S = x/x^* = c/c^* \quad , \quad * \text{ steht für gesättigte Lösung} \quad 3.4.2.5$$

Alternativ kann auch die *relative Übersättigung* σ der Lösung nach folgender Gleichung:

$$\sigma = S - 1 = c/c^* - 1 = \frac{(c-c^*)}{c^*} = \frac{\Delta c}{c^*} \quad 3.4.2.6$$

ermittelt werden.

3.4.3 Möglichkeiten zur Erzeugung der Übersättigung

Wie oben dargelegt, ist die Übersättigung die Triebkraft der Kristallisation. Jedoch muss die für die Kristallisation in der Arbeitslösung notwendige Übersättigung zunächst erzeugt werden.

In der Abb. 3-5 sind Möglichkeiten der Übersättigungserzeugung mit den Zahlen 1 bis 5 im Phasendiagramm gekennzeichnet.

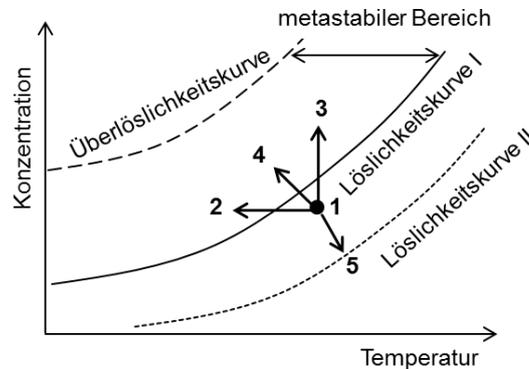


Abb. 3-5: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Erzeugung von Übersättigung. Die Abbildung ist abgeleitet von (Hofmann 2004).

Die Kristallisationsverfahren werden nach der angewendeten Art der Übersättigungserzeugung unterschieden (Hofmann 2004).

[1 - 2] *Abkühlen untersättigter Lösung über die Sättigungstemperatur hinaus.*
 Kühlungskristallisation wird angewendet, wenn die Löslichkeit der zu kristallisierenden Substanz eine starke Temperaturabhängigkeit zeigt. Sie wird im großtechnischen Maßstab z. B. zur Kristallisation von Kalium- bzw. Ammoniumnitrat aus wässrigen Lösungen eingesetzt (Mersmann 2001).

- [1 - 3] *Entziehen des Lösungsmittels mittels Verdampfung.* Verdampfungskristallisation wird eingesetzt, wenn die Löslichkeit mit zunehmender Temperatur nur geringfügig ansteigt, nahezu konstant bleibt oder sogar abnimmt. Beispiel: Kristallisation von Natriumchlorid aus wässriger Lösung (Mullin 2001).
- [1 - 4] *Simultane Verdampfung und Kühlung* der Lösung durch das Anlegen von Vakuum. Es wird zwischen Vakuummühlungs- und Vakuummver-
dampfungskristallisation unterschieden. Die Vakuummühlungskristallisation wird z. B. zur Gewinnung von Eisensulfat eingesetzt (Hofmann 2004).
- [1 - 5] *Zugabe eines löslichkeitssenkenden Additivs.* Die dabei erzeugte Löslichkeitserniedrigung der zu kristallisierenden Komponente ist im Phasendiagramm mit der Löslichkeitskurve II dargestellt. Die Reduktion der Löslichkeit kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden:
- Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung;* Zugabe eines zweiten Lösungsmittels (sog. Antisolvents), in welchem der untersuchte Feststoff entweder wenig oder gar nicht löslich und welches mit der Ausgangslösung mischbar ist. Mit zunehmendem Antisolvent-Anteil nimmt die Löslichkeit im System ab, wobei die Konzentration ansteigt. Üblicherweise wird Antisolvent der Lösung entweder zu Beginn einer isothermen Kristallisation oder am Ende einer Kühlungskristallisation zur Erhöhung der Produktausbeute hinzugefügt (Wieckhusen 2013).
 - Änderung der Lösungszusammensetzung;* Zugabe eines in der Lösung löslichen Additivs, welches zur Erniedrigung der Löslichkeit der zu kristallisierenden Komponente und dadurch zur Fällung führt. Der Vorgang nennt sich „Aussalzen“ und findet insbesondere bei der Gewinnung anorganischer schwerlöslicher Salze aus wässrigen Lösungen Anwendung (Mullin 2001).
 - Änderung des pH-Werts* der Lösung durch Zugabe einer Säure bzw. Base zur Lösung.
- [6] *Reaktivkristallisation* ist ein komplexer Mehrphasenprozess, welcher die chemische Reaktion mit der kristallisationsbasierten Stofftrennung vereint. Beispiel: Reaktivkristallisation von Salizylsäure in wässriger Lösung (Caro et al. 2014).

Ausgehend vom Löslichkeitsverhalten der hier untersuchten Stoffsysteme, wurde die Übersättigung des Systems einerseits durch Abkühlen der Lösung sowie andererseits durch Zugabe eines geeigneten Antisolvents erzeugt.

3.4.4 Kristallisation aus metastabiler Lösung

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten den Kristallisationsvorgang in einer metastabilen Lösung zu initiieren: entweder das Erzwingen der Primärkeimbildung durch Erzeugung sehr hoher Übersättigungen oder, bei geringen Übersättigungen, mittels Sekundärkeimbildung auf der dem System angebotenen Oberfläche, z. B. der der Impfkristalle der zu kristallisierenden Komponente.

Da im Laufe dieser Arbeit die Lösungskristallisation zur Stoffaufreinigung eingesetzt wird, nimmt der Prozess der Sekundärkeimbildung zur Kristallisation der Zielkomponente in der metastabilen Lösung eine übergeordnete Stellung ein. Insbesondere durch Animpfen mit Impfkristallen der aufzureinigenden Komponente soll die spontane Keimbildung der Verunreinigungen in der übersättigten Lösung verhindert und der selektive Einbau der Moleküle der Zielkomponente in das vorgelegte Kristallgitter begünstigt werden. Damit steht der Vorgang der Sekundärkeimbildung im Vordergrund der theoretischen Betrachtung.

Die Sekundärkeimbildung findet in einer metastabilen Lösung an wachstumsfähigen Kristallkeimen statt. Diese können entweder als Folge mechanischer Beanspruchung größerer Aggregate zu Bruchstücken zerfallen oder durch bewusste Zugabe der Impfkristalle des zu kristallisierenden Stoffs zu einer metastabilen übersättigten klaren Lösung entstehen.

Die Anwendung des sog. Animpfens zum Initiieren des Kristallisationsvorgangs ist eine gängige Methode bei Batch-Prozessen, weil bereits bei geringer Übersättigung der Lösung und niedrigem Unterkühlungsgrad des Systems eine robuste und kosteneffiziente Prozessführung möglich ist. Auf der molekularen Ebene stellen die Impfkristalle eine kristalline Strukturvorlage für den Aufbau weiterer Kristallebenen dar und legen somit die Feststoffeigenschaften des resultierenden kristallinen Produkts fest. Aus diesem Grund repräsentiert das Animpfen oft die einzige zuverlässige Möglichkeit zur Herstellung gewünschter Polymorphe oder Solvatphasen des kristallinen Produkts. Außerdem können die Morphologie und die Kristallgrößenverteilung des gewonnenen Kristallisats mithilfe der äußeren Form und Größe der vorgelegten Impfkristalle gezielt beeinflusst werden (Beckmann et al. 1998; Hofmann 2004; Mersmann 2001).

Der Vorgang der Primärkeimbildung wurde im Laufe dieser Arbeit zur Bestimmung des Verlaufs der Überlöslichkeitskurve, welche zur Ermittlung der metastabilen Breite sowie Auswahl der geeigneten Impfstrategie für das jeweilige Trennprozess notwendig ist, verwendet. Die Theorie der Primärkeimbildung ist in verschiedenen Werken (Davey 2000; Gnielinski et al. 1993; Mullin 2001; Roth 2006; Volmer 1939) in ausführlicher Form erläutert und wird in dieser Arbeit nicht näher behandelt.

3.5 Grundlagen von Polymorphie und Solvatbildung

1818 hat Berzelius, nach dem er drei verschiedene feste Formen des Elements Kohlenstoff auf ihre physikalischen Eigenschaften untersuchte, den Begriff der *Allotropie* eingeführt (Weinlig 1844). Als 1819 E. Mitscherlich ein ähnliches Phänomen bei Arsenit- und Phosphatsalzen beobachtete, führte er 1821 den Begriff der *Polymorphie* (von griechischen *Vielgestaltigkeit*) für chemische anorganische Verbindungen ein (von Meyer 1905). Zehn Jahre später, nach dem Isolieren von zwei verschiedenen kristallinen Formen des Benzamids aus wässriger Lösung, wurde die Eigenschaft der Polymorphie letztendlich auch den organischen Verbindungen zugesprochen (Roth 2006).

3.5.1 Bedeutung und Begriffserklärung

Theoretisch könnte ein Molekül im festen kristallinen Zustand eine Vielzahl verschiedener Formen ausbilden. Einerseits können Moleküle derselben Art durch diverse räumliche Anordnungen der Bausteine verschiedene polymorphe Phasen im kristallinen Zustand ausbilden. Andererseits können Moleküle einer Art kristalline Aggregate mit Molekülen bzw. Ionen anderer Art bilden. In Abhängigkeit vom Additiv können dabei verschiedene Solvatphasen, Co-Kristalle bzw. Salze entstehen (Grepioni 2008; Hilfiker 2006). In der Abb. 3-6 sind nur wenige ausgewählte von einer Vielzahl theoretisch möglicher kristalliner Phasen eines Moleküls schematisch dargestellt.

Das Bewusstsein, dass unterschiedliche kristalline Formen einer chemischen Substanz sich wie verschiedene Materialien verhalten können, hat wichtige Auswirkungen auf alle Bereiche der Chemie (Arzneimittel, Agrochemikalien, Lebensmittelzusatzstoffe, kosmetische Produkte, Pigmente, Sprengstoffe usw.), die mit der Herstellung und Vermarktung von festen kristallinen Stoffen verbunden sind (Bernstein 2002). So können z. B. verschiedene feste Phasen einer pharmazeutisch relevanten Substanz aufgrund des unterschiedlichen Löslichkeits- und Auflösungsverhaltens direkte Auswirkungen auf die resultierende pharmakologische Wirkung haben.

Polymorphie ist die am häufigsten anzutreffende Eigenschaft kristalliner organischer aber auch anorganischen Substanzen. Untersuchungen von pharmazeutisch relevanten niedermolekularen organischen Verbindungen (Molgewicht < 1000 g/mol) haben gezeigt, dass rund 90% davon in der Lage sind, polymorphe Strukturen auszubilden. Berücksichtigt man Solvate als zusätzliche mögliche kristalline Form dieser Substanzen, so sind von rund 87% aller Verbindungen mindestens zwei feste Formen bekannt.

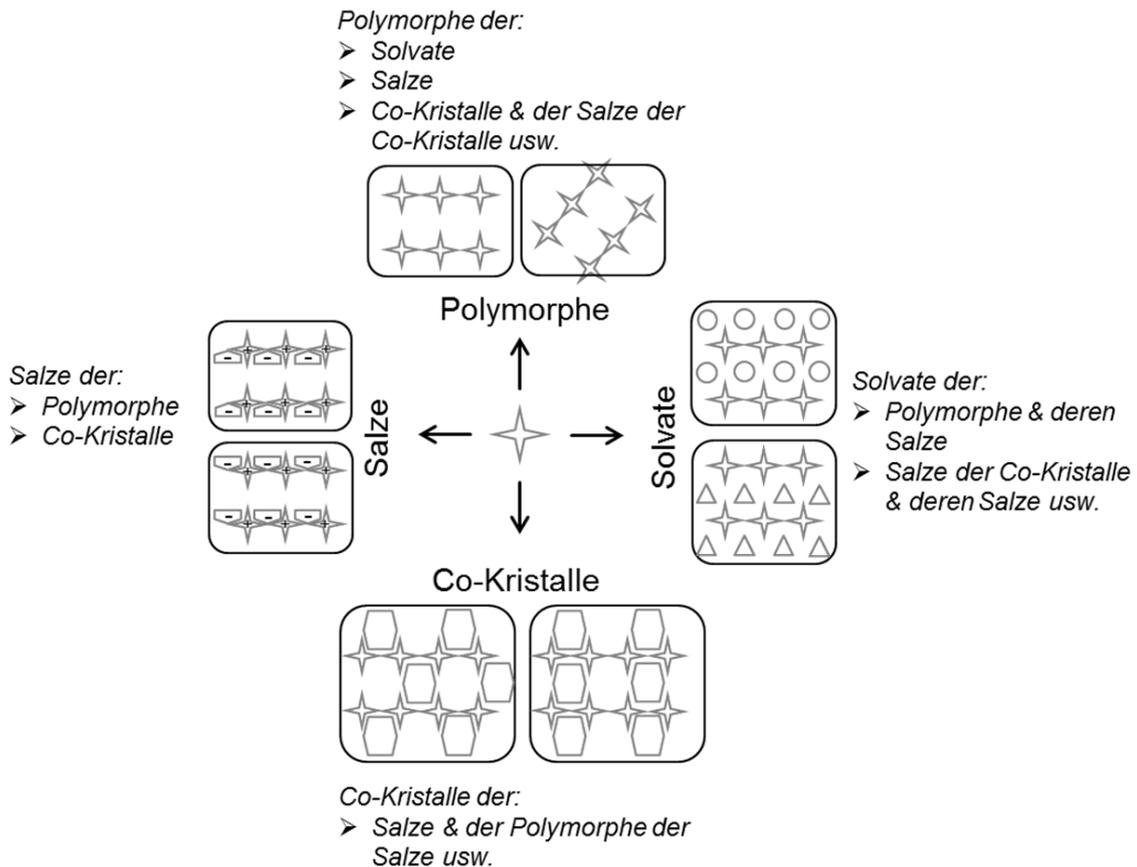


Abb. 3-6: Schematische Darstellung der theoretisch möglichen kristallinen Formen eines beliebigen Moleküls. Die Abbildung ist abgeleitet von (Grepioni 2008; Hilfiker 2006).

Neben polymorphen Phasen und Solvatphasen spielt auch die Salzbildung eine entscheidende Rolle. Diese wird zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des aktiven Bestandteils des Medikaments in der festen Darreichungsform und somit der Bioverfügbarkeit ausgenutzt (Hilfiker 2006).

Studiert man Werke, welche sich ausführlich mit Begriffsinhalten und Bedeutung der Polymorph- und Solvatbildung befassen, lassen sich im Wesentlichen folgende Aussagen zusammenfassen (Bernstein 2002; Bernstein 2011; Brittain 1999; Burger and Ramberger 1979a; Burger and Ramberger 1979b; Griesser 2006; Haleblan and McCrone 1969; Henck et al. 1997; Hilfiker 2006; Körber 1926; Threlfall 1995): Existieren von einer gegebenen chemischen Verbindung mindestens zwei kristalline Formen, welche verschiedene Raumgitteranordnungen desselben Moleküls aufweisen, so sind diese **zwei** Polymorphe (= **Dimorphe**) einer chemischen Verbindung. Aufgrund der verschiedenen räumlichen Anordnung der Moleküle im Kristall, unterscheiden sich die einzelnen Modifikationen in ihren physikalischen Eigenschaften, u.a. in Dichten, Löslichkeiten, Schmelztemperaturen, Schwingungsspektren, Röntgendiffraktogrammen. Im Gegensatz zu Polymorphen, handelt es sich bei kristallinen Solvaten um eine regelmäßige Anordnung des Lösungsmittelmoleküls (engl. „solvent“) in das Hauptkristallgitter des Wirtsmoleküls. Dabei ist das Kristallgitter

des Solvats durch van-der-Waals Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und dem Wirtsmolekül stabilisiert (Reichardt and Welton 2001).

Existieren von einem pharmazeutischen Wirkstoff unter dem Umgebungsdruck mindestens zwei kristalline Modifikationen, ist es für die großtechnische Verarbeitung der Substanz zum festen Arzneimittel wichtig, dass ausschließlich die unter den Umgebungsbedingungen thermodynamisch stabile Form ausgewählt wird. Die Bedeutung der frühen Erkennung thermodynamischer Beziehungen zwischen polymorphen Phasenpaaren pharmazeutischer Substanzen soll am Beispiel von *Ritonavir*, einem Arzneistoff zur Behandlung von HIV-Infektionen, deutlich gemacht werden.

Der Wirkstoff wurde 1992 von Abbott Laboratories entdeckt und bereits 1996 als konzentrierte Ethanol-Lösung in Kapseln formuliert auf den Markt gebracht. In dieser Zeit war nur eine kristalline Form von Ritonavir bekannt und alle Versuche, andere Modifikationen zu identifizieren, waren erfolglos. Als 1998 der größte Feststoffanteil in der kapselformulierten Lösung ausfiel und die kristalline Substanz den Auflösungsstest nicht bestanden hatte, musste der Verkauf von Ritonavir eingestellt werden. Der Kapselniederschlag wurde als neue, thermodynamisch stabile kristalline Form II von Ritonavir identifiziert. Da in den Kapseln eine bzgl. metastabilen Form I nahezu gesättigte Ritonavir/Ethanol-Lösung formuliert war und die Form II eine ca. 5-fach geringere Ethanol-Löslichkeit im Vergleich zur Form I zeigte, war die Lösung deutlich übersättigt bzgl. der Form II, welche anschließend in den Kapseln auskristallisierte. Nachdem die kontrollierte Produktion beider Ritonavirformen sichergestellt war, wurde das Arzneimittel neu vermarktet (Chemburkar et al. 2000; Saurabh and Kaushal 2011).

3.5.2 Ostwald'sche Stufenregel

Die Gewinnung metastabiler polymorpher Phasen, wie es bei der Ritonavirherstellung der Fall war, lässt sich mit der Ostwald'schen Stufenregel erläutern. 1897 hatte Ostwald beim Auskristallisieren von Hydraten des Natriumsulfats sowie Polymorphen des Quecksilberjodids aus übersättigten Lösungen folgende Gesetzmäßigkeit beobachtet: Beim Verlassen irgendeines Zustandes gehen Systeme in einen stabileren Zustand, aber nicht in den unter den vorhandenen Bedingungen stabilsten, sondern in den am nächsten liegenden Zustand, über. Nach (Ostwald 1897) liegt dies daran, dass alle Systeme bei einer Zustandsänderung immer bestrebt sind, „möglichst geringe Verluste an freier Energie“ zu „erleiden“ und somit beim Übergang vom übersättigten in den Gleichgewichtszustand immer zuerst den Zustand der nächstgrößten freien Energie annehmen. Dieses Kristallisationsverhalten polymorpher Phasen wird als *Ostwald'sche Stufenregel* bezeichnet.

Zur Beurteilung der relativen Stabilität polymorpher Phasenpaare hatte Tammann um 1926 die vergleichende Betrachtung des thermodynamischen Potentials G der jeweiligen kristallinen Phase in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem Druck herangezogen. Als Schlussfolgerung hatte Tammann zusammengefasst, dass die kristalline Phase mit dem niedrigsten G -Wert die höchste Stabilität aufweist. Existiert bei einer bestimmten Temperatur T_τ , welche kleiner der Schmelztemperatur des jeweiligen Polymorphs ist, ein Schnittpunkt der G -Kurven, so findet ein Stabilitätswechsel zwischen den polymorphen Phasen statt und die Temperatur T_τ entspricht der Temperatur der polymorphen Phasenumwandlung. Tritt bei polymorphen Phasenpaaren solche „partielle Stabilität“ auf, so verhalten sie sich zueinander enantiotrop. Ist nur eine Phase gegenüber der anderen im gesamten Temperaturbereich stabil, so liegt die sog. „totale Stabilität“ vor und die Polymorphe verhalten sich zueinander monotrop (Körber 1926).

Die Gültigkeit der *Ostwald'schen Stufenregel* ist in der Abb. 3-7 anhand der vergleichenden Betrachtung der qualitativen Kurvenverläufe der freien Gibbs-Enthalpie von zwei polymorphen Phasen A und B einer beliebigen Verbindung veranschaulicht. Wie im Beispiel gezeigt, ist die Form B mit der niedrigeren freien Gibbs-Enthalpie die thermodynamisch stabile im Vergleich zu A. Die Form A ist somit metastabil im Vergleich zu B.

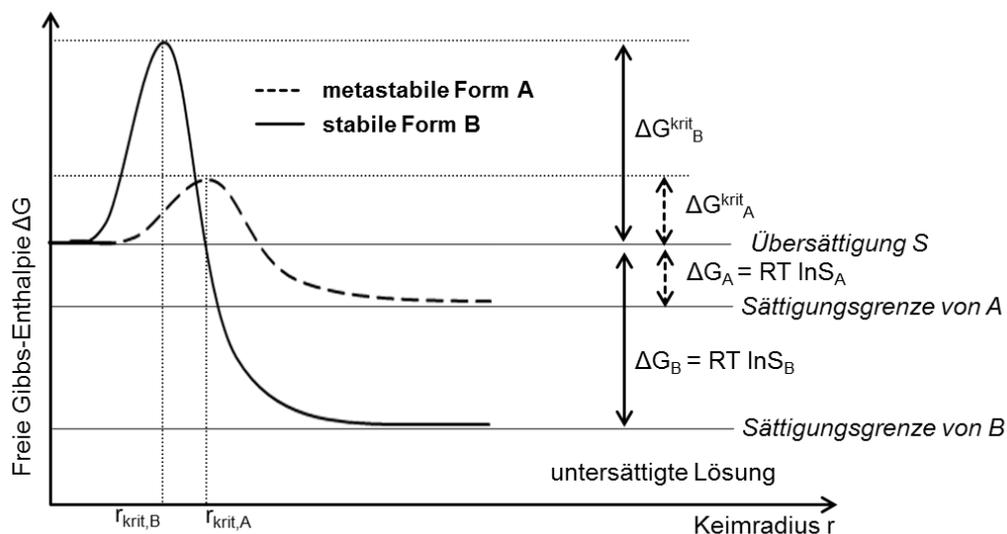


Abb. 3-7: Qualitative Darstellung der freien Gibbs-Enthalpie zweier polymorpher Formen einer chemischen Verbindung: thermodynamisch metastabile Form A und stabile Form B. Die Abbildung ist abgeleitet von (Bernstein 2002; Roth 2006).

Während des Kristallisationsvorgangs aus einer übersättigten Lösung wird zur Ausbildung eines stabilen Keimes der Größe $r > r_{krit}$ der thermodynamisch stabilen Form B ein höherer Betrag der Keimbildungsenthalpie $\Delta G_{krit,B}$ benötigt als zur Ausbildung der metastabilen Form A (Bernstein 2002; Roth 2006). Für das System ist es günstiger, zunächst die kleinere Energiebarriere von $\Delta G_{krit,A}$ zu

überwinden, indem die Primärkeime der metastabilen Form A aus der übersättigten Lösung gebildet werden. Unter geringerem Energieaufwand von $\Delta G_{A-B} = \Delta G^{krit_B} - \Delta G^{krit_A}$ erfolgt anschließend eine Fest/fest-Phasenumwandlung von A zur thermodynamisch stabilen Form B, wodurch das System den Zustand mit der niedrigsten freien Gibbs-Enthalpie annimmt.

Die höhere thermodynamische Stabilität der Form B gegenüber A bedeutet eine niedrigere Löslichkeit des Feststoffs (Hilfiker 2006).

Betrachtet man rein hypothetisch eine Substanz, welche die *n-te* Anzahl kristalliner Formen, wie in Abb. 3-8 gezeigt, ausbilden kann, so müssten die primäre Kristallkeimbildung und die Umwandlungen polymorpher Phasenpaare nach der *Ostwald'schen Stufenregel* folgendermaßen ablaufen:

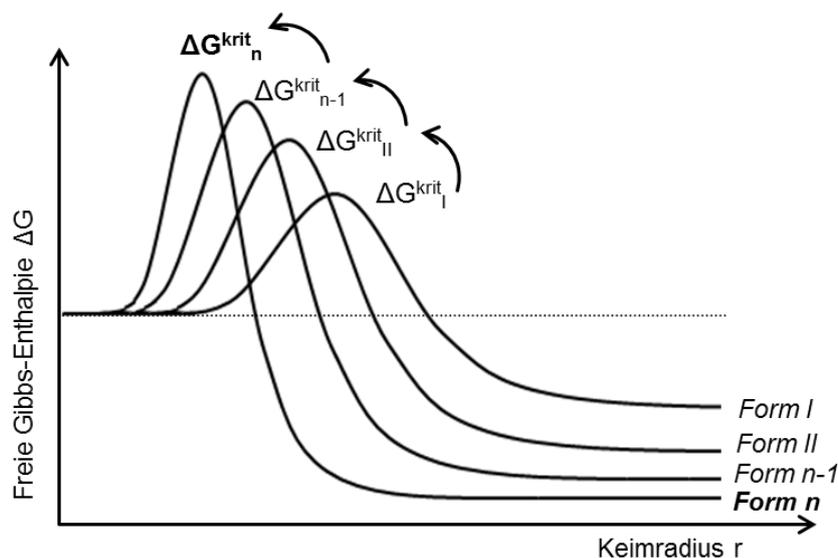


Abb. 3-8: Illustration des Kristallisationsvorgangs einer beliebigen Substanz, welche eine *n-te* Anzahl kristalliner Formen aufweist. Anwendung der Ostwald'schen Stufenregel anhand der qualitativen Kurvenverläufe der freien Gibbs-Enthalpie einzelner polymorpher Formen. Ausgehend von der Form I mit der geringsten thermodynamischen Stabilität stufenweise Fest/fest-Phasenumwandlung zu Form *n* mit der höchsten Stabilität und niedrigsten freien Gibbs-Enthalpie.

Ausgehend von der Ausbildung von Primärkristallkeimen der Form I mit der geringsten thermodynamischen Stabilität über die stufenweise Fest/fest-Phasenumwandlung zur thermodynamisch stabilsten Form *n* erreicht das System letztendlich den Zustand der niedrigsten Energie.

Aufgrund des energetisch bedingten stufenartigen Kristallisationsverhaltens polymorpher Formen lassen sich auch metastabile Formen monotroper Polymorphe trotz derer offensichtlichen thermodynamischen Instabilität in der Praxis isolieren (Davey 2000).

3.5.3 Thermodynamische Beziehungen zwischen polymorphen Phasenpaaren

Wie im Kap. 3.3 erläutert, ist der Flüssig/fest-Phasenübergang eines beliebigen Stoffes von gelöstem zum energetisch günstigeren kristallinen Zustand immer mit der Abnahme der freien Gibbs-Enthalpie verbunden. Kann der zu kristallisierende Stoff mehrere kristalline Formen ausbilden, so wird nach der Ostwald'schen Stufenregel die thermodynamisch stabilste Form, welche dem Zustand der niedrigsten freien Gibbs-Enthalpie im System entspricht, letztendlich angenommen.

Die Änderung der freien Gibbs-Enthalpie G beim Fest/fest-Phasenübergang eines dimorphen Systems bestehend aus den Formen A und B bei konstantem Druck und Temperatur kann mithilfe der Gibbs-Helmholz-Gleichung (Gl. 3.5.3.1) ausgedrückt werden (Hilfiker 2006):

$$\Delta G_{AB} = \Delta H_{AB} - T\Delta S_{AB} \quad 3.5.3.1$$

Diese setzt sich aus der Enthalpieänderung ΔH (Gl. 3.5.3.2) sowie dem Produkt aus der Temperatur und der Entropieänderung ΔS (Gl. 3.5.3.3) des Systems zusammen (Hilfiker 2006):

$$\Delta H_{AB} = \int_0^T C_{P,m} dT + H^0 \quad 3.5.3.2$$

$$\Delta S_{AB} = \int_0^T \frac{C_{P,m}}{T} dT + S^0 \quad \text{mit} \quad S^0(T = 0K) = 0 \quad 3.5.3.3$$

Dabei sind $C_{P,m}$ die molare Wärmekapazität des Feststoffs bei $p=\text{konst.}$, H^0 und S^0 die Enthalpie und Entropie des kristallinen Stoffs am absoluten Nullpunkt ($T = 0 \text{ K}$).

Ausgehend von den obigen Gleichungen und unter der Annahme der Druckkonstanz lassen sich zwei typische Energie-Temperatur-Diagramme kristalliner Phasen für das dimorphe *monotrope* sowie *enantiotrope* System schematisch darstellen (Abb. 3-9, links und rechts). Aus den dargestellten Kurvenverläufen der freien Gibbs-Enthalpie lassen sich Aussagen über die relative Stabilität der polymorphen Phasenpaare ableiten sowie Rückschlüsse zum monotropen bzw. enantiotropen Fest/fest-Phasenverhalten ziehen. Weist eine der Formen A und B in dem gesamten Temperaturbereich unterhalb der zugehörigen Schmelztemperaturen immer die niedrigere freie Gibbs-Enthalpie auf, wie die Form A in Abb. 3-9 links, so ist A im Gegensatz zu B thermodynamisch stabil. Dieses dimorphe Verhalten bezeichnet man als *monotrop*. Somit ist Form B innerhalb des gesamten Temperaturbereichs metastabil.

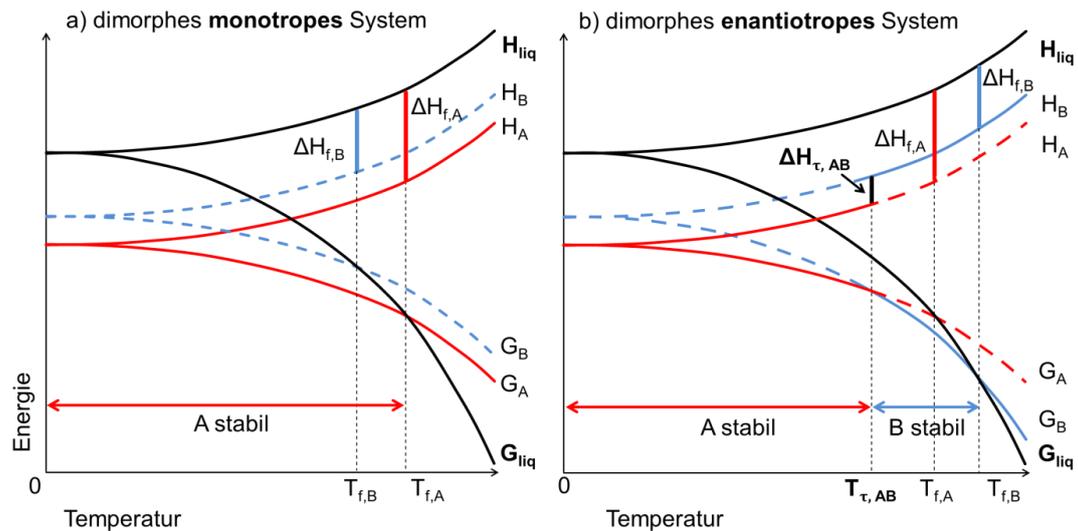


Abb. 3-9: Schematische Darstellung von zwei typischen Energie-Temperatur-Diagrammen mit der Kennzeichnung der Stabilitätsbereiche der kristallinen Phasen A und B eines dimorphen a) monotropen sowie b) enantiotropen Systems. Indizes: $T_{f,i}$ die Schmelztemperatur der Form i; $T_{\tau,AB}$ die Temperatur der polymorphen Fest/fest-Phasenumwandlung; $\Delta H_{\tau,AB}$ die Enthalpie der polymorphen Fest/fest-Phasenumwandlung; $\Delta H_{f,i}$ die Schmelzenthalpie der Form i; H und G die Enthalpie und freie Gibbs-Energie. Abkürzungen: liq=liquid=flüssig. Die Abbildung ist abgeleitet von (Hilfiker 2006).

Schneiden sich die Kurven der freien Gibbs-Enthalpie beider Polymorphe unterhalb der zugehörigen Schmelzpunkte bei einer bestimmten Temperatur $T_{\tau,AB}$, wie in Abb. 3-9 rechts gezeigt, so gilt für alle $T < T_{\tau,AB}$ die Ungleichung $G_A < G_B$, wobei die Form A die stabile und Form B die metastabile Modifikation in dem Temperaturbereich darstellt. Für den Temperaturbereich $T_{\tau,AB} < T < T_{f,B}$ gilt $G_A > G_B$, sodass Form B die stabile Modifikation und A dementsprechend die metastabile Form ist. Dieses dimorphe Phasenverhalten wird als *enantiotrop* bezeichnet. Die Temperatur $T_{\tau,AB}$ entspricht der Temperatur der Fest/fest-Phasenumwandlung von A zu B und umgekehrt. Die Besonderheit des enantiotropen Verhaltens liegt in der Reversibilität des polymorphen Festphasenübergangs. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 3-10 schematisch dargestellt.

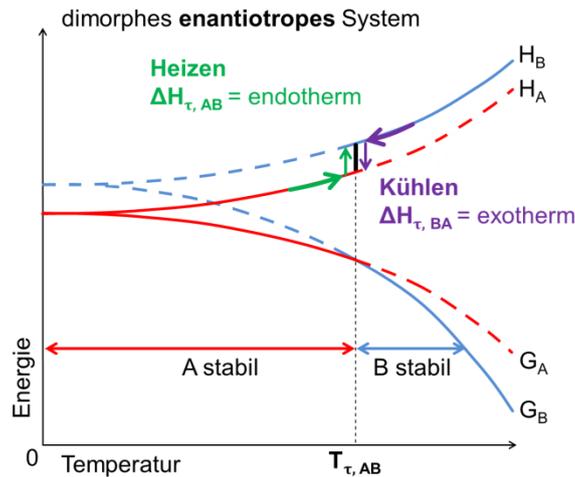


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der Richtung der Enthalpieänderung $\Delta H_{\tau, AB}$ beim Aufheiz- bzw. Abkühlvorgang während des reversiblen dimorphen enantiotropen Fest/fest-Phasenübergangs.

Beim Aufheizvorgang der niedertemperaturstabilen Ausgangsform A über die Temperatur $T = T_{\tau, AB}$ hinaus findet ein endothermer Fest/fest-Phasenübergang zur hochtemperaturstabilen Form B statt. Wird die so gebildete Form B auf die Temperatur unter die Umwandlungstemperatur $T_{\tau, AB}$ abgekühlt, so läuft der Vorgang rückwärts ab und die polymorphe Fest/fest-Phasenumwandlung zur niedertemperaturstabilen Form A läuft über Wärmefreisetzung ab.

Die physikalischen Eigenschaften sowie die relative Stabilität polymorpher Phasenaare, wie Schmelzpunkt und -enthalpie, Temperatur der enantiotropen Fest/fest-Phasenumwandlung, lassen sich mittels thermischer Festphasenanalytik charakterisieren.

3.5.4 Ableitung physikalischer Eigenschaften polymorpher Phasenaare aus thermodynamischen Beziehungen

1979 haben Burger und Ramberger (Burger and Ramberger 1979a; Burger and Ramberger 1979b) nach Untersuchung von über 30 kristallinen chemischen Verbindungen auf die Festphasenstabilität allgemeingültige Regeln zur Unterscheidung verschiedener kristalliner Formen einer und derselben chemischen Verbindung zusammengefasst (Threlfall 1995). Diese wurden als klassische Burger-Ramberger-Regeln bezeichnet. Insbesondere zwei davon, das „heat of transition rule“ und das „heat of fusion rule“, lassen sich direkt aus Ergebnissen der thermischen Festphasenanalytik ableiten (Hilfiker 2013a).

Auch andere physikalische Eigenschaften, wie Dichte, Härte und Löslichkeit, lassen sich aus der relativen Stabilität kristalliner Phasenaare ableiten (Hilfiker 2006). Sind zwei kristalline Formen A und B einer chemischen Verbindung gegeben, wobei die Form A die stabilere bei einer beliebigen Temperatur T ist,

d. h. $G_A(T) < G_B(T)$, so gilt aus der Gl. 3.3.3 für das chemische Potential der chemischen Verbindung im kristallinen Zustand $\mu_A(T) < \mu_B(T)$.

Befindet sich die jeweilige kristalline Phase mit der an ihr gesättigten Lösung im thermodynamischen Gleichgewicht, ist das chemische Potential der Moleküle im kristallinen Zustand gleich dem im gelösten, d. h. $\mu_A(T) = \mu_A^*(T)$ sowie $\mu_B(T) = \mu_B^*(T)$. Unter Berücksichtigung der Gleichgewichtslöslichkeit x_i^* für den jeweiligen Feststoff gilt für das chemischen Potential folgender Ausdruck (Davey 2000):

$$\mu_i(T) = \mu_i^*(T) = \mu^0 + RT \ln x_i^* \quad \text{mit } i = A, B \quad 3.5.4.1$$

Demzufolge gilt für die Sättigungskonzentrationen der beiden kristallinen Phasen die Ungleichung $x_A^*(T) < x_B^*(T)$. Folglich weist die kristalline Form mit der niedrigsten freien Gibbs-Energie und höchsten thermodynamischen Stabilität die niedrigste Aktivität und Löslichkeit auf (Davey 2000; Hilfiker 2006; Hilfiker 2013b). In den folgenden Abb. 3-11 und Abb. 3-12 sind diese Zusammenhänge graphisch veranschaulicht.

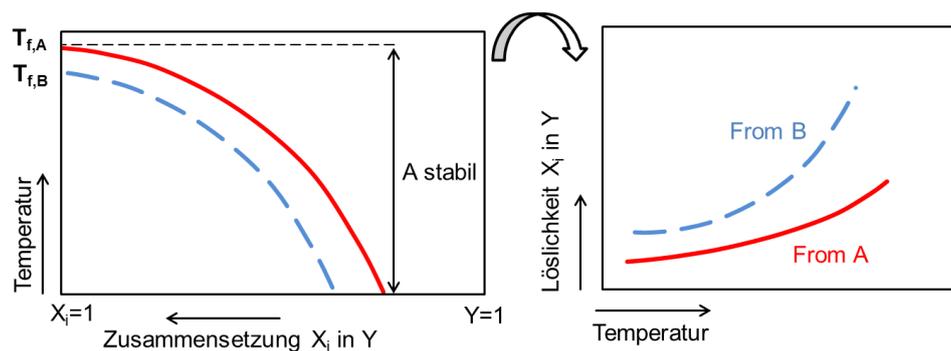


Abb. 3-11: Links: Fragment eines binären Schmelzdiagramms einer beliebigen Komponente X mit einer beliebigen Komponente Y. Die Komponente X stellt im kristallinen Zustand ein dimorphes monotropes System dar, wobei die Modifikation A im gesamten Temperaturbereich stabil ist. Rechts: Skizze des Löslichkeitsdiagramms der Dimorphe A und B der Komponente X in Y. Die Abbildung ist abgeleitet von (Davey 2000; Lorenz 2013)

Den einfacheren Fall stellt das monotrope polymorphe Phasenpaar in der Abb. 3-11 dar. Hier hat die im gesamten Temperaturbereich thermodynamisch stabile Form A stets die niedrigere Löslichkeit. Dementsprechend verhalten sich die zugehörigen Löslichkeitskurven im gesamten Temperaturbereich zueinander konstant, unabhängig von dem untersuchten Lösungsmittel.

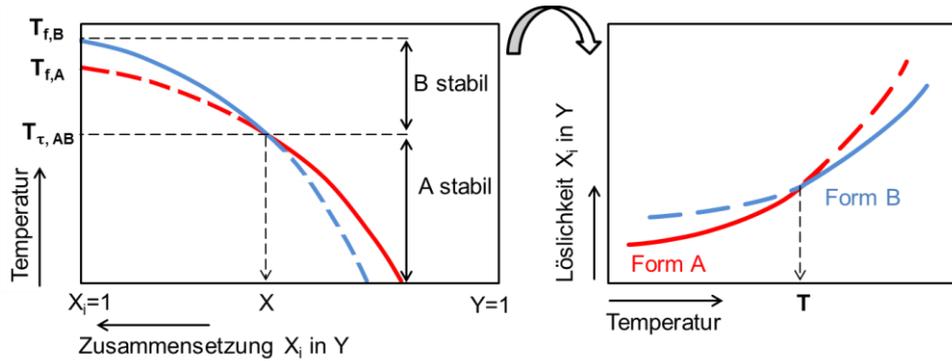


Abb. 3-12: Links: Fragment eines binären Schmelzdiagramms einer beliebigen Komponente X mit einer beliebigen Komponente Y. Die Komponente X stellt im kristallinen Zustand ein dimorphes enantiotropes System dar, wobei Modifikation A die niedertemperaturstabile Form ist. Rechts: Skizze des Löslichkeitsdiagramms der Dimorphe A und B der Komponente X in Y. Die Abbildung ist abgeleitet von (Davey 2000; Lorenz 2013).

Bei einem dimorphen enantiotropen System (Abb 3-12) ändert sich auch das relative Löslichkeitsverhalten entsprechend der vorliegenden thermodynamischen Stabilitätsbereiche der kristallinen Formen. Unter Berücksichtigung der Temperatur des Fest/fest-Phasenumwandlung weist die stabilere Form immer eine geringere Löslichkeit, wie am Beispiel von Ritonavir diskutiert, auf.

Berechnung von $T_{\tau,AB}$ aus Messdaten thermischer Festphasenanalytik

Aus dem skizzierten Schmelzdiagramm eines dimorphen enantiotropen Phasenpaares (Abb. 3-12, links) ist ersichtlich, dass die Temperatur des polymorphen Fest/fest-Phasenübergangs $T_{\tau,AB}$ aus dem Schnittpunkt der Liquiduskurven der einzelnen kristallinen Phasen näherungsweise berechnet werden kann.

Zur mathematischen Beschreibung der Liquiduskurvenverläufe für die jeweilige kristalline Form (A oder B) kann die vereinfachte Version der Schroeder-van-Laar-Gleichung (Gl. 3.4.1b) unter der Annahme von Idealität in der flüssigen Phase verwendet werden. Damit gilt am Schnittpunkt der Liquiduskurven für $x_A = x_B$ und $T = T_{\tau,AB}$:

$$\frac{\Delta H_{f,A}}{R} \left[\frac{1}{T_{f,A}} - \frac{1}{T_{\tau,AB}} \right] = \frac{\Delta H_{f,B}}{R} \left[\frac{1}{T_{f,B}} - \frac{1}{T_{\tau,AB}} \right] \quad 3.5.4.2$$

Nach der Umstellung der obigen Gleichung nach $T_{\tau,AB}$ ergibt sich für die Temperatur der dimorphen enantiotropen Fest/fest-Phasenumwandlung folgender Ausdruck:

$$T_{\tau,AB} = \frac{T_{f,A} \cdot T_{f,B} \cdot (\Delta H_{f,A} - \Delta H_{f,B})}{\Delta H_{f,A} \cdot T_{f,B} - \Delta H_{f,B} \cdot T_{f,A}} \quad 3.5.4.3$$

Daraus folgt, dass die mittels thermischer Festphasenanalytik gemessenen Schmelzdaten (Temperatur, Enthalpie) der reinen kristallinen Phasen zur Berechnung der Temperatur des polymorphen Fest/fest-Phasenübergangs als erste Näherung ausreichend sind.

3.5.5 Besonderheiten der Solvatbildung

Im Allgemeinen liegt ein Solvat vor, wenn Lösungsmittelmolekül L ein fester Bestandteil des Kristallgitters des Wirtsmoleküls X ist. Aus dem Arrangement resultiert eine neue kristalline Verbindung der Summenformel $(X \cdot nL)$, mit n der Anzahl der Lösungsmittelmoleküle pro Wirtsmolekül X. Das Ansolvat stellt die nicht solvatisierte lösungsmittelfreie Form vom Solvat dar.

Üblicherweise besetzen die kleinen Lösungsmittelmoleküle Zwischengitterplätze der deutlich größeren Wirtsmoleküle. Unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Druck) könnte theoretisch jedes denkbare Lösungsmittelmolekül kristalline Solvate mit jedem beliebigen Wirtsmolekül ausbilden. Dabei ist die Solvatbildung bei niedrigeren Temperaturen mehr begünstigt. Nach (Sheth 2004) steigt die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Solvatbildung mit der zunehmenden Größe des Wirtsmoleküls an. Dennoch stellt von 300 untersuchten Lösungsmitteln das Wasser, aufgrund der kleinsten Molekülgröße, mit mehr als 11.000 Fällen das am häufigsten in Form von Solvaten vorkommende Lösungsmittel dar (Griesser 2006). Von insgesamt 6.000 erfassten pharmazeutisch aktiven Substanzen, geht der Trend jedoch in Richtung der Monohydratbildung, d. h. Solvate mit einem Wassermolekül pro Wirtsmolekül (Brittain 1999).

Die thermodynamische Stabilität der Wirkstoffsolvate spielt bei der Wirkstoffentwicklung und Herstellung fester Darreichungsformen eine entscheidende Rolle. Die relative Stabilität von Solvat/Ansolvat-Phasenpaaren bzw. Solvaten mit unterschiedlicher Anzahl der Lösungsmittelmoleküle pro Wirtsmolekül ist abhängig von der Temperatur und, bei der Stabilisierung in Lösungsmittelgemischen, auch vom Partialdruck der einzelnen Lösungsmittel. Werden kristalline Solvate in eigenem Lösungsmittel betrachtet, so ist deren Stabilität nur von der Temperatur abhängig. Für die Ausbildung und Stabilität von Hydratphasen spielt neben der Temperatur auch die Luftfeuchtigkeit eine entscheidende Rolle.

Das Solvat als eine komplett neue chemische kristalline Verbindung zeigt von der korrespondierenden nicht solvatisierten festen Phase abweichende Feststoffeigenschaften, wie Schmelzpunkt und Löslichkeit. Zu den entscheidenden Eigenschaften einer pharmazeutischen Substanz gehören die Bioverfügbarkeit und die Permeabilität (Florence and Attwood 2006). Diese stehen im direkten Zusammenhang mit der Löslichkeit der Substanz im wässrigen und lipophilen Medium (Kutz and Wolff 2007).

Über die gezielte Herstellung eines Wirkstoffhydrats, Spezialform des Solvats, kann z. B. die Löslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit einer pharmazeutischen Substanz erhöht werden. Im Gegensatz dazu kann die Ausbildung der Wirkstoffsolvate mit toxischen organischen Lösungsmitteln die pharmakologische Wirkung beeinträchtigen. Als metastabile Solvatphasen können sich diese unter Lagerungsbedingungen an der Luft zum Ansolvat bzw. Hydrat umwandeln (Grunenberg 1997). Der Restlösungsmittelgehalt in pharmazeutischen Zubereitungen darf einen nach ICH (engl. *International Conference on Harmonisation*) festgelegten Grenzwert nicht überschreiten und das Lösungsmittel muss aus dem kristallinen Produkt entfernt werden. Die Herstellung eines lösungsmittelfreien Kristallisats im Downstream-Prozess kann zudem sehr schwierig und kostenintensiv sein (Griesser 2006; Hilfiker 2006).

3.5.6 Analytische Methoden zur Untersuchung polymorpher und Solvatphasen

Die verfahrenstechnischen Operationen, welche bei der Isolierung der Wirk- bzw. Hilfsstoffe aus Rohgemischen sowie bei der anschließenden Arzneimittelformulierung angewendet werden, umfassen oft neben der mechanischen Beanspruchung dieser Substanzen auch prozessbedingte Änderungen der Temperatur, des Drucks bzw. einen Lösungsmittelaustausch. Diese Faktoren können die Ausbildung unerwünschter, im ungünstigsten Fall vorher nicht bekannter, aber kinetisch begünstigter metastabiler kristalliner polymorpher Formen oder Solvatphasen induzieren. Thermodynamisch angetrieben können sich diese in die unter normalen Umgebungsbedingungen stabile Form umwandeln. Aufgrund der abweichenden Feststoffeigenschaften dieser kristallinen Phasen könnte die exakte Dosierung des Wirkstoffs dramatisch beeinträchtigt werden. Zur Vermeidung solcher Probleme sollten neben den biopharmazeutischen und toxikologischen Eigenschaften des potenziellen Arzneistoffs auch die Feststoffeigenschaften aller kristallinen Einsatzstoffe möglichst genau charakterisiert werden (Giron et al. 2004).

Zu Eigenschaften, welche standardmäßig zur Charakterisierung von potentiellen festen Pharmazeutika geprüft werden, gehören Kristallinität verbunden mit der Kristallstruktur, Temperaturstabilität beim konstanten Umgebungsdruck, Löslichkeit, Hygroskopizität sowie Neigung zur Polymorphie und Solvatbildung. In Tabelle 3-1 ist eine Übersicht über die analytischen Methoden gegeben, welche insbesondere zur Charakterisierung und zum Nachweis verschiedener kristalliner polymorpher bzw. Solvatphasen geeignet sind.

Tabelle 3-1: Ausgewählte analytische Methoden zur Untersuchung von Polymorphen und Solvatphasen. Tabelle zusammengefasst anhand (Bernstein 2002; Brittain 1999; Giron et al. 2004; Griesser 2006).

Analytische Methoden	Anwendung
Heiztischmikroskopie	Schmelz- und Sublimationstemperatur, Morphologische Veränderung der kristallinen Probe aufgrund der thermischen Beanspruchung, Zersetzung
Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry, Abk. DSC)	Schmelz- und Rekristallisationsverhalten, polymorphe Fest/fest-Phasenumwandlung, Desolvatisierung, Zersetzung
Thermogravimetrische Analyse gekoppelt mit DSC (Abk. TG-DSC)	Charakterisierung von Solvatphasen, Stabilitätsuntersuchung, Quantifizierung des Solvatlösungsmittels im Kristall
Röntgenpulverdiffraktometrie (Abk. XRPD) (T-programmiert)	Charakterisierung der Kristallstruktur, Kristallstrukturänderung aufgrund der polymorphen Fest/fest-Phasenumwandlung bzw. Desolvatisierung infolge thermischer Beanspruchung, Nachweis kristalliner Verunreinigungen und amorpher Anteile
Raman / IR Spektroskopie	Qualifizierung und Quantifizierung kristalliner polymorpher und Solvatphasen
Karl-Fischer Titration	Quantifizierung der kristallinen Hydrate
Mikroskopie	Feststoffmorphologie

In dieser Arbeit war das Hauptaugenmerk auf die thermodynamischen, spektroskopischen sowie strukturspezifischen Eigenschaften kristalliner Substanzen gerichtet. Zur Beurteilung der relativen thermodynamischen Stabilität kristalliner polymorpher Phasen spielen die Untersuchungen des thermischen Festphasenverhaltens eine entscheidende Rolle (Giron et al. 2004; Grunenberg 1997). Eine detaillierte Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten analytischen und experimentellen Methoden sowie Geräte ist im Kapitel 5 gegeben.

3.6 Lösungskristallisation als Aufreinigungsverfahren

Wird mittels Lösungskristallisation kristalline Phase erzeugt, welche zur Mutterlauge eine abweichende Zusammensetzung hat und bezüglich einer Komponente angereichert ist, so wird von der Aufreinigung dieser Komponente gesprochen. Dementsprechend sind die Verunreinigungen in der nach der Fest/flüssig-Phasentrennung gewonnenen Mutterlauge zurückgeblieben. Üblicherweise ist der Gehalt an Verunreinigungen in der Ausgangslösung viel geringer als der der Zielkomponente. Aber selbst in sehr geringen Konzentrationen (ppm-Anteile) können die Verunreinigungen neben der Prozessführung auch die Produktqualität beeinträchtigen, welche bei pharmazeutischen

Substanzen im engen Zusammenhang mit der pharmakologischen Wirkung steht (Sangwal 2007). Aus diesem Grund hat die FDA (engl. Food and Drug Administration) die Substanzen, welche insbesondere bei der Herstellung, Verarbeitung oder Lagerung von Nahrungsergänzungsmitteln bzw. pharmazeutischen Wirk- und Hilfsstoffen als potentielle Verunreinigungen eine Rolle spielen könnten, nach ihrer Art (organisch/anorganisch, Feststoffe/Lösungsmittel) und zugelassener Grenzkonzentration im Endprodukt erfasst (ICH 2008; ICH 2011; ICH 2014; ICH 2016). Die Quantifizierung des im Kristallinat vorliegenden Restlösungsmittels ist insbesondere bei Verwendung nachgewiesener toxischer Lösungsmittel bzw. bei der Ausbildung von Wirkstoffsolvaten entscheidend.

3.6.1 Einbau von Verunreinigungen in das kristalline Produkt

Die Verunreinigungen können auf verschiedene Art und Weise aus der Mutterlösung in das kristalline Produkt gelangen. Der Prozess des Einbaus von Verunreinigungen kann entweder thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert ablaufen (Lorenz and Beckmann 2013).

Thermodynamisch kontrollierter Einbau

Während des Kristallwachstums ist die Einlagerung der Moleküle der Zielkomponente in das arteigene Kristallgitter immer mit der Abnahme der freien Gibbs-Enthalpie verbunden und ist aus diesem Grund hochspezifisch und selektiv. Jedoch bei strukturell sehr ähnlichen Molekülen ist auch der Einbau der Verunreinigung in das Kristallgitter der Hauptkomponente mit geringen Änderungen der Wechselwirkungsenthalpie verbunden und somit thermodynamisch begünstigt. Das führt zur partiellen oder vollständigen Mischkristallbildung der beiden Komponenten im kristallinen Zustand (Lorenz and Beckmann 2013). Im Fall von Mischkristallbildung kann unabhängig von den gewählten Kristallisationsbedingungen innerhalb einer Trennstufe lediglich eine Anreicherung und keine vollständige Aufreinigung der Zielkomponente im kristallinen Produkt erzielt werden. Dabei nimmt bei der erwünschten hohen Produktreinheit die Anzahl der erforderlichen Trennstufen zu und somit die Gesamtproduktausbeute ab. Die Hintereinanderschaltung mehrerer Aufreinigungsschritte unter Verwendung der im vorgehenden Schritt gewonnenen kristallinen Phase als Ausgangsphase des nachgeschalteten Schritts wird bezeichnet als fraktionierte Kristallisation. Diese Prozesskonfiguration wird in der Regel angewendet, wenn die Aufreinigung mehrerer Mischungskomponenten erwünscht ist (Lin et al. 2008).

Kinetisch kontrollierter Einbau

Im Gegensatz zu Mischkristallbildung sind die Adsorption von Verunreinigungen auf der Kristalloberfläche, der Einbau von Verunreinigungen in Form von Mutterlaugeneinschlüssen in Kristallen bzw. in den Hohlräumen agglomerierter Kristalle von der Kristallwachstumskinetik abhängig und können über eine kontrollierte Kristallisationsprozessführung gezielt beeinflusst werden. Dabei ist die Reinheit des kristallinen Produkts umgekehrt proportional zur Kristallwachstumsgeschwindigkeit, welche im direkten Zusammenhang mit der Übersättigung der Lösung steht (Lorenz and Beckmann 2013). Somit kann eine hohe Produktreinheit erzielt werden, wenn die Impfkristalle der zu kristallisierenden Komponente mit einer moderaten Geschwindigkeit aus der mäßig übersättigten Lösung wachsen.

Nach (Wieckhusen 2013) wird zur Aufreinigung einer Zielkomponente aus komplexen organischen Gemischen die geimpfte Kühlungskristallisation der Antisolvent- und Verdampfungskristallisation bevorzugt. Typischerweise findet die Kristallisation im ersten Drittel der Breite des metastabilen Bereichs bei einer Kühlrate von 5 – 10 K/h statt. Die Antisolventkristallisation wird üblicherweise zur Erzeugung der Übersättigung zu Beginn einer isotherm betriebenen Kristallisation oder zur Erhöhung der Gesamtproduktausbeute am Ende einer Kühlungskristallisation eingesetzt. Bei schwacher Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit der zu kristallisierenden Komponente wird in seltenen Fällen auf die Verdampfungskristallisation zurückgegriffen.

Haben die Verunreinigungen eine Auswirkung auf die Lage des Fest/flüssig-Phasengleichgewichts der Zielkomponente im Prozesslösungsmittel, oder auf die Kristallisationskinetik der Zielkomponente, in dem sie die Kristallkeimbildung bzw. das Kristallwachstums verstärken, verzögern oder gar vollständig unterdrücken, so sollten die Löslichkeit und das Nukleationsverhalten der Zielkomponente in Anwesenheit der Verunreinigungen bei der Kristallisationsprozessführung berücksichtigt werden (Ginde and Myerson 1993; Rauls et al. 2000).

Bleibt Prozesslösungsmittel nach dem Filtrationsschritt an der Kristalloberfläche oder in den Hohlräumen der agglomerierten Kristalle in Form von Mutterlaugenresten haften, kann dieses in einem nachgeschalteten Waschschrift bzw. durch Zentrifugieren aus dem kristallinen Produkt entfernt werden. Kommt es während des Prozesses zur Ausbildung kristalliner Solvate, so kann das Lösungsmittel entweder durch das Resuspendieren des Kristallisats in einem von Solvat-Lösungsmittel abweichenden Medium, oder durch das sog. Ausschwitzen des Lösungsmittels (engl. *sweating*) aus dem Produkt entfernt werden (Lorenz and Beckmann 2013).

3.6.2 Bedeutung des Animpfens

Um die Kristallisation einer Komponente aus einer komplexen Lösung gezielt einzuleiten und die spontane Keimbildung von Verunreinigungen zu unterdrücken, werden der übersättigten Lösung die Impfkristalle des zu kristallisierenden Feststoffs hinzugefügt. Dabei ist nicht nur die Impfkristallmasse, sondern auch der Zeitpunkt des Animpfens, d. h. die Temperatur und der Übersättigungsgrad der Lösung, die Art und Weise (in Form von Pulver oder Suspension) der Impfkristallzugabe entscheidend. Nach (Wieckhusen 2013) stellt eine gut dispergierte Impfsuspension die optimale Form der Impfkristalle dar. Die Temperatur der Impfkristallzugabe sollte etwa 4 - 5 K unter der Löslichkeitstemperatur liegen, sodass die Kristallisation im ersten Drittel des metastabilen Bereichs durchgeführt werden kann.

Über das Animpfen können auch die Partikel- und Struktureigenschaften des kristallinen Produktes wie Polymorphie, Kristallhabitus und -größe beeinflusst werden (Wieckhusen 2013).

Unter der Annahme, dass keine spontane Keimbildung auftritt, kann die für die Herstellung der Produktkristalle der Größe d_S notwendige Impfkristallmasse m_S unter Verwendung der Impfkristallgröße d_P sowie der erwarteten Masse des kristallinen Produktes m_P nach der Gl. 3.6.2.1 abgeschätzt werden (Roberts et al. 2017):

$$m_S = m_P \cdot \left(\frac{d_S^3}{d_P^3 - d_S^3} \right) \quad 3.6.2.1$$

In der industriellen Kristallisationspraxis ist es üblich, die Impfkristallmasse einzusetzen, welche 0,1% - 5% der zu erwarteten Produktmasse nicht überschreitet (Beckmann et al. 1998; Wieckhusen 2013).

3.6.3 Bewertung der kristallisationsbasierten Aufreinigung

Da Ziel dieser Arbeit die Aufreinigung einer Zielkomponente aus einem flüssigen Mehrkomponentengemisch mittels Kristallisation ist, werden der Trennerfolg anhand der erzielten Produktreinheit und der Kristallisationsprozesserfolg anhand der Produktausbeute bewertet. Die Produktreinheit wird üblicherweise als Anteil der Zielkomponente im gewonnenen Kristallisat angegeben. Das kristalline Produkt, welches frei von Verunreinigungen ist, wird dementsprechend als 100% rein bezeichnet.

Im Laufe dieser Arbeit wurden die maximale Produktausbeute einer Kühlungskristallisation mit η_{TD} sowie die Gesamtproduktausbeute mit η , wie in der Abb. 3-13 schematisch dargestellt, ermittelt.

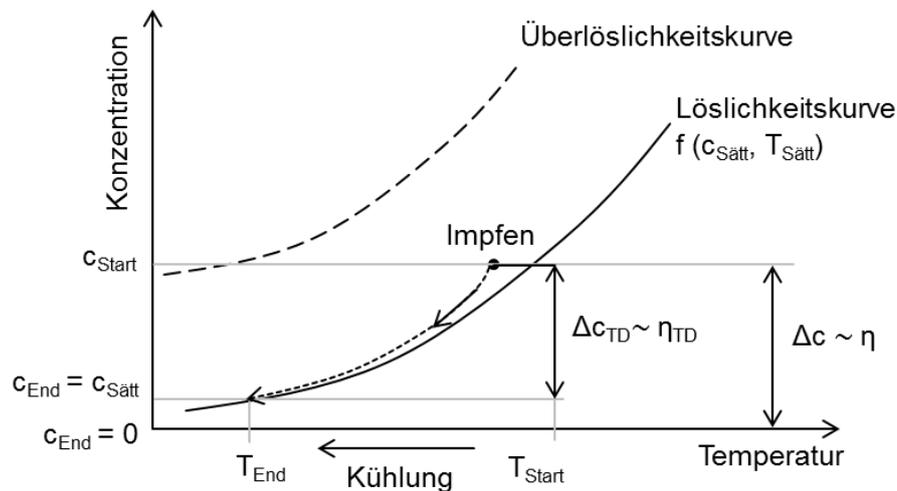


Abb. 3-13: Ableitung der maximal erzielbaren Menge des kristallinen Produktes am Ende einer geimpften Kühlungskristallisation. Verwendete Indizes: T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, c_{Start} und c_{End} die Anfangs- und Endkonzentrationen der Zielkomponente in der Lösung, $c_{Sätt}$ die Sättigungskonzentration der Zielkomponente, Δc_{TD} die maximal erzielbare Konzentrationsänderung der Komponente in der Lösung am Ende der Kühlung, η_{TD} und η die thermodynamisch maximal mögliche Produktausbeute und die Gesamtproduktausbeute.

Die maximale Produktausbeute einer Kühlungskristallisation, η_{TD} , wurde aus der zuvor ermittelten Sättigungskonzentration der zu kristallisierenden Komponente in der Arbeitslösung bei T_{End} der Temperatur am Ende des Kühlvorgangs, $c_{Sätt}$, und der tatsächlich erzielten Endkonzentration dieser am Prozessende, c_{End} , nach der Gl. 3.6.3.1 in Prozent ermittelt (Wieckhusen 2013):

$$\eta_{TD} = \frac{c_{Sätt}}{c_{End}} \cdot 100\% \quad 3.6.3.1$$

Die Gesamtproduktausbeute η wurde in dieser Arbeit als Anteil der Zielkomponente im kristallinen Produkt bzgl. der zu Prozessbeginn in der Lösung vorliegenden Produktmenge nach der Gl. 3.6.3.4 ermittelt:

$$\eta = \frac{c_{End}}{c_{Start}} \cdot 100\% \quad 3.6.3.2$$

Unter Berücksichtigung der Masse der zu kristallisierenden Komponente in der Lösung zu Prozessbeginn m_{Start} und -ende m_{End} kann die Gesamtproduktausbeute auch folgendermaßen berechnet werden:

$$\eta = \frac{m_{End}}{m_{Start}} \cdot 100\% \quad 3.6.3.3$$

Wurde am Prozessende die zu kristallisierende Komponente aus der gelösten in die kristalline Form vollständig überführt, so ist die Gesamtproduktausbeute η gleich dem maximalen Wert von 100%.

Aus der Darstellung in Abb. 3-13 ist ersichtlich, dass die maximale Produktausbeute η_{TD} einer Kühlungskristallisation durch den Verlauf der Löslichkeitskurve der zu kristallisierenden Komponente begrenzt ist. Eine Erhöhung dieser kann entweder über die Erhöhung der Ausgangskonzentration der Zielkomponente in der Lösung und/oder das Herabsetzen der Endtemperatur des Kühlvorgangs erzielt werden.

Zur Verbesserung der Gesamtproduktausbeute kann ein Antisolvent zur bestehenden Lösung hinzugegeben werden. Dieses setzt die Löslichkeit der zu kristallisierenden Komponente herab, was zur Einstellung eines neuen thermodynamischen Fest/flüssig-Phasengleichgewichts im System führt (Wieckhusen 2013).

Literatur zum Kapitel 3

- Atkins P, de Paula J (2006) Physical Chemistry, 8 edn. W. H. Freeman and Company, New York
- Beckmann W, Nickisch K, Budde U (1998) Development of a seeding technique for the crystallization of the metastable A modification of Abecarnil. *Organic Process Research & Development* 2(5):298-304 doi:DOI 10.1021/op980029b
- Bernstein J (2002) Polymorphism in Molecular Crystals. Clarendon Press, Oxford
- Bernstein J (2011) Polymorphism – A Perspective. *Crystal Growth & Design* 11(3):632-650 doi:10.1021/cg1013335
- Brittain HG (1999) Polymorphism in Pharmaceutical Solids, vol 192, 2 edn. Marcel Dekker, New York
- Burger A, Ramberger R (1979a) On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I. *Mikrochimica Acta* 72(3-4):259-271 doi:10.1007/bf01197379
- Burger A, Ramberger R (1979b) On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. II. *Mikrochimica Acta* 72(3-4):273-316 doi:10.1007/bf01197380
- Caro JA, Woldehaimanot M, Rasmuson AC (2014) Semibatch reaction crystallization of salicylic acid. *Chemical Engineering Research and Design* 92(3):522-533 doi:10.1016/j.cherd.2013.09.009
- Chemburkar SR, Bauer J, Deming K, et al. (2000) Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research & Development* 4(5):413-417 doi:DOI 10.1021/op000023y
- Davey R, Garside, J. (2000) From Molecules to Crystallizers. Oxford University Press Inc., New York
- Findlay A (1911) The Phase Rule and its Application, 3rd edn. Longmans, Green, and Co., London
- Florence AT, Attwood D (2006) Physicochemical Principles of Pharmacy, 4 edn. Pharmaceutical Press, London, Chicago
- Ginde RM, Myerson AS (1993) Effect of Impurities on Cluster Growth and Nucleation. *Journal of Crystal Growth* 126(2-3):216-222 doi:Doi 10.1016/0022-0248(93)90028-U
- Giron D, Mutz M, Garnier S (2004) Solid-state of pharmaceutical compounds - Impact of the ICH Q6 guideline on industrial development. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 77(2):709-747 doi:Doi 10.1023/B:Jtan.0000039005.51343.33

- Gnielinski V, Mersmann A, Thurner F (1993) Verdampfung, Kristallisation, Trocknung. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Grepioni F (2008) Themed issue: Polymorphism and crystal forms. *New Journal of Chemistry* 32(10):1657 doi:10.1039/b814474p
- Griesser JU (2006) The Importance of Solvates. In: Hilfiker R (ed) *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Grunenberg A (1997) Polymorphie und Thermische Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe. *Pharmazie in Unserer Zeit* 26(5):224-231 doi:10.1002/pauz.19970260506
- Haleblian J, McCrone W (1969) Pharmaceutical applications of polymorphism. *J Pharm Sci* 58(8):911-29
- Henck J-O, Griesser UJ, Burger A (1997) Polymorphie von Arzneistoffen. *Pharm Ind* 59(2):5
- Hilfiker R (2006) *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Hilfiker R (2013a) Characterization of Crystalline Products. In: Beckmann W (ed) *Crystallisation: Basic Concepts and Industrial Application*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 149-171
- Hilfiker R (2013b) Polymorphism of Crystalline Systems. In: Beckmann W (ed) *Crystallisation: Basic Concepts and Industrial Application*. 1st edn. Wiley-VCH, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., p 85-103
- Hofmann G (2004) *Kristallisation in der industriellen Praxis*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- ICH (2008) Impurities in New Drug Substances. In: ICH (ed) *Guidance for Industry*. vol Q3A, Geneva, Switzerland
- ICH (2011) Guideline for Residual Solvents. In: ICH (ed) *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. Step 4 edn, Geneva, Switzerland, p 29
- ICH (2014) Guideline for Elemental Impurities. In: ICH (ed) *ICH Harmonised Guideline*. vol Q3D, Geneva, Switzerland, p 77
- ICH (2016) Guideline for Residual Solvents. In: ICH (ed) *ICH Harmonised Guideline*. vol Q3C(R6), Geneva, Switzerland, p 40
- Körber F (1926) Schmelzen, Erstarren und Sublimieren. In: Drucker C (ed) *Handbuch der Physik: Thermische Eigenschaften der Stoffe*. 10 edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH
- Kutz G, Wolff A (2007) *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*, 1 edn. Wiley-VCH, Weinheim
- Lin SW, Ng KM, Wibowo C (2008) Synthesis of crystallization processes for systems involving solid solutions. *Computers & Chemical Engineering* 32(4-5):956-970 doi:10.1016/j.compchemeng.2007.04.005
- Lorenz H (2013) Solubility and Solution Equilibria in Crystallization. In: Beckmann W (ed) *Crystallization: Basic Concepts and Industrial Application*. 1 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 35-74
- Lorenz H, Beckmann W (2013) Purification by Crystallization. In: Beckmann W (ed) *Crystallization: Basic Concepts and Industrial Application*. 1 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 129-148
- Lorenz H, Seidel-Morgenstern A (2002) Binary and ternary phase diagrams of two enantiomers in solvent systems. *Thermochimica Acta* 382(1-2):129-142 doi:Doi 10.1016/S0040-6031(01)00746-8
- Matsuoka M (1991) Developments in Melt Crystallization. In: Garside J, Davey RJ, Jones AG (eds) *Advances in Industrial Crystallization*. Butterworth-Heinemann, London, p 229-244
- McCabe WL, Hsü HT (1934) Supersaturation and Crystal Formation in Seeded Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry* 26(11)
- Mersmann A (2001) *Crystallization Technology Handbook*, 2nd edn. Marcel Dekker, Inc., New York
- Mersmann A, Kind M, Stichlmair J (2011) *Thermal Separation Technology: Principles, Methods, Process Design*. Springer-Verlag Berlin
- Mullin JW (2001) *Crystallization*, 4 edn
- Ostwald W (1897) Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper. 1. Abhandlung: Übersättigung und Überkaltung. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 22:289-330
- Rauls M, Bartosch K, Kind M, Kuch S, Lacmann R, Mersmann A (2000) The influence of impurities on crystallization kinetics – a case study on ammonium sulfate. *Journal of Crystal Growth* 213(1-2):116-128 doi:10.1016/s0022-0248(00)00323-7
- Reichardt C, Welton T (2001) *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 4th edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany

- Rittner S, Steiner R (1985) Die Schmelzkristallisation von organischen Stoffen und ihre großtechnische Anwendung. *Chemie Ingenieur Technik* 57(2):91-102 doi:10.1002/cite.330570202
- Roberts KJ, Docherty R, Tamura R (2017) *Engineering Crystallography: From Molecule to Crystal to Functional Form*. Springer
- Roth K (2006) Polymorphie: Fast ein kristallographisches Wintermärchen. *Chemie in unserer Zeit* 40(6):398-406 doi:10.1002/ciuz.200600402
- Sangwal K (2007) *Additives and Crystallization Processes: From Fundamentals to Applications*. John Wiley & Sons
- Saurabh G, Kaushal C (2011) Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Application (ANDA) – A Regulatory Perspective. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3
- Seader JD, Henley EJ (2006) *Separation Process Principles*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Inc.
- Sheth ARB, W. W.; Young, V. G.; Muller, F. X.; Grant, D. J. (2004) Solid-state properties of warfarin sodium 2-propanol solvate. *J Pharm Sci* 93(11):2669-80 doi:10.1002/jps.20164
- Stephan K, Mayinger, F. (1999) *Thermodynamik Band 2: Mehrstoffsysteme*, 14 edn. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Threlfall TL (1995) Analysis of organic polymorphs. A review. *The Analyst* 120(10):2435 doi:10.1039/an9952002435
- Ulrich J, Özoguz Y (1988) Zur Begriffserklärung in der technischen Kristallisation. *Chem-Ing-Tech* 60(6):481-483
- Volmer M (1939) *Kinetik der Phasenbildung*, vol IV. Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig
- von Meyer E (1905) *Geschichte der Chemie von den ältesten Zeiten bis zur Gegenwart*. In: von Meyer E (ed) *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften*. 3 edn. Königliche Akademie der Wissenschaften, Berlin, p 576
- Weinlig A (1844) Ueber die Allotropie mehrerer einfachen Körper, von Berzelius. *Pharmaceutisches Central Blatt* 15(16)
- Wieckhusen D (2013) Development of Batch Crystallizations. In: Beckmann W (ed) *Crystallization: Basic Concepts and Industrial Applications*. 1 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 187-202

KAPITEL 4

Untersuchte Substanzen

In diesem Kapitel werden die während dieser Arbeit untersuchten Substanzen bezüglich ihrer natürlichen Herkunft, chemischen Eigenschaften und der daraus resultierenden pharmakologischen Anwendung charakterisiert. Ferner werden die bisher zur Isolierung der jeweiligen aktiven Komponente aus der zugehörigen pflanzlichen Quelle eingesetzten Trenntechniken vorgestellt.

4.1 Semi-synthetischer Analogon des Naturstoffs Artemisinin

Der Naturstoff Artemisinin (Abk. ARTE) (Abb. 4-1) vom chinesischen *Qinghaosu*, ist ein natürlicher Bestandteil des in China heimischen Einjährigen Beifußes (Lat. *Artemisia annua* L.). Aufgrund der 15 Kohlenstoffatome im Grundgerüst gehört ARTE chemisch zur Gruppe der Sesquiterpene und zeichnet sich insbesondere durch das im Molekül vorhandene Trioxanringssystem mit der Endoperoxid-Funktion und der Lactone-Funktion aus (Abb. 4-1).

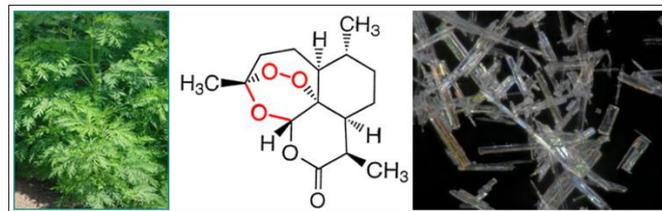


Abb. 4-1: Von links nach rechts: die Pflanze Einjähriger Beifuß (Lat. *Artemisia annua* L.), die Strukturformel des Pflanzeninhaltsstoffs Artemisinin (Chin. *Qinghaosu*) (rot: das Trioxanringssystem mit der Endoperoxid-Funktion) sowie die weißen nadelförmigen Artemisininkristalle.

Bereits in 200 v.Chr. wurden die pflanzlichen Zubereitungen aus *Artemisia annua* L in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Hämorrhoiden eingesetzt. In 330 n.Chr. hat Ge Hong, chinesischer Philosoph und Alchemist, die Wirkung des wässrigen Auszugs aus der Pflanze bei Schüttelfrost und Fieber beschrieben. Im 16. Jhd. wurde die Abkochung aus der *Artemisia annua* L. zur Behandlung von Malaria-Fieber empfohlen (Klayman 1985). Jedoch erst in den 1970er Jahren nach einer Überprüfung von über 2.000 chinesischen Kräuterzubereitungen gelang es der chinesischen Medizinwissenschaftlerin Youyou Tu, die aktive Komponente aus der *Artemisia annua* L., die weißen

nadelförmigen Kristalle des Artemisinins, zu isolieren (Tu 2011). Nach der Strukturaufklärung wurde nachgewiesen, dass die im ARTE-Molekül vorhandene Endoperoxid-Gruppe die reaktivste Stelle darstellt und somit der Schlüssel zur Bekämpfung des Einzellers der Gattung *Plasmodium falciparum*, den gefährlichsten der Malariaerreger, ist (Luo and Shen 1987; White 2008). Mit dem Ziel, die Entstehung möglicher ARTE-Resistenzen bei den Einzellern vorzubeugen, wurde 2005 von der WHO die Anwendung der ARTE-basierten Kombinationspräparate (sog. ACTs) angekündigt (McIntosh and Olliaro 2000; Mutabingwa 2005; Tu 2011; WHO 2012). Aufgrund der niedrigen Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit von ARTE und zur Aufrechterhaltung der wirkungsvollen Endoperoxid-Funktion im Molekül gewinnt die Herstellung semi-synthetischer ARTE-Derivate wie Dihydroartemisinin, Artemisitene, Artemether oder Artesunate (Abb. 4-2) zunehmend an Bedeutung (White 2008).

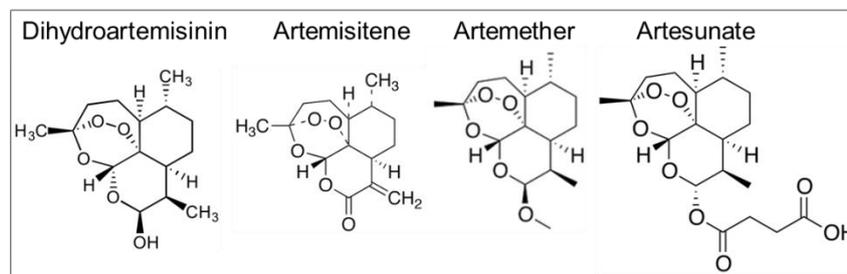


Abb. 4-2: Strukturformel der semi-synthetischen Derivate des Artemisinins.

Neben dem vordergründigen Einsatz von ARTE im Kampf gegen Malaria, wurde aufgrund der nachgewiesenen entzündungshemmenden und anti-oxidativen Wirkung des ARTE auch auf seine potentielle Rolle bei der Krebstherapie hingewiesen (Frohlich et al. 2016; Nandakumar et al. 2006; White 2008).

Extraktion von ARTE aus der *Artemisia annua* L. – Stand der Technik

Der ARTE-Gehalt in den Blättern und Blüten von wildwachsenden *Artemisia annua* L. Pflanzen variiert aufgrund der saisonalen und geographischen Schwankungen beträchtlich zwischen 0,01 und 0,5% (bzgl. der Trockenmasse) (Erdemoglu et al. 2007). Diese geringen ARTE-Erträge treiben die Wirkstoffkosten derart in die Höhe, dass die ARTE-Präparate für Malaria infizierte Patienten unbezahlbar sind (Baraldi et al. 2008; Kawamoto et al. 1999). Da die totale chemische Synthese von ARTE zu komplex ist, um einen kommerziellen Wert des Wirkstoffs zu erzielen (Zhou and Xu 1994), hängt die Produktion von ARTE in erster Linie von der Kultivierung der *Artemisia annua* L. (Kawamoto et al. 1999) ab. Daraufhin wurden unter Verwendung moderner molekularer Züchtungswerkzeuge Hybridpflanzen der *Artemisia annua* L. gezüchtet, welche einen ARTE-Gehalt von über 2% (bzgl. der Trockenmasse) über drei Populationen aufweisen (Graham et al. 2010).

Aus den geernteten und luftgetrockneten Blättern der *Artemisia annua* L. wird ARTE mittels Fest/flüssig-Extraktion gewonnen. Nach (Klayman et al. 1984) erfolgt die ARTE-Isolierung aus der Pflanze bei niedrigen Temperaturen unter Verwendung von Petrolether als Extraktionsmittel am selektivsten. In modernen Extraktionsanlagen lassen sich in einem zweistufigen Prozess ausgehend von 960 kg luftgetrockneten *Artemisia annua* L. Blättern unter Verbrauch von 4.000 l Petrolether bei 45°C und einer Extraktionsdauer von 5 h 6,24 kg des trockenen Rohextrakts mit einem ARTE-Gehalt von 14% gewinnen (Pilkington et al. 2014). Alternativ zu Petrolether wurden auch Hexan, Ethanol, Dichlormethan, Aceton, superkritisches Kohlenstoffdioxid und ionische Flüssigkeit als mögliche Extraktionsmittel für ARTE im Labormaßstab untersucht (Lapkin et al. 2006; Malwade et al. 2013).

Alternative Herstellungswege von ARTE – Stand der Technik

Um unabhängiger von den geringen ARTE-Ausbeuten aus der Phytoextraktion zu sein, ist die Entwicklung alternativer Herstellungswege zur ARTE-Gewinnung zu günstigeren Konditionen und in ausreichenden Mengen unbedingt erforderlich. Innerhalb der letzten zehn Jahre wurde dazu eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt und mehrere Verfahren wurden publiziert. Dennoch spielt bei allen beschriebenen Verfahren die Pflanze *Artemisia annua* L., insbesondere als Lieferant biosynthetischer ARTE-Vorstufen, wie der Artemisininsäure (Abk. AA) und Dihydroartemisininsäure (Abk. DHAA), eine zentrale Rolle (Larson et al. 2013).

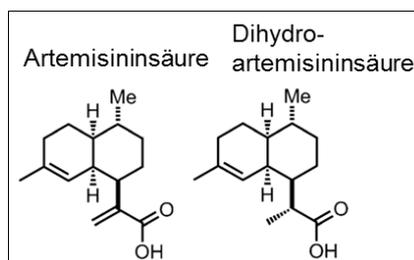


Abb. 4-3: Strukturformel biosynthetischen Vorstufen von Artemisinin, Artemisininsäure und Dihydroartemisininsäure.

Da die AA und DHAA (Abb. 4-3) zwei deutlich weniger komplexe Moleküle im Vergleich zu ARTE sind und nach der ARTE-Extraktion im Raffinat als unbrauchbarer Rückstand anfallen, bietet sich an, diese als Ausgangsverbindungen zur Gewinnung des semi-synthetischen ARTE einzusetzen (Lévesque and Seeberger 2012).

Der Arbeitsgruppe von Professor J. D. Keasling ist es gelungen, die AA ausgehend von Amorpha-4,11-dien pflanzenunabhängig von einer dafür entwickelten genmodifizierte Hefe in einer dreistufigen Oxidation mit einer Reinheit von 95% zu produzieren (Ro et al. 2006). 6 Jahre später wurde von derselben Arbeitsgruppe die chemische Umwandlung aus der mikrobiell

hergestellten AA zur DHAA, des unmittelbaren Vorläufers von ARTE, mit einer Ausbeute von 80% demonstriert (Westfall et al. 2012).

Der Durchbruch in der semi-synthetischen Herstellung von ARTE, ausgehend von der pflanzlichen AA bzw. DHAA, ist der Arbeitsgruppe von Professor Peter Seeberger gelungen. Unter Verwendung eines für diesen Zweck gefertigten Durchflussreaktorsystems wurde in einer kontinuierlichen katalytischen Photooxidation unter Verwendung von hochreaktivem Triplett-Sauerstoff DHAA zu ARTE erfolgreich umgewandelt (Lévesque and Seeberger 2012). Anschließend wurde gezeigt, dass insbesondere durch Einsatz von hochselektivem Photokatalysator 9,10-Dicyanoanthracen (Abk. DCA) in reinem Toluol ARTE mit einer Ausbeute von 69% hergestellt werden kann. Wie in Abb. 4-4 zusammengefasst, bilden die restlichen Komponenten die Verunreinigungen von ARTE in der Produktlösung. Diese setzen sich aus dem Photokatalysator DCA, nichtumgesetzten Reaktionsedukt DHAA sowie einer Reihe dem ARTE strukturell sehr ähnlicher Nebenprodukte zusammen (Kopetzki et al. 2013).

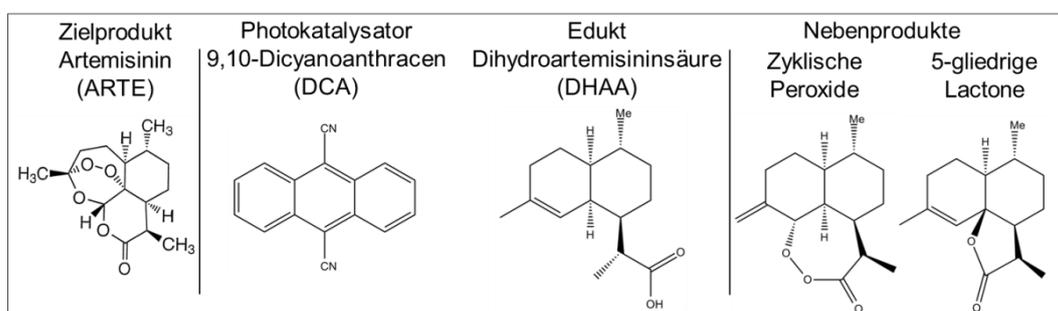


Abb. 4-4: Molekülaufbau des Zielprodukts Artemisinin sowie seiner Verunreinigungen in der Produktlösung der organischen Synthese: Photokatalysator 9,10-Dicyanoanthracen (DCA), Reaktionsedukt Dihydroartemisininsäure (DHAA) sowie zyklische Nebenprodukte.

Da insbesondere der Beitrag zyklischer Nebenprodukte zum therapeutischen Gesamteffekt aufgrund der fehlenden Reinstoffe als Referenzen nicht ausreichend untersucht ist, muss folglich ARTE aus der Syntheselösung in einem nachgeschalteten Trennverfahren mit möglichst hoher Reinheit isoliert werden. Ein Hybrid-Trennverfahren zur Isolierung von ARTE aus dem Pflanzenextrakt wurde von einer dänischen Arbeitsgruppe 2010 vorgestellt. Mittels Kopplung von Säulenchromatographie und einer zweistufigen Antisolvent-Kristallisation konnte kristallines ARTE mit einer Reinheit von 95% und einer Ausbeute von 30% gewonnen werden (Qu et al. 2010). Später wurde ebenfalls gezeigt, dass insbesondere das Verfahren der Kristallisation ein unentbehrlicher Schritt zur Aufreinigung von ARTE aus einer Extraktions- oder Syntheselösung bzw. den Fraktionen der Säulenchromatographie darstellt (Malwade et al. 2016).

Die kristallisationsbasierte Aufreinigung von ARTE aus der Syntheselösung der katalytischen Photooxidation, bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Professor

Peter Seeberger stellt die erste Trennaufgabe der hier vorliegenden Arbeit dar. Gemäß Qualitätsanforderungen von (WHO 2015) an ARTE als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Präparaten gegen Malaria wurde die Zielreinheit von ARTE im kristallinen Produkt auf > 97% gesetzt.

4.2 Naturstoff Rutin

Der Naturstoff Rutin (Abb. 4-5), einst im Jahr 1898 aus den Blättern des Eukalyptus als blassgelber Feststoff isoliert, wurde als ‚das neue Glykosid‘ des zu der Zeit bereits bekannten Flavonols Quercetin entdeckt und zunächst mit dem Namen *Myrticolorin* gekürt (Smith 1898). Die Bezeichnung Rutin wurde dem gelben Farbstoff wenige Jahre später gegeben, nach dem das Disaccharid Rutinose (Abb. 4-5) als zweites Hydrolyseprodukt neben dem Quercetin in alkalischem Medium nachgewiesen wurde (Perkin 1902). Genauso wie Quercetin (Abb. 4-5) gehört Rutin chemisch zu der Gruppe der Flavonoide und ist ein natürlicher Bestandteil von mehr als 70 in China und Vietnam beheimateten Pflanzen (Chua 2013).

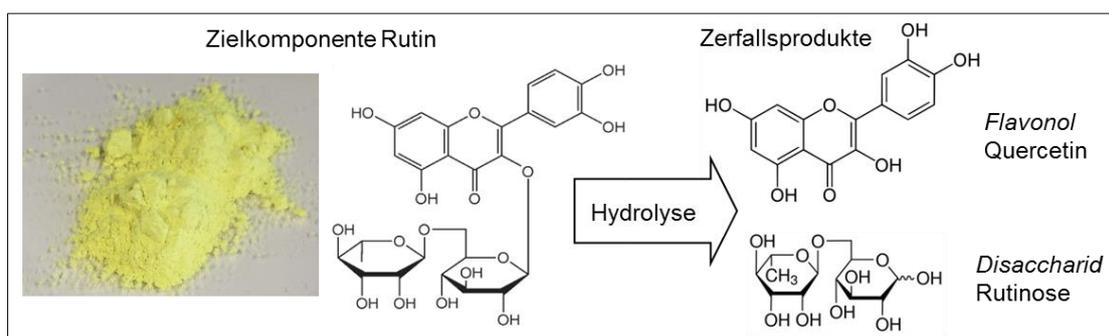


Abb. 4-5: Der gelbe Rutinpulver und die Strukturformeln des Rutins sowie seiner zwei Hydrolyseprodukte Quercetin und Rutinose.

Mit mehr als 40 nachgewiesenen therapeutischen Wirkungen auf den menschlichen Körper, darunter neuroprotektive, analgetische, sedative, antidepressive und blutdrucksenkende, ist Rutin ein unverzichtbarer Bestandteil von über 130 weltweit registrierten pharmazeutischen Präparaten (Birt et al. 2001; Ganeshpurkar and Saluja 2017; Humphreys 1964). Zur Herstellung solcher Präparate ist es essentiell, Rutin in reiner Form und ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen. Dabei stellt das Quercetin die Hauptverunreinigung des Rutins im Pflanzenextrakt dar. Insbesondere aufgrund der nachgewiesenen gentoxischen Wirkung von Quercetin sollte das Rutin möglichst kein freies Quercetin enthalten (Dunnick and Hailey 1992).

Pflanzliche Quellen von Rutin

Als sekundärer Pflanzenmetabolit kommt Rutin häufig niedrig konzentriert (0,1 - 2,4 Ma%) in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten, wie Äpfel, Feigen, Tomaten, sowie in Pflanzensamen und –blättern, wie Buchweizen, Traubenkerne und im grünen Tee, vor (Jiang et al. 2007; Stewart et al. 2000; Veberic et al. 2008). Die vierfache Rutinmenge von 8,6 Ma% wurde in den Blättern und Blüten von Rautenkraut gemessen (Sofic et al. 2010). Der höchste Rutingehalt von 22 Ma% wurde in den Blütenknospen des in China wachsenden Baumes *Sophora japonica* Leguminosae (Abk. *Sophora japonica* L.), auch als Japanischer Schnurbaum bekannt, nachgewiesen (Couch et al. 1952). Dieser für die Sekundärmetabolite ungewöhnlich hohe Rutingehalt motiviert die *Sophora japonica* L. für die Herstellung von Rutin gezielt zu kultivieren.

Gewinnung von Rutin aus der Pflanze *Sophora japonica* L. – Stand der Technik

Seit 10 Jahren wird die Pflanze *Sophora japonica* L. (Abb. 4-6) im Delta des Roten Flusses, der Region Nordvietnams, zunehmend zu Zwecken der Rutinherstellung kultiviert (Linh 2009; Nguyen et al. 2009). Dabei stellen die Blütenknospen der Pflanze (Abb. 4-6) die Hauptquelle von Rutin dar. Über 10.000 Jahrestonnen sonnengetrockneter Blütenknospen werden in den nahgelegenen Extraktionsfabriken für die Rutingewinnung gebracht.

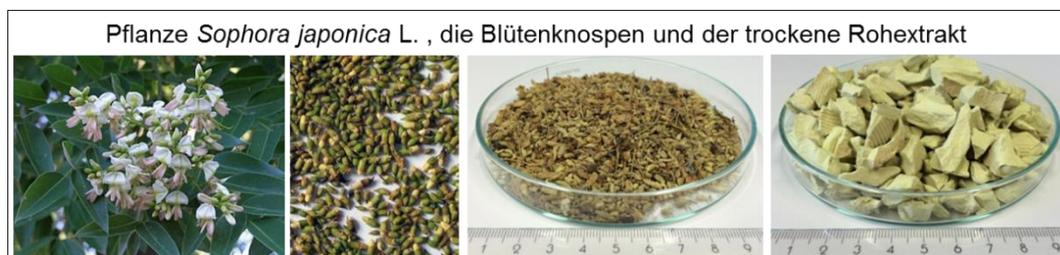


Abb. 4-6: Der Japanischen Schnurbaum (Lat. *Sophora japonica* L.) mit frisch geernteten und getrockneten Blütenknospen sowie der trockene Rohextrakt.

Das etablierte Extraktionsverfahren, das im Batch-Modus betrieben wird, umfasst neben standardisierten Auf- und Nachbereitungsschritte und dem Zellaufschluss trockener Blütenknospen mit Wasserdampf, zwei Hauptprozesse, die Fest/flüssig-Extraktion von Rutin sowie die anschließende Rutinfällung in der Extraktphase. Während der Extraktion wird das Extraktionsgut, die mit Wasserdampf behandelten Blütenknospen, auf die perforierten Böden übereinander gepackt und mit einer wässrigen Branntkalklösung (pH = 12) berieselt. Anschließend wird mittels Einstellung des pH auf 3 aus der Extraktlösung das Rutin gefällt. Nach der Fest/flüssig-Phasentrennung und Trocknung wird der trockene Rohextrakt (Abb. 4-6) mit über 75% Rutin als Produkt gewonnen. Alle Prozessschritte, mit der Ausnahme der Herstellung des

Wasserdampfs für den Zellaufschluss zu Prozessbeginn sowie der Trocknung des gewonnenen Rohextrakts, werden unter Umgebungsbedingungen ohne spezifische Temperaturregelung ausgeführt. Der im Rohextrakt erzielte Rutingehalt von 75% ist bereits sehr hoch. Jedoch unterstreicht der in der gesamten Gattung *Sophora* analysierte hohe Gehalt von toxischen Alkaloiden die Notwendigkeit einer weiteren Rutinaufreinigung aus dem Rohextrakt (Briggs and Ricketts 1937; Briggs and Russell 1942a; Briggs and Russell 1942b; Briggs and Taylor 1938; Harrisson et al. 1950; Ng et al. 2013).

Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt - Stand der Technik

Das erste publizierte und patentierte Verfahren insbesondere zur Trennung von Rutin von Quercetin stammt aus dem Jahr 1950 (Couch et al. 1950). Mit diesem Verfahren konnten 2,8 g des Quercetin freien Rutintrihydrats ausgehend von 81,5% Rutin im binären Rutin/Quercetin Gemisch in zwei Rekristallisationschritten aus Ethanol und Wasser mit der Gesamtausbeute von 21% gewonnen werden. Bereits 2 Jahre danach wurde eine zweite umfassende Arbeit zur Aufreinigung von Rutin von derselben Arbeitsgruppe veröffentlicht (Krewson and Naghski 1952). Mittels Rekristallisation aus Ethanol-, 2-Propanol- und Aceton-Lösungen wurde das Rutin von 97,3% auf 100% aufgereinigt.

Erst 40 Jahre später wurde ein kompletter Prozess zur Reindarstellung von kristallinem Rutin aus der Buchweizenpflanze vorgestellt (Kim et al. 2005). Das entwickelte Verfahren umfasste die Extraktion aus der wässrigen Ethanol Lösung bei 80°C, gefolgt von der Anreicherung des Rutins mittels Säulenchromatographie und anschließender Umkristallisation bei 4°C in Wasser. Durch dieses Verfahren wurden 991 mg Rutin mit einer zwar geringeren Reinheit von 95,4% aber deutlich höheren Gesamtausbeute von 92% erhalten.

Die kristallisationsbasierte Trennung von Rutin aus dem in Vietnam gewonnenen trockenen Pflanzenextrakt der *Sophora japonica* L., bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Professor Nguyen Minh Tan (Hanoi University of Science and Technology), stellt die zweite Trennaufgabe der hier vorliegenden Arbeit dar. Die Zielreinheit von Rutin im kristallinen Produkt wurde dabei auf mind. > 99% gesetzt.

4.3 Naturstoff Curcumin

Das Curcumin (Abk. CUR), auch bekannt als Diferuloylmethan, ist ein intensiv orange-gelber Feststoff und ein natürlicher Bestandteil des Rhizoms der in Süd- und Südostasien heimischen Pflanze *Curcuma Longa* Linnaeus (Abk. *Curcuma Longa* L.) (Abb. 4-7) aus der Familie der Ingwergewächse (Zingiberaceae).



Abb. 4-7: Pflanze Kurkuma (Lat. *Curcuma Longa* L.) und der Wurzelstock.

Wie Rutin gehört der Farbstoff CUR chemisch zur Gruppe der Flavonoide. Als hydrophobes Polyphenol ist es nahezu unlöslich in Wasser und zeigt eine gute Löslichkeit in Ethanol, Methanol und Aceton (Péret-Almeida et al. 2005). Die im CUR-Molekül existierende Keto-Enol-Tautomerie spielt eine entscheidende Rolle für die physikochemischen Eigenschaften und anti-oxidative Aktivität des potentiellen Wirkstoffs (Lee et al. 2013; Priyadarsini 2013; Yanagisawa et al. 2010). Die Untersuchungen der CUR-Stabilität haben gezeigt, dass in saurem Milieu die Zersetzung des Moleküls viel langsamer abläuft als bei höheren pH-Werten. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass, der Sonneneinstrahlung ausgesetzt, das CUR seine typische Färbung verliert, was auf Zersetzung zu farblosem Vanillin, Ferulasäure, Ferulamethan und Bicyclopentadion zurückzuführen ist (Gordon and Schneider 2012; Priyadarsini 2014).

Wie Abb. 4-8 zeigt, sind im Wurzelstock der Pflanze neben dem CUR drei Curcumin-Derivate, das Demethoxycurcumin (Abk. DMC), Bisdemethoxycurcumin (Abk. BDMC), sowie das kürzlich identifizierte Cyclocurcumin, zu finden. DMC, BDMC und CUR werden zusammen einfachheitshalber mit dem Sammelbegriff ‚Curcuminoide‘ (weiter als CURD genannt) bezeichnet.

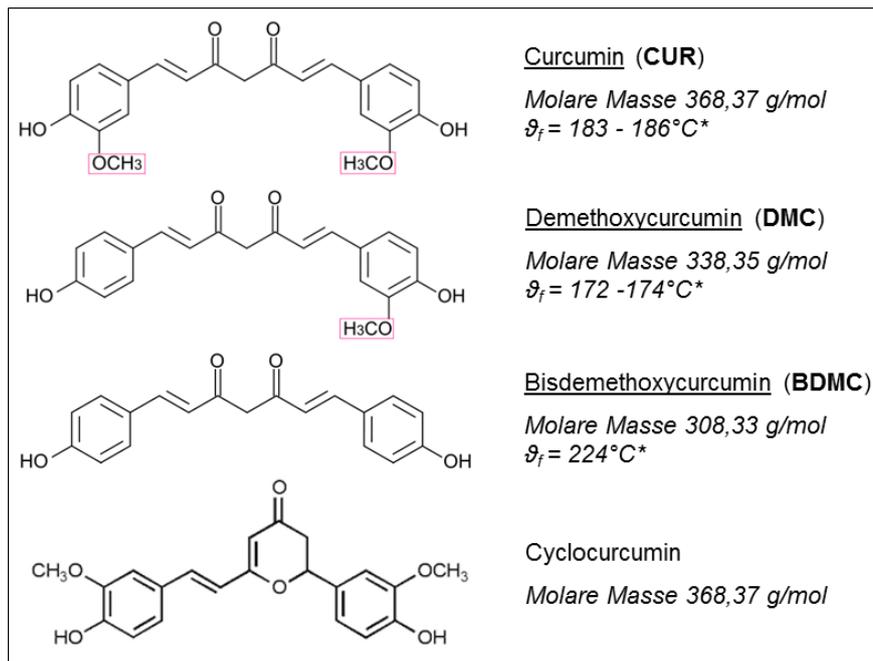


Abb. 4-8: Strukturformeln, Molmassen und Schmelzpunkte des Curcumins (CUR) und der CUR-Derivate, des Demethoxycurcumins (DMC), Bisdemethoxycurcumins (BDMC) und Cyclocurcumins. *Schmelzwerte sind entnommen aus (Lee et al. 2013).

Je nach Herkunft und Bodenbeschaffenheit sind in der Kurkumawurzel zwischen 2% bis 9% CURD, ca. 6% Proteine, 3% Mineralstoffe, 70% Kohlenhydrate sowie Restfeuchte enthalten. Mit ca. 70% in Bezug auf den Gesamtcurcuminoidegehalt stellt CUR die Haupt- und die Zielkomponente der CURD dar (Abdul et al. 2016; Bagchi 2012; Tanaka et al. 2008).

Anwendung von Curcumin

Bereits seit Tausenden von Jahren in der asiatischen Küche und der ayurvedischen Medizin bekannt, wurde das Curcumin erst im 14. Jhd. in die westlichen Kulturen nach der Entdeckung der asiatischen Länder durch die Europäer eingeführt. Jedoch ist es den Chemikern erst im 19. Jhd. gelungen, Curcumin in reiner und kristalliner Form aus der Pflanze zu isolieren (Aggarwal et al. 2007). In den letzten drei Dekaden hat sich der Naturstoff von dem beliebten asiatischen Gewürz und ökologischem Lebensmittelfarbstoff (EU Bezeichnung E100), infolge des breiten Spektrums therapeutischer Anwendungen des CUR, zum vielversprechenden Arzneimittelkandidaten entwickelt (Gryniewicz and Ślifirski 2012; WHO 1999).

Den Untersuchungen zur Folge kann das CUR aufgrund seiner anti-oxidativen, immunsuppressiven, wundheilenden, entzündungshemmenden und phototoxischen Wirkung zur Behandlung von über 25 Krankheiten potentiell eingesetzt werden. Darunter wurden insbesondere genannt: neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, Diabetes, Herzkrankheiten, bakterielle, virale und Pilzkrankungen, AIDS sowie über 20 verschiedene Krebsarten

(Aggarwal et al. 2007; Anand et al. 2008; Lee et al. 2013; Salem et al. 2014). Ferner wurde CUR, aufgrund der nachgewiesenen Aktivität gegen Malariaerreger, in Kombination mit Artemisinin zur Behandlung von Malaria vorgeschlagen (Nandakumar et al. 2006).

Laut den Untersuchungen von (Ruby et al. 1995) hat BDMC insbesondere in tierischen Zellen eine höhere Bioverfügbarkeit, zytotoxische sowie Antitumor-Aktivität als DMC und CUR.

Trotz der großen therapeutischen Breite von CUR hat seine schlechte Wasserlöslichkeit und geringe Bioverfügbarkeit die Entstehung eines wirksamen CUR-Präparats bis jetzt verhindert (Liu et al. 2015). Mit dem Ziel, diese Eigenschaften zu verbessern, tendiert man jeher zur Entwicklung neuer CUR-Formulierungsformen, wie supramolekulare Anordnungen von CUR mit Cyclodextrin bzw. Cucurbyturyl, CUR-Co-Kristallen bzw. Nanopartikeln aus CUR-Metall-Komplexen bzw. an Silicium-Nanopartikel gebundenes CUR (Carvalho et al. 2015; Priyadarsini 2014; Sanphui et al. 2011; Wanninger et al. 2015).

Gewinnung von Curcumin aus der Pflanze

Mit über 850.000 Jahrestonnen ist Indien der wichtigste Exporteur des trockenen Wurzelstockextrakts. Nach dem Ernten der Kurkumawurzel wird diese in 5-7 cm dicke Scheiben geschnitten, im Wasser ausgekocht, der abfiltrierte Rückstand getrocknet, pulverisiert und anschließend als solcher gehandelt. Da der Wurzelstockextrakt neben 80% CURD weitere Pflanzenbestandteile, wie Proteine, Öle, Fette enthält, gilt es nun mittels Extraktion, das ternäre CURD-Gemisch aus dem Rückstand zu gewinnen (Grynkiwicz and Ślifirski 2012). Dabei sind die Soxhlet-, Ultraschall- und Mikrowellenextraktion die gängigsten Extraktionsverfahren. Unter Verwendung von typischen Lösungsmitteln als Extraktionsmittel, wie Ethanol, Methanol, Ethylacetat, Aceton oder Hexan, liegen im Extrakt ternäre Gemische mit der CURD-Zusammensetzung von 64% CUR, 21% DMC und 15% BDMC vor (Pothitirat and Gritsanapan 2005; Revathy et al. 2011). Dagegen stellt das ternäre CURD-Gemisch mit ca. 77% CUR, 17% DMC und 6% BDMC das handelsübliche Produkt dar (Aggarwal et al. 2007). Da das CUR die stärkste pharmakologische Wirkung auf den menschlichen Körper aufweist und für die oben beschriebenen Anwendungen in reiner Form vorliegen muss, gilt es, das CUR aus dem ternären Gemisch der CURD abzutrennen. Nach (Nandakumar et al. 2006) ist der CUR-Gehalt von 98% im CURD-Gemisch zur Herstellung von Artemisinin-Curcumin-Kombinationspräparaten ausreichend.

Isolierung von CUR aus dem ternären CURD-Gemisch - Stand der Technik

In der Literatur sind zwei Methoden zur CUR-Trennung aus dem ternären CURD-Gemisch zu finden: einerseits die Normalphasenchromatographie (Säulen- oder Dünnschichtchromatographie), andererseits die Lösungskristallisation. Es wurde

erwähnt, dass die Säulenchromatographie das bisher am häufigsten eingesetzte Verfahren zur CURD-Trennung ist (Priyadarsini 2014). Beide Verfahren wurden als zwei- bzw. dreistufige Trennverfahren beschrieben. Für die chromatographische CUR-Trennung wird üblicherweise Kieselgel 60G (unbehandelt oder mit Natriumhydrogenphosphat imprägniert) als stationäre Phase sowie verschiedene Variationen binärer Lösungsmittelgemische aus Dichlormethan, Chloroform, Methanol, Essigsäure, Ethylacetat, Hexan als mobile Phase verwendet. Am Prozessende liegen drei chromatographische Fraktionen, angereichert mit je einem CURD, vor (Anderson et al. 2000; Péret-Almeida et al. 2005; Priyadarsini 2014; Revathy et al. 2011).

Mittels Antisolvent- oder Kühlungskristallisation unter Verwendung von Methanol, Ethanol oder 2-Propanol als Prozesslösungsmittel und Wasser als Antisolvent wurden, wie Tabelle 4-1 zeigt, folgende Ergebnisse bei der Aufreinigung von CUR erzielt:

Tabelle 4-1: Überblick über die Ergebnisse der publizierten Untersuchungen zur Aufreinigung von CUR mittels Kristallisation: Ref. 1 ist entnommen aus (Péret-Almeida et al. 2005), Ref. 2 aus (Liu et al. 2015), Ref. 3 aus (Ukrainczyk et al. 2016).

Ref.	Roh- gemisch	Lösungs- mittel	Art der Kristallisa- tion	Anzahl der Zyklen	Kristallisatzusam- mensetzung		Gesamt- ausbeute
	CUR-Gehalt				CUR	DMC	
1	56,9%	Methanol	Antisolvent (Wasser)	2	92,2%	7,8%	40%
2	82%	Ethanol	Kühlung von 70°C bis 5°C	2	96%	4%	k. A.
3	78,6%	2-Propanol	Kühlung von 60°C bis 20°C	3	98,9%	1,1%	48%

Je nach CUR-Ausgangsgehalt im Rohgemisch und verwendetem Prozesslösungsmittel wurde das kristalline CUR nach zwei bzw. drei aufeinanderfolgenden Kristallisationsschritten mit einer Reinheit von 92,2%, 96% bzw. 98,9 % gewonnen. (Ukrainczyk et al. 2016) hat ebenfalls berichtet, dass das BDMC bereits nach dem ersten Trennzyklus aus dem Kristallisat entfernt werden konnte. Dagegen lag das DMC immer im kristallinen Endprodukt neben dem CUR vor.

Die kristallisationsbasierte Trennung von CUR aus CURD-Gemisch stellt die dritte Trennaufgabe der hier vorliegenden Arbeit dar. Da für die Untersuchungen ca. 2 ml des flüssigen Rohextrakts zur Verfügung standen, wurden alle Trennexperimente unter Verwendung der pulverförmigen Substanz von Fa. Sigma Aldrich als Ausgangsmischung durchgeführt. Die Komponentenzusammensetzung dieser Probe kam dem Originalextrakt am nächsten.

Literatur zum Kapitel 4

- Abdul R, Hatifah PL, Ratna W, Muhammad K (2016) Use of Thin Layer Chromatography and FTIR Spectroscopy Along with Multivariate Calibration for Analysis of Individual Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa* Linn) Powder. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8(5):419-424
- Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, et al. (2007) Curcumin-Biological and medicinal properties. In: Ravindran PN, Babu KN, Sivaraman K (eds) *Turmeric the Genus Curcuma*. CRC Press, NY, p 297-368
- Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2008) Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett* 267(1):133-64 doi:10.1016/j.canlet.2008.03.025
- Anderson AM, Mitchell MS, Mohan RS (2000) Isolation of curcumin from turmeric. *Journal of Chemical Education* 77(3):359-360
- Bagchi A (2012) Extraction of Curcumin. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 1(3):1-16
- Baraldi R, Isacchi B, Predieri S, Marconi G, Vincieri FF, Bilia AR (2008) Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochemical Systematics and Ecology* 36(5-6):340-348 doi:10.1016/j.bse.2007.11.002
- Birt DF, Hendrich S, Wang W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 90(2-3):157-77
- Briggs LH, Ricketts J (1937) Sophora alkaloids. Part I. The alkaloids of the seeds of *S. microphylla*, Ait. *J Chem Soc*:1795-1798 doi:DOI 10.1039/jr9370001795
- Briggs LH, Russell WE (1942a) Sophora alkaloids. Part III. The alkaloids of the seeds of *S. chrysophylla*. *J Chem Soc*:507 doi:10.1039/jr9420000507
- Briggs LH, Russell WE (1942b) Sophora alkaloids. Part IV. The alkaloids from the seeds of the Chatham Islands species. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*:555 doi:10.1039/jr9420000555
- Briggs LH, Taylor WS (1938) Sophora alkaloids. Part II. The alkaloids of the seeds of *S-tetraptera*. *J Chem Soc*:1206-1207 doi:DOI 10.1039/jr9380001206
- Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Torres MCL (2015) Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology (Campinas)* 35(1):115-119 doi:10.1590/1678-457x.6515
- Chua LS (2013) A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 150(3):805-17 doi:10.1016/j.jep.2013.10.036
- Couch JF, Naghski J, Krewson CF (1952) Rutin Content of *Sophora japonica* L. *Journal of the American Chemical Society* 74(2):424-425 doi:10.1021/ja01122a042
- Couch JF, Naghski J, Porter WL (1950) Method of Purifying Rutin. United States Patent,
- Dunnick JK, Hailey JR (1992) Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam Appl Toxicol* 19(3):423-31 doi:10.1016/0272-0590(92)90181-G
- Erdemoglu N, Orhan I, Kartal M, Adiguzel N, Bani B (2007) Determination of Artemisinin in Selected *Artemisia* L. Species of Turkey by Reversed Phase HPLC. *Rec Nat Prod* 1(2-3):36-43
- Frohlich T, Capci Karagoz A, Reiter C, Tsogoeva SB (2016) Artemisinin-Derived Dimers: Potent Antimalarial and Anticancer Agents. *J Med Chem* 59(16):7360-88 doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01380
- Ganeshpurkar A, Saluja AK (2017) The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J* 25(2):149-164 doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025
- Gordon ON, Schneider C (2012) Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin. *Trends Mol Med* 18(7):361-3; author reply 363-4 doi:10.1016/j.molmed.2012.04.011
- Graham IA, Besser K, Blumer S, et al. (2010) The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science* 327(5963):328-31 doi:10.1126/science.1182612
- Gryniewicz G, Ślifirski P (2012) Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica* 59(2):201-212
- Harrisson JWE, Seltzer BW, Martin EW (1950) The spectrophotometric examination and acute toxicity of rutins obtained from *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) and *Sophora japonica*. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed)* 39(10):556-559 doi:10.1002/jps.3030391007

- Humphreys FR (1964) The occurrence and industrial production of Rutin in Southeastern Australia. *Economic Botany* 18(3):195-253 doi:10.1007/bf02908118
- Jiang P, Burczynski F, Campbell C, Pierce G, Austria JA, Briggs CJ (2007) Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International* 40(3):356-364 doi:10.1016/j.foodres.2006.10.009
- Kawamoto H, Sekine H, Furuya T (1999) Production of Artemisinin and Related Sesquiterpenes in Japanese *Artemisia annua* During a Vegetation Period. *Planta Med* 65(1):88-9 doi:10.1055/s-2006-960449
- Kim KH, Lee KW, Kim DY, Park HH, Kwon IB, Lee HJ (2005) Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresour Technol* 96(15):1709-12 doi:10.1016/j.biortech.2004.12.025
- Klayman DL (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 228(4703):1049-55 doi:10.1126/science.3887571
- Klayman DL, Lin AJ, Action N, et al. (1984) Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia Annua* growing in the United States. *J Nat Prod* 47(4):715-717
- Kopetzki D, Levesque F, Seeberger PH (2013) A continuous-flow process for the synthesis of artemisinin. *Chemistry* 19(17):5450-6 doi:10.1002/chem.201204558
- Krewson CF, Naghski J (1952) Some Physical Properties of Rutin. *J Am Pharm Assoc Sci* 41(11):582-587 doi:10.1002/jps.3030411106
- Lapkin AA, Plucinski PK, Cutler M (2006) Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. *J Nat Prod* 69(11):1653-64 doi:10.1021/np060375j
- Larson TR, Branigan C, Harvey D, Penfield T, Bowles D, Graham IA (2013) A survey of artemisinic and dihydroartemisinic acid contents in glasshouse and global field-grown populations of the artemisinin-producing plant *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products* 45:1-6 doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.004
- Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R (2013) Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology* 11(4):338-378
- Lévesque F, Seeberger PH (2012) Kontinuierliche Synthese des Malariawirkstoffs Artemisinin. *Angewandte Chemie* 124(7):1738-1741 doi:10.1002/ange.201107446
- Linh HT (2009) Natural Dyes in Eastern Asia (Vietnam and Neighbouring Countries). In: Bechtold TM, R. (ed) *Handbook of Natural Colorants*. John Wiley & Sons, Ltd., p 65-72
- Liu J, Svard M, Hippen P, Rasmuson AC (2015) Solubility and crystal nucleation in organic solvents of two polymorphs of curcumin. *J Pharm Sci* 104(7):2183-9 doi:10.1002/jps.24463
- Luo XD, Shen CC (1987) The Chemistry, Pharmacology, and Clinical-Applications of Qinghaosu (Artemisinin) and Its Derivatives. *Medicinal Research Reviews* 7(1):29-52 doi:DOI 10.1002/med.2610070103
- Malwade CR, Buchholz H, Rong B-G, et al. (2016) Crystallization of Artemisinin from Chromatography Fractions of *Artemisia annua* Extract. *Organic Process Research & Development* 20(3):646-652 doi:10.1021/acs.oprd.5b00399
- Malwade CR, Qu H, Rong B-G, Christensen LP (2013) Conceptual Process Synthesis for Recovery of Natural Products from Plants: A Case Study of Artemisinin from *Artemisia annua*. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(22):7157-7169 doi:10.1021/ie302495w
- McIntosh HM, Olliaro P (2000) Artemisinin derivatives for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*(2):CD000527 doi:10.1002/14651858.CD000527
- Mutabingwa TK (2005) Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop* 95(3):305-15 doi:10.1016/j.actatropica.2005.06.009
- Nandakumar DN, Nagaraj VA, Vathsala PG, Rangarajan P, Padmanaban G (2006) Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 50(5):1859-60 doi:10.1128/AAC.50.5.1859-1860.2006
- Ng SW, Ching CK, Chan AY, Mak TW (2013) Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids (aconitum alkaloids, solanaceous tropane alkaloids, sophora alkaloids, strychnos alkaloids and colchicine) in human urine and herbal samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 942-943:63-9 doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.020

- Nguyen TTH, Phan DC, Pham VT (2009) The composition of fruit essential oil and extract of dried bud of *Sophora japonica* L. cultivated in Vietnam. *Journal of Science & Technology* 75A:79-82
- Péret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA (2005) Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38(8-9):1039-1044 doi:10.1016/j.foodres.2005.02.021
- Perkin AG (1902) Robinin, violaquercetin, myrticolorin, and osyritrin. *J Chem Soc* 81:473-480 doi:DOI 10.1039/ct9028100473
- Pilkington JL, Preston C, Gomes RL (2014) Comparison of response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANN) towards efficient extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products* 58:15-24 doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.016
- Pothitirat W, Gritsanapan W (2005) Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin in the Crude Curcuminoid Extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC-Densitometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences* 32(1-2):23-30
- Priyadarsini KI (2013) Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. *Curr Pharm Des* 19(11):2093-100 doi: 10.2174/1381612811319110010
- Priyadarsini KI (2014) The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules* 19(12):20091-112 doi:10.3390/molecules191220091
- Qu H, Christensen KB, Fretté XC, Tian F, Rantanen J, Christensen LP (2010) Chromatography-Crystallization Hybrid Process for Artemisinin Purification from *Artemisia annua*. *Chemical Engineering & Technology* 33(5):791-796 doi:10.1002/ceat.200900575
- Revathy S, Elumalai S, Benny M, Antony B (2011) Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences* 2(7):21-25
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440(7086):940-3 doi:10.1038/nature04640
- Ruby AJ, Kuttan G, Dinesh Babu K, Rajasekharan KN, Kuttan R (1995) Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters* 94:79-83
- Salem M, Rohani S, Gillies ER (2014) Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. *RSC Advances* 4(21):10815 doi:10.1039/c3ra46396f
- Sanphui P, Goud NR, Khandavilli UBR, Nangia A (2011) Fast Dissolving Curcumin Cocrystals. *Crystal Growth & Design* 11(9):4135-4145 doi:10.1021/cg200704s
- Smith HG (1898) LXXIV.—On myrticolorin, the yellow dye material of *Eucalyptus* leaves. *J Chem Soc, Trans* 73(0):697-701 doi:10.1039/ct8987300697
- Sofic E, Copra-Janicijevic A, Salihovic M, Tahirovic I, Kroyer G (2010) Screening of medicinal plant extracts for quercetin-3rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries* 2(2):97 doi:10.5958/j.0975-4261.2.2.015
- Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean ME, Crozier A (2000) Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agric Food Chem* 48(7):2663-9 doi:10.1021/jf000070p
- Tanaka K, Kuba Y, Sasaki T, Hiwatashi F, Komatsu K (2008) Quantitation of curcuminoids in *curcuma* rhizome by near-infrared spectroscopic analysis. *J Agric Food Chem* 56(19):8787-92 doi:10.1021/jf801338e
- Tu Y (2011) The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* 17(10):1217-20 doi:10.1038/nm.2471
- Ukrainczyk M, Hodnett BK, Rasmuson AC (2016) Process Parameters in the Purification of Curcumin by Cooling Crystallization. *Organic Process Research & Development* 20(9):1593-1602 doi:10.1021/acs.oprd.6b00153
- Veberic R, Colaric M, Stampar F (2008) Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry* 106(1):153-157 doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.061
- Wanninger S, Lorenz V, Subhan A, Edelmann FT (2015) Metal complexes of curcumin--synthetic strategies, structures and medicinal applications. *Chem Soc Rev* 44(15):4986-5002 doi:10.1039/c5cs00088b
- Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. (2012) Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(3):E111-8 doi:10.1073/pnas.1110740109

- White NJ (2008) Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 320(5874):330-4
doi:10.1126/science.1155165
- WHO (1999) WHO monographs on selected medicinal plants Part 1. vol 1, Geneva, p 115-124
- WHO (2012) World Malaria Report 2012. World Health Organization 2012
- WHO (2015) WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO technical Report Series 992(49):210
- Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, et al. (2010) Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their Abeta-binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31(14):4179-85
doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.142
- Zhou WS, Xu XX (1994) Total Synthesis of the Antimalarial sesquiterpene Peroxide Qinghaosu and Yingzhaosu A. *Acc Chem Res* 27(7):211-216

KAPITEL 5

Verwendete Substanzen und Analytik

In diesem Kapitel werden die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Substanzen (Feststoffe und Lösungsmittel) sowie die eingesetzten experimentellen und instrumentellen analytischen Methoden vorgestellt.

5.1 Verwendete Substanzen

Die bzgl. der jeweiligen Zielkomponente aufzureinigenden Pflanzenextrakte der *Sophora japonica* L. (ca. 1 kg des Trockenextrakts, Rutin-Gehalt > 75%) sowie *Curcuma Longa* L. (ca. 2 ml des flüssigen Rohextrakts) wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Nguyen Minh Tan (Hanoi University of Science and Technology, Institute for Research and Development of Natural Products, Vietnam) zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchungen zur Aufreinigung aus der Produktlösung der organischen Synthese wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Peter Seeberger (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam, Deutschland) ca. 300 ml der Toluol-Lösung mit einem Gesamtfeststoffgehalt von ca. 12,2 Ma% und einem Artemisininanteil von 69% im Feststoff hergestellt. Alle im Laufe dieser Arbeit für die Untersuchungen erworbenen Feststoffe sind in der Tabelle 5-1 bzgl. der Menge, Reinheit (laut Angabe des Herstellers) und des Herstellers erfasst.

Tabelle 5-1: Übersicht über die verwendeten käuflich erworbenen Feststoffe.

Substanz	Menge	Reinheit	Hersteller
Artemisinin	25 g	> 97%	TCI Chemicals
9,10-Dicyanoanthracene	5 g	> 98%	TCI Chemicals
Rutintrihydrat	50 g	> 98%	TCI Chemicals
Quercetindihydrat	5 g	> 98%	Alfa Aesar
Curcumin, synthetisch	10 g	> 98%	TCI Chemicals
Curcumin	100 g	> 78%	Sigma Aldrich
Curcumin	5 g	> 80%	Acros
Curcumin-Handelspräparat zur Nahrungsergänzung	60 Kapseln	ohne Angabe	Curcuma L.
Bisdemethoxycurcumin	5 g	> 98%	TCI Chemicals
Demethoxycurcumin	100 mg	> 99%	ChemFaces China
Demethoxycurcumin	2 g	> 98%	Cfm Oskar Tropitzsch GmbH

Die für diese Untersuchungen verwendeten Lösungsmittel Ethanol, 2-Propanol, Aceton, Methanol, Acetonitril, Ethylacetat sowie Toluol (alle > 99,8% rein, HiPerSolv CHRPMANORM) wurden von VWR Chemicals geliefert. Wasser war vor jeder Verwendung über MilliQ Advantage, Anlage von Fa. Merck Millipore, aufbereitet.

5.2 Eingesetzte Analytik

Die im Laufe dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden lassen sich in experimentelle und instrumentelle einteilen.

Die experimentelle Analytik wurde insbesondere zur Bestimmung der Fest/flüssig-Phasengleichgewichte der jeweiligen Zielkomponente (Artemisinin, Rutin und Curcumin) in dem prozessrelevanten Lösungsmittel bzw. -gemisch eingesetzt. Zur Bestimmung der Löslichkeit sowie der Überlöslichkeit, zur Charakterisierung der auftretenden kristallinen Phasen, zur Ermittlung der Komponentengehalte in flüssigen und festen Phasen wurde instrumentelle Analytik verwendet.

5.2.1 Bestimmung der Löslichkeit und Überlöslichkeit

Experimentelle Löslichkeitsbestimmung mittels klassischer isothermer Methode

Zur Bestimmung von Lösungsgleichgewichten wurde die klassische isotherme Methode nach (Lorenz 2013) eingesetzt.

Die Tabellen 5-2 und 5-3 fassen die bei verschiedenen konstanten Temperaturen durchgeführte Löslichkeitsmessungen bzgl. der untersuchten binären bzw. pseudobinären Systeme, bestehend aus der reinen bzw. verunreinigten Zielkomponente in dem jeweiligen Lösungsmittel bzw. -gemisch zusammen.

Tabelle 5-2: Übersicht über die durchgeführten Löslichkeitsmessungen der **reinen Zielkomponente** (Artemisinin, Rutin und Curcumin) in dem jeweiligen Lösungsmittel bzw. -gemisch (Ma%/Ma%).

Zielkomponente, rein	Artemisinin					Rutin			Curcumin			
	5	10	20	30	40	5	20	40	10	20	30	40
Temperatur in °C												
Ethanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-Propanol									x	x	x	x
Aceton									x	x	x	x
Methanol									x	x	x	x
Acetonitril	x	x	x	x	x				x	x	x	x
Ethylacetat	x	x	x	x	x							
Toluol	x	x	x	x	x							
20/80 Toluol/Ethanol	x	x	x	x	x							

30/70 Toluol/Ethanol	x	x	x	x	x							
50/50 Toluol/Ethanol	x	x	x	x	x							
50/50 Aceton/Ethanol											x	
50/50 Aceton/2-Propanol											x	
50/50 Aceton/Methanol											x	
50/50 Aceton/Acetonitril											x	

Tabelle 5-3: Übersicht über die durchgeführten Löslichkeitsmessungen der **verunreinigten Zielkomponente** (Artemisinin und Curcumin) in dem jeweiligen Lösungsmittel bzw. -gemisch (Ma%/Ma%).

Zielkomponente, verunreinigt	Artemisinin					Curcumin							
	5	10	20	30	40	5	10	20	30	40	50	60	65
Aceton							x	x	x	x			
Acetonitril							x		x		x		x
Toluol	x	x	x	x	x								
20/80 Toluol/Ethanol	x	x	x	x	x								
50/50 Aceton/2-Propanol							x	x	x	x		x	
50/50 Aceton/Acetonitril						x		x		x	x		x

Hierfür wurden Suspensionen aus dem zu untersuchenden Feststoff im Überschuss im jeweiligen Lösungsmittel in 20 ml Glasgefäßen vorgelegt, mit einem einfachen Magnetrührer zur Gewährleistung der kontinuierlichen Durchmischung des suspendierten Feststoffs ausgestattet und verschlossen. Die hergestellten Proben wurden in einem thermostatierten Bad (Thermostat, Lauda RE104) zunächst auf 10 K über der jeweiligen Messtemperatur geheizt, danach auf diese heruntergekühlt und für ca. 48 h unter ständigem Rühren bei konstanter Messtemperatur gehalten. Zur Temperaturkontrolle bzw. -regelung wurde ein Pt-100 Widerstandsthermometer (Auflösung 0,1°C) verwendet. Die Vorversuche zur Einstellung des Fest/flüssig-Phasengleichgewichts im jeweiligen binären Zielkomponente/Lösungsmittel-System haben gezeigt, dass eine Dauer von 48 h zum Equilibrieren der Suspensionen ausreichend ist.

Zur Ermittlung der Sättigungskonzentration des jeweiligen Feststoffs in der zugehörigen Lösung wurde eine Probe der gesättigten Lösung über einen 0,45 µm PTFE-Aufsatzfilter aus der Suspension entnommen und mittels HPLC analysiert. Um probenahmebedingte Messfehler möglichst gering zu halten, erfolgte die Entnahme der unter 15°C gesättigten flüssigen Phasen über entsprechend vorgekühlte Aufsatzfilter. Die strukturelle Identität der mit den gesättigten Lösungen im Gleichgewicht stehenden kristallinen Phasen wurde mittels XRPD charakterisiert.

Instrumentelle Löslichkeitsbestimmung mittels polythermer Methode

Nach (Lorenz 2013) beruht die polytherme Methode zur Löslichkeitsbestimmung auf dynamischem Aufheizen der Suspension mit fixer Feststoffkonzentration im jeweiligen Lösungsmittel bis zur vollständigen Auflösung des vorgelegten Feststoffs.

Im Laufe dieser Arbeit wurde das Multireaktorsystem Crystal16™ von Avantium Technologies BV Amsterdam für die polytherme Löslichkeitsbestimmung eingesetzt. In Standard-HPLC-Vials wurden Suspensionen aus einer fixen überschüssigen Menge des zu untersuchenden Feststoffs in ca. 600 mg des jeweiligen Lösungsmittels hergestellt, mit einem Magnetrührer ausgestattet, verschlossen und in die Crystal16™-Apparatur hineingestellt. Je nach Feststoffgehalt wurden die Proben von 0°C auf 60°C mit einer moderaten Heizrate von 0,1 K/min unter ständigem Rühren (700 U/min) bis zum kompletten Auflösen des vorgelegten Feststoffs geheizt. Die Temperatur, bei welcher mittels Trübungsmessung 100% Transmission im System detektiert wurde, galt als die Löslichkeitstemperatur der Probe vorgelegter Konzentration in Ma%. Aufgrund der benötigten geringen Substanzmenge sowie dem niedrigen Zeitaufwand, diente die polytherme Löslichkeitsmessung dem Lösungsmittelscreening und als Ausgangspunkt für die darauffolgenden isothermen Löslichkeitsuntersuchungen.

Da der Naturstoff Rutin ausschließlich in Form des Trihydrats ($\text{Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) käuflich erworben werden kann, wurde mittels polythermer Methode die scheinbare Löslichkeit des $\text{Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in Ethanol, Methanol und 2-Propanol ermittelt.

Instrumentelle Bestimmung der Überlöslichkeit mittels polythermer Methode und Ermittlung der Breite des metastabilen Bereichs

Für die Bestimmung der Überlöslichkeitskurve sowie zur Ermittlung der Breite des metastabilen Bereichs wurde dasselbe Multireaktorsystem Crystal16™ für das jeweilige Stoffsystem eingesetzt.

Lösungen verschiedener bekannter Konzentrationen, bestehend aus dem zu untersuchenden Feststoff in ca. 600 mg des prozessrelevanten Lösungsmittels wurden in den Standard-HPLC-Vials hergestellt, mit einem Magnetrührer ausgestattet und in die Messapparatur hineingestellt. Ausgehend von einer partikelfreien Lösung bei einer höheren Temperatur (je nach Feststoffgehalt und Lösungsmittel zwischen 40 und 70°C) wurden Proben unter ständigem Rühren (700 U/min) mit einer Kühlrate von 0,1 K/min auf -15°C heruntergekühlt.

Die Temperaturen, bei welchen mittels Trübungsmessung eine steile Transmissionsabnahme detektiert wurde, d. h. sich die ersten erfassbaren Kristallkeime in der jeweiligen Lösung ausgebildet haben, wurden zusammen

mit den zugehörigen Feststoffkonzentrationen in Ma% für die Darstellung der Überlöslichkeitskurven verwendet.

Die Breite des metastabilen Bereichs wurde für das jeweilige Feststoff/Lösungsmittel-System aus dem Verlauf der ermittelten Löslichkeits- und Überlöslichkeitskurven, wie im Kap. 3.4.1 beschrieben, als Temperaturdifferenz in Kelvin berechnet.

Die strukturelle Identität der aus der jeweiligen Lösung gebildeten kristallinen Phasen wurde in Hinblick auf eine mögliche Solvat- bzw. Polymorphbildung mittels XRPD untersucht.

5.2.2 Instrumentelle Analytik zur Charakterisierung der flüssigen Phasen

Analytische HPLC

Im Laufe dieser Arbeit wurde die analytische Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography, Abk. HPLC) zur Identifikation und Quantifizierung der in dem jeweiligen Rohgemisch (Syntheselösung bzw. Pflanzenextrakt) enthaltenen Haupt- und Nebenkomponenten, als Referenzmethode zur Inlinemessung der Konzentration mittels ATR-FTIR-Spektroskopie sowie zur Reinheitsanalyse des gewonnenen kristallinen Produkts eingesetzt.

Das Verfahren der Säulenchromatographie beruht auf den unterschiedlichen (starken oder schwachen) Wechselwirkungen zwischen einer durch die Säule bewegenden, mobilen flüssigen Phase (in diesem Fall ein Lösungsmittel bzw. -gemisch mit dem darin gelösten Feststoff bzw. -gemisch) und der auf der chromatographischen Säule ruhenden stationären Phase. Bei gleich gewählten Betriebsparametern (stationäre Phase, Art und Flussrate der mobilen Phase, Druck, Temperatur, Injektionsvolumen) bestimmt die Adsorptionsstärke der Substanzen auf dem Säulenmaterial die Passiergeschwindigkeit durch die Säule. Diese spiegelt sich in der gemessenen sog. Elutions- bzw. Retentionszeit wieder. Anhand der substanzspezifischen und charakteristischen Retentionszeiten können die einzelnen Mischungskomponenten identifiziert und anhand des Elutionsprofils, d. h. der Höhe und Fläche des detektierten Signals, quantifiziert werden (Meyer 2009).

Alle HPLC-Messungen wurden ausgeführt auf der analytischen Anlage der Fa. Agilent 1200 Series, Agilent Technologies Germany GmbH. In Tabelle 5-4 ist eine Übersicht über die verwendeten chromatographischen Methoden gegeben.

Tabelle 5-4: Verwendete chromatographische Säulen und eingestellte Messbedingungen für die Analyse und Kalibration im Laufe der Untersuchungen von Artemisinin, Rutin und Curcumin. Abkürzungen: ACN = Acetonitril, MeOH = Methanol, AcOH = Essigsäure

Parameter	Artemisinin	Rutin	Curcumin
Chrom. Säule	KINETEX, Phenomenex	LUNA, Phenomenex	LUNA, Phenomenex
Säulenmaße, in cm	25.0 x 0.46	25.0 x 0.46	25.0 x 0.46
Stationäre Phase	C18, 5 µm	C18, 10 µm	C18, 10 µm
Probenlösungsmittel	ACN	MeOH	ACN
Mobile Phase (Vol%/Vol%/Vol%)	ACN/Wasser 50/50	MeOH/ACN/0,1%AcOH 40/15/45	ACN/0,1%AcOH 50/50
Flussrate, in ml/min	0,5	1	1
Injektionsvolumen, in µl	1	1	1
Druck, in bar	44	76	53
Temperatur, in °C	20	20	25
Wellenlänge, in nm	254	254	254

Im Gegensatz zur Substanzidentifikation bedarf die Komponentenquantifizierung der Erstellung einer Kalibriergeraden. Dazu wurden unter Verwendung von Reinsubstanzen und Probenlösungsmittel (Tabelle 5-4) zwischen 5 und 8 Kalibrierproben fixer Feststoffkonzentration im prozessrelevanten Konzentrationsbereich hergestellt und mit der jeweiligen analytischen Methode vermessen. Nach der Auswertung der substanz- und komponenten-gehaltsspezifischen Peakflächen wurden die Kalibriergeraden erstellt. Die von den einzelnen Reinstoffen aufgenommenen Chromatogramme zusammen mit den entsprechenden Kalibriergeraden können dem Anhang dieser Arbeit entnommen werden (Anhang A).

Inline - ATR-FTIR-Spektroskopie

Im Laufe dieser Arbeit wurde das Verfahren der abgeschwächten Totalreflektion-Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (Abk. ATR-FTIR) zur kontinuierlichen Überwachung der Änderung der Zusammensetzung einer Komponente in der Lösung bei gleichzeitiger Anwesenheit der kristallinen Phase während des Kristallisationsprozesses verwendet. Dafür wurde eine Inline-ATR-FTIR-Tauchsonde (Sondendurchmesser 9,5 mm, Eintauchlänge 305 mm; Diamantkristall), verbunden mit der Basiseinheit ReactIR™ 45m von Mettler Toledo, eingesetzt.

Die Konzentrationsänderung von Rutin und Curcumin in der Arbeitslösung während des Trennprozesses wurde ausschließlich qualitativ anhand Höhenänderung ausgewählter Peaks verfolgt. Dabei wurde Rutin anhand des charakteristischen Peaks im Wellenzahlbereich zwischen 910 und 1000 cm⁻¹ untersucht. Die Messung von Curcumin erfolgte auf der Basis mehrere IR-

Banden im Wellenzahlbereich von $820 - 870 \text{ cm}^{-1}$, $1110 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ sowie $1260 - 1310 \text{ cm}^{-1}$ (Larkin 2011). Im Gegensatz dazu wurde der Kristallisationsfortschritt von Artemisinin aus der Syntheselösung nach einer umfangreichen Kalibrierung des ReactIR™ Gerätes quantitativ erfasst.

In Abb. 5-1 ist der während der Gerätekalibrierung verwendete Versuchsaufbau sowie das Funktionsprinzip der ATR-FTIR-Spektroskopie schematisch vorgestellt. Wie die Abbildung zeigt, wird bei ATR-FTIR-Spektroskopie der IR-Strahl durch das in der Sondenspitze eingebaute interne Reflexionselement (Abk. IRE) geführt, hier ein monolithischer Diamantkristall, und an der Grenzfläche zwischen dem IRE und der Probenschnittstelle vielfach reflektiert bzw. gebrochen. Die Probeneindringtiefe hängt dabei von der Lichtwellenlänge, dem Strahleinfallswinkel sowie den Brechzahlen von IRE und Probe ab (Griffiths and de Haseth 2007).

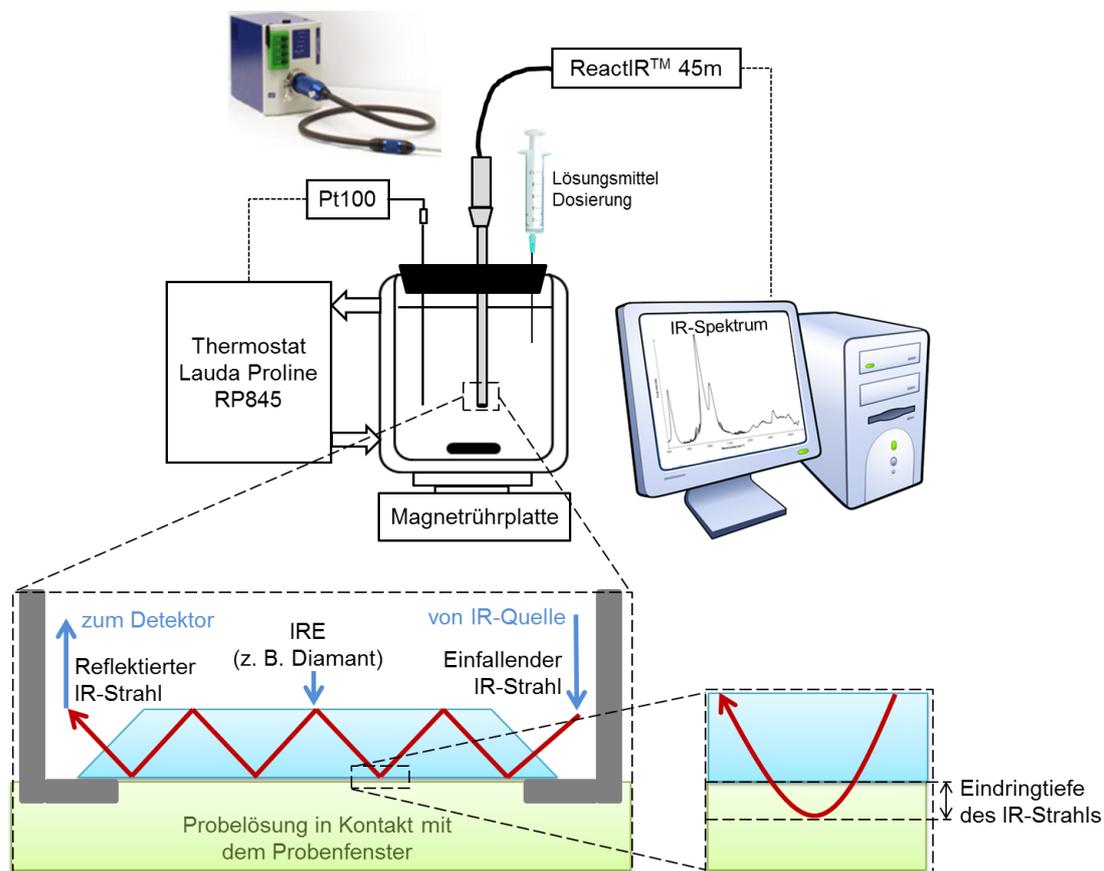


Abb. 5-1: Oben: Versuchsaufbau zur ReactIR™-Gerätekalibrierung; unten: schematische Darstellung der abgeschwächten Totalreflexion des IR-Strahls in dem internen Reflexionselement (IRE). Die Abbildung ist abgeleitet von (Griffiths and de Haseth 2007).

Der in der ReactIR™ 45m Basiseinheit integrierte und mit Flüssigstickstoff gekühlte MCT-Detektor (Mercury Cadmium Telluride) sorgte für die Aufnahme des reflektierten Strahls. Um kristallisationsbedingte Konzentrationsänderungen der Zielkomponente in der Arbeitslösung möglichst genau zu verfolgen, wurden

die Spektren im sog. Fingerprintbereich für die Wellenzahlen zwischen 650 und 1500 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} in einem Zeitintervall von 15 s aufgenommen und auf 30 Scans gemittelt. Vor jedem Experiment wurde ein Hintergrundspektrum mit 256 Scans in Luft aufgenommen und vom Proben-spektrum abgezogen.

Für die quantitative Inline-Analyse des gelösten Artemisinin während des Kristallisationsprozesses wurde ein multivariates Kalibrationsmodell im Vorfeld offline erstellt. Um vertrauenswürdige Kalibrierdaten aufzunehmen, erfolgte während der Kalibrierprozedur eine schrittweise Lösungsmitteldosierung zu einer bzgl. Artemisinin untersättigten Ausgangslösung bekannter Komponenten-zusammensetzung. Bei jeder vorgenommenen Änderung der System-zusammensetzung sowie -temperatur wurde ein IR-Spektrum aufgezeichnet. Auf dieser Basis wurde unter Auswertung der Höhe des für die Peroxid-Gruppe im Artemisinin charakteristischen Peaks im Wellenzahlenbereich zwischen 800 und 1100 cm^{-1} (Oxley et al. 2008) ein multivariates Kalibrierungsmodell erstellt und mit der iC IR^{MT} Quant Modeling Software validiert.

5.2.3 Instrumentelle Analytik zur Charakterisierung der festen Phasen

Inline - Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)

Im Laufe dieser Arbeit wurde die FBRM® S400A Tauchsonde von Mettler Toledo zur Inline-Verfolgung des Kristallisationsfortschritts der Zielkomponente aus der Lösung. Dabei konnte einerseits der Zeitpunkt der Impfkristallzugabe erfasst und andererseits das Impfkristallwachstum sowie die Primärkeimbildung einer unerwünschten Komponente in der Arbeitslösung während des Prozesses detektiert werden.

In Abb. 5-2 ist das Funktionsprinzip der FBRM®-Inlinesonde skizziert. Wie Abbildung zeigt, wird während der Messung ein gebündelter Laserstrahl durch das Saphir-Fenster der Sonde in das zu analysierende Medium fokussiert, wobei sich der Strahl auf einer Kreisbahn entlang des Fensterumfangs bewegt. Passieren die Partikel das Sondenfenster, überstreicht der Laserstrahl ihre Ränder und wird an diesen zurückgestreut.

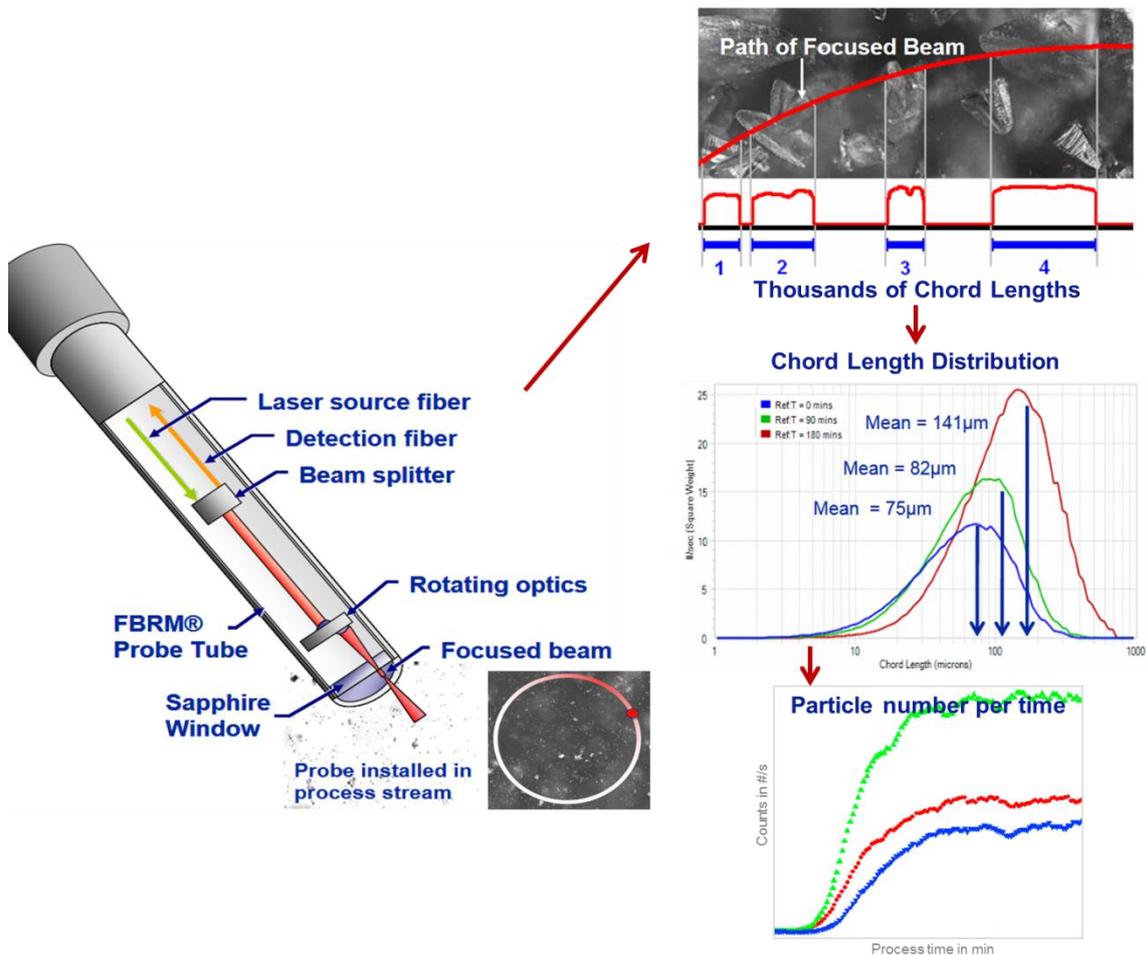


Abb. 5-2: Funktionsprinzip der FBRM® - Inlinesonde und Ausgabe des Messergebnisses in Form der zeitlichen Änderung der Partikel verschiedener Sehnenlänge. Die Abbildung ist erstellt aus: Sherman, J. W., O'Grady, D., Mettler Toledo PowerPoint Präsentation vorgestellt auf IFPAC® 2014 in Cortona, Italien.

Die FBRM-Optik fängt die Rückstreuung auf und überführt diese in ein elektronisches Signal. Aus der zeitlich erfassten Änderung der Partikelsehnenlängen sowie -verteilung ergibt sich die zeitliche Änderung der Partikelgröße und -anzahl.

Röntgenpulverdiffraktometrie (XRPD)

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Röntgenpulverdiffraktometrie (engl. X-Ray powder diffraction, Abk. XRPD) zur Charakterisierung von käuflich erworbenen Referenzfeststoffen, zur Phasenzuordnung der bei Löslichkeits- und Rekristallisationsversuchen erhaltenen Feststoffe, zur Untersuchung der Kristallstrukturänderung aufgrund der polymorphen Fest/fest-Phasenumwandlung bzw. Desolvatisierung infolge thermischer Beanspruchung sowie zum Nachweis kristalliner Verunreinigungen und amorpher Anteile in gewonnenen kristallinen Produkten und Mischproben eingesetzt.

XRPD ist eine analytische Methode zur Charakterisierung, Identifizierung und Strukturaufklärung kristalliner organischer/anorganischer Verbindungen. Wie

Abb. 5-3 zeigt, beruht das Messprinzip der XRPD auf die Reflexion (bzw. Beugung) des monochromatischen Röntgenstrahls der Wellenlänge λ an den Atomen der einzelnen Gitterebenen der untersuchten kristallinen Verbindung.

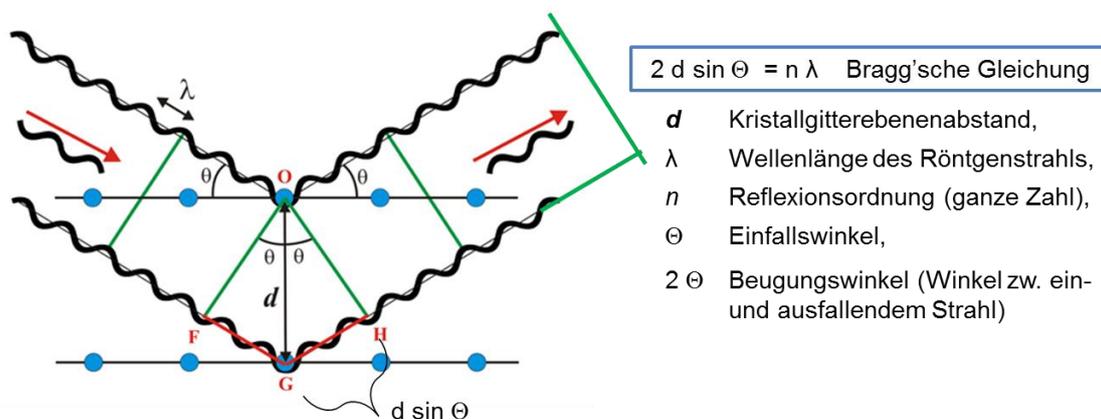


Abb. 5.3: Messprinzip auf der Grundlage der Bragg'schen Gleichung: konstruktive Interferenz, wenn die Wegdifferenz von Röntgenstrahlen gleich λ bzw. einem Vielfachen davon ist. Die Abbildung ist abgeleitet von (Hilfiker 2013).

Da die verschiedenen kristallinen Verbindungen unterschiedliche Gitterebenenabstände d in ihren Kristallgittern aufweisen, erzeugen sie charakteristische Röntgenbeugungsmuster, anhand welcher die Verbindungen auch innerhalb eines Feststoffgemisches einzeln identifiziert werden können (Hilfiker 2013).

Im Laufe dieser Arbeit wurden alle XRPD-Messungen auf dem X'Pert Pro Diffraktometer der Firma PANalytical GmbH ausgeführt, wobei die Röntgenbeugungsmuster mit der Cu-K α -Strahlung erzeugt wurden.

Für eine Standardmessung wurden die zu untersuchenden trockenen Feststoffe fein gemörsert und auf einem Si-Einkristall-Probenträger in dem 2Theta-Intervall von 4 bis 30° mit einer Schrittweite von 0,017° und 50 s Scandauer pro Schritt bei Umgebungstemperatur durchgescannt.

Zur Phasenzuordnung und Stabilitätsuntersuchung der Solvatphasen wurden feuchte Feststoffproben auf demselben Probenträger präpariert und mit einer vergrößerten Schrittweite von 0,033° sowie einer verkürzten Scandauer von 22 s pro Schritt in einem begrenzten 2Theta-Intervall von 4 bis 11° ebenfalls bei Umgebungstemperatur analysiert.

Zur Untersuchung des Temperaturverhaltens ausgewählter kristalliner Phasen wurde eine sog. temperaturlaufgelöste XRPD-Messung durchgeführt. Der trockene fein gemörserte Feststoff wurde auf einen plattenförmigen Probenhalter aus chrombeschichtetem Kupfer mit einer Probentiefe von 0,2 mm appliziert. Die Aufheizung der Probe erfolgte direkt über den Boden des Probenhalters, welcher zur optimalen Wärmeübertragung mit einer Wärmeleitpaste benetzt war. Die Probe wurde dabei folgendem Temperaturprogramm unterzogen: Während des schrittweisen Aufheizvorgangs von 30°C

auf 200°C mit einer Heizrate von 1 K/min wurde die Probe bei bestimmten Temperaturen für eine Dauer von 15 min isotherm gehalten und mit dem Standardprogramm (wie oben für Standardmessung beschrieben) analysiert. Nach dem Beenden des Aufheizvorgangs wurde die Probe auf die Ausgangstemperatur von 30°C mit 10 K/min zurückgekühlt und mit demselben Programm analysiert.

Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Im Laufe dieser Arbeit wurde Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. Differential Scanning Calorimetry, Abk. DSC) verwendet, um die Reinstoffreferenzen anhand des Schmelz- und Rekristallisationsverhaltens zu charakterisieren, polymorphe Phasenübergänge zu charakterisieren und Umwandlungstemperaturen und –wärmen zu analysieren, Desolvatisierung kristalliner Solvate zu untersuchen sowie die strukturelle und chemische Reinheit gewonnener kristalliner Produkte anhand der Schmelzpunkte der zugehörigen Reinstoffe zu überprüfen.

Dazu wurde das Gerät DSC131 von Setaram Instrumentation eingesetzt. Zur DSC-Analyse wurde eine abgewogene Menge (gewöhnlich 10 – 12 mg) des fein gemörsterten Feststoffs in einen Al-Tiegel überführt, versiegelt und in der Apparatur mit konstanter Heizrate (2 K/min) von 30°C auf 200°C unter Heliumatmosphäre (ca. 35 ml/min) geheizt bzw. mit 10 K/min auf die 30°C zurückgekühlt.

Das Verfahren der DSC beruht auf dem Wärmeumsatz der zu analysierenden Substanz infolge einer physikalischen Umwandlung während des Aufheiz- bzw. Abkühlschritts. Dabei wird die Wärmestromdifferenz ΔH zwischen dem Proben-tiegel und dem leeren Referenztiegel in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen (Hemminger and Cammenga 1989).

Thermogravimetrischen Analyse gekoppelt mit DSC (TG-DSC)

Bei der TG-DSC Analyse handelt es sich um eine Kombination aus der oben beschriebenen DSC-Analyse und der thermogravimetrischen Analyse (TG) der Probe.

Im Laufe dieser Arbeit wurde das TG-DSC-Gerät Sensys Evo von Setaram Instrumentation zur Charakterisierung kristalliner Molekülsolvate, zur Untersuchung deren Stabilität und Quantifizierung des Solvatlösungsmittels eingesetzt. Dazu wurden zwischen 15 – 20 mg des zu untersuchenden Feststoffs in einen 100 μ l Aluminium-Tiegel eingewogen. Im offenen Tiegel unter Heliumatmosphäre (ca. 35 ml/min) wurden die Probe und die Referenz zunächst von 20°C auf 200°C mit einer konstanten Rate von 2 K/min aufgeheizt und anschließend mit 10 K/min auf 20°C gekühlt. Während der Messung wurde in Abhängigkeit von der Temperatur simultan zum DSC-Signal der Massen-

verlust der Probe, welcher mit der Freisetzung des Solvatlösungsmittels korreliert, erfasst.

Mikroskopie

Mikroskopische Bilder von kristallinem Rutin wurden mit einem digitalen Mikroskop (VHX-2000, Keyence, Deutschland) in 150-facher Vergrößerung aufgenommen.

Literatur zum Kapitel 5

- Griffiths PR, de Haseth JA (2007) Fourier Transform Infrared Spectrometry, 2 edn. J. Wiley & Sons, New York
- Hemminger WF, Cammenga HK (1989) Methoden der thermischen Analyse Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Hilfiker R (2013) Characterization of Crystalline Products. In: Beckmann W (ed) Crystallization: Basic Concepts and Industrial Application. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 149-171
- Larkin P (2011) Illustrated IR and Raman Spectra Demonstrating Important Functional Groups. 135-176 doi:10.1016/b978-0-12-386984-5.10008-4
- Lorenz H (2013) Solubility and Solution Equilibria in Crystallization. In: Beckmann W (ed) Crystallization: Basic Concepts and Industrial Application. 1 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 35-74
- Meyer VR (2009) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 10 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Oxley J, Smith J, Brady J, et al. (2008) Raman and Infrared Fingerprint Spectroscopy of Peroxide-Based Explosives. Applied Spectroscopy 62(8)

Aufreinigung von Artemisinin aus der Produktlösung organischen Synthese ausgehend von DHAA

In diesem Kapitel werden experimentelle Untersuchungen zur kristallisationsbasierten Aufreinigung der Zielkomponente ARTE aus der Produktlösung organischen Synthese dargestellt. Die Synthesemischung stellte eine klare leuchtendgelbe Toluol-Lösung mit einem Gesamtfeststoffgehalt von 12,2 Ma% und einem Artemisininanteil von 69% im Feststoff. Die Farbgebung der Mischung beruhte auf dem in Toluol nach der Reaktion verbliebenen Photokatalysator, gelben Farbstoff 9,10-Dicyanoanthracen.

Mit dem Ziel, das geeignete Prozesslösungsmittel für die Kristallisation zu finden, wird zunächst das Löslichkeits- und Keimbildungsverhalten des reinen ARTE in vier reinen Lösungsmitteln (Toluol, Acetonitril, Ethylacetat und Ethanol) sowie in ausgewählten binären Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen vorgestellt. Zur Beurteilung des möglichen Einflusses der in der Syntheselösung vorhandenen Nebenkomponenten auf die Aufreinigung von ARTE, wurden Löslichkeits- und Rekristallisationsversuche von ARTE in Gegenwart von Verunreinigungen durchgeführt. Ergänzend dazu werden die auftretenden kristallinen Phasen des ARTE bzgl. ihrer strukturellen Identität untersucht. Das auf der Basis der Voruntersuchungen abgeleitete und ausgeführte Trennverfahren wird detailliert beschrieben, die erzielten Produktreinheiten sowie Prozessausbeuten ausgewertet und anschließend diskutiert.

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in (Horosanskaia et al. 2014; Horvath et al. 2015) publiziert. Grundlegende Resultate zur Polymorphie von Artemisinin sind in (Horosanskaia et al. 2014) veröffentlicht.

6.1 Charakterisierung der Synthesemischung und Ableitung der Trennaufgabe

Um ARTE aus dem vorliegenden Rohgemisch in kristalliner Form mit möglichst hoher Reinheit und Ausbeute zu gewinnen, wurde die Originalsyntheselösung (Abb. 6-1, links oben) bzgl. der Zusammensetzung und des Gehalts der Komponenten mittels analytischer HPLC charakterisiert. In Abb. 6-1 ist das zugehörige Chromatogramm dargestellt, zusammen mit denen der zur Verfügung stehenden Referenzproben der reinen Zielkomponente ARTE, des

Photokatalysators 9,10-Dicyanoanthracen (Abk. DCA) sowie des Reaktions-
 edukts Dihydroartemisininsäure (Abk. DHAA).

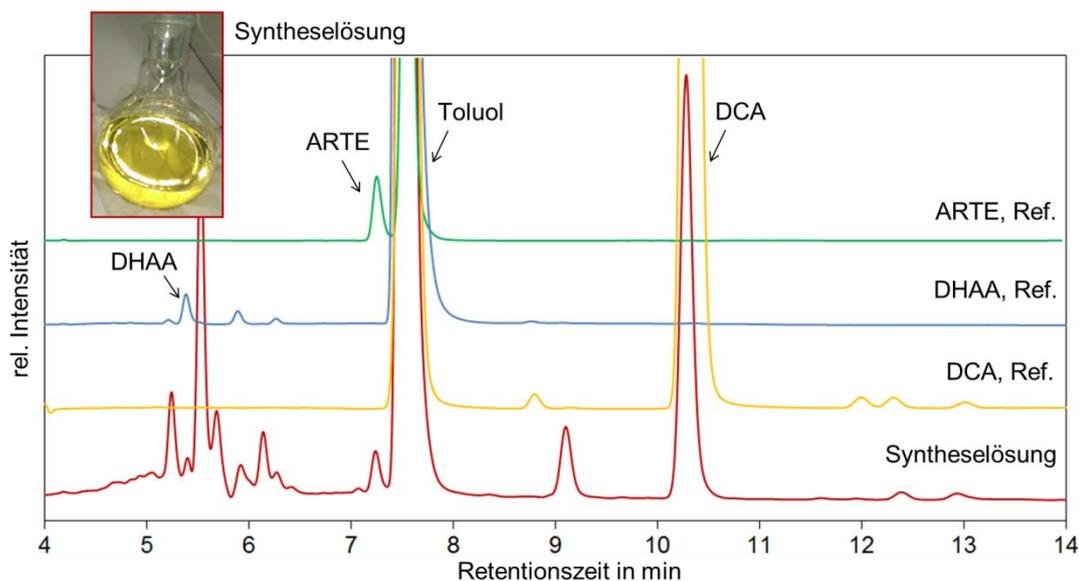


Abb. 6-1: Analytische HPLC-Chromatogramme der Syntheselösung (rot) sowie der vorhandenen Referenzen der Zielkomponente ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb), des Reaktionsedukts DHAA (blau). Links oben: Fotografische Aufnahme der Originalsyntheselösung.

In dem von der Syntheselösung aufgenommenen HPLC Chromatogramm kann das Zielprodukt ARTE anhand seines charakteristischen Peaks bei 7,2 min eindeutig identifiziert und seine Lösungskonzentration anhand der zuvor erstellten Kalibriergerade zu ca. 8,6 Ma% ermittelt werden. Da Toluol das Reaktionsmedium für die ARTE-Synthese darstellt und hier zur Herstellung der chromatographischen Referenzproben verwendet wurde, kann der größte Peak im Chromatogramm, gemessen dicht nach ARTE bei 7,6 min, ohne Zweifel dem Toluol zugeordnet werden.

Dementsprechend stellen die restlichen im Chromatogramm der Syntheselösung auftretenden Peaks die Gesamtheit der Verunreinigungen des ARTE dar. Aus der Gesamtfeststoffkonzentration der Syntheselösung von 12,2 Ma% (Kopetzki et al. 2013) und dem gemessenen ARTE-Gehalt von 8,6 Ma% kann die Konzentration aller gelösten Verunreinigungen zu 3,6 Ma% berechnet werden. Darunter können zwei Verunreinigungen anhand der Chromatogramme der Reinstoffe ebenfalls identifiziert und quantifiziert werden: das Reaktionsedukt DHAA, mit einem Feststoffgehalt von unter 0,08 Ma% sowie der Photokatalysator DCA, mit einem Gehalt von 0,049 Ma% in der Syntheselösung. Bei Betrachtung des charakteristischen DCA-Peaks bei 10,4 min im Chromatogramm der Syntheselösung fällt auf, dass dieser trotz des sehr geringen DCA-Gehalts ungewöhnlich groß ausgefallen ist. Dieser Sachverhalt ist mit der starken Lichtabsorption von DCA, eines intensiv gelben Farbstoffs, bei 420 nm zu erklären. Wie die fotografische Aufnahme der Originalsyntheselösung in

Abb. 6-1 zeigt, verleiht das DCA der Lösung seine charakteristische leuchtend gelbe Farbe.

6.2 Wahl des Prozesslösungsmittels

Mit dem Ziel, Artemisinin möglichst rein und kristallin im unmittelbaren Anschluss an die kontinuierlich betriebene Reaktion aus der Syntheselösung zu gewinnen, wurde zunächst nach einem geeigneten Lösungsmittel für die Kristallisation gesucht. Da der Einsatz von Toluol als Lösungsmittel der Klasse 2 nach (ICH 2016) in Pharmazeutika begrenzt werden soll, galt es zuerst, das Toluol aus der Originalsyntheselösung zu entfernen. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels lag eine ölige viskose Masse vor. Laut HPLC Analyse beinhaltet diese immer noch mind. 2% Toluol, sodass es praktisch unmöglich war, das Rohgemisch Toluolfrei zu bekommen. Aus diesem Grund wurde Toluol als „unvermeidliche“ Komponente des Prozesslösungsmittels für die Kristallisation festgelegt. Sodann galt es, ein zweites Lösungsmittel festzulegen, welches ein starkes Antisolvent des ARTE in Toluol darstellt und im Gegensatz zu Toluol als gering toxisch eingestuft ist.

Basierend darauf und ausgehend von den in der Literatur bereits beschriebenen Löslichkeitstrends von ARTE wurden Acetonitril, Ethylacetat und Ethanol als mögliche Prozessantisolvents untersucht (Liu et al. 2009; Nti-Gyabaah et al. 2010).

Das gemessene isotherme Löslichkeitsverhalten von ARTE in Toluol, Acetonitril, Ethylacetat und Ethanol ist in Abb. 6-2 in einem Konzentrations-Temperatur-Diagramm dargestellt. Aufgrund des qualitativen Anstiegs der ARTE-Löslichkeit mit zunehmender Temperatur wurde eine Kühlungskristallisation zur ARTE-Gewinnung in Betracht gezogen. Im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln, eignet sich Acetonitril für die Kühlungskristallisation nicht.

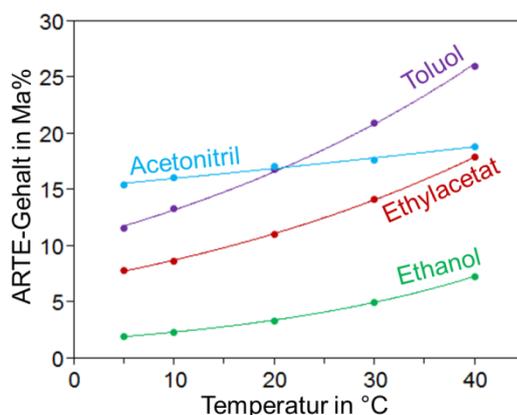


Abb. 6-2: Löslichkeitsverhalten von ARTE in Acetonitril (blau), Toluol (violett), Ethylacetat (rot) und Ethanol (grün) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Quantitativ zeigt ARTE die höchste Löslichkeit in Toluol, in welchem bereits bei 5°C 12 Ma% und bei 40°C 26 Ma% Feststoff gelöst werden können. Dagegen ist die Löslichkeit von ARTE in Ethanol mit einer Sättigungskonzentration von 1,9 Ma% bei 5°C und 7,3 Ma% bei 40°C von den untersuchten Lösungsmitteln am geringsten. Die in Ethylacetat ermittelte Löslichkeitskurve von ARTE verläuft zwischen denen in Toluol und Ethanol, wobei die Löslichkeit von 7,8 Ma% bei 5°C auf 17,9 Ma% bei 40°C zunimmt. Die geringste Löslichkeitsänderung von 3,4 Ma% ARTE wurde bei einem Temperaturanstieg von 35 K in Acetonitril gemessen.

Hieraus kann abgeleitet werden, dass sich Ethanol in seiner Rolle als Antisolvent von ARTE für den geplanten Trennprozess besonders gut eignet. Im Vergleich zu Ethylacetat kann durch die Ethanol-Zugabe zur Toluolhaltigen Syntheselösung eine deutlich höhere Produktausbeute erzielt werden.

Um das optimale Toluol/Ethanol-Lösungsmittelverhältnis für die ARTE-Aufreinigung zu finden, wurde darauffolgend die Löslichkeit von ARTE in verschiedenen binären Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen gemessen.

Löslichkeit von ARTE in ausgewählten Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen

Die Änderung der ARTE-Löslichkeit in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt in Toluol sowie von der Temperatur ist in Abb. 6-3 in einem 3D-Plot dargestellt. Die bereits in der Abb. 6-2 aufgeführten Löslichkeitswerte von ARTE in reinem Toluol (Abb. 6-3, violette Kurve) und Ethanol (Abb. 6-3, grüne Kurve) sind im Diagramm zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse ergänzend aufgetragen.

Die schwarzen Kreise im Diagramm sind die Löslichkeitswerte von ARTE in dem jeweiligen Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch, welche aus den isothermen Messungen stammen. Die Verbindung der einzelnen Werte entlang einer Toluol/Ethanol-Lösungsmittelzusammensetzung (farbige durchgezogene Kurven) gibt die temperaturabhängige Änderung der ARTE-Löslichkeit in dem jeweiligen Lösungsmittelgemisch wieder.

Wie bereits in reinen Lösungsmitteln beobachtet, ist auch in 20/80, 30/70 und 50/50 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen eine Zunahme der ARTE-Löslichkeit mit der steigenden Temperatur zu verzeichnen.

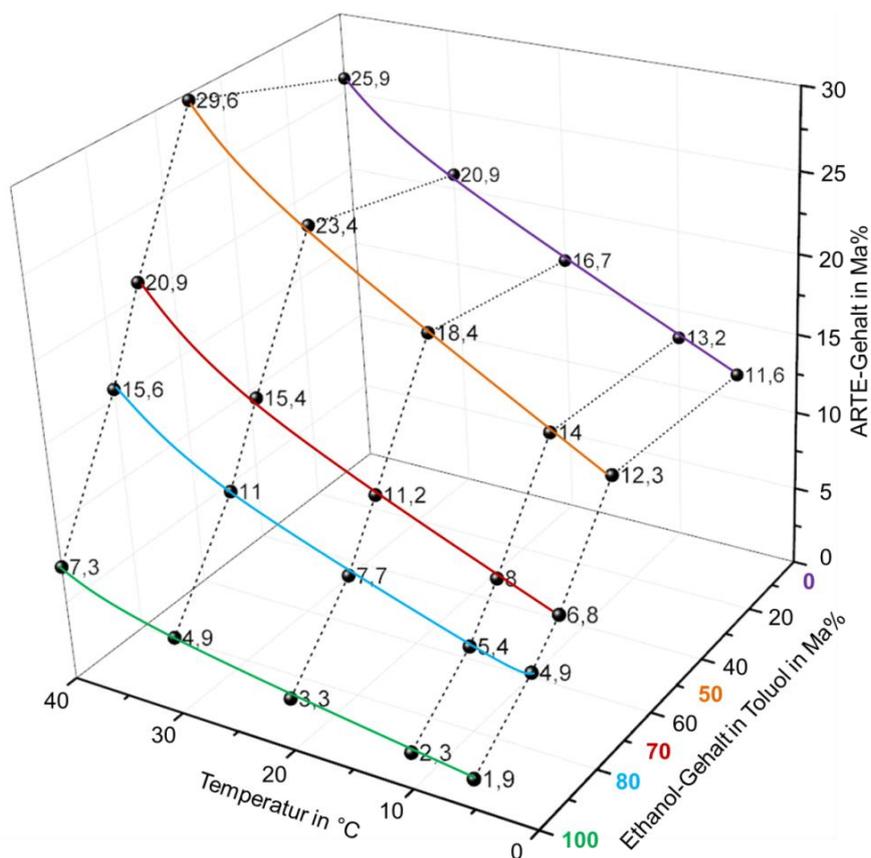


Abb. 6-3: Änderung der ARTE-Löslichkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Ethanol-Gehalt in Toluol. Volle Kreise sind Messwerte aus isothermen Löslichkeitsuntersuchungen; durchgezogene Kurven entsprechen verschiedenen Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen (Ma%/Ma%): 100/0 (violett), 50/50 (orange), 30/70 (rot), 20/80 (blau) und 0/100 (grün).

Die Wirkung des Ethanols als Antisolvent auf das ARTE/Toluol-System ist in Abb. 6-3 durch die Verbindung der Löslichkeitswerte entlang konstanter Temperaturen (schwarze gestrichelte Linien) veranschaulicht. So können z. B. bei 20°C in dem 50/50 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch 18,4 Ma% ARTE gelöst werden. Weitere Ethanol-Zugabe zum Lösungsmittelgemisch bei derselben Temperatur bewirkt einen stetigen Abfall der ARTE-Löslichkeit bis hin zu 7,7 Ma% in der Lösung mit dem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelverhältnis. Bei Betrachtung der Messwerte entlang der Isothermen fällt auf, dass diese, ausgehend von reinem Ethanol in Richtung 50/50 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch, zunächst ansteigen und danach zum reinen Toluol wieder fallen. Das weist auf ein mögliches Löslichkeitsmaximum von ARTE im Bereich zwischen 50 und 100% Toluol im Lösungsmittelgemisch hin.

Ein ähnliches Löslichkeitsverhalten wurde von (Kaemmerer 2012) für den chiralen Wirkstoff Bicalutamid in Toluol/Methanol-Lösungsmittelgemischen beobachtet. Er beschrieb das Löslichkeitsmaximum für das R-Enantiomer des Wirkstoffs bei einem Toluol-Gehalt von 25% im Lösungsmittelgemisch. Die

Ermittlung der Lage des Löslichkeitsmaximums von ARTE in dem hier untersuchten Lösungsmittelsystem ist für die Auslegung einer Antisolventkristallisation nicht ausschlaggebend und wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt.

Da der ARTE-Gehalt von 8,6 Ma% in der Originalsyntheselösung der bei 23°C ermittelten Sättigungskonzentration von ARTE in dem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch entspricht, ist das Lösungsmittel für die Kristallisation von ARTE unmittelbar aus der Syntheselösung besonders gut geeignet. Nach (ICH 2016) darf die Restlösungsmittelmenge in pharmazeutischen Produkten einen Grenzwert von 410 ppm Toluol bzw. 5000 ppm Ethanol nicht überschreiten. Dementsprechend würde der Einsatz eines Prozesslösungsmittels mit möglichst hohem Ethanolanteil die Einhaltung dieser Grenzwerte unterstützen. Jedoch zeigten die Voruntersuchungen, dass ab einem Ethanol-Gehalt von 90% in der Toluol-Lösung, die in der Synthesemischung bis dahin in gelöster Form vorliegenden Verunreinigungen spontan ausfallen und somit die Aufreinigung von ARTE gefährden. Daraus folgend wurde das 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch für die Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation von ARTE gewählt. Um den möglichen Einfluss der in der Syntheselösung vorliegenden Verunreinigungen auf die Kristallisation von ARTE zu bewerten, wurde zusätzlich das Löslichkeits- und Nukleationsverhalten von ARTE in Gegenwart dieser untersucht. Auf der Basis der ermittelten der Löslichkeits- und Überlöslichkeitskurvenverläufe wird die Auslegung und Durchführung des Trennprozesses im Kap. 6.3 detailliert vorgestellt.

Identifizierung der auftretenden kristallinen Phasen von Artemisinin mittels XRPD

Da Artemisinin, genauso wie rund ein Drittel weiterer organischer Verbindungen, in der Lage ist, mehrere kristalline Formen, auszubilden (Chan et al. 1997; Klayman et al. 1984; Leban et al. 1988), ist es zur Gewährleistung einer effektiven Wirkstoffdosierung erforderlich, die thermodynamisch stabile Form im kristallinen Produkt zu gewinnen. In den vorläufigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Aufgrund des enantiotropen Phasenverhaltens der beiden ARTE-Formen die orthorhombische Form die unter Umgebungsbedingungen stabile Modifikation von ARTE gegenüber der triklinen ist (Horosanskaia et al. 2014).

Basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen, wurden die während der isothermen Löslichkeitsmessungen im thermodynamischen Gleichgewicht stehenden festen Phasen des ARTE bzgl. ihrer kristallinen Identität mittels XRPD analysiert. Die zugehörigen Röntgenpulverdiffraktogramme, zusammen mit dem des Ausgangsfeststoffs (Fa. Sigma Aldrich), sind in Abb. 6-4 den Strukturen der orthorhombischen und triklinen Modifikation gegenübergestellt.

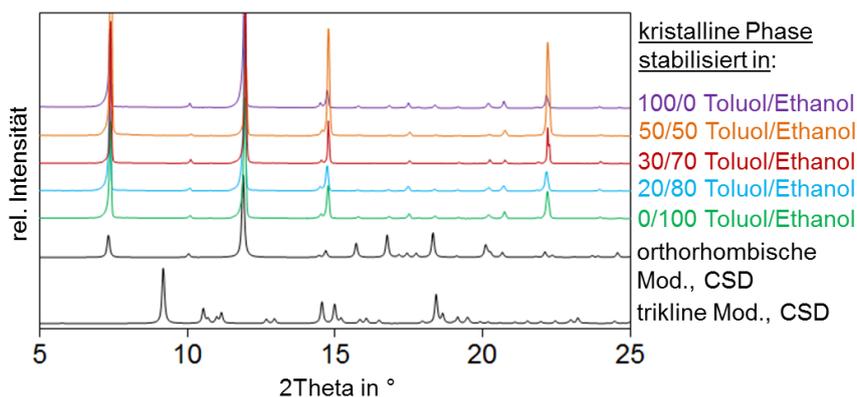


Abb. 6-4: Röntgenpulverdiffraktogramme der im thermodynamischen Gleichgewicht stehenden festen Phase von ARTE in Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen (Ma%/Ma%): 100/0 (violett), 50/50 (orange), 30/70 (rot), 20/80 (blau) und 0/100 (grün). Die zwei unteren Diffraktogramme entsprechen jeweils der orthorhombischen (CSD Strukturcode QNGHSU10) und triklinen (CSD Strukturcode QNGHSU01) Modifikation des ARTE, entnommen aus der internationalen kristallographischen Datenbank (Cambridge Structural Database, CSD).

Die Diffraktogramme der kristallinen Phasen des ARTE, welche mit der jeweiligen gesättigten Lösung im thermodynamischen Gleichgewicht stehen, sind untereinander gleich und mit der tieftemperaturstabilen orthorhombischen Modifikation identisch. Dieses Analyseergebnis entspricht den Beobachtungen aus den Untersuchungen zum polymorphen Phasenverhalten von ARTE (Horosanskaia et al. 2014) und stellt die Gewinnung der stabilen Form von ARTE in dem jeweiligen Prozesslösungsmittel sicher.

6.3 Aufreinigungsprozess: Auslegung, Durchführung und Ergebnisse

Wie bereits im Kap. 6.2 erläutert, wurde das Lösungsmittel mit der Zusammensetzung 20/80 Toluol/Ethanol für die kristallisationsbasierte Aufreinigung von ARTE aus der Syntheselösung ausgewählt. Die Abb. 6-5 zeigt den Ablauf der geplanten geimpften Kühlungskristallisation auf der Grundlage der Löslichkeits- und Nukleationskurve des verunreinigten ARTE im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch.

Der Trennprozess wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten geplant. Der erste Schritt diente der Bereitstellung einer klaren bzgl. ARTE untersättigten Arbeitslösung mit der ARTE-Konzentration von 8,6 Ma%, welche etwa der in der Originalsyntheselösung entspricht. Dabei wurde zum eingedampften Synthesegemisch entsprechende Masse des 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischs (Ma%/Ma%) hinzugefügt. Nach dem Überführen dieser Lösung in den Kristallisationsbehälter wurde der zweite Prozessschritt, welcher die Kristallisation darstellte, durchgeführt.

Wie in Abb. 6-5 illustriert, wurde die im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch vorliegende untersättigte und klare Ausgangslösung von 40°C auf 5°C mit einer konstanten Rate von 6 K/h abgekühlt. Um die selektive Kristallisation von ARTE aus dem Rohgemisch zu initiieren, wurden, nach dem Überschreiten der Sättigungstemperatur von ca. 27°C, der übersättigten klaren Lösung ca. 50 mg Impfkristalle des reinen ARTE bei der Temperatur von 21°C hinzugefügt. Die Impftemperatur wurde dabei so gewählt, dass sie mind. 5°C unter der Sättigungstemperatur und möglichst im ersten Drittel des metastabilen Bereichs liegt.

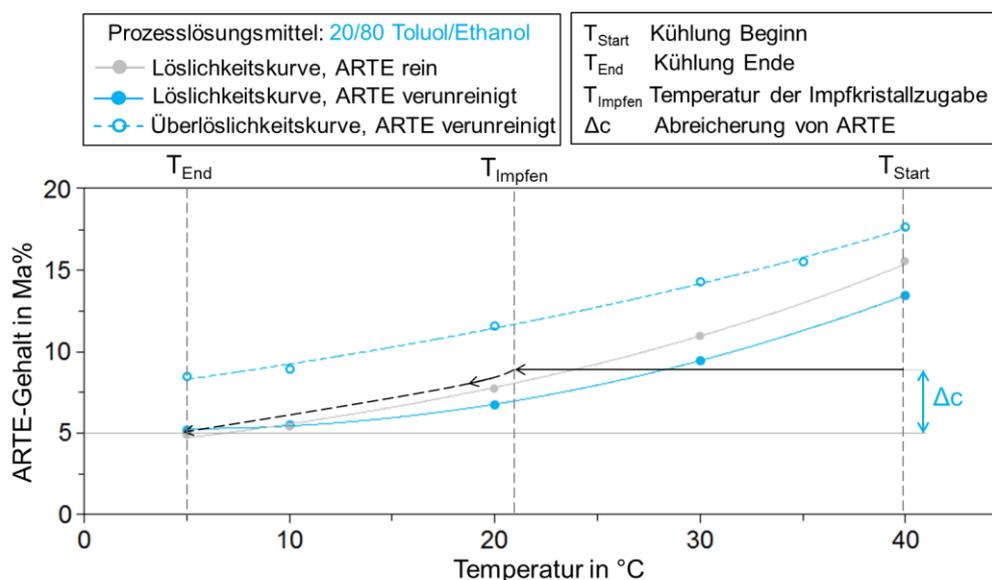


Abb. 6-5: Design des Kristallisationsprozesses von ARTE auf der Basis der Löslichkeitskurve (durchgezogene Linien) und der Überlöslichkeitskurve (gestrichelte Linien) des verunreinigten ARTE in Abhängigkeit von der Temperatur im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Richtung der ARTE-Konzentrationsänderung in der Lösung.

Während der weiteren Kühlung fand das Wachstum der Impfkristalle statt. Nach dem Erreichen der Endtemperatur von 5°C wurde die gewonnene Produktsuspension für ca. 30 min bei derselben Temperatur nachgerührt. Um das restliche Toluol sowie die anhaftende Mutterlauge zu entfernen, wurde das nach der Fest/flüssig-Phasentrennung (über Nutsche, Filterpapierporengröße mit 0,6 µm) gewonnene Kristallisat mit 250 ml kalten (< 5°C) Ethanol gewaschen, bei 40°C für ca. 1 h getrocknet und anschließend bzgl. der chemischen und strukturellen Reinheit mittels HPLC und XRPD analysiert.

In Tabelle 6-1 sind die gewählten kristallisationsspezifischen Betriebsparameter zusammengefasst.

Tabelle 6-1: Kristallisationsspezifische Betriebsparameter für die ARTE-Aufreinigung in 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch. Verwendete Indizes: T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe, T_{Sätt} die Sättigungstemperatur von ARTE in der Lösung, C_{Start} und

c_{End} die Anfangs- und Endkonzentrationen von ARTE, $c_{\text{Sätt}}$ die Sättigungskonzentration von ARTE bei 5°C, Δc_{TD} ist die thermodynamisch maximal mögliche Änderung der ARTE-Konzentration in der Lösung am Ende der Kühlung.

Lösungsmittel	c_{Start} (ARTE) Ma%	T_{Start} °C	$T_{\text{Sätt}}$ (ARTE) °C	T_{Impfen} °C	T_{End} °C	Kühlrate K/h	$c_{\text{End}} = c_{\text{Sätt}}$ (T = 5°C) (ARTE) Ma%	Δc_{TD} (ARTE) Ma%
20/80 Toluol/Ethanol	8,9	40	27	21	5	6	5,0	3,9

Wie in Abb. 6-5 skizziert, würden bei der vorgestellten Prozessführung nach der thermodynamisch maximal erzielbaren ARTE-Abreicherung von Δc_{TD} von 3,9 Ma% ca. 5 Ma% ARTE am Prozessende in der Mutterlauge gelöst bleiben. Diese Abreicherung entspricht nach Gl. 3.6.3.4 einer Gesamtproduktausbeute η von 43,8%. Möglichkeiten zur Erhöhung der Gesamtproduktausbeute von ARTE werden im Anschluss an die Kühlungskristallisation diskutiert.

Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch

Im ersten Prozessschritt wurde eine untersättigte klare Ausgangslösung aus 9,74 g Syntheseprodukt (Feststoff) und 70 g des 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischs hergestellt. Anschließend wurde die Arbeitslösung, wie der Versuchsaufbau in Abb. 6-6 zeigt, in den vorgesehenen Kristallisationsbehälter überführt und auf die geplante Starttemperatur von 40°C erwärmt. Zur genauen Bestimmung der Anfangskonzentration von ARTE wurde eine Probe der Arbeitslösung mit der Spritze über einen PTFE-Aufsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) entnommen und mittels HPLC analysiert. Die gemessene Startkonzentration von ARTE betrug 8,87 Ma%.

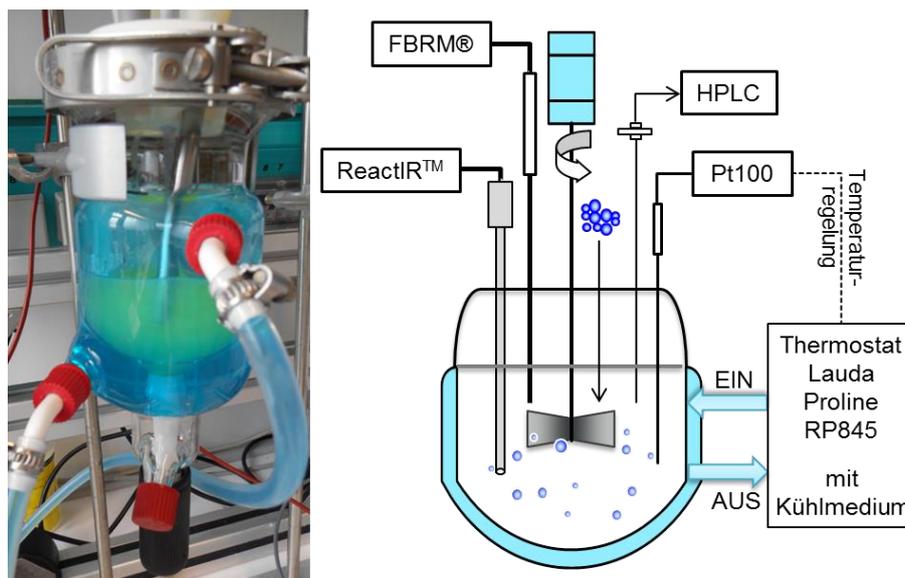


Abb. 6-6: Photographische Aufnahme (links) und schematischer Aufbau (rechts) der Batch-Kristallisationsapparatur: 100ml Glasgefäß mit einem Kühlmantel ausgestattet mit einem Propellerrührer.

Wie die photographische Aufnahme und das Schema des Versuchsaufbaus in Abb. 6-6 zeigen, wurde der Kristallisationsprozess in einem 100 ml Glasbehälter mit einem Kühlmantel durchgeführt. Ein Stativrührwerk (Propellerrührer) wurde für die Durchmischung der Arbeitslösung verwendet. Die Temperatur der Arbeitslösung wurde über ein Pt-100 Widerstandsthermometer (0,1°C Auflösung), verbunden mit einem Thermostat (Lauda Proline RP845), geregelt. Zur kontinuierlichen Verfolgung des Kristallisationsfortschritts von ARTE wurde der Kristallisationsbehälter mit einer ATR-FTIR-Inlinesonde zur Überwachung der ARTE-Konzentration in der flüssigen Phase sowie einer FBRM-Inlinesonde zur Beobachtung der Keimbildung und des Kristallwachstums ausgestattet. Offline-HPLC diente als unabhängige Referenzmethode zur Bestimmung des ARTE-Gehalts in der Lösung.

Auf dem Diagramm in Abb. 6-7 sind die während des Trennprozesses aufgezeichneten Signale der ATR-FTIR- (grüne Linie) sowie FBRM-Sonde (schwarze Linien) zusammen mit den HPLC-Messergebnissen (grüne Kreise) und Systemtemperatur (rote Linie) graphisch dargestellt.

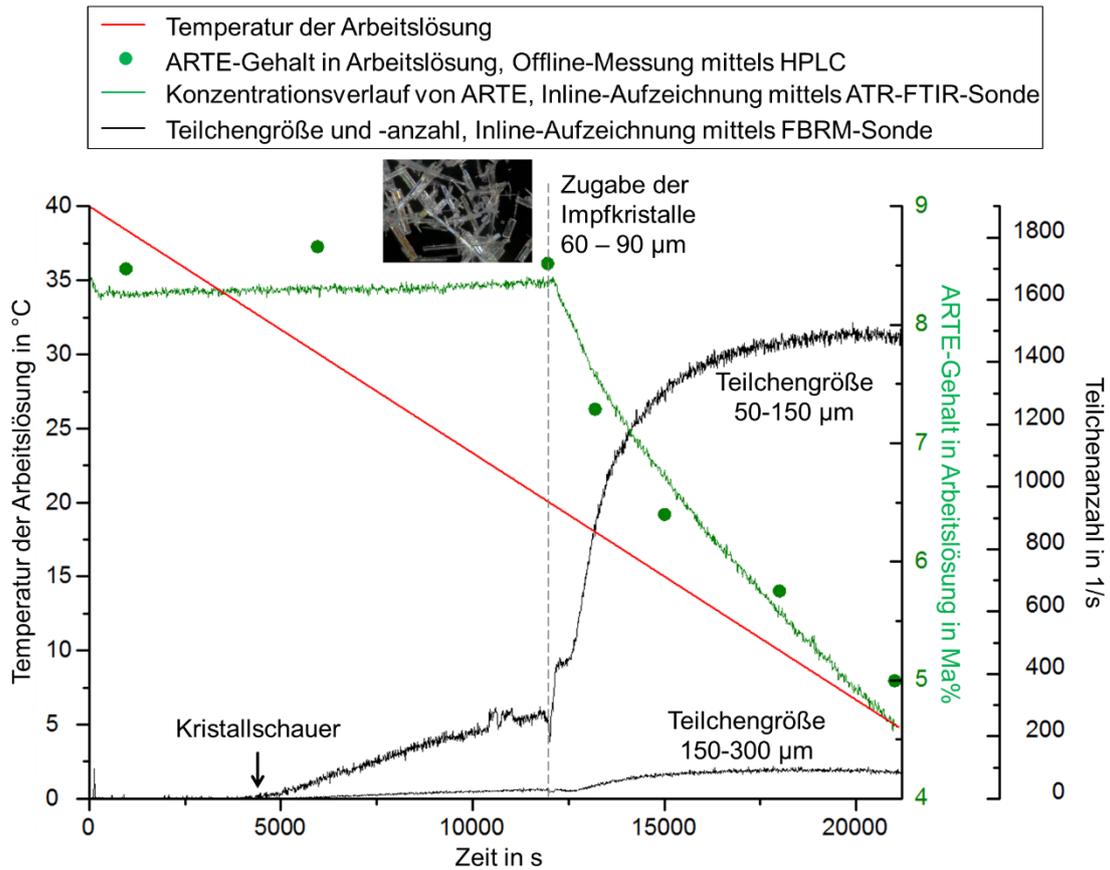


Abb. 6-7: Kontinuierliche Verfolgung des Kristallisationsprozesses von ARTE während des Abkühlvorgangs der angeimpften Arbeitslösung.

Zu Prozessbeginn bei 40°C wurden mittels FBRM-Sonde keine Teilchen detektiert und mittels Infrarotsonde ein konstantes Signal für den ARTE-Gehalt in der Lösung gemessen. Dieser ARTE-Gehalt zeigte mit kleinen Abweichungen eine gute Übereinstimmung zu den HPLC-Messwerten. Während der Abkühlung der Lösung auf 21°C, kurz vor der Impfkristallzugabe, wurden mittels beider Analysemethoden, Offline-HPLC und Inline-ATR-FTIR-Spektroskopie nahezu unveränderte Werte der ARTE-Konzentration in der flüssigen Phase gemessen. Dennoch wurde bei einer Temperatur von 32°C, 5°C über der zuvor ermittelten Sättigungstemperatur von ARTE (27°C), ein Kristallschauer beobachtet. Parallel dazu wurde mittels FBRM-Sonde ein stetiger Anstieg der Teilchenanzahl der Größe 50-150 µm aufgezeichnet (Abb. 6-7). Die leuchtend gelbe Färbung der Syntheselösung erschwerte die visuelle Identifizierung der gebildeten Kristalle als weiße Nadeln des ARTE.

Unter der Berücksichtigung der zuvor ermittelten Löslichkeitskurve von ARTE (Abb. 6-5, blaue Linie) sowie des mittels ATR-FTIR-Sonde erfassten Konzentrationsverlaufs von ARTE in der flüssigen Phase konnte eine primäre Keimbildung von ARTE bei dieser Temperatur in der vorliegenden Lösung ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden trotz der bereits vorliegenden Suspension die Impfkristalle des reinen ARTE (Partikelgröße 60 -

90 μm) bei 21°C dem System hinzugefügt. Innerhalb weniger Sekunden erfasste die FBRM-Sonde einen sprunghaften Anstieg in der Teilchenanzahl der Größe 50 -150 μm . Im weiteren zeitlichen und Kühlungsverlauf nahm die Anzahl der Teilchen dieser und der Größe 150 – 300 μm zu, was auf das Wachstum der ARTE-Impfkristalle hinwies. Die mittels Infrarotsonde aufgezeichnete stetige Abnahme der ARTE-Konzentration in der Lösung sowie die HPLC-Ergebnisse bestätigten den Übergang von ARTE während des Kristallisationsversuchs aus der gelösten in die kristalline Form.

Am Ende des Trennprozesses lagen ca. 5 Ma% (HPLC) ARTE in der abfiltrierten Mutterlauge vor. Dieser Wert entspricht der zuvor ermittelten Sättigungskonzentration von ARTE im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch bei 5°C und weist darauf hin, dass die thermodynamisch maximal mögliche ARTE-Abreicherung in der Lösung erzielt wurde.

Bewertung des kristallinen Produkts

In den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 6-8 und 6-10) sind fotografische und mikroskopische Aufnahmen sowie die Ergebnisse der strukturellen und chemischen Reinheitsanalyse des gewonnenen Kristallisats vorgestellt.

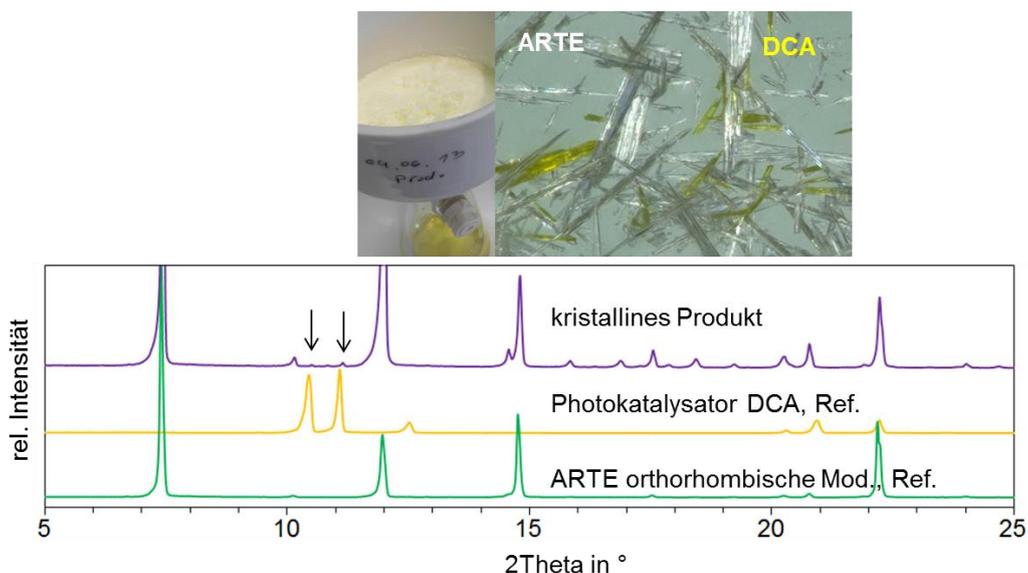


Abb. 6-8: Fotografische und mikroskopische Aufnahme des Kristallisats (oben) sowie Röntgenpulverdiffraktogramme des kristallinen Produkts, der Referenzprobe des reinen ARTE (orthorhombische Modifikation) und des Photokatalysators DCA (unten).

Die fotografische Aufnahme des Filterkuchens und Filtrats (Abb. 6-8 (oben)) zeigt, dass beide Phasen gleichmäßig gelb gefärbt sind. In der mikroskopischen Aufnahme des Kristallisats können die weißen Nadeln des kristallinen ARTE von den gelben Nadeln des Photokatalysators DCA deutlich unterschieden werden. In dem von dem Kristallisat aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogramm (Abb. 6-8, unten, violette Linie) sind einerseits die Reflexe der bei

Umgebungstemperatur stabilen orthorhombischen Modifikation von ARTE, andererseits zwei Reflexe sehr geringer Intensität bei 2θ $10,3^\circ$ und $11,1^\circ$ zu erkennen. Letztere können anhand der Referenzprobe zweifelsfrei dem Photokatalysator DCA zugeordnet werden. Wie aus der mikroskopischen Aufnahme ersichtlich war, bestätigte die Röntgenanalyse, dass das DCA nicht in Form von Mutterlaugenresten am Kristallat anhaftet, sondern als Kristallgemisch mit ARTE im Produkt vorliegt. Der während des Kristallisationsprozesses bei 32°C beobachtete Kristallschauer ließ somit auf die Primärkeimbildung von DCA schließen. Der daraufhin ermittelte Löslichkeitskurvenverlauf von DCA im Prozesslösungsmittel (Abb. 6-9) hat diese Annahme bestätigt.

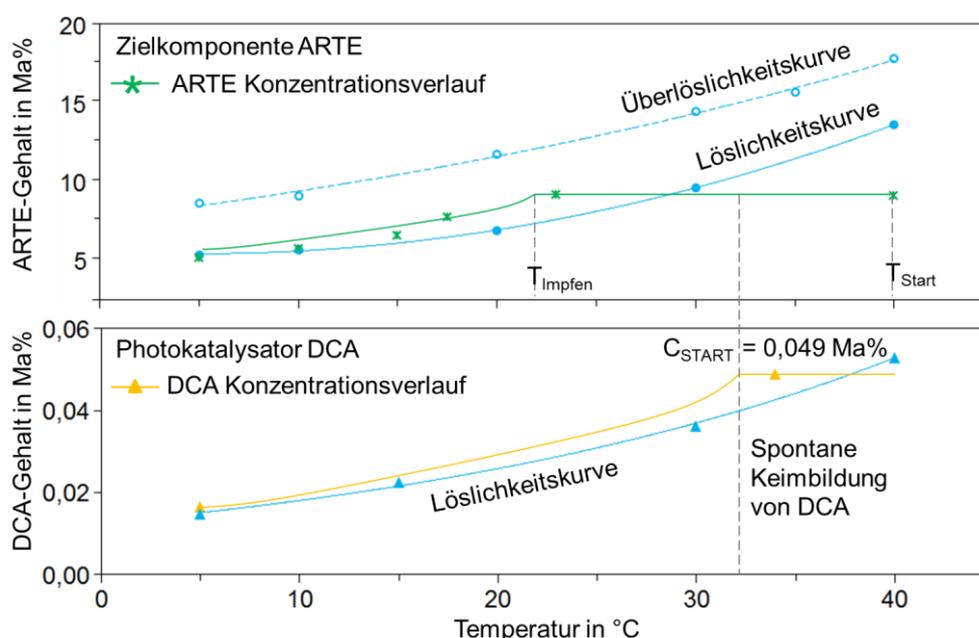


Abb. 6-9: Konzentrationsverlauf der gelösten Komponente (ARTE (oben) und DCA (unten)) in der Arbeitslösung während des Trennprozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven. Punkte: Messwerte; durchgezogene Linien: skizzierte Trajektorien; gestrichelte senkrechte Linien kennzeichnen: T_{Start} die Anfangstemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe sowie die Temperatur der spontanen Keimbildung von DCA.

Wie Abb. 6-9 zeigt, befand sich das DCA, aufgrund der hohen Anfangskonzentration von $0,049 \text{ Ma}\%$ in der Arbeitslösung, bereits nach etwa 2 K Abkühlung im übersättigten Bereich. Die weitere Temperatursenkung löste die Nukleation von DCA bei 32°C , 5 K über dem geplanten ARTE-Impfvorgang, aus.

Wie das vom Produktfeststoff aufgenommene HPLC-Chromatogramm in Abb. 6-10 zeigt, wirkte sich die spontane Keimbildung von DCA negativ auf die ARTE-Reinheit aus. Neben dem ARTE-Peak bei $7,2 \text{ min}$, ist auch das DCA anhand

seines Hauptpeaks bei 10,3 min in dem Chromatogramm des kristallinen Produkts zu erkennen.

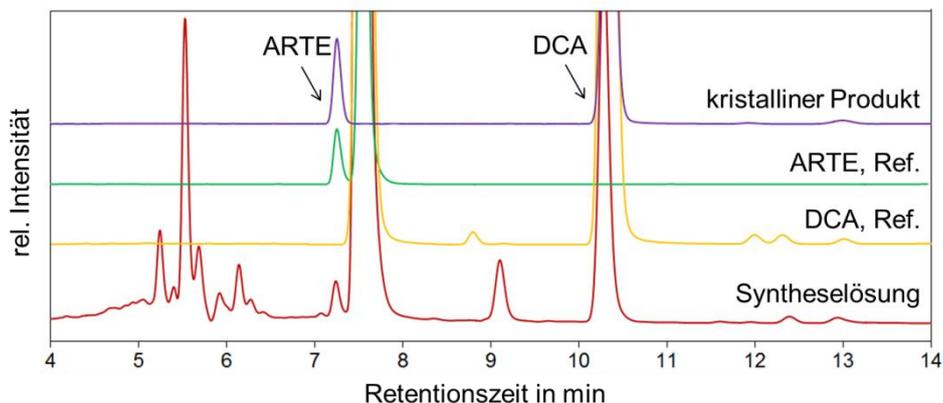


Abb. 6-10: HPLC-Chromatogramme des Produkts (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot).

Um neben anderen Bestandteilen auch das Toluol in dem kristallinen Produkt zu quantifizieren, wurde für die Herstellung der HPLC-Probe reines Acetonitril als Laufmittel der HPLC verwendet. Aus dem Chromatogramm geht hervor, dass das gewonnene Kristallisat frei von Toluol und anderen in der Syntheselösung anfänglich vorliegenden Verunreinigungen ist.

In Tabelle 6-2 sind die quantitativen Ergebnisse des durchgeführten Trennprozesses zusammengefasst.

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Kühlungskristallisation von ARTE aus der Syntheselösung in einem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch.

Parameter	Prozessstart Menge	Prozessende Menge
Syntheselösung	79,74 g	
20/80 Toluol/Ethanol Lösungsmittelgemisch	70 g	
Synthesegemisch	9,74 g	
Gesamtfeststoffgehalt	12,21 Ma%	
ARTE-Gehalt	7,08 g / 8,87 Ma%	
DCA-Gehalt	0,049 Ma%	
Kristallisat		3,10 g
ARTE-Reinheit (HPLC-Messwert)		98,8 % / 3,06 g
DCA-Gehalt (HPLC-Messwert)		1,2 %
ARTE-Ausbeute		43,2 % [#] (98 %) [*]

[#] Gesamtproduktausbeute $\eta = m(\text{ARTE im Produkt}) / m(\text{ARTE im Synthesegemisch}) \cdot 100\%$

^{*} Anteil der thermodynamisch maximal möglichen Ausbeute η_{TD}

Der vorgestellte Trennprozess ermöglichte die Aufreinigung von ARTE von anfänglichen 69% in der Syntheselösung auf 98,8% im kristallinen Produkt mit

einer Gesamtproduktausbeute von 43,2%. Alle Verunreinigung des ARTE wurden, bis auf 1,2% von DCA, in einem Trennschritt entfernt. Unabhängig davon entsprechen die erzielte Produktqualität und -quantität nicht dem optimalen Ergebnis. In diesem Zusammenhang wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Reinheit und die Gesamtproduktausbeute von ARTE zu erhöhen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen werden im Folgenden vorgestellt.

Untersuchungen zur Erhöhung der ARTE-Ausbeute

Mit der beschriebenen Kühlprozedur (von 40°C auf 5°C) konnten 43,2% des in der Syntheselösung zu Prozessbeginn vorliegenden ARTE gewonnen werden. Da dieser Wert annähernd der thermodynamisch maximal möglichen Ausbeute entspricht, wurde für die Ausbeuteerhöhung bei gleichen Startbedingungen in der 1. Option die Endtemperatur des Kühlvorgangs auf -10°C herabgesetzt und in der 2. Option Ethanol als Antisolvent dem System am Ende der Kühlung bei 5°C entsprechend der Endzusammensetzung des Lösungsmittels von 10/90 Toluol/Ethanol hinzugefügt. Die hiermit erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 6-3 der nach dem ersten Trennprozess erreichten Produktausbeute und Reinheit gegenübergestellt.

Tabelle 6-3: Ergebnisse der Untersuchungen zur Erhöhung der Gesamtproduktausbeute von ARTE.

Vorgehensweise		ARTE Ausbeute in %	ARTE Reinheit in %	DCA Gehalt in %
<i>Kühlung</i>	<i>von 40°C bis 5°C</i>	43,2	98,8	1,2
1. Kühlung	von 40°C bis -10°C	62,8	98,7	1,2
2. Antisolventzugabe	10/90 Toluol/Ethanol	73,8	93,2	6,8

Wie die Tabelle 6-3 zeigt, brachte die Unterkühlung der Arbeitslösung um weitere 15 K bei gleichgebliebener ARTE-Reinheit von 98,7% eine Erhöhung der Gesamtproduktausbeute auf 62,8%. Die Veränderung der Zusammensetzung des Prozesslösungsmittels auf 10/90 Toluol/Ethanol zum höheren Antisolventanteil ermöglichte zwar eine deutliche Steigerung der Ausbeute (auf ca. 74%), führte aber zur Verschlechterung der ARTE-Reinheit, wobei der DCA-Gehalt im Kristallisat um etwa das 6-fache angestiegen ist. Die Ethanol-Zugabe führte offensichtlich zur Herabsetzung der Löslichkeit von DCA und zum Anstieg seines Gehalts im Produktfeststoff.

Untersuchungen zur weiteren Erhöhung der ARTE-Reinheit

Wie in Tabelle 6-3 zusammengefasst, verbleibt bei jeder der vorgestellten Prozessführungsstrategie das DCA als einzige Verunreinigung im Produktfeststoff und beeinträchtigt die Reinheit von ARTE.

Hinsichtlich der Qualitätsanforderungen an ARTE als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Präparaten gegen Malaria (> 97%, (WHO 2015)) würde die erzielte Reinheit von 98,8% bereits ausreichen. Nach derselben Richtlinie darf jedoch der Gehalt der Einzelverunreinigung die 0,5% - Marke nicht überschreiten. Dementsprechend und aufgrund der hohen Toxizität von DCA wurden folgende drei Verfahrensoptimierungen untersucht, um die Reinheit von ARTE auf mind. 99,5% anzuheben:

- I. Weitere Aufreinigung des nach der Kühlungskristallisation gewonnenen Rohprodukts in einem nachgeschalteten Downstream-Prozess.
- II. Entfernung von DCA in einem vorgeschalteten Trennprozess aus der Originalsyntheselösung und anschließende Kühlungskristallisation von ARTE aus dem DCA-freien Synthesegemisch.
- III. Auslegung einer neuen Kühlungskristallisation für ARTE unter Verwendung eines anderen Prozesslösungsmittels, in dem DCA gut löslich ist und während des gesamten Trennprozesses möglichst untersättigt bleibt.

Im Folgenden wird auf die Durchführung und Ergebnisse der jeweiligen Strategie im Einzelnen eingegangen.

I. Aufreinigung von Produktfeststoff im Downstream-Prozess

Da die 3,1 g des gewonnenen Produktfeststoffs lediglich 1,2% DCA beinhalten, wurde nach einem Lösungsmittel für den Downstream-Prozess gesucht, in welchem ARTE sehr gute und das DCA dagegen sehr schlechte Löslichkeit aufweist. Hiermit würde ARTE in der flüssigen und das DCA in der festen Phase angereichert werden.

Aus Ergebnissen der Löslichkeitsuntersuchungen von ARTE (Abb. 6-2) folgte, dass Acetonitril, in welchem bereits bei 5°C über 15 Ma% ARTE löslich sind, ein geeigneter Lösungsmittelkandidat für den Downstream-Prozess ist. Die ermittelten Löslichkeitswerte von DCA in Acetonitril haben die Wahl bekräftigt. Wie Abb. 6-11 (unten) zeigt, können lediglich 0,015 Ma% bei 5°C und 0,028 Ma% bei 30°C von DCA in Acetonitril gelöst werden.

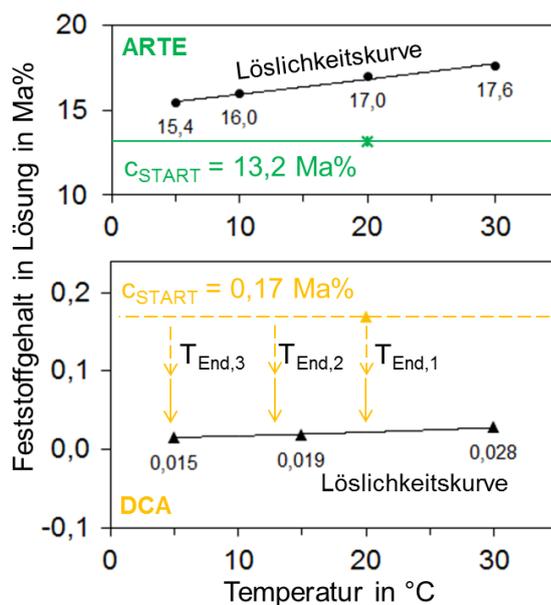


Abb. 6-11: Skizze des Downstream-Prozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven von ARTE (oben) und DCA (unten) in Acetonitril. Punkte: Messwerte; durchgezogene / gestrichelte Linien: skizzierte Trajektorien.

Unter Berücksichtigung der ermittelten Löslichkeitskurven wurde folgender Prozess durchgeführt: Zu 3,1 g Produktfeststoff wurden bei konstanten 20°C 20 g Acetonitril im Glasgefäß unter Rühren hinzugefügt. Die dafür benötigte Lösungsmittelmenge ist so gewählt, dass ARTE mit der Konzentration von 13,2 Ma% untersättigt und DCA mit 0,17 Ma% in derselben Lösung deutlich übersättigt vorliegt (siehe Abb. 6-11). Diese Lösung wurde anschließend für weitere 30 min. bei konstanten 20°C nachgerührt und über eine Nutsche filtriert. In der photographischen Aufnahme in Abb. 6-12 (links) sind gelbe nadelförmige DCA-Kristalle auf dem weißen Filterpapier zu sehen. Somit könnte das aus der Lösung zurückgewonnene DCA z. B. für die nächste photokatalytische ARTE-Synthese direkt eingesetzt werden.



Abb. 6-12: Photographische Aufnahmen links- gelbe nadelförmige Kristalle des zurückgewonnenen reinen DCA auf dem weißen Filterpapier; rechts- das kristalline Produkt: weiße Bereiche - reines ARTE, gelbe Bereiche - ARTE mit DCA verunreinigt. Beide Feststoffe erhalten im Downstream-Prozess.

Nach dem Eindampfen von Acetonitril aus dem mit ARTE angereicherten Filtrat wurde 99,95% reines ARTE in kristalliner Form zurückzugewonnen.

Der erzielte Reinheitsgrad von ARTE spricht zunächst für den Erfolg des vorgestellten Downstream-Prozesses. Jedoch zeigt die fotografische Aufnahme des Produktfeststoffs in Abb. 6-12 (rechts), dass neben weißem ARTE-Pulver auch gelbe DCA-haltige Bereiche zu erkennen sind. Das DCA ist sogar bei dem geringen Gehalt von 0,05% im Kristallisat mit bloßem Auge erkennbar. Die beobachtete Farbstoffintensität von DCA unterstreicht den hartnäckigen Charakter dieser Verunreinigung und die Notwendigkeit eines vorgeschalteten Trennprozesses für DCA.

II. Entfernung von DCA aus der Originalsyntheselösung im vorgeschalteten Prozess und anschließender Kühlungskristallisation von ARTE

Da ARTE in einem kontinuierlichen Durchflussreaktor hergestellt wird (Kopetzki et al. 2013), wäre ein ebenfalls kontinuierlich betriebenes Trennverfahren zur Entfernung von DCA aus der Produktlösung im direkten Anschluss an die Synthese von Vorteil.

Zur Isolierung eines Zielmoleküls aus einer ähnlichen Syntheselösung wurde das Verfahren der kontinuierlichen Gegenstrom-Flüssigchromatographie (sog. *Simulated Moving Bed* (Abk. SMB) Chromatographie) in einer Direktkopplung an die kontinuierliche Synthese erfolgreich eingesetzt (O'Brien et al. 2012). In einer weiteren Arbeit wurde demonstriert, dass mittels Kombination von kontinuierlichen SMB-Chromatographie und selektiver Kristallisation die Enantiomere des racemischen Bicalutamids sehr produktiv getrennt werden können (Kaemmerer et al. 2011). Da beide Forschungsarbeiten aus eigener Arbeitsgruppe entstanden sind, bot sich die Untersuchung zur Aufreinigung von ARTE mittels Verfahrenskopplung von SMB-Chromatographie und Kristallisation in einem Kooperationsprojekt innerhalb der Arbeitsgruppe an.

Auf der Grundlage des gemessenen chromatographischen Elutionsprofils der ARTE-haltigen Synthesemischung auf einer präparativen Säule (Abb. 6-13) wurde von (Horvath 2017) die sog. „Center-Cut“-Methode unter Verwendung von vier hintereinandergeschalteten chromatographischen Säulen umgesetzt. Dafür wurde die mobile Phase (96/4 Toluol/Ethylacetat (Vol.%/Vol.%)) so gewählt, dass die Syntheselösung in Toluol aus dem Reaktorausgang kommend, lediglich nach der Einstellung der erforderlichen Feststoffkonzentration in die SMB-Anlage zur DCA-Trennung kontinuierlich eingespeist werden konnte.

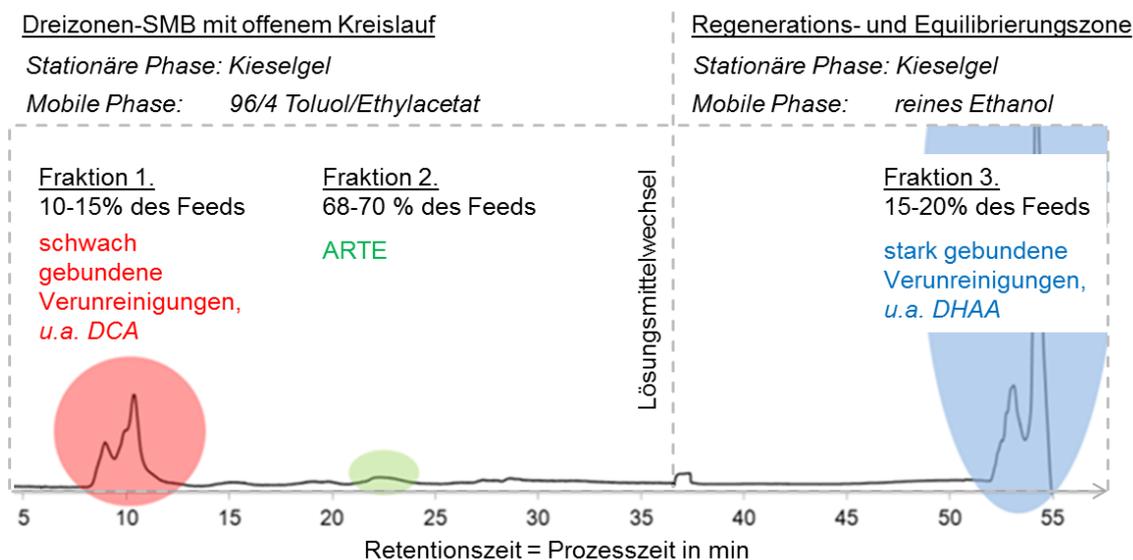


Abb. 6-13: Prinzip einer Dreizonen-SMB mit offenem Kreislauf und einer Regenerations- bzw. Equilibrierungszone anhand des chromatographischen Elutionsprofils der Syntheselösung (Horvath 2017).

Wie Abb. 6-13 zeigt, wurden die ersten drei Säulen in Form einer Dreizonen-SMB mit offenem Kreislauf eingesetzt. Dabei wurde das Gemisch in zwei Fraktionen, die erste mit DCA und die zweite mit ARTE angereichert, getrennt. Die mit den restlichen Verunreinigungen (u. a. DHAA) beladene Säule wurde in der Regenerationszone mit Ethanol freigespült. Nach der anschließenden Equilibrierung der Säule mit der mobilen Phase wurde die Säule für die nächste Beladung mit der Syntheselösung in die Dreizonen-SMB geschaltet. Das Produkt der kontinuierlich betriebenen Säulenchromatographie war die nach mehreren Durchläufen aufgesammelte flüssige Fraktion 2 (Abb. 6-13), eine ca. 1 Ma%-ige Lösung mit 92% ARTE im 96/4 Toluol/Ethylacetat-Lösungsmittelgemisch gelöst. Das zugehörige HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 6-14 gezeigt.

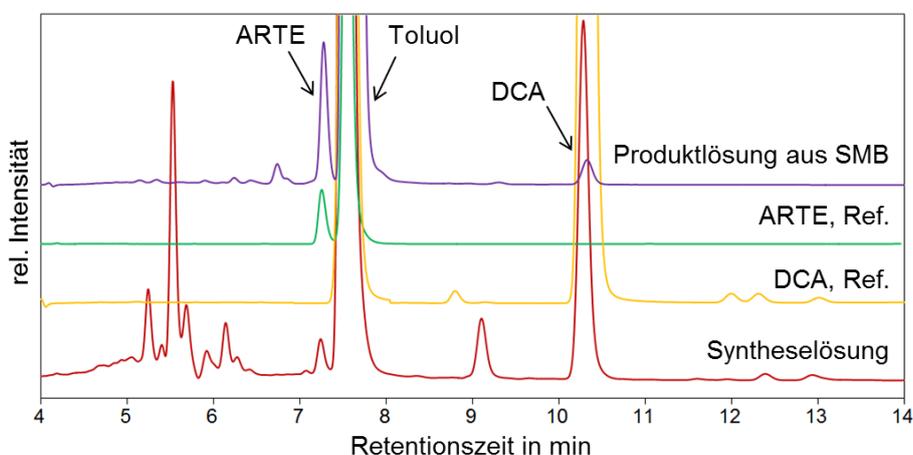


Abb. 6-14: HPLC-Chromatogramme der Produktlösung aus der SMB (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot).

Bei Betrachtung des DCA-Hauptpeaks bei 10,3 min und nach quantitativer Auswertung ist ersichtlich, dass der DCA-Gehalt von anfänglichen 0,049% auf 0,0008 Ma% deutlich reduziert werden konnte.

Aus dieser SMB-vorgereinigten Lösung erfolgte dann die Kühlungskristallisation zur Gewinnung von ARTE. Zum Einstellen der dafür notwendigen Ausgangskonzentration von ARTE (ca. 11,88 Ma%, etwas höher als im ersten Kristallisationsprozess) wurde das überschüssige Lösungsmittel eingedampft und nach Zugabe von Ethanol das Lösungsmittelverhältnis von 20% (96/4 Toluol/Ethylacetat) und 80% Ethanol (wie im ersten Kristallisationsprozess) eingestellt. Die Anwesenheit von ca. 0,008% Ethylacetat im Prozesslösungsmittel zeigte keine Auswirkungen auf die Sättigungskonzentration von ARTE. Aufgrund seiner geringen Konzentration von 0,0008 Ma% in der Arbeitslösung ist DCA während des gesamten Prozesses deutlich untersättigt und sollte in der Lösung verbleiben.

Die Ergebnisse der Aufreinigung von ARTE aus der Kopplung von SMB-Chromatographie und Kristallisation sind in Tabelle 6-4 zusammengefasst.

Tabelle 6-4: Ergebnisse der Aufreinigung von ARTE nach der Kopplung von zwei Trennverfahren SMB-Chromatographie und Kristallisation.

	Trennverfahren	ARTE Reinheit in %	ARTE Ausbeute in %
1. Prozessschritt	SMB Chromatographie	92,0	99,0
2. Prozessschritt	Kristallisation	99,9	62,1
Gesamtausbeute über beide Prozesse			61,5

Unter Einsatz von SMB-Chromatographie wurde die Konzentration von DCA, der Hauptverunreinigung von ARTE in der Syntheselösung, optimal reduziert, was die Gewinnung von 99,9% reinem ARTE (weiße nadelförmige Kristalle) in der darauffolgenden Kristallisation ermöglichte. Die im zweiten Prozessschritt mittels Kühlungskristallisation erzielte höhere Ausbeute von 62,1% als mittels erster Kühlungskristallisation (43,2%) hängt mit der höheren ARTE-Ausgangskonzentration zusammen.

III. Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation in Toluol

Die Durchführung der Kühlungskristallisation in reinem Toluol als Prozesslösungsmittel ermöglicht die Aufreinigung von ARTE im unmittelbaren Anschluss an die kontinuierliche Synthese.

Im Vorfeld der Prozessplanung wurde der Löslichkeits- und Nukleationskurvenverlauf von ARTE in Toluol in Anwesenheit von Verunreinigungen ermittelt. Um sicher zu gehen, dass das in der Syntheselösung vorliegende DCA die Kristallisation von ARTE nicht beeinträchtigt, wurde die Löslichkeit von DCA in Toluol ebenfalls gemessen (Abb. 6-15). Auf der Grundlage dieser

Messergebnisse wurde die geimpfte Kühlungskristallisation von ARTE in reinem Toluol nach analogem Prozessablauf wie im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch in zwei Schritten durchgeführt.

Da die Löslichkeit von ARTE in reinem Toluol deutlich höher ist als im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch (Abb. 6-15), wurde im ersten Prozessschritt das überschüssige Toluol aus der Originalsyntheselösung mit einem Gesamtfeststoffgehalt von 12,2 Ma% bzw. ARTE-Gehalt von 8,6 Ma% so weit eingedampft, dass zu Beginn des Kristallisationsschritts eine bzgl. ARTE untersättigte Arbeitslösung mit ARTE-Gehalt von ca. 22,0 Ma% vorlag. Die Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation ist in Abb. 6-15 auf der Basis der Löslichkeits- und Überlöslichkeitskurve von ARTE in Toluol dargestellt. Die für den Aufreinigungsprozess von ARTE verwendeten kristallisationsspezifischen Betriebsparameter sind in Tabelle 6-5 zusammengefasst.

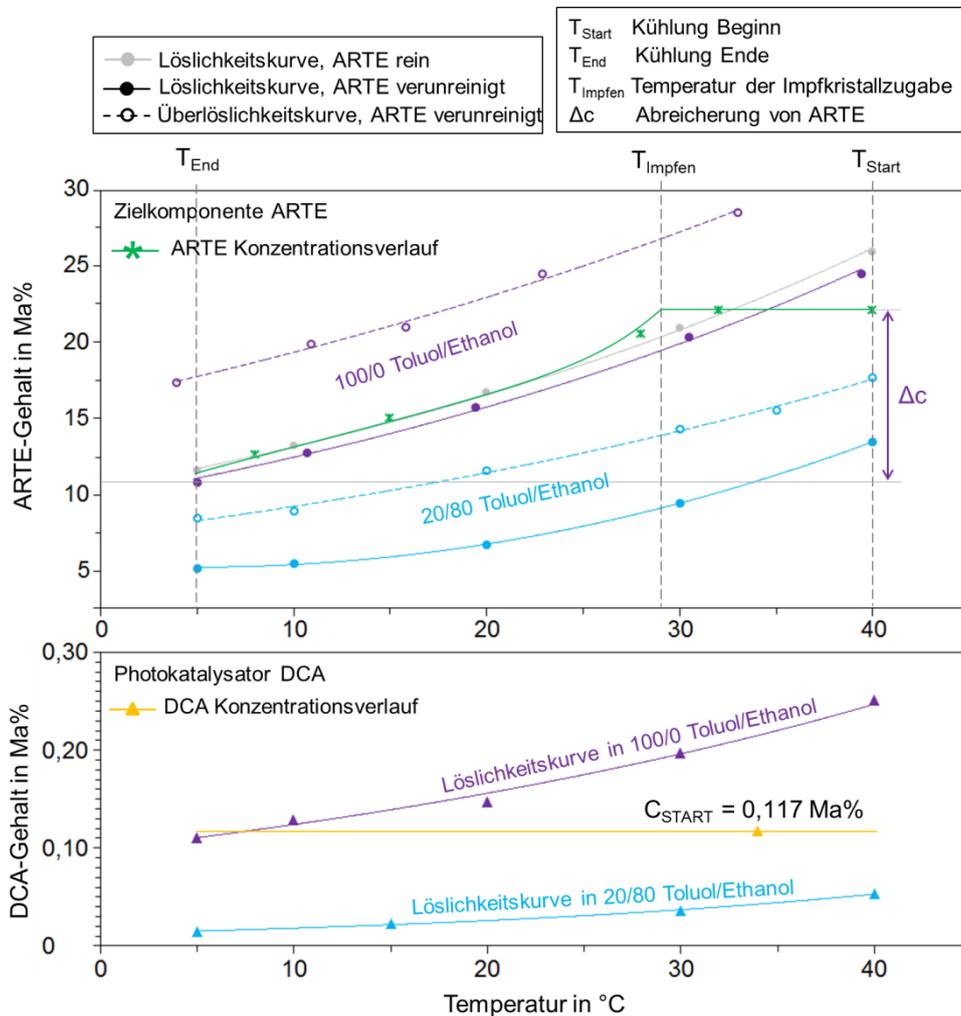


Abb. 6-15: Konzentrationsverlauf der gelösten Komponente ARTE (oben) und DCA (unten) in der Arbeitslösung während des Trennprozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven. Punkte: Messwerte; durchgezogene Linien: skizzierte Trajektorien; gestrichelte senkrechte Linien kennzeichnen: T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe.

Das Einengen der Originalsyntheselösung führte auch zur Aufkonzentrierung aller darin enthaltenen Verunreinigungen, u. a. der Hauptverunreinigung DCA bis zu einer Konzentration von ca. 0,12 Ma%. Jedoch, wie in Abb. 6-15 (unten) gezeigt, ist das DCA (analog zu ARTE) in reinem Toluol deutlich besser löslich als in Ethanol-haltigen Lösungsmittelgemischen und verbleibt oberhalb 8°C in der Arbeitslösung untersättigt.

Tabelle 6-5: Kristallisationsspezifische Betriebsparameter für die ARTE-Aufreinigung in Toluol. Verwendete Indizes: T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe, $T_{\text{Sätt}}$ die Sättigungstemperatur von ARTE in der Lösung, c_{Start} und c_{End} die Anfangs- und Endkonzentrationen von ARTE, $c_{\text{Sätt}}$ die Sättigungskonzentration von ARTE bei 5°C, Δc_{TD} ist die thermodynamisch maximal mögliche Änderung der ARTE-Konzentration in der Lösung am Ende der Kühlung.

Lösungsmittel	c_{Start} (ARTE)	T_{Start}	$T_{\text{Sätt}}$ (ARTE)	T_{Impfen}	T_{End}	Kühlrate	$c_{\text{End}} = c_{\text{Sätt}}$ ($T = 5^\circ\text{C}$) (ARTE)	Δc_{TD} (ARTE)
	Ma%	°C	°C	°C	°C		K/h	Ma%
Toluol	22,0	40	34	29	5	6	10,8	11,2

Während der Kühlung der Arbeitslösung von 40°C auf 5°C wurden bei 29°C der bzgl. ARTE übersättigten klaren Lösung die ARTE-Impfkristalle hinzugefügt (Abb. 6-15). Am Ende der Kühlung wurde die Produktsuspension für weitere 30 min bei 5°C nachgerührt. Um das restliche Toluol aus dem Kristallisat zu entfernen, wurde der Filterkuchen mit kaltem Ethanol gespült und nach dem Trocknen bei 40°C für ca. 1h auf die ARTE-Reinheit und Ausbeute überprüft. Die Ergebnisse der qualitativen Bewertung des gewonnenen kristallinen Produkts sind in Abb. 6-16 anhand des HPLC-Chromatogramms sowie der fotografischen und mikroskopischen Aufnahme dargestellt.

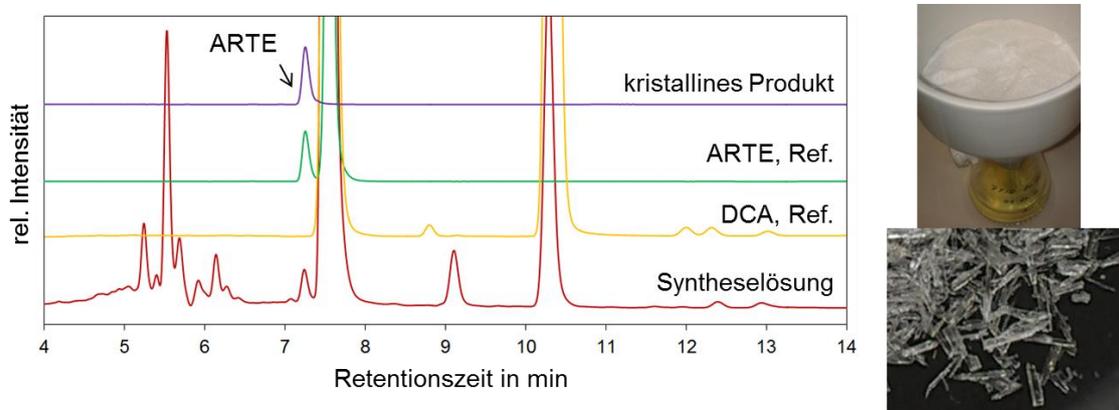


Abb. 6-16: HPLC-Chromatogramme (links) des kristallinen Produkts (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot). Fotografische und mikroskopische Aufnahmen des kristallinen Produkts (rechts).

Die photographische und mikroskopische Aufnahme des Filterkuchens bzw. der Kristalle in Abb. 6-16 zeigen den gewünschten weißen Produktfeststoff. Mittels HPLC wurde die Reinheit des gewonnenen Kristallisats auf über 99,9% ARTE-Gehalt bestimmt.

In Tabelle 6-6 ist eine Übersicht über die quantitativen Ergebnisse des Aufreinigungsprozesses von ARTE aus der Syntheselösung in reinem Toluol gegeben.

Tabelle 6-6: Ergebnisse der Kühlungskristallisation von ARTE aus der Syntheselösung in reinem Toluol.

Parameter	Prozessstart Menge	Prozessende Menge
Syntheselösung	73,5 g	
darin		
Toluol	50 g	
Synthesegemisch	23,5 g	
Gesamtfeststoffgehalt	31,9 Ma%	
ARTE-Gehalt	16,21 g / 22,05 Ma%	
DCA-Gehalt	0,12 Ma%	
Kristallisat		8,15 g
ARTE-Reinheit (HPLC-Messwert)		99,9 % / 8,15 g
ARTE-Ausbeute		50,2 % [#] (99 % [*])

[#] Gesamtproduktausbeute: $m(\text{ARTE im Produkt}) / m(\text{ARTE im Synthesegemisch}) * 100\%$

^{*} Anteil der thermodynamisch maximal möglichen Ausbeute η_{TD}

Es lässt sich ableiten, dass die Kühlungskristallisation in reinem Toluol die Isolierung von 99,9% reinem kristallinem ARTE in einem Trennschritt direkt aus der Syntheselösung ermöglicht. Aufgrund der höheren Aufkonzentrierung der Ausgangslösung bzgl. ARTE und der stärkeren Temperaturabhängigkeit der ARTE-Löslichkeit konnte in reinem Toluol bei gleicher Kühlprozedur nahezu die dreifache Produktmasse (d. h. höhere Produktivität) mit einer Ausbeute von über 50% im Vergleich zum 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch gewonnen werden. Auch hier ist die Verbesserung der Gesamtproduktausbeute z. B. über die weitere Kühlung der Arbeitslösung noch möglich. Aufgrund der in der Mutterlauge am Prozessende enthaltenen beträchtlichen ARTE-Menge in Toluol (etwa 8 g), könnte diese Lösung in die nächste Kühlungskristallisation zurückgeführt werden. Da die Mutterlauge bzgl. der Verunreinigungen angereichert ist, sollten dabei die möglichen Auswirkungen der Zurückführung dieser auf die Produktreinheit überprüft werden.

6.4 Diskussion der Ergebnisse

Mit dem Ziel, Artemisinin frei von Verunreinigungen in kristalliner Form unmittelbar aus der Produktlösung der kontinuierlich betriebenen photochemischen Reaktion zu gewinnen, wurde eine geimpfte Kühlungskristallisation in dem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch ausgelegt und durchgeführt. Mit dem vorgestellten Prozess wurde ARTE mit einer Reinheit von 98,8% und Ausbeute von 43,2% im kristallinen Produkt gewonnen. Als einzige Verunreinigung lag der Photokatalysator DCA mit dem Gehalt 1,2% im Endprodukt vor.

Davon ausgehend wurden Untersuchungen zur Erhöhung der Produktausbeute über Herabsetzung der Endtemperatur der Kühlung bzw. Erhöhung des Antisolventanteils im Prozesslösungsmittel durchgeführt. Insbesondere mit letzterem konnte eine deutliche Steigerung der ARTE-Ausbeute auf 73% erzielt werden. Jedoch haben diese Untersuchungen bestätigt, dass der Photokatalysator DCA die Hauptverunreinigung im ARTE darstellt. Daraufgehend wurden Möglichkeiten zur DCA-Eliminierung und damit zur Erhöhung der ARTE-Reinheit im Kristallinat untersucht.

In der Option wurde das mittels Kühlungskristallisation gewonnene 98,8% reine ARTE-Kristallinat in einem nachgeschalteten Downstream-Prozess auf 99,95% in Acetonitril-Lösung angereichert. Dabei blieb das über 99% reine DCA als kristalliner Filtrerrückstand zurück. Da 1g DCA (> 98% rein, Fa. TCI Chemicals) ca. 51,00 EUR kostet, bietet sich zur Senkung der ARTE-Herstellkosten an, den hiermit gewonnenen kristallinen Farbstoff und Katalysator in die ARTE-Synthese zurückzuführen.

In der zweiten Option wurde die Kombination von Gegenstrom-Flüssigchromatographie und Kühlungskristallisation zur Aufreinigung von ARTE aus der Syntheselösung untersucht. Dabei wurde mittels kontinuierlicher Chromatographie der Gehalt von DCA in der Originalsyntheselösung soweit herabgesetzt, dass in der darauffolgenden Kristallisation ARTE mit einer Reinheit von 99,9% hergestellt werden konnte. Die Resultate dieser Arbeiten sind in (Horvath, Horosanskaia et al. 2015) veröffentlicht.

Der letzte Trennprozess stellte die geimpfte Kühlungskristallisation von ARTE aus reinem Toluol dar. Aufgrund der vergleichsweise hohen Löslichkeit von DCA in Toluol, blieb es während der Kühlungskristallisation von ARTE untersättigt und verunreinigte das kristalline Produkt am Prozessende nicht. Somit konnte 99,9% reines Artemisinin mit einer Ausbeute von über 50% in einem Trennschritt im direkten Anschluss an die kontinuierliche Synthese gewonnen werden. Da die mit der konzipierten Kühlungskristallisation erzielte Gesamtproduktausbeute durch den Verlauf der Artemisinin-Löslichkeitskurve in Toluol begrenzt ist, kann eine Verbesserung dieser entweder über die Erhöhung der Ausgangskonzentration der Zielkomponente in der Lösung und/oder das

Herabsetzen der Endtemperatur des Kühlvorgangs in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Literatur zum Kapitel 6

- Chan KL, Yuen KH, Takayanagi H, Janadasa S, Peh KK (1997) Polymorphism of artemisinin from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 46(7):1209-1214 doi:Doi 10.1016/S0031-9422(97)00437-8
- Horosanskaia E, Seidel-Morgenstern A, Lorenz H (2014) Investigation of drug polymorphism: Case of artemisinin. *Thermochimica Acta* 578:74-81 doi:10.1016/j.tca.2013.12.019
- Horvath Z (2017) Kontinuierliche chromatographische Trennung gekoppelt mit kontinuierlich betriebenen Reaktoren und nachgeschalteten Trennprozessen, vol 48. Shaker Verlag GmbH, Aachen
- Horvath Z, Horosanskaia E, Lee JW, et al. (2015) Recovery of Artemisinin from a Complex Reaction Mixture Using Continuous Chromatography and Crystallization. *Organic Process Research & Development* 19(6):624-634 doi:10.1021/acs.oprd.5b00048
- ICH (2016) Guideline for Residual Solvents. In: ICH (ed) ICH Harmonised Guideline. vol Q3C(R6), Geneva, Switzerland, p 40
- Kaemmerer H (2012) New concepts for enantioselective crystallization, vol 32. Shaker Verlag GmbH, Aachen
- Kaemmerer H, Horvath Z, Lee JW, et al. (2011) Separation of Racemic Bicalutamide by an Optimized Combination of Continuous Chromatography and Selective Crystallization. *Organic Process Research & Development* 16(2):331-342 doi:10.1021/op200136z
- Klayman DL, Lin AJ, Action N, et al. (1984) Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia Annua* growing in the United States. *J Nat Prod* 47(4):715-717
- Kopetzki D, Levesque F, Seeberger PH (2013) A continuous-flow process for the synthesis of artemisinin. *Chemistry* 19(17):5450-6 doi:10.1002/chem.201204558
- Leban I, Golic L, Japelj M (1988) Crystal and molecular structure of qinghaosu - a redetermination. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica* 38(1):71-77
- Liu Y, Lu H, Pang F (2009) Solubility of Artemisinin in Seven Different Pure Solvents from (283.15 to 323.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 54(3):762-764 doi:10.1021/jc800515w
- Nti-Gyabaah J, Gbewonyo K, Chiew YC (2010) Solubility of Artemisinin in Different Single and Binary Solvent Mixtures Between (284.15 and 323.15) K and NRTL Interaction Parameters. *J Chem Eng Data* 55(9):3356-3363 doi:10.1021/jc100125x
- O'Brien AG, Horvath Z, Levesque F, Lee JW, Seidel-Morgenstern A, Seeberger PH (2012) Continuous synthesis and purification by direct coupling of a flow reactor with simulated moving-bed chromatography. *Angew Chem Int Ed Engl* 51(28):7028-30 doi:10.1002/anie.201202795
- WHO (2015) WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO technical Report Series 992(49):210

Aufreinigung von Rutin aus dem Pflanzenextrakt der *Sophora japonica* L.

Dieses Kapitel gibt eine detaillierte Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen zur kristallisationsbasierten Aufreinigung von Rutin aus dem Trockenextrakt der in Vietnam wachsenden Pflanze *Sophora Japonica* L. Wie im Kap. 4 vorgestellt, wird die Extraktion von Rutin in einer Fabrik in Vietnam als Batch-Verfahren unter Umgebungsbedingungen betrieben. Der Trennprozess von Rutin soll so ausgelegt werden, dass dieser als sukzessiver Schritt nach der Extraktion vor Ort in Vietnam eingesetzt werden kann. Mit dem Ziel, die Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt aus verfahrenstechnischer Sicht möglichst einfach, robust, aber auch kostengünstig zu gestalten, sollte neben der Batch-Kristallisation auch die Möglichkeit einer semikontinuierlichen Betriebsweise mit periodischen Produktabzug und Rohlösungszufuhr untersucht werden. Vor dem Hintergrund der Batch-Extraktion stand die Untersuchung eines vollständig kontinuierlichen Rutin-Aufreinigungsverfahrens nicht im Fokus dieser Arbeit.

Mit dem Ziel der Entwicklung einer kristallisationsbasierten Aufreinigung wurden zunächst die grundlegenden Untersuchungen zum Löslichkeits- und Keimbildungsverhalten von Rutin in Methanol, Ethanol und 2-Propanol durchgeführt. Die Identifizierung und Charakterisierung der auftretenden Festphasen des Rutins sowie die Bestimmung von Stabilitätsbereichen spielten bei der Prozessauslegung eine entscheidende Rolle. Basierend darauf wurde ein geeignetes Prozesslösungsmittel gewählt und der Kristallisationsprozess zunächst als Batch-Verfahren ausgeführt. Nach Optimierung der Prozessparameter, wie Anfangskonzentration und Übersättigung von Rutin in der Arbeitslösung, wurde der zunächst chargenweise durchgeführte Kristallisationsprozess auf die semikontinuierliche Betriebsweise erweitert sowie ein Up-Scaling des Prozesses durchgeführt.

Das entwickelte Trennverfahren zur Aufreinigung von Rutin wurde patentiert (Horosanskaia, Nguyen, Vu, Seidel-Morgenstern, Lorenz, "Method for purifying Rutin", VN 1-2016-01852) und der wesentliche Teil der hier vorgestellten Ergebnisse publiziert (Horosanskaia et al. 2017).

7.1 Charakterisierung des Trockenextrakts und Ableitung der Trennaufgabe

Zur Aufreinigung von kristallinem Rutin aus dem pflanzlichen Trockenextrakt wurde dieser zunächst bezüglich der Komponentenzusammensetzung sowie des Rutingehalts mittels analytischer HPLC untersucht. Zur Identifizierung und Quantifizierung kristalliner Extraktbestandteile wurde XRPD-Methode eingesetzt.

Ergebnisse der HPLC Analyse

Ein vom Trockenextrakt aufgenommenes HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 7-1 den Referenzproben Rutin und Quercetin gegenübergestellt.

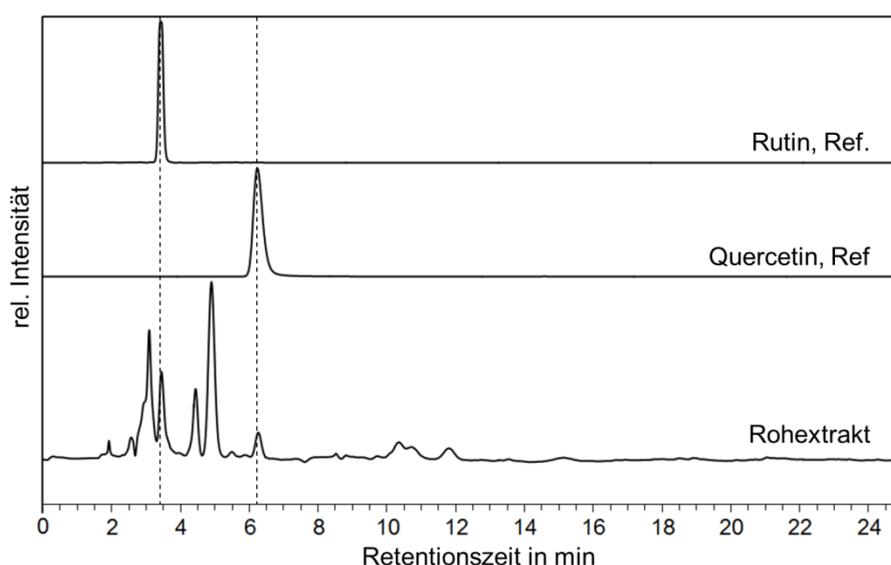


Abb. 7-1: Analytische HPLC-Chromatogramme des Rohextrakts, der Zielkomponente Rutin und der Verunreinigung Quercetin.

Zwei Peaks, detektiert jeweils bei 3,4 min und 6,2 min, konnten anhand der charakteristischen Elutionsprofile eindeutig der Zielkomponente Rutin sowie der Verunreinigung Quercetin zugeordnet werden. Die restlichen im Chromatogramm des Trockenextrakts aufgezeichneten Peaks konnten aufgrund der fehlenden Reinstoffreferenzen nicht identifiziert werden. Trotz der hohen Anzahl dieser Peaks, d. h. weiterer Komponente, stellt das Rutin mit 81%-Anteil den Hauptbestandteil des Rohextrakts dar.

Ergebnisse der XRPD Analyse

Seit Untersuchungen von (Perkin 1902) ist bekannt, dass das Rutintrihydrat ($\text{Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) die einzige unter Umgebungsbedingungen stabile kristalline Form des Rutins darstellt und wasserfreies Rutin, aufgrund seiner extremen Hygroskopizität, äußerst schwer herzustellen ist. Dennoch war in der Literatur keine Information zur Kristallstruktur des $\text{Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ zu finden. Aus diesem Grund wurde zunächst das Röntgenbeugungsmuster der käuflich erworbenen

Referenzprobe des Ru·3H₂O-Pulvers mittels XRPD aufgenommen und anschließend als Referenzdiffraktogramm für eigene Festphasencharakterisierung verwendet. Die vom Trockenextrakt sowie von Reinstoffen Rutintri-hydrat und Quercetindihydrat aufgezeichneten Röntgenpulverdiffraktogramme sind in Abb. 7-2 dargestellt.

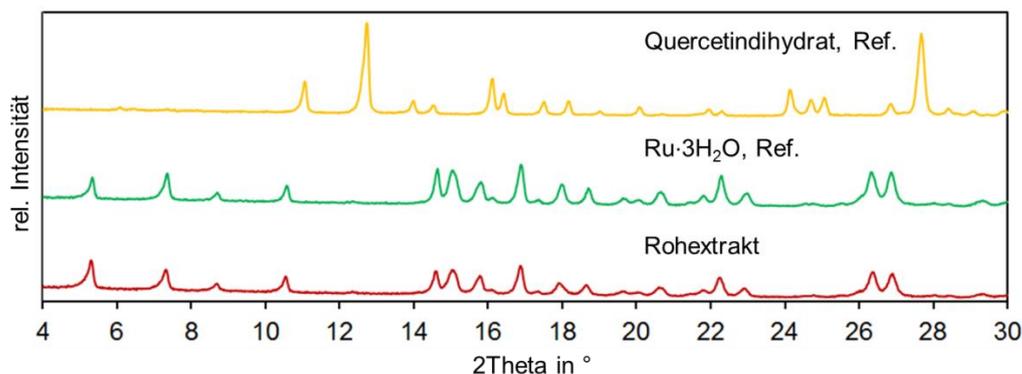


Abb. 7-2: Röntgenpulverdiffraktogramm des trockenen Rohextrakts (rote Linie) sowie der Referenzprobe des Rutintrihydrats, Ru·3H₂O (grüne Linie) und des Quercetindihydrats (gelbe Linie).

Wie zu sehen ist, stimmt das Röntgenbeugungsmuster des trockenen Rohextrakts mit dem des kristallinen Standards von Ru·3H₂O nahezu vollständig überein. Weitere mittels HPLC nachgewiesene Extraktbestandteile (Abb. 7-1) konnten über XRPD nicht identifiziert werden. Das könnte entweder am amorphen Zustand oder am geringen Gehalt dieser Komponenten im Rohextrakt liegen.

Untersuchung des Temperaturverhaltens des Ru·3H₂O mittels TG-DSC sowie temperaturaufgelöster XRPD

Zur genauen Quantifizierung des in der Referenzprobe des Ru·3H₂O vorhandenen Kristallwassers wurde die TG-DSC-Analyse durchgeführt. In Abb. 7-3 sind die mittels TG-DSC aufgezeichnete Wärmestromänderung (durchgezogene Linie) und der Massenverlust (gestrichelte Linie) der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Während des Probenaufheizvorgangs von 20°C auf 200°C wurden zwei endotherme Peaks im Verlauf der Wärmestromkurve beobachtet. Der erste breite Peak, welcher ein Peakmaximum bei 138°C aufwies, war begleitet mit einem kontinuierlichen Massenverlust der analysierten Probe. Während des zweiten endothermen Peaks mit einem Peakmaximum von 180°C blieb die Probenmasse nahezu unverändert. Höchstwahrscheinlich entspricht dieser Peak dem Schmelzvorgang des dehydratisierten Feststoffs. Die Masseabnahme der Probe erfolgte, nach den eingezeichneten Tangentenanstiegen zu beurteilen, in zwei aufeinanderfolgenden Stufen. Während der ersten Stufe zwischen 21,7°C und 120°C verlor die Probe etwa 3% ihrer Ausgangsmasse. Dieser Masseverlust

korreliert mit der Freisetzung eines im $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ schwach gebundenen Wassermoleküls. Die darauffolgende zweite Stufe mit steilerem anfänglichem Tangentenanstieg endet bei etwa 178°C und entspricht dem Verlust von zwei weiteren Wassermolekülen aus dem $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Gitter.

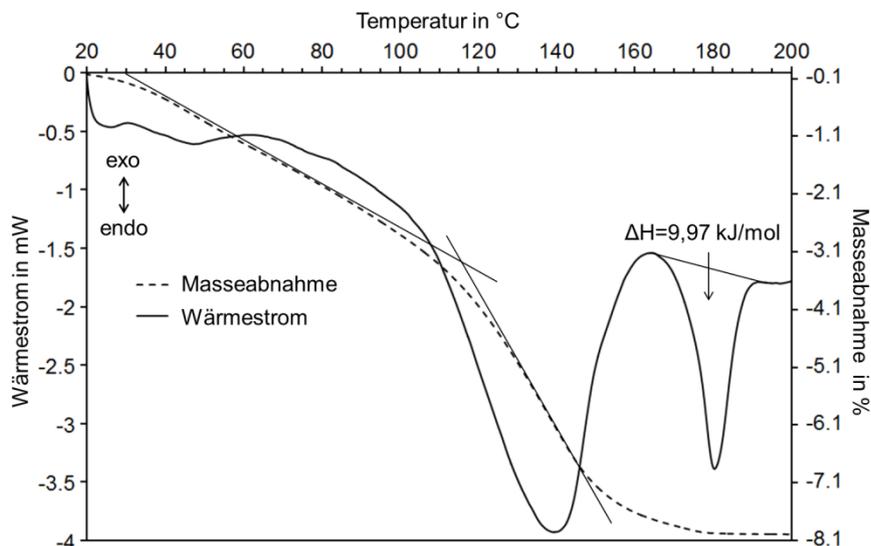


Abb. 7-3: Charakterisierung der Referenzprobe des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mittels TG-DSC: Änderung des Wärmestroms (durchgezogene Linie) und Änderung der Probenmasse (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der steigenden Temperatur.

Insgesamt wurde ein Masseverlust von 8% gemessen. Der Wert korreliert mit dem Verlust von drei Wassermolekülen pro Rutinmolekül, rechnerisch ermittelt als 8,13%. Dementsprechend stellt die vorliegende Rutin-Referenzprobe tatsächlich das kristalline $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mit dem in Abb. 7-2 gezeigten Röntgenbeugungsmuster dar.

Parallel zur TG-DSC Messung wurde das Temperaturverhalten des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mittels temperatur aufgelöster XRPD untersucht. In Abb. 7-4 sind die bei verschiedener Temperatur von der Probe aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogramme dargestellt.

Im Temperaturbereich zwischen 30°C auf 120°C , in welchem mittels TG-DSC die erste Stufe der Masseabnahme gemessen wurde, wurde eine Veränderung der Peak breiten und -höhen aller Röntgenreflexe sowie Verschmelzen (z. B. bei 2θ von zwischen 14° und 16°) bzw. Verschwinden kleinerer Röntgenreflexe (z. B. bei 2θ von 17°) beobachtet.

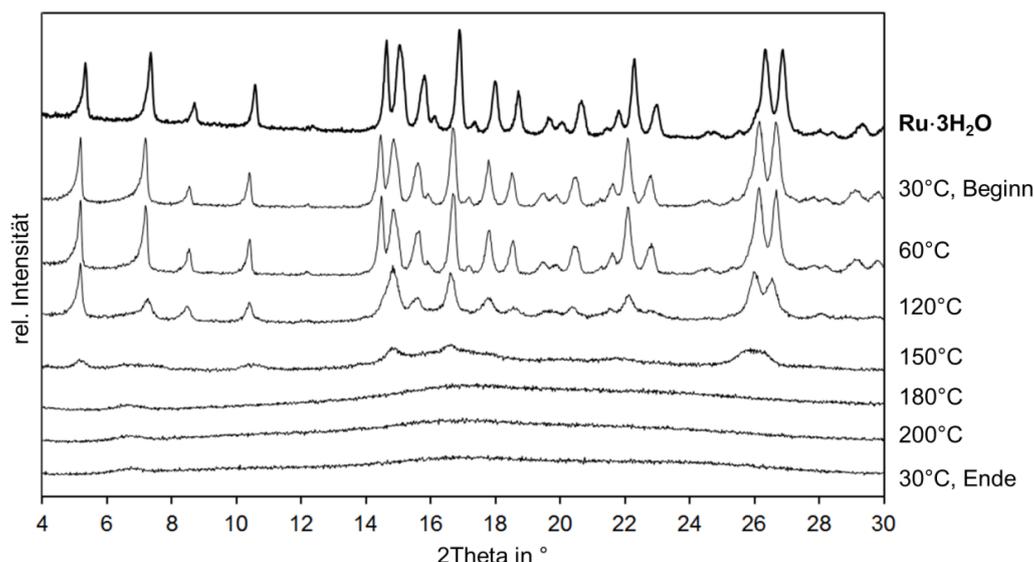


Abb. 7-4: Charakterisierung der Referenzprobe des Ru·3H₂O mittels temperaturlösender XRPD.

Weiteres Aufheizen der Probe bis auf 200°C führte zum vollständigen Schmelzen des Feststoffs. Da nach dem anschließenden Abkühlvorgang der Probe von 200°C auf die Umgebungstemperatur eine optisch glasige, plastifizierte Substanz auf dem XRPD-Probeträger vorlag, kann geschlossen werden, dass die Dehydratisierung zur vollständigen Amorphisierung des Feststoffs geführt hat. Nach (Wieckhusen and Beckmann 2013) wurde eine partielle oder vollständige Amorphisierung bei einer Reihe organischer Feststoffe als Resultat thermischer Desolvatisierung beobachtet. Demnach entspricht der mittels TG-DSC gemessene zweite endotherme Peak bei 180°C mit höherer Wahrscheinlichkeit der Amorphisierung und nicht dem Schmelzen der Probe.

Das hier beobachtete Temperaturverhalten von Ru·3H₂O bestätigte das von (Perkin 1902) publizierte Ergebnis, dass das wasserfreie Rutin in kristalliner Form unter diesen Bedingungen nicht stabilisiert werden kann. Da im Trockenextrakt Rutin als Trihydrat vorliegt, wurde der in ausreichender Menge zur Verfügung stehende Ru·3H₂O-Reinstoff als Ausgangsfeststoff für die anstehenden Untersuchungen des Löslichkeits- und Keimbildungsverhaltens von Rutin verwendet.

7.2 Wahl des Prozesslösungsmittels

Detaillierte Löslichkeitsdaten des wasserfreien Rutins in acht organischen Lösungsmitteln wurden von (Zi et al. 2007) bereits publiziert. Dabei wurde die geringste Löslichkeit von Rutin in Wasser mit 0,04 Ma% bei 40°C berichtet. Dagegen wurden insbesondere Alkohole, darunter 2-Propanol (2,7 Ma% bei 40°C), Methanol (7,09 Ma% bei 40°C) und Ethanol (7,31 Ma% bei 40°C), als

gute Lösungsmittel für wasserfreies Rutin bezeichnet. Basierend auf diese Angaben und auf den nach (ICH 2016) in pharmazeutischen Produkten zugelassenen hohen Restlösungsmittelgehalt von 3000 ppm Methanol sowie von je 5000 ppm Ethanol und 2-Propanol, wurden drei Alkohole und Wasser für die Untersuchungen zur kristallisationsbasierten Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt gewählt.

Bestimmung der Löslichkeit von $Ru \cdot 3H_2O$ mittels polythermer Methode

Das Löslichkeits- und Rekrystallisationsverhalten des zur Verfügung stehenden $Ru \cdot 3H_2O$ -Referenzfeststoffs in den drei Alkoholen wurde nach der im Kap. 5.1 beschriebenen polythermen Methode ermittelt. Wasser wurde ohne weitere Untersuchungen als potentielles Antisolvent für den zukünftigen Trennprozess berücksichtigt. Die erhaltenen Messwerte sind in Abb. 7-5 im Konzentrations-Temperatur-Diagramm aufgetragen. Da $Ru \cdot 3H_2O$ als Ausgangsphase für die Untersuchungen verwendet wurde, entsprechen die Löslichkeitswerte der sog. scheinbaren Löslichkeit des $Ru \cdot 3H_2O$ im jeweiligen Lösungsmittel.

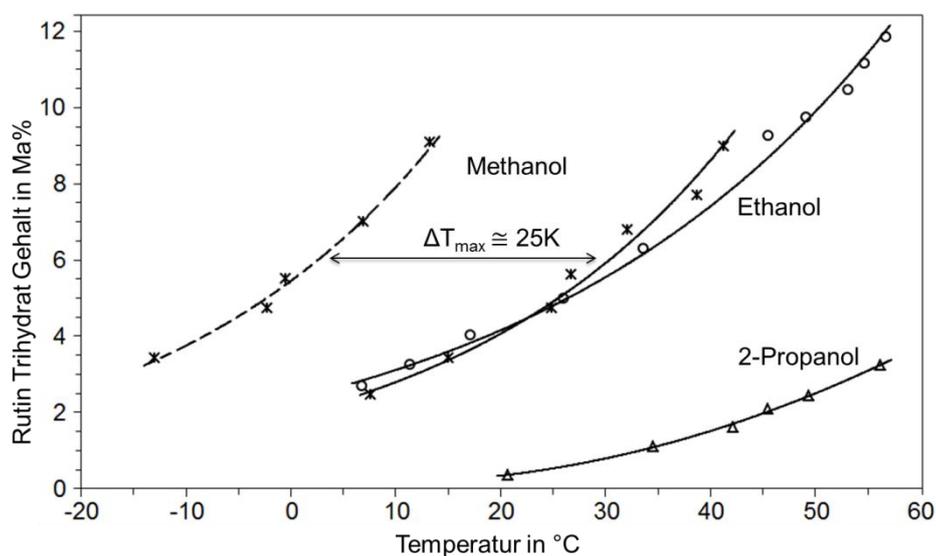


Abb. 7-5: Kurven der scheinbaren Löslichkeit (durchgezogene Linien) der Referenzprobe des $Ru \cdot 3H_2O$ in Methanol (*), Ethanol (○) und 2-Propanol (Δ) sowie die Überlöslichkeitskurve (gestrichelte Linie) von Rutinmethanolat in Methanol in Abhängigkeit von der Temperatur. Kennzeichnung: ΔT_{max} in K die Breite des metastabilen Bereichs von Rutinmethanolat in Methanol.

Wie die Abb. 7-5 zeigt, können bei 20°C etwa 4 Ma% $Ru \cdot 3H_2O$ in Methanol und Ethanol (jeweils) gelöst werden. Die zugehörigen Kurven der scheinbaren Löslichkeit weisen einen ähnlich steilen Anstieg mit zunehmender Temperatur auf. In 2-Propanol löst sich $Ru \cdot 3H_2O$ deutlich schlechter mit 0,3 Ma% bei 20°C und 3 Ma% bei 55°C.

Während des Abkühlvorgangs der vorliegenden klaren Rutin/Ethanol- bzw. Rutin/2-Propanol-Lösungen bis -15°C trat keine Keimbildung auf. Folglich wurde für diese Stoffsysteme die Breite des metastabilen Bereichs mit größer

als 40 K angenommen. In Abb. 7-5 ist ausschließlich die Keimbildungskurve für Rutin in Methanol aufgetragen, wobei die Breite des metastabilen Bereichs im untersuchten Temperaturbereich von 40°C bis -15°C ca. 25 K beträgt.

Die dabei gewonnene feste Phase des Rutins wurde mittels XRPD bzgl. ihrer Struktur charakterisiert. Das aufgezeichnete Röntgenbeugungsmuster stimmte weder mit dem des Ru·3H₂O-Referenzfeststoffs noch mit der in der Publikation von (Jin et al. 1990) beschriebenen Rutinpentamethanolatphase (Ru·5CH₃OH) überein. Unter Berücksichtigung der von (Krewson and Naghski 1952) und (Jin et al. 1990) veröffentlichten Ergebnisse ist die Ausbildung eines weiteren Rutinsolvats aus Methanol sehr wahrscheinlich. Da Methanol als Lösungsmittel der Klasse 2 (ICH 2016) im kristallinen Produkt unerwünscht ist, wurde auch von der genaueren Charakterisierung der gewonnenen kristallinen Rutin-Phase aus Methanol abgesehen.

Basierend auf die ermittelte starke Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Löslichkeit von Ru·3H₂O in Ethanol sowie dem extrem Breiten metastabilen Bereich (> 40 K) bot sich Ethanol als Prozesslösungsmittel für die geimpfte Kühlungskristallisation zur Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt an. Da aus Methanol kein Ru·3H₂O als feste Phase rekristallisiert wurde, wurde im Laufe isothermer Löslichkeitsuntersuchungen eine Phasenidentifizierung der im Gleichgewicht mit Ethanol stehenden festen Rutin-Phasen durchgeführt.

Bestimmung von Rutin-Sättigungskonzentrationen in Ethanol mittels isothermer Methode und Festphasenanalyse mittels XRPD

Aus dem vorliegenden Ru·3H₂O-Referenzfeststoff und Ethanol wurden Suspensionen hergestellt und bei konstanten Temperaturen von jeweils 5°C, 20°C und 40°C für 48 h equilibriert. Nach der Einstellung des thermodynamischen Fest/flüssig-Phasengleichgewichts wurden über PTFE-Aufsatzfilter (Porengröße 0,45 µm) Proben gesättigter klarer Rutin-in-Ethanol-Lösungen zur Rutingehaltsanalyse (mittels HPLC) entnommen.

Die in Abb. 7-6 im Konzentrations-Temperatur-Diagramm in rot dargestellte Sättigungskurve entstand aus der Verbindung der isotherm ermittelten Rutin-Sättigungskonzentrationen in Ethanol. Die zuvor polytherm ermittelten Werte der scheinbaren Löslichkeit von Ru·3H₂O in Ethanol (siehe Abb. 7-5) sind in Abb. 7-6 blau dargestellt. Dabei entspricht die Konzentrationsangabe von Rutin in Ma% auf der y-Achse der Konzentration des wasserfreien Rutins in Ethanol.

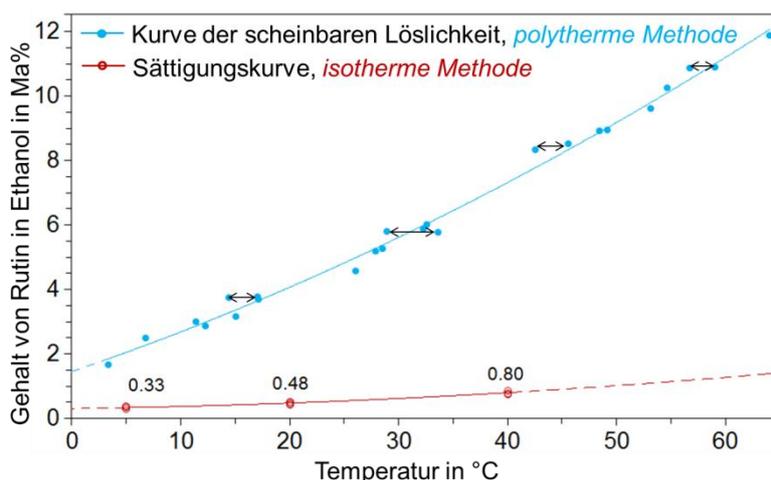


Abb. 7-6: Änderung der Sättigungskonzentration (rot, isotherm bestimmt) sowie der scheinbaren Löslichkeit (blau, polytherm bestimmt) von Rutin in Ethanol als Funktion der Temperatur.

Die isotherm gemessenen Sättigungskonzentrationen von Rutin in Ethanol (Abb. 7-6, rote Kurve) sind deutlich geringer als die polytherm ermittelten Werte der scheinbaren Löslichkeit des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Ausgangsfeststoffs (Abb. 7-6, blaue Kurve). Das vorgestellte Löslichkeitsverhalten weist auf die Ausbildung einer von $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ abweichenden kristallinen Phase des Rutins im thermodynamischen Gleichgewicht mit gesättigter Rutin/Ethanol-Lösung hin.

Das beobachtete Löslichkeitsverhalten soll anhand der Feststoffanalyse der im thermodynamischen Gleichgewicht mit Ethanol gebildeten kristallinen Phasen des Rutins mittels XRPD aufgeklärt werden. Das zugehörige Röntgenpulverdiffraktogramm ist in Abb. 7-7 dem des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Referenzfeststoffs gegenübergestellt.

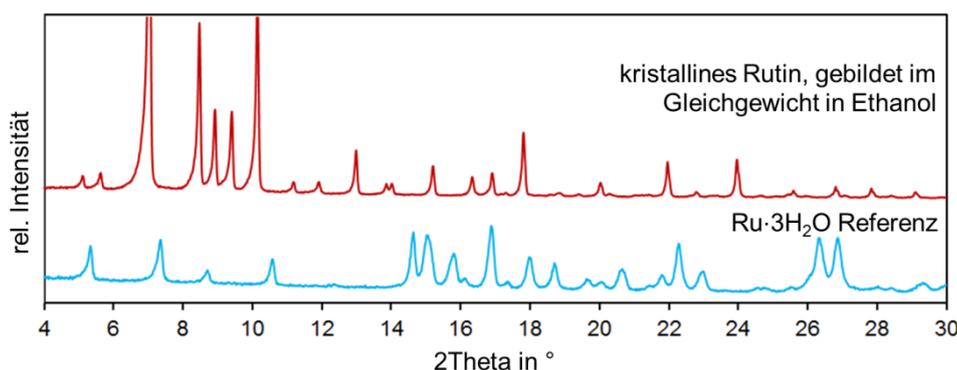


Abb. 7-7: Röntgenpulverdiffraktogramm der kristallinen Phase von Rutin gebildet in Ethanol im thermodynamischen Gleichgewicht (rot) sowie das Diffraktogramm der $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Referenzprobe (blau).

Aus dem direkten Vergleich der beiden Röntgenbeugungsmuster ist die Ausbildung einer vom Ausgangsfeststoff $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ abweichenden kristallinen Phase des Rutins offensichtlich. Insbesondere die Röntgenreflexe gemessen

bei 2θ von 5° , $5,6^\circ$, 7° , $8,5^\circ$, 9° , $9,5^\circ$ und $10,1^\circ$ sind für die im Gleichgewicht in Ethanol gebildete kristalline Phase des Rutin charakteristisch.

Wie in den photographischen und mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 7-8 ersichtlich, ist die Farbgebung und die Kristallmorphologie der vorliegenden kristallinen Phasen des Rutins ebenfalls unterschiedlich.

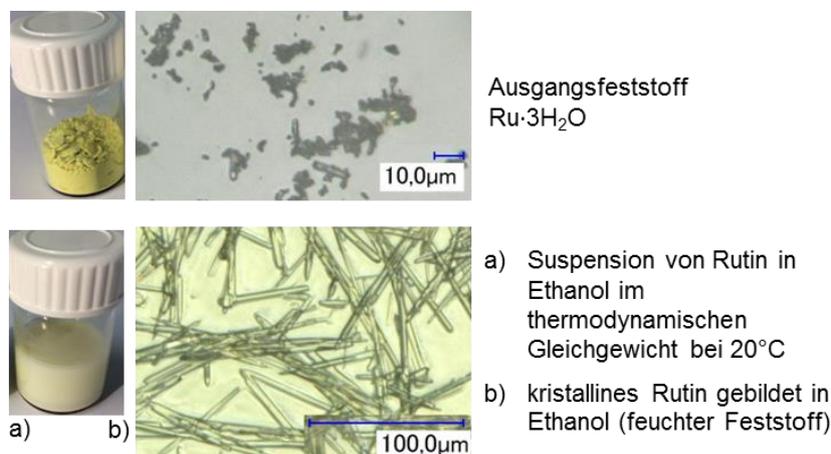


Abb. 7-8 Photographische sowie mikroskopische Aufnahmen des Ausgangsfeststoffs des Ru·3H₂O (oben) sowie des kristallinen Rutins, gebildet im thermodynamischen Gleichgewicht in Ethanol bei 20°C (unten).

Die kleinen Teilchen des Ru·3H₂O können leicht von den langen transparenten Nadeln der aus Ethanol erhaltenen kristallinen Rutin-Phase unterschieden werden.

Unter Berücksichtigung des Löslichkeits- als auch des Festphasenverhaltens von Rutin kann zusammengefasst werden, dass Ru·3H₂O (Abb. 7-7, blaue XRPD-Reflexe) die bei Umgebungsbedingungen in Luft stabile feste Phase von Rutin ist. Dagegen stellt die neue Rutin-Phase (Abb. 7-7, rote XRPD-Reflexe) die thermodynamisch stabile Form des Rutins in Gegenwart von Ethanol innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs dar.

Da die Ausbildung verschiedener Rutin-Solvate insbesondere aus Methanol, Aceton, Ethanol, 2-Propanol bereits 1952 von (Krewson and Naghski 1952) beschrieben wurde, ist die Ausbildung eines Rutin-Ethanol-Solvats während der isothermen Equilibrierung von Rutin/Ethanol-Suspensionen wahrscheinlicher als die eines Polymorphs.

Die zum Teil deutliche Abweichung der einzelnen gemessenen Löslichkeitswerte (bis zu 5 K) von der Kurve der scheinbaren Löslichkeit des Ru·3H₂O in Ethanol (Abb. 7-6, blaue Kurve) hängt möglicherweise mit einer nur partiellen Fest/fest-Phasenumwandlung des Ausgangsfeststoffs Ru·3H₂O zum in Ethanol stabilen Rutinethanolat (weiter Ru·nEtOH genannt) zusammen.

Untersuchungen zur Stabilität des Ru·nEtOH

Wie bereits im Kap. 3.5 erläutert, hat die Auswahl der unter den Lagerungsbedingungen thermodynamisch stabilen kristallinen Form einer pharmazeutischen Substanz für die Arzneimittelformulierung höchste Priorität. Ist dabei die Herstellung eines Wirkstoffsolvats unumgänglich, so werden üblicherweise stabile Wirkstoffhydrate den unter Lagerungsbedingungen metastabilen organischen Solvaten bevorzugt (Griesser 2006).

Stabilität des Ru·nEtOH unter Umgebungsbedingungen

Die aus der Rutin/Ethanol-Suspension isolierte feuchte kristalline Phase des Ru·nEtOH wurde auf den XRPD-Proben-träger appliziert und unter Umgebungsbedingungen mittels XRPD auf die Stabilität untersucht. Mit dem Ziel, die Fest/fest-Phasenumwandlung möglichst vollständig aufzunehmen, wurde der Röntgenscanbereich auf den repräsentativen 2Theta-Bereich von 4° bis 11° eingeschränkt und die Dauer eines einzelnen Durchlaufs auf 1 min verkürzt.

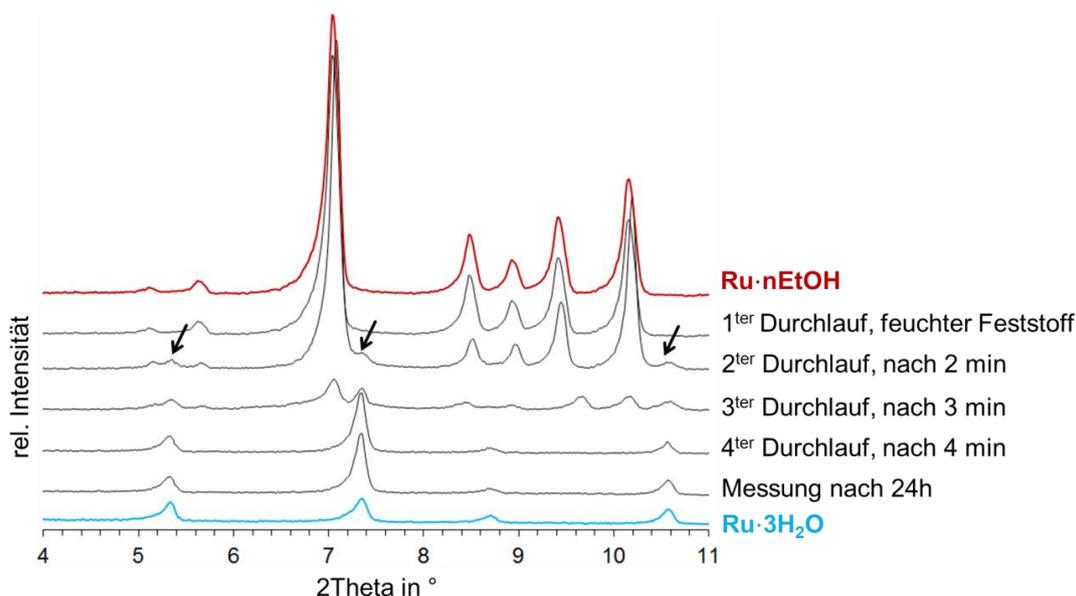


Abb. 7-9: Zeitlich aufgelöste XRPD-Messung der Fest/fest-Phasenumwandlung von dem in Ethanol im Gleichgewicht gebildeten Ru·nEtOH (rote Röntgenreflexe) zum unter Umgebungsbedingungen stabilen Ru·3H₂O (blaue Röntgenreflexe). Gescannt für 2Theta Winkeln von 4° bis 11°; Dauer eines Scandurchlaufs 1 min.

Wie die aufgenommene zeitliche Änderung der Röntgenreflexe des Ausgangsfeststoff Ru·nEtOH in Abb. 7-9 zeigt, erfolgt die vollständige Fest/fest-Phasenumwandlung des Ausgangsfeststoffs Ru·nEtOH zum Ru·3H₂O innerhalb von nur 4 min. Das nach 4 min am Ende des letzten Scandurchlaufs gebildete Ru·3H₂O lag auch 24 h später auf dem Probeträger vor, was die Stabilität des Rutintrihydrats unter Umgebungsbedingungen bestätigt.

Aus den Beobachtungen folgt, dass gebildetes Ru·nEtOH ausschließlich in der Ethanol-Umgebung stabil ist. Nachdem isoliertes feuchtes Ru·nEtOH der in der Umgebungsluft vorhandenen Feuchtigkeit ausgesetzt war, fand innerhalb

kürzester Zeit die Fest/fest-Phasenumwandlung des nun metastabilen $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ zum stabilen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ statt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungsergebnissen von (Perkin 1902) und (Krewson and Naghski 1952) überein. Nach einer aufwendigen Trocknung der aus Ethanol rekristallisierten Rutin-Phase hatte (Krewson and Naghski 1952) die Ausbildung eines Rutinpentaethanolats ($\text{Ru}\cdot 5\text{EtOH}$) vermutet. Aufgrund der vorgestellten extremen kurz-zeitigen Stabilität des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ unter Umgebungsbedingungen konnte die Anzahl der in das Rutin-Kristallgitter eingebauten Ethanolmoleküle mittels TG-DSC im Laufe dieser Untersuchungen nicht bestimmt werden. Somit wird das in der Ethanol-Lösung gebildete Rutinethanolat auch weiterhin mit $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ gekennzeichnet.

Ru·nEtOH-Stabilität in Abhängigkeit vom Wassergehalt in Ethanol-Lösungen

Wie bereits beschrieben, rekristallisiert Rutin aus reinem Ethanol in Form des Ethanololvats. Da der Reinheitsgrad von Ethanol im direkten Zusammenhang mit Lösungsmittelkosten steht, können durch den Einsatz technischen Ethanols die Gesamtprozesskosten deutlich verringert werden. Jedoch kann das im technischen Ethanol bis zu 6% enthaltene Wasser die Ausbildung des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ beeinträchtigen. Die Bestimmung des maximal zulässigen Wassergehalts im Ethanol für die Kristallisation von $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$, insbesondere im Hinblick auf einen möglichst einfachen, robusten und preiswerten Trennprozess zum Einsatz vor Ort in Vietnam, von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde dieser Zusammenhang im Vorfeld der Kristallisationsprozessauslegung untersucht.

Dazu wurden in 20 ml Glasgefäßen Suspensionen aus dem Standardfeststoff $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in verschiedenen Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemischen präpariert und bei konstanten 25°C bis zur Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts 14 Tage gerührt. Während dessen wurde täglich eine Probe des isolierten feuchten Feststoffs mittels XRPD auf die Identität untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass bei 25°C bis zu einem Wasseranteil von 6 Ma% in Ethanol das $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ die stabile kristalline Phase darstellt.

Die Abb. 7-10 demonstriert anhand der zeitlich aufgezeichneten Röntgenpulverdiffraktogramme die Fest/fest-Phasenumwandlung des Ausgangsfeststoffs $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ zum kristallinen $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ im 94/6 (Ma%/Ma%) Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch bei 25°C.

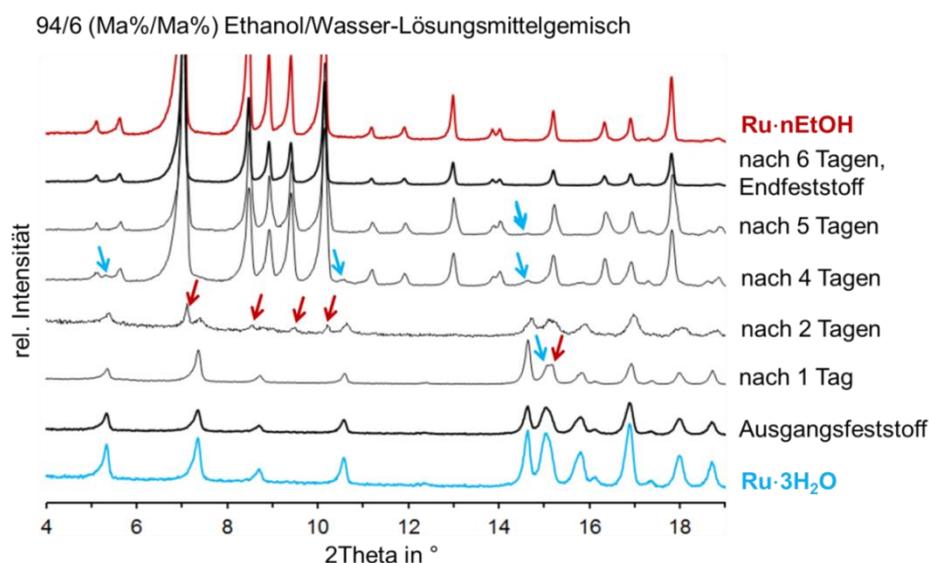


Abb. 7-10: Röntgenpulverdiffraktogramme des kristallinen Rutins gebildet im 94/6 (Ma%/Ma%) Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch bei 25°C innerhalb von 6 Tagen. Ausgangsfeststoff $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (blaues Referenzdiffraktogramm); Endfeststoff $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ (rotes Referenzdiffraktogramm).

Die Messung zeigt, dass die vollständige Fest/fest-Phasenumwandlung etwa 6 Tage beansprucht hat. Bereits nach den ersten 24 h wurde in den Röntgenreflexen des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ eine leichte Spaltung des Peaks bei 2Theta von 15° aufgenommen. Im Diffraktogramm des 2 Tage alten Feststoffs hat die Intensität der $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Reflexe sichtbar abgenommen und die für das $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ charakteristischen Reflexe bei 2Theta von 7°, 8,5°, 9,5° und 10,1° sind nun deutlich erkennbar. Somit lag bereits nach 2 Tagen ein Gemisch aus kristallinem $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in der Suspension vor.

Im Diffraktogramm des nach 4 Tagen analysierten Feststoffs waren überwiegend die Röntgenreflexe des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ enthalten und nach 6 Tagen war ausschließlich das $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in der Suspension vorhanden. In Suspensionen mit höherem Wasseranteil von 7%, 8% und 10% im Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch lag nach 14 Tagen des Equilibrierens der Ausgangsfeststoff $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ vor.

Aus diesen Beobachtungen wurde für den zukünftigen Trennprozess abgeleitet, dass technisches Ethanol, in welchem Wasser bis zu einem Anteil von etwa 6% vorliegt, als Prozesslösungsmittel für die Kristallisation von $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ ebenfalls geeignet ist.

7.3 Aufreinigungsprozess: Auslegung, Durchführung und Ergebnisse

Aufgrund der großen absoluten Löslichkeitsunterschiede beider Rutinsolvate in Ethanol, der starken Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und der vergleichsweise schwachen des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in demselben Lösungsmittel (Abb. 7-11) sowie des breiten metastabilen Bereichs von $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in Ethanol

(über 40 K, Abb. 7-5) wurde die geimpfte Kühlungskristallisation aus Ethanol zur Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt gewählt.

Ableitung des kristallisationsbasierten Aufreinigungsprozesses von Rutin

Wie schematisch in Abb. 7-11 gezeigt, teilen die Löslichkeitskurven beider Solvatphasen des Rutins in Ethanol, des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$, das Konzentrations-Temperatur-Diagramm in drei charakteristische Bereiche auf.

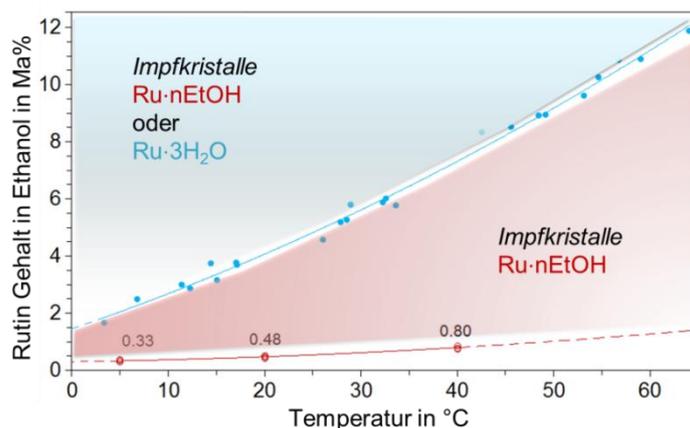


Abb. 7-11: Drei charakteristische Bereiche im Konzentrations-Temperatur-Diagramm von Rutin in Ethanol. Weißer Bereich: Lösung bzgl. beider Formen ($\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ und $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) unterschättigt; roter Bereich: Lösung bzgl. $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ übersättigt und bzgl. $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ unterschättigt; blauer Bereich: Lösung bzgl. beider Formen ($\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ und $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) übersättigt.

Der erste Bereich, in Abb. 7-11 weiß hinterlegt, gilt in dem untersuchten Temperaturbereich für alle Rutinkonzentrationen $< 0,8$ Ma% und ist durch die Sättigungslinie des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in Ethanol nach oben begrenzt. In diesem Bereich liegt eine bezüglich beider, $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$, unterschättigte Lösung vor. Innerhalb dieses Bereichs kann Rutin weder in Form von $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ oder $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ mittels Kühlungskristallisation aus dem gelösten in den kristallinen Zustand überführt werden.

Der zweite, rot markierte Bereich, befindet sich über der Sättigungslinie des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ und unter der scheinbaren Löslichkeitskurve des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in Ethanol. Hier kann ausschließlich $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ durch Animpfen der übersättigten Lösung mit Kristallen gleicher Art kristallisiert werden. Da die Löslichkeit des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in Ethanol (Abb. 7-11, rote Kurve) nur eine geringfügige Temperaturabhängigkeit aufweist, würde eine Kühlung der geimpften Arbeitslösung keine spürbare Erhöhung der Produktausbeute bewirken.

Der dritte, blau gekennzeichnete Bereich, befindet sich im Konzentrations-Temperatur-Diagramm oberhalb beider Löslichkeitslinien des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ in Ethanol. Das bedeutet, dass innerhalb dieses Bereichs eine bzgl. beider Rutinsolvate übersättigte Lösung vorliegt. Somit kann prinzipiell kristallines Rutin unter Verwendung der jeweiligen Impfkristalle, $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$, aus der übersättigten Rutin/Ethanol-Lösung gewonnen werden.

In reinem Ethanol ist jedoch ausschließlich $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ als feste Phase stabil. Demnach wird angenommen, dass nach der Zugabe von $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Impfkristallen zu einer entsprechenden Lösung eine sog. lösungsmittelvermittelte Fest/fest-Phasenumwandlung der metastabilen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Phase in die stabile $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ -Phase stattfinden wird. Damit stellt das $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ die einzige kristalline Phase, welche aus der übersättigten Ethanol-Lösung gewonnen werden kann, dar.

Kristallisationsbasierte Aufreinigung von Rutin aus dem Trockenextrakt

Die kristallisationsbasierte Aufreinigung von Rutin wurde ausgeführt in zwei Prozessschritten. Mit dem Ziel, eine möglichst hohe Produktmasse am Prozessende zu erhalten, diente der erste Prozessschritt der Bereitstellung einer konzentrierten Arbeitslösung aus dem aufzureinigenden Trockenextrakt in Ethanol. Im zweiten Schritt wurde eine geimpfte Kühlungskristallisation von Rutin durchgeführt.

Herstellung der Arbeitslösung

Da der Trockenextrakt neben den pflanzlichen Verunreinigungen zu über 85% aus $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ besteht, wurde die Ausgangskonzentration von Rutin in Ethanol so gewählt, dass zu Prozessbeginn eine bzgl. $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ untersättigte Lösung vorliegt. Gemäß Abb. 7-11 sollte dabei die Anfangskonzentration von Rutin in der Arbeitslösung im roten Bereich des c-T-Diagramms, d. h. oberhalb der Sättigungslinie des $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ und unterhalb der Kurve der scheinbaren Löslichkeit des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ liegen (siehe auch Abb. 7-13).

Wie Abb. 7-12 zeigt, wurde unter Rühren die entsprechende Menge des Trockenextrakts in Ethanol suspendiert und bei 50°C aufgelöst. Mit dem Ziel, eine partikelfreie Ausgangslösung für die geimpfte Kristallisation bereitzustellen, wurde die heiße Lösung über eine Nutsche (Filterpapierporengröße $0,6\ \mu\text{m}$) filtriert. Dabei wurden etwa 3,5% der in Ethanol unlöslichen Extraktbestandteile entfernt.

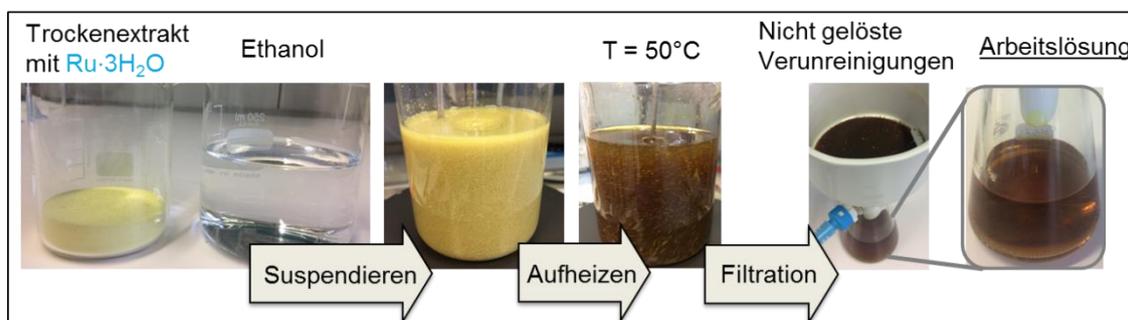


Abb. 7-12: Erster Prozessschritt: Herstellung der Arbeitslösung für die Kristallisation aus dem $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ haltigen Trockenextrakt in Ethanol.

Die so erhaltene klare, braun gefärbte Lauge (Abb. 7-12, rechts) stellte die Arbeitslösung für die Kristallisation dar.

Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation im Batch-Modus

Um die kristallisationsbasierte Aufreinigung von Rutin aus dem Rohextrakt semikontinuierlich mit periodischem Produktabzug und Rohlösungszufuhr zu gestalten, wurden in Batch-Vorversuchen die optimalen kristallisations-spezifischen Betriebsparameter festgelegt. Dabei wurde insbesondere untersucht, wie sich die Wahl der Impfkristallphase (entweder Ru·3H₂O-Pulver oder in Ethanol suspendiertes Ru·nEtOH) und die verschiedenen Ausgangskonzentrationen von Rutin in der Arbeitslösung auf die chemische und strukturelle Reinheit des Endprodukts sowie die Gesamtproduktausbeute auswirken.

Zunächst wurde der Einfluss der Impfkristallphase auf die Produktqualität beurteilt. Dazu wurden im ersten Prozessschritt ca. 260 g der Arbeitslösung mit einer Rutinkonzentration von 6,2 Ma% hergestellt. Die Arbeitslösung wurde geteilt und jeweils eine Hälfte in ein Glasgefäß zur Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation im zweiten Schritt überführt. Das Kristallisationsgefäß wurde mit einem Magnetrührer sowie einem Pt100-Widerstandsthermometer zur Temperaturkontrolle und -steuerung ausgestattet.

Wie in Abb. 7-13 mit grünen Pfeilen schematisch dargestellt ist, wurde jede dieser zwei Arbeitslösungen unter Rühren auf 25°C abgekühlt (Kühlrate 10 K/h).

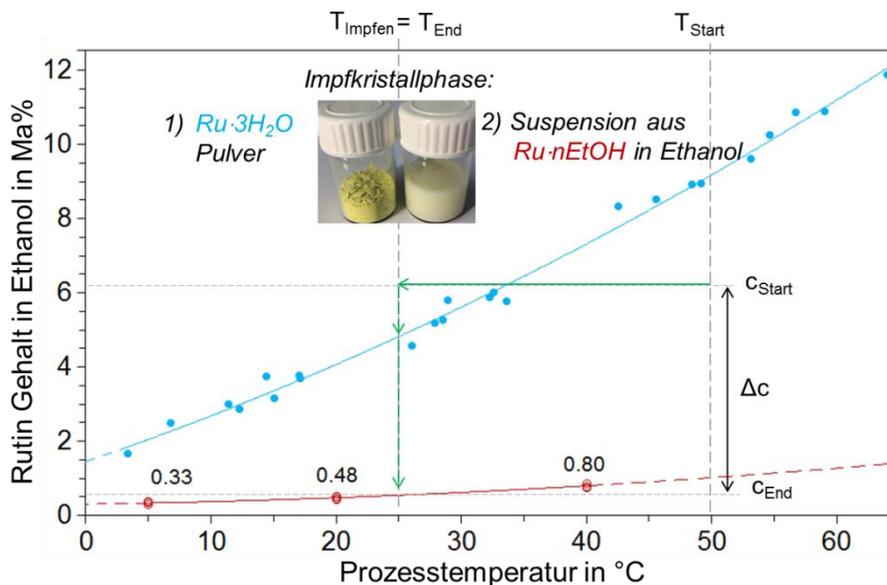


Abb. 7-13: Schematische Darstellung der Konzentrationsänderung von Rutin in der Arbeitslösung (grüne Pfeile) während der geimpften Kristallisation auf der Basis der scheinbaren Löslichkeit des Ru·3H₂O (blau) und der Löslichkeit des Ru·nEtOH (rot) in Ethanol. Indizes: c_{Start} und c_{End} die Ausgangs- und Endkonzentration von Rutin in Arbeitslösung; T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe; Δc Änderung der Rutinkonzentration in der Arbeitslösung am Prozessende.

Bei dieser Temperatur lag eine bzgl. beider Rutinsolvate übersättigte Ethanol-Lösung vor. Daraufhin wurde die Arbeitslösung bei konstanten 25°C im

Kristallisationsversuch Nr. 1 mit ca. 50 mg des pulverförmigen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Referenzfeststoffs und im Versuch Nr. 2 mit 1 ml der in Ethanol suspendierten $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ -Kristallen angeimpft (Abb. 7-13). Die Impfsuspension wurde im Laufe des isothermen Equilibrierens von $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Ausgangsfeststoff im Überschuss in Ethanol bei 25°C hergestellt und über eine Spritze dem Kristallisationsbehälter zugeführt.

Wie Abb. 7-14 zeigt, wurde unabhängig von der verwendeten Impfkristallphase kurze Zeit nach dem Animpfen der jeweiligen übersättigten Lösung zunächst ein Keimbildungsschauer und nach dem Ablauf weiterer 30 min die Ausbildung einer gelben flockig-pastösen Masse beobachtet.

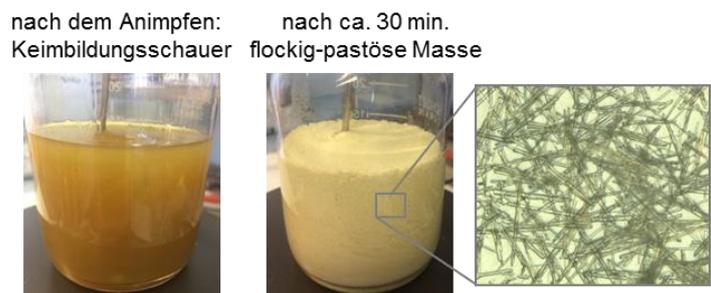


Abb. 7-14: Von links nach rechts: photographische Aufnahme des Keimbildungsschauers kurz nach dem Animpfen der Arbeitslösung sowie von der Produktsuspension nach ca. 30 min; mikroskopische Aufnahme der Produktkristalle.

Nach Betrachtung der Produktsuspension unter dem Mikroskop wurde deutlich, dass diese durch das „Ineinanderverhaken“ einer großen Anzahl gebildeter nadelförmiger Kristalle und durch den Einschluss der Mutterlauge in die Kristallzwischenräume stabilisiert wurde. Die Suspensionsdichte wurde dabei so hoch, dass eine homogene Durchmischung des Systems nicht mehr gewährleistet werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Versuche abgebrochen, die gewonnene Produktsuspension über Nutsche (Filterpapierporengröße $0,6\ \mu\text{m}$) filtriert und das Kristallisat nach dem Trocknen bei 40°C bzgl. der Rutin-Reinheit und -ausbeute analysiert.

Während des Filtriervorgangs der Produktsuspension wurden photographischen Aufnahmen des Filterkuchens gemacht. In Abb. 7-15 (links) ist die Aufnahme der Nutsche mit dem feuchten und lufttrockenen Kristallisat aus Versuch Nr. 1 beispielhaft gezeigt. Wie auf den Bildern zu sehen ist, fand während der Filtration eine Farbtonänderung des Produktfeststoffs von hell zu leuchtend gelb statt.

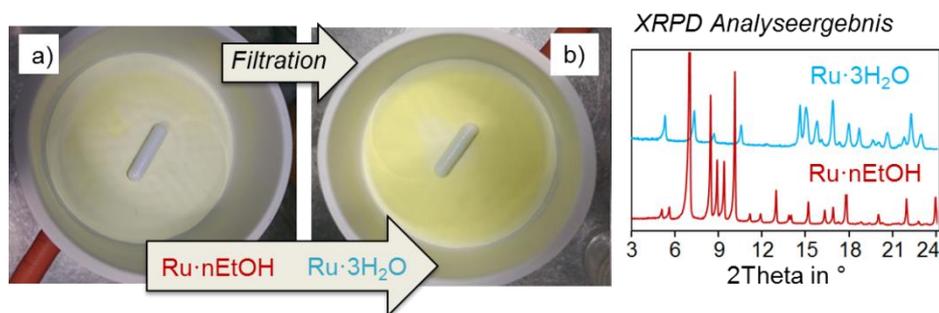


Abb. 7-15: Links: fotografische Aufnahme der Nutsche a) während der Filtration mit dem feuchten Produktfeststoff und b) nach dem Filtriervorgang. Rechts: Röntgenpulverdiffraktogramme des feuchten (rot) sowie des luftgetrockneten (blau) Produktfeststoffs.

Die parallel durchgeführte Röntgenstrukturanalyse des zugehörigen feuchten sowie luftgetrockneten Produktfeststoffs (Abb. 7-15, rechts) verdeutlicht, dass die erfasste Farbänderung des Filterkuchens mit der Fest/fest-Phasenumwandlung von zu Beginn des Filtriervorgangs vorliegenden $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ (Abb. 7-15, rotes Röntgenpulverbeugungsmuster) zu dem an der Luft stabilen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Abb. 7-15, blaues Röntgenpulverbeugungsmuster) verbunden ist. Diese Beobachtung stimmt mit der zuvor beschriebenen Stabilität der beiden Solvatphasen des Rutins überein.

Somit wurde unabhängig von der verwendeten Impfkristallphase ausschließlich das in Ethanol stabile $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ aus der jeweiligen übersättigten Rutin/Ethanol-Lösung als primäres Produkt gewonnen. Danach während der Filtration unter Einwirkung der Umgebungsluft wandelte sich das in Ethanol auskristallisierte $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ zum nun stabilen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ um. Dieser Feststoff stellte das finale kristalline Produkt beider Versuche dar.

Offensichtlich fand während des Kristallisationsversuchs Nr. 1 nach dem Animpfen der Arbeitslösung mit pulverförmigen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ eine lösungsmittelvermittelte Fest/fest-Phasenumwandlung von in Ethanol metastabilem $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ zum stabilen $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ statt. Die anschließende Präsenz des in Ethanol nahezu unlöslichen $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$ führte letztendlich zum beobachteten Keimbildungsschauer und der hohen Suspensionsdichte.

Die HPLC-Chromatogramme der jeweiligen Produkte in Abb. 7-16 zeigen, dass trotz der ungünstigen Eigenschaften beider Produktsuspensionen (schlechte Pump- und Fließfähigkeit, Filtrierbarkeit), das gewonnene kristalline $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ eine Reinheit von über 99% aufwies.

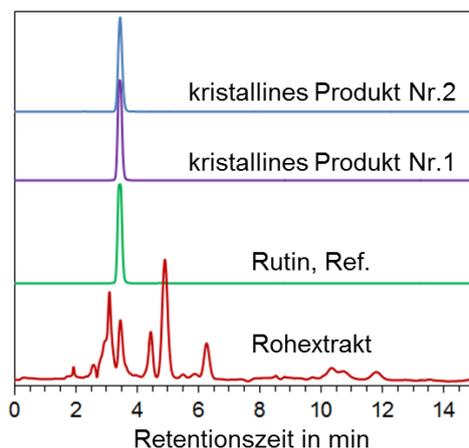


Abb. 7-16: Analytische HPLC-Chromatogramme der kristallinen Produkte aus den Versuchen Nr. 1 und 2 im Vergleich zu dem des Rohextrakts sowie der Rutin-Referenzprobe.

In Tabelle 7-1 sind die zur Herstellung der 260 g Arbeitslösung verwendeten Substanzmengen sowie die quantitativen Ergebnisse der beiden Kristallisationsversuche zusammengefasst.

Tabelle 7-1: Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats bei den Kristallisationsversuchen 1 und 2.

Parameter	Menge Ausgangsstoffe		
	gesamt	je 130 g Ausgangslösung	
Trockenextrakt	20,0 g		
Ethanol	240,0 g		
Gesamtfeststoffgehalt	7,7 Ma%		
Ausgangsmenge Ru·3H ₂ O (87,58%)	17,5 g	8,75 g	8,75 g
Rutin, Lösungsmittelfrei (81%)	16,2 g / 6,2 Ma%		
Nicht gelöste Verunreinigungen	0,64 g / 3,2 %		
		Endproduktmenge	
		1	2
Kristallisat mit Ru·3H₂O		8,38 g	8,42 g
Produkt Reinheit / Masse		99 % / 8,29 g	99 % / 8,33g
Gesamtproduktausbeute		94,7 % [#]	95,2 % [#]

[#] Gesamtproduktausbeute: $m(\text{Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O im Produkt}) / m(\text{Ausgangsmenge Ru} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) \cdot 100\%$

Aus den präsentierten Zahlenwerten lässt sich ableiten, dass mittels der vorgestellten geimpften Kühlungskristallisationen Rutin mit einer Reinheit von über 99% und einer Ausbeute von ca. 95% nahezu vollständig aus dem Pflanzenextrakt innerhalb einer Stufe abgetrennt werden konnte. Unabhängig von der eingesetzten Impfkristallphase wurde zunächst das in Ethanol schlechtlösliche Ru·nEtOH auskristallisiert, welches sich nach der Filtration zum unter Umgebungsbedingungen stabilen Ru·3H₂O umgewandelt hat. Letztendlich ist das gewünschte Ru·3H₂O das kristalline Endprodukt der beiden Prozesse.

Bestimmung der maximal zulässigen Übersättigung von Ru·nEtOH in der Arbeitslösung

Wie bereits beschrieben, verhinderte die am Prozessende vorliegende flockig-pastöse Produktsuspension aus Ru·nEtOH-Kristallen in Ethanol mit einer Dichte von etwa 31% (berechnet beispielhaft für Ru·5EtOH (Krewson and Naghski 1952) im Produktfeststoff) die weitere Prozessierbarkeit des Kristallisats.

Unter Berücksichtigung der Rutin-Ausgangskonzentration von 6,2 Ma% sowie der Sättigungskonzentration des Ru·nEtOH in Ethanol von 0,5 Ma% bei 25°C beträgt der Wert der relativen Übersättigung des Ru·nEtOH in der Arbeitslösung $\sigma = 11,4$ (berechnet nach Gl.3.4.2.6, Seite 19). Dieser Wert liegt deutlich über dem nach (Hofmann 2004) für ein kontrollierbares Kristallisationsprozess definiertes σ -Optimum zwischen 0,8 und 1, womit der aufgetretene Kristallisationsschauer und die gebildete dicke Produktsuspension zu erwarten waren.

Jedoch sind die Pump- und Fließfähigkeit sowie gute Filtrierbarkeit der Produktsuspension eine Voraussetzung für die Durchführung einer semikontinuierlichen Kristallisation mit periodischen Produktabzug und Rohlösungszugabe.

Mit dem Ziel, die Primärkeimbildung und das Impfkristallwachstum während des semikontinuierlichen Kristallisationsprozesses besser zu kontrollieren und gleichzeitig die maximale Ausbeute zu gewinnen, wurden drei weitere geimpfte Kühlungskristallisationen von Rutin in Ethanol nach dem Muster des Kristallisationsversuchs Nr. 2 unter Verwendung des in Ethanol suspendierten Ru·nEtOH als Impfkristallform im Batch-Modus durchgeführt. Dafür wurden die Ausgangskonzentrationen von Rutin in der Arbeitslösung zwischen 5 Ma%, 3 Ma% und 2 Ma% variiert und damit der Wert der relativen Übersättigung von Ru·nEtOH in der Lösung auf 9, 5 bzw. 3 reduziert.

Alle drei Versuche lieferten in Bezug auf die erzielte Produktreinheit (~ 99%) sowie Gesamtproduktausbeute (~ 95%) vergleichbar gute Endergebnisse. Jedoch konnte ausschließlich aus der Ausgangslösung mit dem geringsten Rutingehalt von 2 Ma% sowie der zugehörigen relativen Übersättigung des Ru·nEtOH von 3 eine Produktsuspension mit den gewünschten Prozesseigenschaften, wie leichte Durchmischbarkeit, Pumpfähigkeit und Filtrierbarkeit, gewonnen werden. Darauf basierend wurde die Ausgangskonzentration von Rutin in der Arbeitslösung für die weiterführende semikontinuierliche Kristallisation auf 2 Ma% gesetzt.

Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation im semikontinuierlichen Betrieb in einem 200 ml-Behälter

Die Abb. 7-17 präsentiert den schematischen Aufbau der für die semikontinuierliche Prozessführung verwendeten Kristallisationsapparatur. Die semikontinuierliche Prozessführung wurde umgesetzt mittels periodischer Entnahme der im Kristallisationsbehälter gewonnenen Produktsuspension und

gleichzeitiger periodischer Zugabe der vorgelegten Feed-Lösung. Die geimpfte Kühlungskristallisation wurde im temperierten 200 ml-Doppelmantelglasbehälter durchgeführt.

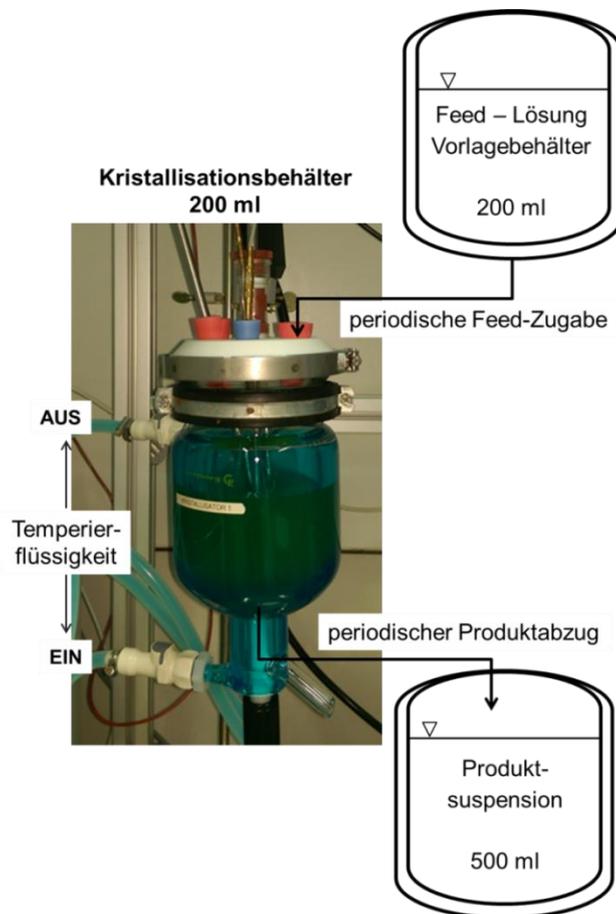


Abb. 7-17: Aufbau des semikontinuierlichen Kristallisationsprozesses in einem temperierten 200 ml-Doppelmantelglasbehälter mit periodischer Feed-Zugabe und periodischem Abzug der Produktsuspension.

Im ersten Prozessschritt wurde die Arbeitslösung wie in den vorhergehenden Versuchen hergestellt: die Suspension, bestehend aus 6,1 g des trockenen Rohextrakts und 240 g Ethanol, wurde unter Rühren auf 50°C aufgeheizt und der Anteil der in Ethanol unlöslichen Extraktbestandteile (ca. 3,6%) wurde abfiltriert. Anschließend wurde die hergestellte partikelfreie Arbeitslösung zweigeteilt.

Zum Anfahren des Kristallisationsprozesses wurde die eine Hälfte der Lösung in den Kristallisationsbehälter überführt, unter Rühren auf 25°C abgekühlt (10 K/h) und mit 1 ml Suspension aus Ru·nEtOH-Kristallen in Ethanol angeimpft. Aufgrund der sehr schwachen Temperaturabhängigkeit der Ru·nEtOH-Löslichkeit in Ethanol war keine weitere Kühlung des Systems notwendig. Somit wurde die Kristallisation bei konstanten 25°C durchgeführt. Nach Ablauf von 30 min wurde die erste Fraktion der gewonnenen Produktsuspension (ca. 40 ml) aus dem Kristallisationsbehälter entnommen und in den

dafür vorgesehenen Tank überführt. Zur selben Zeit wurde das gleiche Volumen der frischen Ausgangslösung (ca. 40 ml) aus dem Feed-Vorlagebehälter dem Kristallisationsbehälter zugeführt, sodass das anfängliche Lösungsniveau wieder erreicht war. Die im Kristallisationsbehälter verbliebenen $Ru \cdot nEtOH$ -Produktkristalle dienten als Impfkristalle und initiierten den weiteren Kristallisationsvorgang in der zugegebenen frischen Feed-Lösung ohne zusätzliche Impfkristallzufuhr.

Die Produktentnahme und Feed-Zugabe wurde so oft wiederholt, bis die vorgelegte Feed-Lösung vollständig aufgebraucht war. Am Ende des letzten Kristallisationsvorgangs wurde der Behälter in den Produktsuspensionstank entleert und die gesamte Produktsuspension filtriert.

Während der Filtration wurde die Fest/fest-Phasenumwandlung von aus der Ethanol-Lösung gewonnenem $Ru \cdot nEtOH$ zum unter Umgebungsbedingungen stabilen $Ru \cdot 3H_2O$ beobachtet (Abb. 7-18).

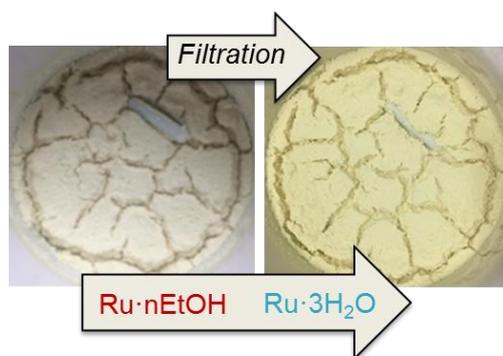


Abb. 7-18: Fest/fest-Phasenumwandlung von aus der Ethanol-Lösung gewonnenem $Ru \cdot nEtOH$ (links) zum unter Umgebungsbedingungen stabilen $Ru \cdot 3H_2O$ (rechts).

Das im Anschluss bei $40^\circ C$ getrocknete Kristallisat wurde bzgl. der Rutin-Reinheit und Gesamtproduktausbeute analysiert. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 7-2 zusammengefasst.

Tabelle 7-2: Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung für die semikontinuierliche Kristallisation im 200 ml-Maßstab sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats.

Parameter	Ausgangsstoffe Menge	Endprodukte Menge
Trockenextrakt	6,1 g	
Ethanol	240 g	
Gesamtfeststoffgehalt	2,47 Ma%	
Ausgangsmenge $Ru \cdot 3H_2O$ (87,58%)	5,34 g	
Rutin, Lösungsmittelfrei (81%)	4,94 g / 2,01 Ma%	
Nicht gelöste Verunreinigungen	0,22 g / 3,6 %	
Kristallisat mit $Ru \cdot 3H_2O$		4,69 g
Produkt Reinheit / Masse		99 % / 4,64 g
Gesamtproduktausbeute		86,8 % [#]

[#] Gesamtproduktausbeute: $m(Ru \cdot 3H_2O \text{ im Produkt}) / m(\text{Ausgangsmenge } Ru \cdot 3H_2O) * 100\%$

Mithilfe der semikontinuierlichen Kristallisationsprozessführung wurden 4,69 g des über 99% reinen Ru·3H₂O aus 6,1 g Trockenextrakt im kristallinen Produkt gewonnen. Die so erzielte Rutinausbeute von 87% bzgl. des im Rohextrakt zuvor vorliegenden Ru·3H₂O ist etwas geringer als die im Batch-Prozess erreichte. Die beobachteten Verluste der Rutinausbeute hängen höchstwahrscheinlich mit der nicht optimierten Verweilzeit der Impfkristalle bzw. Produktsuspension in der Arbeitslösung zwischen den periodischen Produktabzug und Feed-Zugabe zusammen.

Da die semikontinuierlicher Prozessführung kristallines Ru·3H₂O mit hohen Reinheit und Ausbeute lieferte wurde anschließend die Möglichkeit des Prozess-Up-Scalings von 200 ml auf 1 l-Behältervolumen untersucht.

Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation im semikontinuierlichen Betrieb in einem 1 l-Behälter

Zur Untersuchung des Up-Scalings der semikontinuierlichen Kristallisation von Rutin auf 1 l-Behältervolumen wurden etwa 2 l der 2,03 Ma% partikelfreien Arbeitslösung hergestellt. Eine Hälfte dieser Lösung wurde in den Kristallisationsbehälter zum Anfahren des Trennprozesses überführt, die andere im Feed-Vorlagebehälter aufgehoben. Der Prozess wurde nach demselben Muster, wie in 200 ml-Maßstab, durchgeführt. Nach dem Abkühlen der im Behälter vorgelegten Arbeitslösung auf 25°C wurde diese mit 2 ml Suspension aus Ru·nEtOH-Kristallen in Ethanol (doppelte Menge als in 200 ml-Maßstab) angeimpft. In etwa 50 min-Abständen wurden im Behälter ca. 250 ml der gewonnenen Produktsuspension periodisch gegen 250 ml Feed-Lösung ausgetauscht.

Um den Kristallisationsfortschritt von Rutin aus der Lösung zu erfassen wurde der Prozess mittels der ATR-FTIR- sowie FBRM-Inline-Sonde kontinuierlich verfolgt. Anders als bei Artemisinin, wurde hier die ATR-FTIR-Sonde ohne vorläufige Kalibrierung zur qualitativen Erfassung der Konzentrationsänderung von Rutin in der flüssigen Phase verwendet. Die FBRM-Sonde wurde zur Detektion des Animpfvorgangs und zur Verfolgung des Impfkristallwachstums eingesetzt.

Die im Laufe des semikontinuierlichen Kristallisationsprozesses mittels ATR-FTIR- sowie FBRM-Sonde aufgezeichneten Daten sind in Abb. 7-19 dargestellt.

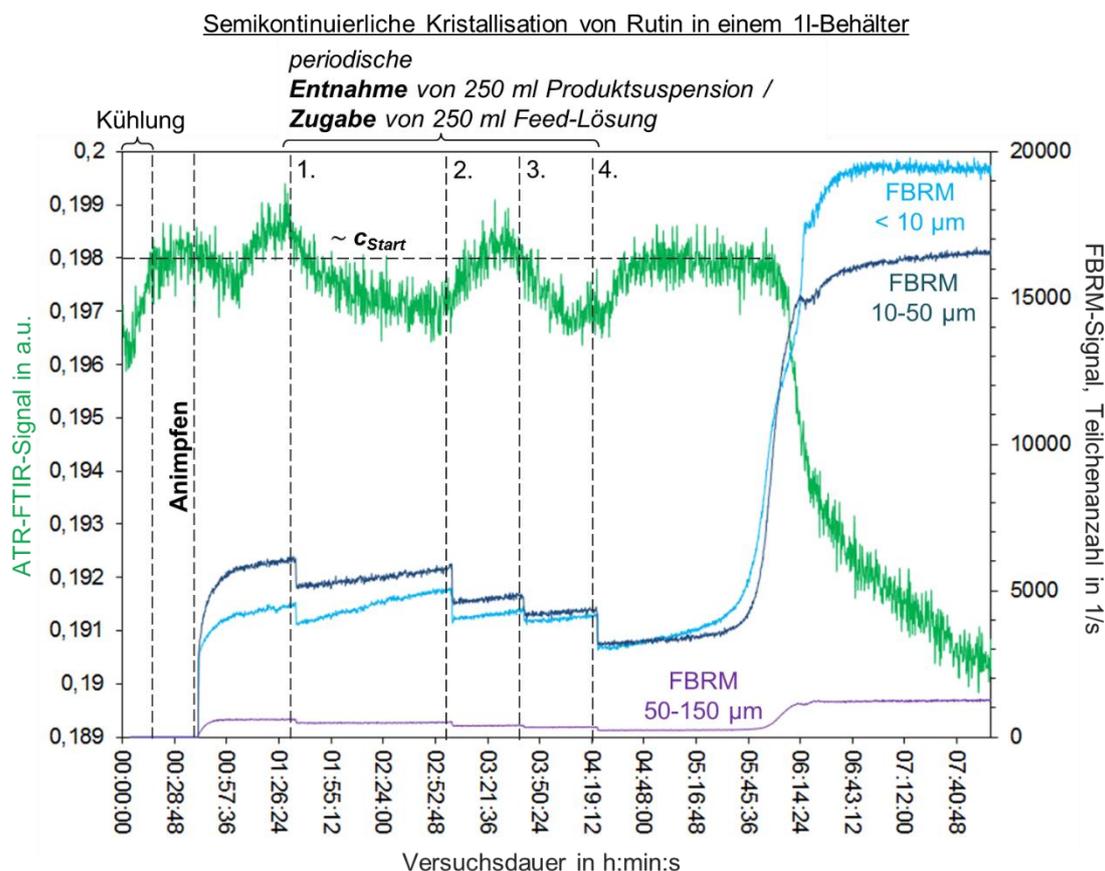


Abb. 7-19: Kontinuierliche Verfolgung der semikontinuierlichen Kristallisation von Rutin in 1l-Behälter. Das ART-FTIR-Signal (Peakhöhe zwischen 910 und 1000 cm^{-1}), gekennzeichnet mit der grünen Linie, zeigt die qualitative Konzentrationsänderung von Rutin in der flüssigen Phase. Das FBRM-Signal, gekennzeichnet mit den hell blauen, dunkel blauen und violetten Linien, zeigt die Änderung der Anzahl der Teilchen der Größe $< 10 \mu\text{m}$, $10\text{-}50 \mu\text{m}$ und $50\text{-}150 \mu\text{m}$. Die senkrechten gestrichelten Linien kennzeichnen Ende des Kühlvorgangs, den Zeitpunkt des Animpfens sowie der periodischen Produktentnahme und Feed-Zugabe.

Der gleich zu Prozessbeginn erfasste leichte Anstieg des ATR-FTIR-Signals von etwa 0,196 a.u. auf 0,198 a.u. (Abb. 7-19, grüne Linie) entspricht dem Abkühlvorgang der vorgelegten partikelfreien Arbeitslösung auf 25°C . Demnach steht der IR-Signalwert von etwa 0,198 a.u. qualitativ für die Startkonzentration von Rutin in der Arbeitslösung. Innerhalb der ersten 5,5 h der Inline-Prozessverfolgung lässt sich der Zeitpunkt des Animpfens sowie des periodischen Austausches der gewonnenen Produktsuspension gegen Feed-Lösung anhand der entsprechenden Signaländerung beider Sonden erkennen. Dennoch wurde mittels FBRM-Sonde ein sehr schwacher Anstieg der Teilchenanzahl und mittels ATR-FTIR-Sonde nur abschnittsweise eine Abnahme des Signals erfasst. Aufgrund der fehlenden Kalibration des IR-Messgerätes ließ sich in dem Versuchsabschnitt aus der qualitativen Signaländerung nicht eindeutig ableiten, wieviel Rutin aus der flüssigen in die kristalline Phase übergegangen ist. Da auch ca. 1 h nach der letzten Feed-Zugabe keine auf die Kristallisation hinweisende Signaländerung aufgezeichnet wurde, wurde die bisher aufgesammelte Produktsuspension (etwa 1 l) separat von dem im Behälter

verbliebenen Inhalt filtriert und das gewonnene kristalline Produkt bzgl. der Reinheit und Gesamtausbeute analysiert.

Währenddessen wurde die im Behälter verbliebene Suspension für weitere 2,5 h kontinuierlich verfolgt. Aus der im zweiten Versuchsabschnitt aufgezeichneten Signaländerung beider Inline-Sonden geht eindeutig hervor, dass sich der Kristallisationsvorgang etwa 1,5 h nach der letzten Zugabe der Feed-Lösung einsetzte. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die im ersten Versuchsabschnitt zwischen der periodischen Produktentnahme bzw. Feed-Zugabe gewählte Verweilzeit der Impf- bzw. Produktsuspension zu kurz war. Somit wurde eine geringere Produktausbeute aus der ersten Hälfte der Arbeitslösung erwartet.

Am Ende des zweiten Versuchsabschnitts wurde die restliche Produktsuspension (ca. 1 l) aus dem Behälter entnommen, ebenfalls filtriert und der gewonnene Kristallisat bezgl. der Rutin-Reinheit sowie -ausbeute analysiert.

Tabelle 7-3 enthält eine Übersicht über die für die Herstellung von 2 l Arbeitslösung benötigten Substanzmengen sowie über die erzielten Trennergebnisse. Die Ergebnisse sind dargestellt für den ersten semikontinuierlichen Versuchsabschnitt und für den verbleibenden Behälterinhalt bezogen auf je 1 l eingesetzter Arbeitslösung.

Tabelle 7-3: Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung für die semikontinuierliche Kristallisation im 1 l-Maßstab sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats.

Parameter	Menge Ausgangsstoffe		
	gesamt	semikonti.	Behälter
Trockenextrakt	41,07 g		
Ethanol	1.600 g		
Gesamtfeststoffgehalt	2,49 Ma%		
Ausgangsmenge Ru·3H ₂ O (87,58%)	35,96 g	17,98 g	17,98 g
Rutin, Lösungsmittelfrei (81%)	33,27 g / 2,03 Ma%		
Nicht gelöste Verunreinigungen	1,31 g / 3,2 %		
		Endproduktmenge	
		pro 1 l Produktsuspension	
Kristallisat mit Ru·3H₂O	22,35 g	5,24 g	17,11 g
Produkt Reinheit / Masse	99 % / 22,13 g	99 % / 5,2 g	99 % / 16,9 g
Gesamtproduktausbeute	62 %#	28,8 %#	93,9 %#

Gesamtproduktausbeute: $m(\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O im Produkt}) / m(\text{Ausgangsmenge Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}) \cdot 100\%$

Aus der Gegenüberstellung der Werte in Tabelle 7-3 ist ersichtlich, dass in beiden Versuchsabschnitten über 99% reines kristallines Rutin gewonnen wurde. Jedoch wurde im Laufe des ersten semikontinuierlichen Versuchsabschnitts lediglich 5,2 g Ru·3H₂O aus anfänglichen 17,98 g im Kristallisat erhalten. Im Gegensatz dazu wurde im letzten Versuchsabschnitt aus dem verbleibenden Behälterinhalt 16,9 g Ru·3H₂O aus derselben Ausgangsmenge

gewonnen. Diese Abweichung der Produktmassen bestätigt die Signalaufzeichnung während der Prozessverfolgung.

Die erzielten Trennergebnisse zeigen, dass die Herstellung von über 99% reines $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ semikontinuierlich auch im größeren 1 l-Behälter möglich ist. Wie im 200 ml-Behälter beobachtet, wurde im Laufe dieses Versuchs bestätigt, dass sich die Produktausbeute über die Erhöhung der Verweilzeit der Impfkristalle bzw. Produktsuspension in der Arbeitslösung zwischen den periodischen Produktabzug und Feed-Zugabe erhöhen lässt.

7.4 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der vorgestellten Untersuchungen war es zunächst, die Zielkomponente Rutin möglichst rein und in kristalliner Form aus dem in Vietnam hergestellten Trockenextrakt *Sophora Japonica* L. zu isolieren.

Aufgrund des bereits hohen Rutingehalts im pflanzlichen Extrakt von über 80% sowie der ermittelten starken Löslichkeitsunterschiede der zwei Solvatformen des Rutins ($\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ru}\cdot n\text{EtOH}$) in Ethanol, konnte das Rutin in Form des an der Umgebungsluft stabilen $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mit einer Reinheit von über 99% und 95% Ausbeute in einem Kristallisationsschritt erfolgreich von den restlichen Extraktbestandteilen abgetrennt werden.

Derzeit wird die Extraktion von Rutin als Batch-Verfahren in Vietnam betrieben, womit keine Notwendigkeit in der Entwicklung eines vollständig kontinuierlichen Kristallisationsverfahrens zur Rutinaufreinigung besteht. Aus diesem Grund wurde das Batch-Verfahren anschließend als semikontinuierlicher Prozess implementiert. Genauso wie der Batch-Prozess, lieferte die zunächst im 200 ml- und anschließend im 1 l-Maßstab durchgeführte semikontinuierliche Kristallisation 99% reines kristallines $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ einer geringeren Ausbeute von 87% bzw. 62%. Der letzte Versuch zeigte, dass sich der Kristallisationsfortschritt einer Zielkomponente aus komplexer Lösung mittels ATR-FTIR-Sonde auch qualitativ verfolgen lässt.

Nur auf der Basis der Reinstofflöslichkeitswerte und unter Berücksichtigung der Stabilitätsbedingungen der Rutinsolvate stellt der entwickelte Kristallisationsprozess ein vergleichsweise einfaches aber auch robustes und kostengünstiges Verfahren zur selektiven Gewinnung von Rutin aus dem Pflanzenextrakt dar. Die laufenden Prozesskosten können über den Einsatz des technischen Ethanol als Prozesslösungsmittel und über die Rückführung des Lösungsmittels reduziert werden. Der vorgestellte Trennprozess ist aus verfahrenstechnischer Sicht sehr attraktiv, da es keine strenge Kontrolle der Prozesstemperatur sowie der Rutinkonzentration in der aufzureinigenden Lösung bedarf und als sukzessiver Schritt nach der Extraktion vor Ort in Vietnam einsetzbar sein sollte. Jedoch bedarf das Up-Scaling des Prozesses

einer systematischen Optimierung der Verweilzeit der Impfkristalle bzw. der Produktsuspension.

Literatur zum Kapitel 7

- Griesser JU (2006) The Importance of Solvates. In: Hilfiker R (ed) Polymorphism in the Pharmaceutical Industry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Hofmann G (2004) Kristallisation in der industriellen Praxis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Horosanskaia E, Nguyen TM, Vu TD, Seidel-Morgenstern A, Lorenz H (2017) Crystallization-Based Isolation of Pure Rutin from Herbal Extract of Sophora japonica L. *Organic Process Research & Development* 21(11):1769-1778 doi:10.1021/acs.oprd.7b00247
- ICH (2016) Guideline for Residual Solvents. In: ICH (ed) ICH Harmonised Guideline. vol Q3C(R6), Geneva, Switzerland, p 40
- Jin G-Z, Yamagata Y, Tomita K-i (1990) Structure of rutin pentamethanol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 38(2):297-300 doi:10.1248/cpb.38.297
- Krewson CF, Naghski J (1952) Some Physical Properties of Rutin. *J Am Pharm Assoc Sci* 41(11):582-587 doi:10.1002/jps.3030411106
- Perkin AG (1902) Robinin, violaquercetin, myrticolorin, and osyritrin. *J Chem Soc* 81:473-480 doi:DOI 10.1039/ct9028100473
- Wieckhusen D, Beckmann W (2013) Downstream Processes. In: Beckmann W (ed) *Crystallization: Basic Concepts and Industrial Applications*. 1 edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p 275-288
- Zi J, Peng B, Yan W (2007) Solubilities of rutin in eight solvents at T=283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15K. *Fluid Phase Equilibria* 261(1-2):111-114 doi:10.1016/j.fluid.2007.07.030

Aufreinigung von Curcumin aus dem Pflanzenextrakt der *Curcuma longa* L.

In diesem Kapitel werden experimentelle Untersuchungen zur kristallisationsbasierten Trennung der Zielkomponente Curcumin aus einem, dem natürlichen Pflanzenextrakt ähnlichen Gemisch, bestehend aus Curcumin (Abk. CUR) sowie zwei wesentlichen strukturähnlichen Verunreinigungen, Demethoxycurcumin (Abk. DMC) und Bisdemethoxycurcumin (Abk. BDMC), vorgestellt. Mit dem Ziel, das geeignete Prozesslösungsmittel für die Kristallisation zu finden sowie die Art der Übersättigungserzeugung festzulegen, wird zunächst das Löslichkeits- und Keimbildungsverhalten des reinen CUR in fünf Lösungsmitteln (Aceton, Acetonitril, Methanol, Ethanol und 2-Propanol) und ausgewählten Lösungsmittelgemischen dieser untersucht. Zur Beurteilung des möglichen Einflusses der beiden Hauptverunreinigungen auf den erzielbaren Reinheitsgrad des CUR werden Untersuchungen zum Fest/flüssig-Phasenverhalten des reinen CUR in dem ternären Curcuminoid-Gemisch (Abk. CURD) und dem jeweiligen Lösungsmittel ergänzend durchgeführt. Alle dabei auftretenden kristallinen Phasen werden bezüglich ihrer Struktur charakterisiert. Darauf basierend werden Trennexperimente geplant, durchgeführt und die erzielten Produktreinheiten sowie Prozessausbeuten analysiert und diskutiert.

Da die zur Verfügung gestellte Rohextraktmenge (ca. 2 ml) für die Durchführung der Trennexperimente nicht ausreichend war, wurde dafür die pulverförmige Substanz von Fa. Sigma Aldrich exemplarisch verwendet.

8.1 Charakterisierung des Rohextrakts und der Referenzproben

Ermittlung von Komponentenzusammensetzung in den vorhandenen CURD-Mischproben mittels HPLC

Der vorliegende flüssige Rohextrakt wurde bezüglich der Komponentenzusammensetzung und des Curcuminanteils mittels HPLC charakterisiert. Das zugehörige Chromatogramm zusammen mit denen der Referenzproben des CUR, DMC und BDMC, CUR-Proben der Fa. Sigma Aldrich und Acros sowie der Probe eines CUR-Handelspräparats, sind Abb. 8-1 zu entnehmen.

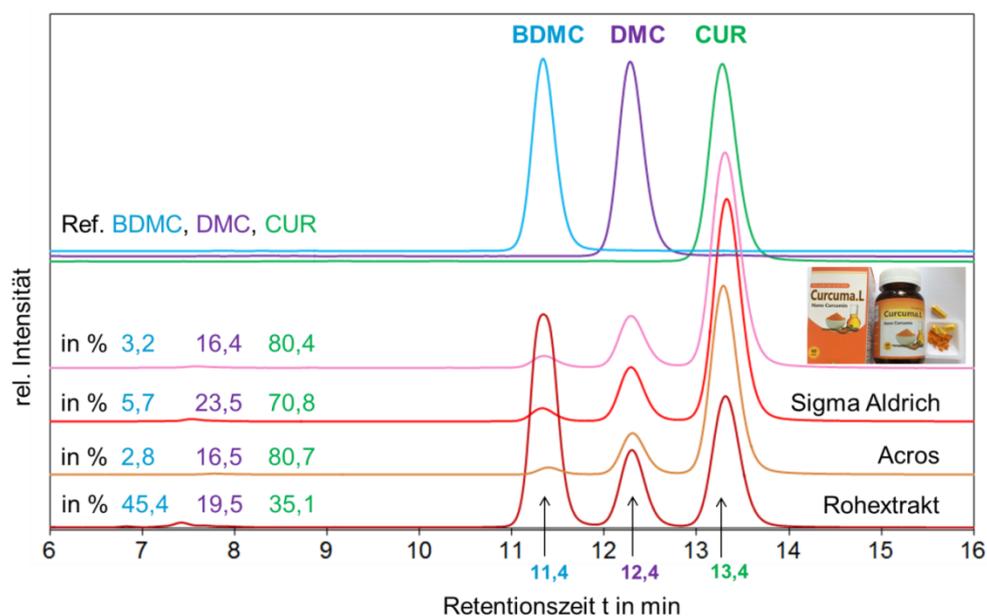


Abb. 8-1: Analytische HPLC-Chromatogramme der vorhandenen Curcumin-Referenzen der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange), der Referenzproben des CUR (Fa. TCI Chemicals) (grün), DMC (Fa. ChemFaces China) (violett) und BDMC (Fa. TCI Chemicals) (blau) sowie des Rohextrakts (weinrot) und Curcumin-Handelspräparates zur Nahrungsergänzung (Fa. Curcuma L.) (rosa).

Das Chromatogramm des Rohextrakts weist drei große Peaks bei 11,4 min, 12,4 min und 13,4 min und einen vergleichsweise kleinen Peak bei 7,4 min auf. Die drei Hauptpeaks können anhand der charakteristischen Retentionszeiten eindeutig den Substanzen BDMC, DMC und CUR zugeordnet werden. Gemäß der zuvor erstellten Kalibriergeraden besteht das Rohextrakt zu 45,4% aus BDMC, zu 19,5% aus DMC und zu 35,1% aus CUR. Die vierte Komponente, welche nach 7,5 min von der chromatographischen Säule eluiert und im Rohextrakt sehr gering konzentriert ist, konnte noch nicht identifiziert werden. Somit stellen die Curcuminoiden BDMC und DMC die Hauptverunreinigungen des CUR im Rohextrakt dar.

Ähnlich wie das Rohextrakt setzten sich die analysierten Proben der Fa. Sigma Aldrich und Acros qualitativ aus den drei bereits identifizierten Komponenten BDMC, DMC und CUR zusammen; hier stellt jedoch CUR mit über 70% den Hauptbestandteil der Gemische dar. Mit mehr als 16% repräsentiert DMC die Hauptverunreinigung in den Proben, wobei BDMC im einstelligen Konzentrationsbereich vorliegt. Auch das Vorhandensein der vierten Komponente mit dem charakteristischen Peak bei 7,5 min ist erkennbar. Da der Gehalt dieser Komponente in analysierten Mischproben vernachlässigbar klein gegenüber den drei CURD ist, werden diese Gemische in weiteren Untersuchungen auf pseudo-ternäre Trennprobleme reduziert. Bei Betrachtung des von der Probe des CUR-Handelspräparats aufgezeichneten Chromatogramms fällt auf, dass sich die Zusammensetzung mit 80,4% CUR, 16,4% DMC und 3,2% BDMC nur

gering vom Feststoff der Fa. Acros unterscheidet. Die Zulassung des vorgestellten CUR-Präparats mit 80% CUR-Anteil zum Handel lässt sich damit erklären, dass dem DMC und BDMC bis jetzt keine toxische Wirkung auf den menschlichen Körper nachgewiesen wurde. Dennoch ist es erstrebenswert die Reinheit des im jeweiligen Arzneimittel formulierten CUR zu erhöhen, um die chemische Belastung des menschlichen Organismus so gering wie möglich zu halten (Kühn and Schmidt 2017).

Laut Untersuchungen von (Poornima et al. 2016; Ruby et al. 1995) weist BDMC in tierischen Zellen eine stärkere zytotoxische Wirkung und somit höhere antikarzinogene Aktivität als CUR und DMC auf. Das weist darauf hin, dass neben CUR zukünftig auch die Bereitstellung von BDMC in reiner Form für die jeweilige pharmazeutische Anwendung an Bedeutung gewinnen wird.

Charakterisierung der kristallinen Standard- und Mischproben des CUR mittels DSC und XRPD

Aufgrund des in der Literatur (Gately and Triezenberg 2012; Mishra et al. 2014; Sanphui et al. 2011; Thorat and Dalvi 2015; Tonnesen et al. 1982) beschriebenen komplexen Festphasenverhaltens des CUR, welches in der Lage ist, sowohl mehrere Polymorphe als auch Solvate auszubilden, wurden die für diese Untersuchungen zur Verfügung stehenden Feststoffe (Reinstoffe des CUR, DMC und BDMC, sowie Mischproben der Fa. Sigma Aldrich und Acros) anhand ihrer Schmelzpunkte und Röntgenpulverbeugungsmuster charakterisiert.

Untersuchung des Schmelzverhaltens mittels DSC

Die zugehörigen Schmelzkurven sind in Abb. 8-2 im Temperatur-Wärmestrom-Diagramm aufgetragen. Da beim Aufheizvorgang der analysierten Proben bis 145°C keine messbaren Änderungen der Wärmeströme aufgezeichnet wurden, ist die Temperaturachse für $\vartheta > 145^\circ\text{C}$ dargestellt.

Die Schmelzkurven der mittels HPLC als Reinstoffe charakterisierten Proben des DMC, CUR und BDMC weisen einen scharfen endothermen Peak bei jeweils 179°C, 184°C und 226°C auf, was eindeutig dem Schmelzvorgang des jeweiligen Feststoffs zugeordnet werden kann. Die zugehörigen Schmelzwärmen betragen jeweils 43,6 kJ/mol, 51,5 kJ/mol und 33,3 kJ/mol.

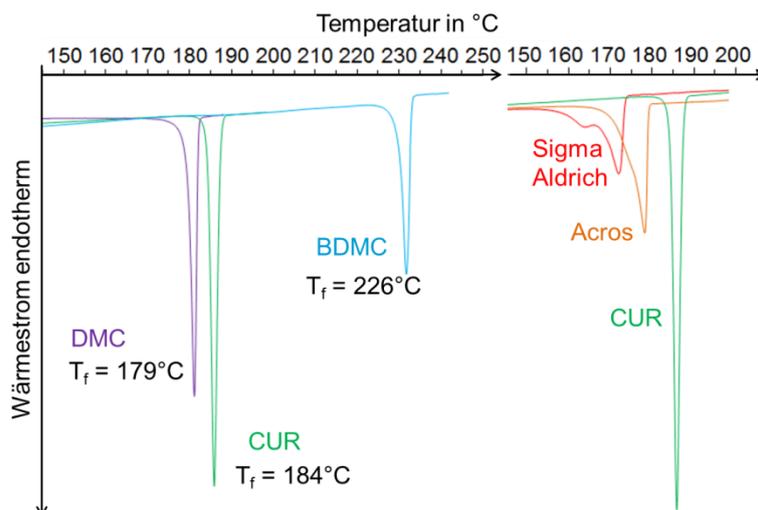


Abb. 8-2: Schmelzkurven der Reinstoffe des CUR (grün), DMC (violett) und BDMC (blau) sowie der vorhandenen Referenzproben der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange).

Die mit 184°C gemessene Schmelztemperatur des CUR entspricht dem Literaturwert der unter Umgebungsbedingungen stabilen Form I (Liu et al. 2015; Sanphui et al. 2011). Mit 226°C stellt BDMC das am höchsten schmelzende CURD dar. Dieser Wert zeigt ebenso eine gute Übereinstimmung mit dem publizierten Messergebnis (Liu et al. 2015; Naama et al. 2012; Péret-Almeida et al. 2005). Der hier gemessene DMC Schmelzpunkt von 179°C liegt 7 K über dem in der Literatur angegebenen Wert von (Naama et al. 2012; Péret-Almeida et al. 2005) und 19 K über dem von (Pothitirat and Gritsanapan 2005) gemessenen. Aus der zugehörigen Publikation lässt sich herauslesen, dass der für die Schmelzpunktanalyse verwendeter DMC-Reinstoff mittels präparativen Flüssigchromatographie (Péret-Almeida et al. 2005) bzw. Dünnschichtchromatografie (Pothitirat and Gritsanapan 2005) aus dem CURD-Gemisch gewonnen wurde. Da keine Schmelzkurven die publizierten Messergebnisse unterstützen, wird angenommen, dass DMC, genauso wie CUR, in der Lage ist, verschiedene kristalline Formen auszubilden. Ferner fällt auf, dass die Probe des CUR-Referenzfeststoffs 5 K über dem DMC-Referenzfeststoff schmilzt. Diese geringe Schmelzpunktdifferenz lässt sich aus der strukturellen Ähnlichkeit der beiden CURD ableiten. Aus der relativen Zunahme der CURD-Schmelztemperaturen von DMC über CUR bis hin zu BDMC kann eine Löslichkeitsabnahme von DMC über CUR zu BDMC vermutet werden (Yalkowsky 1981).

Die von den Mischproben der Fa. Acros und Sigma Aldrich gemessenen Schmelzkurven sind in Abb. 8-2 (rechts) der Schmelzkurve des reinen CUR gegenübergestellt. Die Mischprobe der Fa. Acros weist einen breiten endothermen Peak mit einem Maximum bei 171°C auf, welches 10 K unter dem Schmelzpunkt des CUR liegt. Die Mischprobe der Fa. Sigma Aldrich reprä-

sentiert im Temperaturbereich zwischen 150°C und 174°C einen endothermen Doppelpeak, mit einem Hauptpeak bei 167°C und Nebenpeak bei 163°.

Die bei beiden Mischproben beobachtete Verschiebung der Schmelzereignisse zu niedrigen Temperaturen sowie eine Zunahme der Peakbreite korreliert mit der zuvor mittels HPLC ermittelten geringeren Reinheit der Substanzen. Diese nimmt vom Reinstoff CUR über die Mischprobe der Fa. Acros bis hin zu Fa. Sigma Aldrich um ca. 30% zugunsten von DMC sowie geringfügig von BDMC ab. Da der DMC-Anteil in der Mischprobe der Fa. Sigma Aldrich am höchsten ist, entspricht der bei 167°C gemessene Nebenpeak möglicherweise dem Schmelzpunkt der eutektischen DMC/CUR-Zusammensetzung. Dieser lässt unter Verwendung der ermittelten Reinstoffschmelzdaten aus dem Schnittpunkt der zugehörigen Liquiduslinien nach Schröder-van-Laar-Gleichung (Gl. 3.4.1b) zu 156°C berechnet.

Charakterisierung der Feststoffe mittels XRPD

Die Charakterisierung der kristallinen Reinstoffe des CUR, BDMC und DMC sowie die Qualifizierung und Quantifizierung kristalliner Verunreinigungen in den Mischproben der Fa. Acros und Sigma Aldrich wurden mithilfe der XRPD durchgeführt. In Abb. 8-3 sind die aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogramme zusammengefasst.

Die zuvor mittels HPLC analysierten Reinstoffe des CUR (Abb. 8-3, grüne Reflexe), DMC (Abb. 8-3, violette Reflexe), und BDMC (Abb. 8-3, blaue Reflexe) zeigen charakteristische Röntgenreflexe, durch die sie eindeutig voneinander unterschieden werden können. Das gemessene Diffraktogramm des CUR-Reinstoffs stimmt mit der kristallinen Struktur der stabilen Form I überein. Zu den Kristallstrukturen von DMC und BDMC ist in der Literatur keine Information zu finden. Aufgrund der gemessenen hohen HPLC-Reinheit der beiden CURD wurden die hier gezeigten Diffraktogramme als Vergleichsreferenzen für alle darauffolgenden Festphasenanalysen genommen.

Die von den Mischproben der Fa. Acros (Abb. 8-3, orange Reflexe) und Sigma Aldrich (Abb. 8-3, rote Reflexe) aufgezeichneten Diffraktogramme sind, ungeachtet der kleinen Abweichungen in Reflexhöhen, nahezu deckungsgleich. Obwohl diese Proben mittels HPLC zuvor als ternäre CURD-Gemische identifiziert wurden, sind in den aufgenommenen Diffraktogrammen keine dem BDMC bzw. DMC zuzuordnenden Reflexe zu finden. Dagegen scheinen sie auf den ersten Blick mit dem Diffraktogramm des CUR-Reinstoffs (Abb. 8-3, grüne Reflexe) komplett übereinzustimmen. Eine minimale Verschiebung der Reflexe der Mischproben im Vergleich zum Diffraktogramm des CUR-Standards zu höheren Winkeln, z. B. bei 2Theta von 9° bzw. 17,3°, ist angedeutet.

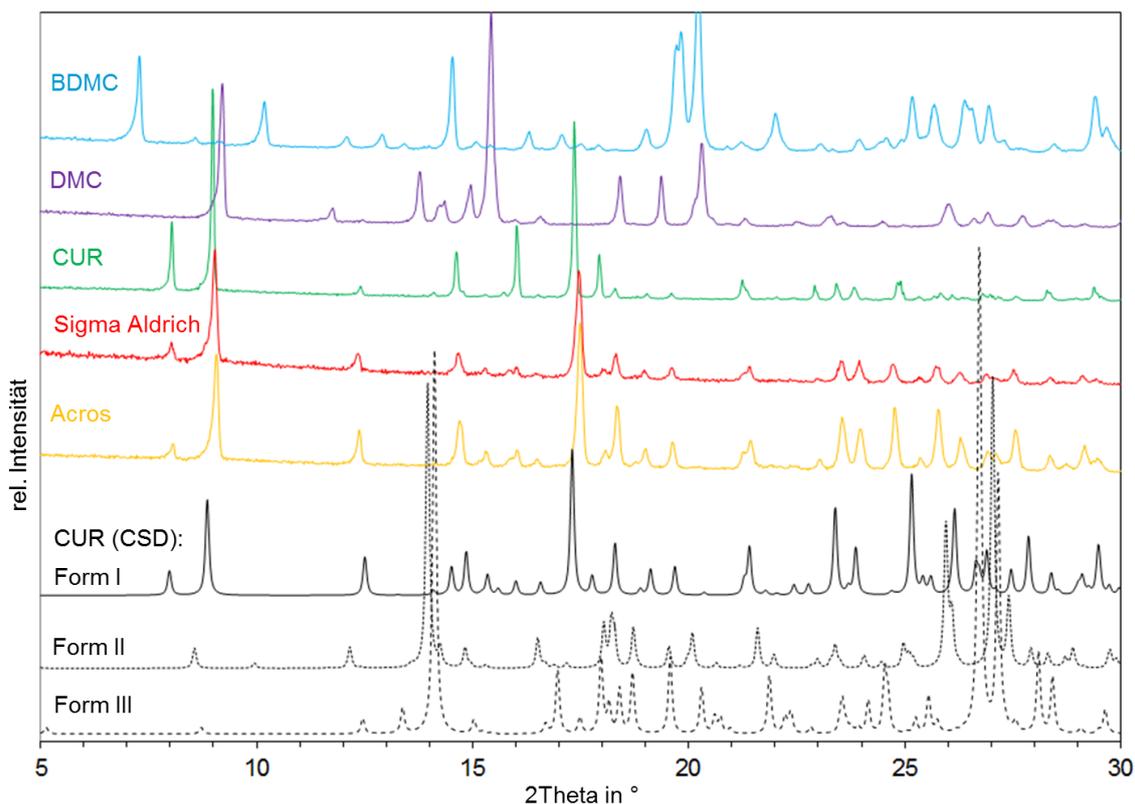


Abb. 8-3: Röntgenpulverdiffraktogramme der vorhandenen Curcumin Referenzproben der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange) sowie der Reinstoffreferenzen des CUR (grün), DMC (violett) und BDMC (blau). Die drei unteren Diffraktogramme entsprechen den drei polymorphen Formen des CUR (Form I CSD Strukturcode BINMEQ05; Form II CSD Strukturcode BINMEQ06; Form III CSD Strukturcode BINMEQ07), publiziert in der kristallographischen Datenbank (Cambridge Structural Database, CSD) (Sanphui et al. 2011).

Trotz der vergleichsweise hohen Anteile der Verunreinigungen in den gemessenen Mischproben konnten in diesen mittels XRPD keine weiteren kristallinen Bestandteile außer CUR nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte einerseits der geringe BDMC-Gehalt sein, welcher sich unter der in der Literatur beschriebenen XRPD-Nachweisgrenze von 5% befindet (Clevers et al. 2012; Zheng et al. 2015), oder andererseits der mögliche amorphe Zustand von BDMC in den Mischproben. Das DMC lässt sich trotz der deutlich höheren Anteile von 16,5% bzw. 23,5% in den Mischproben mittels XRPD nicht identifizieren. Da die Diffraktogramme der Mischproben nahezu vollständig auf der Basislinie liegen, ist die Präsenz eines amorphen Anteils von über 16% in den Feststoffen sehr unwahrscheinlich.

Die Fähigkeit von Molekülen verschiedener chemischer Verbindungen mit sehr ähnlichem strukturellem Aufbau Mischkristalle auszubilden ist bereits bekannt und wurde von (Isakov et al. 2016) am Beispiel von L-Valin und L-Isoleucin detailliert beschrieben.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von DMC und CUR wäre die Ausbildung von CUR/DMC-Mischkristallen eine mögliche Erklärung für die

Abwesenheit der DMC-Röntgenreflexe in den untersuchten Mischproben. In diesem Fall wäre eine kristallisationsbasierte Aufreinigung von CUR innerhalb eines Trennschritts nicht realisierbar.

8.2 Wahl des Prozesslösungsmittels

Zur Auslegung eines kristallisationsbasierten Aufreinigungsprozesses von CUR aus einer übersättigten Lösung galt es, auf der Basis der Untersuchungen zum Löslichkeits- und Keimbildungsverhaltens der Zielkomponente, das geeignete Prozesslösungsmittel zu finden.

Aus verfügbaren Publikationen konnten folgende Angaben zur Löslichkeit von CUR vorläufig zusammengefasst werden: in Wasser ist CUR mit ca. $1,3 \cdot 10^{-7}$ Ma% bei 25°C praktisch unlöslich (Carvalho et al. 2015; Jagannathan et al. 2012).

Laut Angaben von (Ukrainczyk et al. 2016) können bei 20°C in Ethanol ca. 0,5 Ma%, in Acetonitril ca. 0,9 Ma% und in 2-Propanol ca. 0,11 Ma% des CUR (Form I) gelöst werden. In dieser Arbeit ist ebenfalls beschrieben, dass DMC und BDMC eine deutlich höhere (mindestens 2-fache) Löslichkeit in den untersuchten Lösungsmitteln im Vergleich zu CUR aufweisen.

Aus den von (Liu et al. 2015) dargestellten Löslichkeitskurven steigt die Löslichkeit von CUR (Form I) in Ethanol von umgerechnet 0,4 Ma% bei 10°C auf 1,1 Ma% bei 50°C sowie in Ethylacetat von 1 Ma% bei 10°C auf 2,9 Ma% bei 50°C. Die publizierten Löslichkeitsdaten sind zur Auslegung einer geimpften Kristallisation nicht ausreichend und wurden durch eigene Messungen ergänzt. Wasser wurde dabei ohne weitere Untersuchungen als das stärkste Antisolvent für den zukünftigen Prozess berücksichtigt.

Bestimmung der CUR-Sättigungskonzentrationen in Aceton, Acetonitril, Methanol, Ethanol und 2-Propanol

Der reine Referenzfeststoff des CUR, welcher die stabile Form I repräsentiert, wurde für die Untersuchungen des Löslichkeits- und Keimbildungsverhaltens nach der im Kap. 5.1 beschriebenen klassischen isothermen und polythermen Methode verwendet. Dafür wurden Aceton, Acetonitril, Methanol, Ethanol und 2-Propanol als gering toxisch eingestufte Lösungsmittel (ICH 2016) ausgewählt. Die experimentell ermittelte Änderung der Sättigungskonzentration vom CUR im jeweiligen Lösungsmittel ist in Abb. 8-4 in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Da die mittels polythermer Methode erhaltenen Löslichkeitswerte mit den isotherm ermittelten Sättigungskonzentrationen von CUR in den o. g. Lösungsmitteln übereinstimmen, sind diese auf dem Konzentrations-Temperatur-Diagramm in Abb. 8-4 nicht zusätzlich aufgetragen.

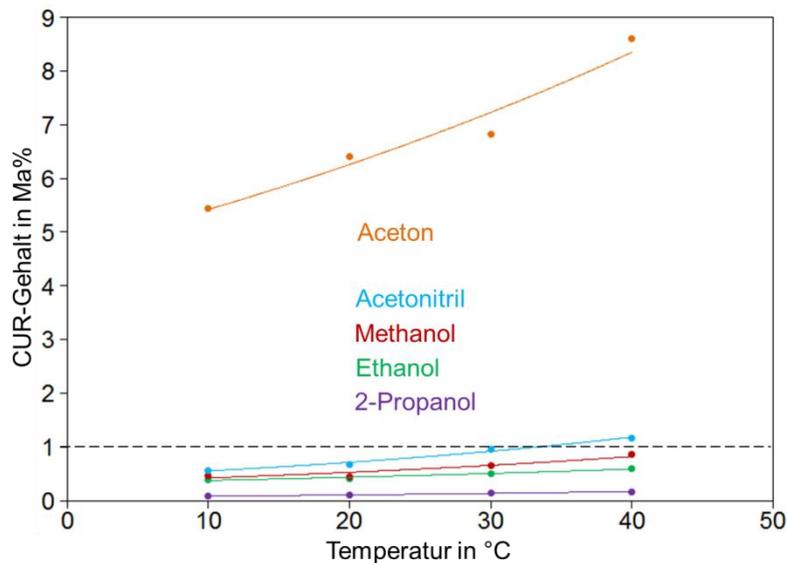


Abb. 8-4: Sättigungskonzentrationen der Reinstoffreferenz von CUR (stabile Form I) in 2-Propanol (violett), Ethanol (grün), Methanol (rot), Acetonitril (blau) und Aceton (orange) bei 10°C, 20°C, 30°C und 40°C.

In jedem der untersuchten Lösungsmittel wurde, wie bei (Liu et al. 2015) grundsätzlich eine Zunahme der CUR-Löslichkeit mit steigender Temperatur beobachtet. Dennoch ist CUR in 2-Propanol, Ethanol, Methanol und Acetonitril im Vergleich zu Aceton deutlich schlechter löslich. Außer den 1,17 Ma% CUR, die in Acetonitril bei 40°C gelöst werden können, liegen die bis 40°C ermittelten Löslichkeitswerte unterhalb der 1 Ma% - Marke. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben zeigt das CUR die niedrigste Löslichkeit in 2-Propanol, mit gemessenen Sättigungswerten von 0,08 Ma% bei 10°C sowie 0,17 Ma% bei 40°C. Im Gegensatz dazu können in Aceton bereits bei 10°C 5,4 Ma% CUR gelöst werden. Resultierend daraus wurden 2-Propanol, Ethanol, Methanol und Acetonitril als geeignete Antisolvents für eine geimpfte Kühlungskristallisation in Aceton als Prozesslösungsmittel betrachtet.

Die maximale Übersättigung bzw. Unterkühlung des jeweiligen CUR/Lösungsmittel-Systems wurde mittels polythermer Methode gemessen. Die daraus ermittelte Breite des metastabilen Bereichs betrug im untersuchten Temperaturbereich im Mittel 33 K in 2-Propanol, 30 K in Aceton, 23 K in Acetonitril, sowie 23 bzw. 20 K in Ethanol und Methanol. Diese Zahlenwerte wurden anschließend für die Planung der geimpften Kühlungskristallisation von CUR verwendet.

Charakterisierung der während der Löslichkeitsmessungen bzw. Rekristallisationsversuchen gebildeten kristallinen Phasen des CUR mittels XRPD

Alle während der isothermen Löslichkeitsuntersuchungen im thermodynamischen Gleichgewicht gebildeten sowie während des Abkühlvorgangs aus den mit CUR gesättigten Lösungen kristallisierten festen Phasen wurden bzgl. ihrer Struktur mittels XRPD charakterisiert. Die zugehörigen Röntgenpulverdiffraktogramme sind in Abb. 8-5 denen aus der internationalen kristallographischen Datenbank (*Cambridge Structural Database, CSD*) stammenden CUR-Strukturen gegenübergestellt.

Die festen Phasen des CUR, welche im thermodynamischen Gleichgewicht mit der jeweiligen gesättigten Lösung stehen, stimmen bzgl. der Anzahl und Lage der Röntgenreflexe mit der stabilen Form I, der eingesetzten Ausgangsform, überein (Abb. 8-5, oberes Diffraktogramm).

Diffraktogramme, aufgenommen von CUR-Phasen, die während der polythermen Untersuchungen aus gesättigter Aceton- und Acetonitril-Lösung rekristallisiert wurden, sind ebenfalls mit der thermodynamisch stabilen Form I des CUR identisch.

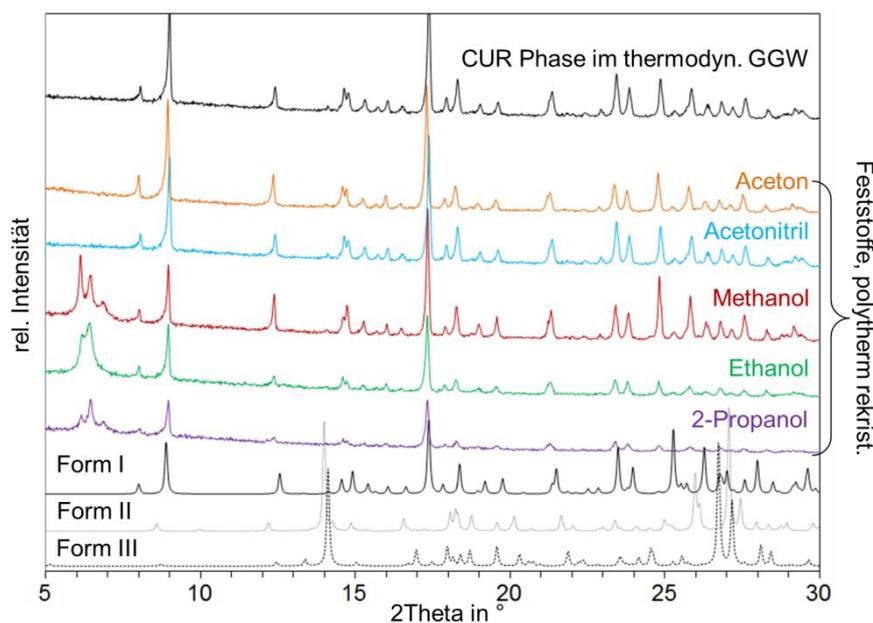


Abb. 8-5: Röntgenpulverdiffraktogramme der im thermodynamischen Gleichgewicht gebildeten festen Phasen des CUR (oberes Diffraktogramm) sowie während der polythermen Rekristallisationsversuche gebildeten CUR-Phasen aus: Aceton (orange), Acetonitril (blau), Methanol (rot), Ethanol (grün) und 2-Propanol (violett). Die drei unteren Diffraktogramme entsprechen den drei polymorphen Formen des CUR (Form I CSD Strukturcode BINMEQ05; Form II CSD Strukturcode BINMEQ06; Form III CSD Strukturcode BINMEQ07), publiziert in der kristallographischen Datenbank (*Cambridge Structural Database, CSD*) (Sanphui et al. 2011).

Diffraktogramme der festen CUR-Phasen, erhalten aus gesättigten Methanol- und 2-Propanol-Lösungen sind untereinander identisch. Im Diffraktogramm des

aus Ethanol rekristallisierten Feststoffs fehlt im Vergleich zu den beiden oberen lediglich ein Reflex bei 2θ von $6,8^\circ$. Außer der zusätzlichen Reflexe im Bereich 2θ zwischen 6° und 8° stimmt die Lage und Anzahl der Reflexe dieser drei Feststoffe mit der stabilen Form I des CUR überein. Da an dieser Stelle keine weiteren Untersuchungen der gebildeten festen Phasen durchgeführt wurden, kann die Ausbildung einer metastabilen, von der Form II und III abweichenden, Modifikation des CUR in Ethanol, Methanol und 2-Propanol bzw. eines CUR/Ethanol-Solvats lediglich vermutet werden.

Einfluss von Antisolvents auf die Löslichkeit von CUR in Aceton bei einer Temperatur von 30°C

Resultierend aus den ermittelten binären Fest/flüssig-Phasengleichgewichten, wurde der mögliche Einsatz von Aceton als Prozesslösungsmittel sowie 2-Propanol, Ethanol, Methanol und Acetonitril als Antisolvent bei der Kristallisation von CUR untersucht. Um den Einfluss der Antisolvents auf die Löslichkeit von CUR in Aceton beurteilen zu können, wurden die Sättigungskonzentrationen von CUR in binären 50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/Antisolvent-Lösungsmittelgemischen bei 30°C gemessen und den bei derselben Temperatur erhaltenen Messwerten in reinen Lösungsmitteln gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8-6 zusammengefasst.

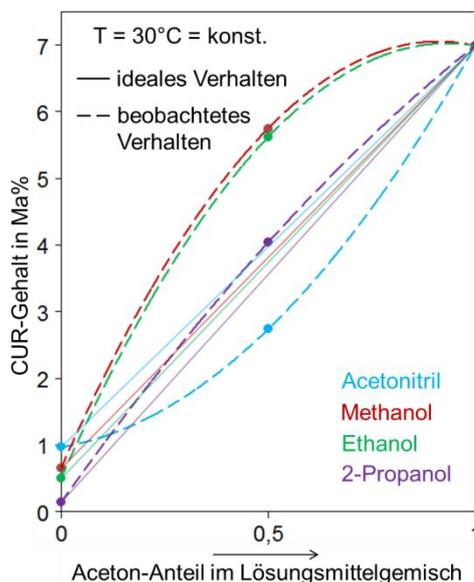


Abb. 8-6: Effekt verschiedener Antisolvents auf die Löslichkeit von CUR in Aceton bei 30°C . Untersuchte Antisolvents: 2-Propanol (violett), Ethanol (grün), Methanol (rot) und Acetonitril (blau). Die durchgezogenen Linien geben den linearen Zusammenhang zwischen der CUR Löslichkeit in reinem Aceton gegenüber dem Antisolvent wieder. Die gestrichelten Kurven stammen aus der Verbindung der Löslichkeitswerte des CUR im jeweiligen Lösungsmittelgemisch.

Auf den Seiten des Diagramms in Abb. 8-6 sind die zuvor ermittelten Sättigungskonzentrationen des CUR bei 30°C in reinem 2-Propanol, Ethanol,

Methanol und Acetonitril (links) sowie in Aceton (rechts) aufgetragen. Innerhalb des Diagramms sind die ermittelten Löslichkeitswerte des CUR im jeweiligen 50/50 Aceton/Antisolvent-Gemisch dargestellt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren das ideale Verhalten der Löslichkeit von CUR im jeweiligen Aceton/Antisolvent-Gemisch. Die gestrichelten Kurven basieren auf den experimentell ermittelten Löslichkeitswerten in den 50/50 Aceton/Antisolvent-Gemischen.

Die Darstellung zeigt, dass alle untersuchten ternären Systeme vom idealen Verhalten abweichen. Aus der Lage der CUR-Löslichkeitswerte im 50/50 Aceton/Methanol-, Aceton/Ethanol- sowie Aceton/2-Propanol-Gemisch (Abb. 8-6, gestrichelte Kurven), welche oberhalb der Linien des idealen Löslichkeitsverhalten liegen, kann abgeleitet werden, dass eine Zugabe dieser Lösungsmittel zur gesättigten CUR/Aceton-Lösung eine Verdünnung und nicht die erwartete Übersättigung der Lösung bzgl. CUR bewirken würde. Dabei ist der relative Verdünnungseffekt von Ethanol und Methanol deutlich höher als der von 2-Propanol, da der Abstand des Messwertes zur durchgezogenen Linie größer ist. Aus diesem Grund werden Ethanol und Methanol für die Auslegung des Trennprozesses nicht berücksichtigt. Im Gegensatz dazu kann nach der Zugabe von Acetonitril eine höhere CUR-Übersättigung und somit eine höhere Produktausbeute erwartet werden. Folglich werden reine Aceton und Acetonitril sowie 50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/Acetonitril- und Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemische als Prozesslösungsmittel für die Kühlungskristallisation berücksichtigt. Wasser als starkes Antisolvent wird ausschließlich zur Erhöhung der Produktausbeute am Ende der Kühlungskristallisation von CUR in Aceton eingesetzt.

Löslichkeitsverhalten von CUR in Anwesenheit der Hauptverunreinigungen DMC und BDMC

Um den Einfluss von BDMC und DMC auf die Aufreinigung von CUR besser bewerten zu können, wurde das Löslichkeitsverhalten von CUR in Anwesenheit beider Komponenten untersucht. Für diese Zwecke wurde das ternäre CURD-Gemisch der Fa. Sigma Aldrich mit einer Zusammensetzung von 70,8% CUR, 23,4% DMC und 5,7% BDMC verwendet. Diese Referenzprobe war von allen zur Verfügung stehenden Mischproben dem natürlichen Pflanzenextrakt am ähnlichsten und für diese Untersuchungen in einer ausreichenden Menge vorhanden (ca. 100 g).

Im Zusammenhang mit dem geplanten Aufreinigungsprozess wurden diese Löslichkeitsuntersuchungen in Aceton und Acetonitril sowie zwei 50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/2-Propanol- bzw. Aceton/Acetonitril-Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Die ermittelten CUR-Löslichkeitswerte sind in Abb. 8-7 den

jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen des reinen CUR (grau hinterlegt) gegenübergestellt.

Die Löslichkeit von CUR in Anwesenheit von BDMC und DMC ist gegenüber dem reinen CUR leicht erhöht. Die Abweichung dieser Werte zu den Löslichkeitsdaten des reinen CUR beträgt in Aceton und dem 50/50 Aceton/2-Propanol-Gemisch ca. 0,2 Ma% bei 10°C und steigt auf 0,5 Ma% bei 40°C. Die Präsenz der Verunreinigungen im 50/50 Aceton/Acetonitril-Gemisch und reinem Acetonitril hatte einen geringeren Einfluss auf die Löslichkeit von CUR. Folglich wurden die in Abb. 8-7 dargestellten Löslichkeitskurven des verunreinigten CUR für die Trennprozessauslegung verwendet.

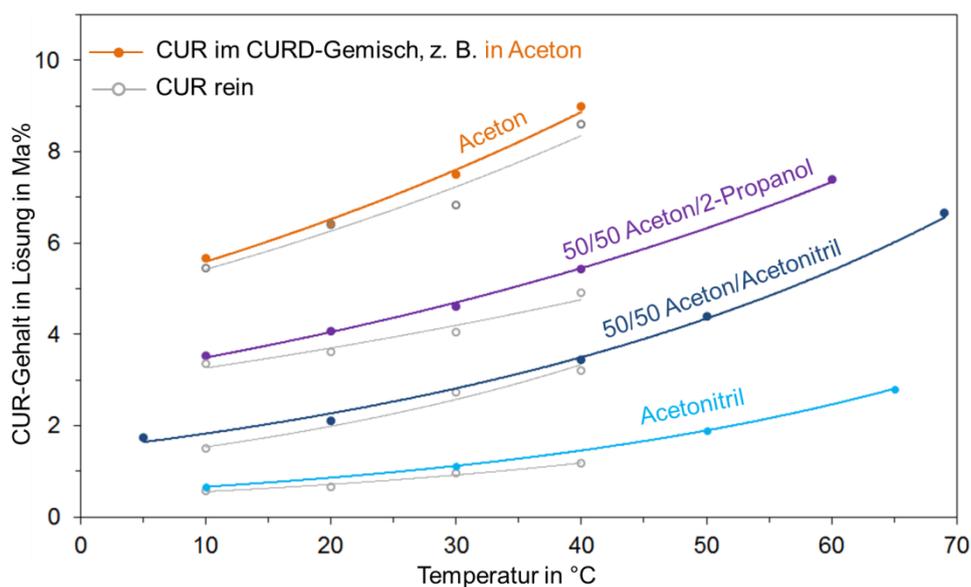


Abb. 8-7: Löslichkeitsverhalten von CUR in Anwesenheit der Hauptverunreinigungen des Pflanzenextraktes BDMC und DMC in Aceton (orange), dem 50/50 Aceton/2-Propanol-Gemisch (violett), dem 50/50 Aceton/Acetonitril-Gemisch (dunkelblau) sowie in Acetonitril (blau) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Gleichgewichtskonzentrationen des reinen CUR in denselben Lösungsmitteln sind mit leeren Kreisen gekennzeichnet und grau hinterlegt.

Das dargestellte Löslichkeitsverhalten von CUR in binären Lösungsmittelgemischen zeigt, dass im Vergleich zu 2-Propanol mit dem Einsatz von Acetonitril als Antisolvent eine deutlich höhere Übersättigung der CUR/Aceton-Lösung und somit eine größere Produktausbeute erzielt werden können.

8.3 Aufreinigungsprozess: Auslegung und Durchführung

Unter Verwendung der in Abb. 8-7 vorgestellten Löslichkeitskurvenverläufen des verunreinigten CUR sowie unter Berücksichtigung des beobachteten Nukleationsverhaltens des reinen CUR wurden vier geimpfte Kühlkristallisationen von CUR aus dem ternären CURD-Gemisch, wie in Abb. 8-8 gezeigt, ausgelegt und durchgeführt.

Jeder der vier Aufreinigungsprozesse beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Schritte. Im ersten Schritt wurde eine klare und bezüglich CUR untersättigte Lösung, bestehend aus dem zu trennenden CURD-Gemisch und dem jeweiligen Prozesslösungsmittel, hergestellt. Um am Ende des Kristallisationsprozesses eine möglichst große Produktmasse zu gewinnen und somit die Produktivität zu erhöhen, wurde im ersten Schritt eine Ausgangslösung mit möglichst hoher CUR-Konzentration bereitgestellt.

Zur genauen Einstellung der Startkonzentration des CUR in der Ausgangslösung wurde das zu trennende CURD-Gemisch vor Beginn mittels HPLC bzgl. der Komponentenzusammensetzung charakterisiert. In Tabelle 8-1 sind die für die Herstellung der jeweiligen Arbeitslösung verwendeten Prozesslösungsmittel und die ermittelte Zusammensetzung der ternären CURD-Gemische vorgestellt.

Tabelle 8-1: Übersicht über die verwendeten Lösungsmittel und die zu trennenden CURD-Gemische.

Prozess Nr.	Lösungsmittel	Zusammensetzung CURD-Gemisch in %		
		CUR	DMC	BDMC
1	Aceton	75,0	19,2	5,8
2	50/50 Aceton/2-Propanol	70,8	23,5	5,7
3	Acetonitril	67,2	25,5	7,3
4	50/50 Aceton/Acetonitril	67,2	25,5	7,3

Die in Tabelle 8-1 aufgeführten Rohgemische stammen aus verschiedenen Substanzchargen erworben bei der Fa. Sigma Aldrich. Die Variation der einzelnen CURD-Anteile in den analysierten Feststoffen liegt höchstwahrscheinlich an der natürlichen Herkunft dieser Probe, welche, nach Angabe des Herstellers, alle Produkte der Phytoextraktion sind.

Der zweite Schritt der Aufreinigung stellte die selektive Kristallisation von CUR aus dem CURD-Rohgemisch dar. In der nachfolgenden Abb. 8-8 ist die Ablaufskizze jeder der vier geimpften Kühlungskristallisation von CUR auf der Grundlage der gezeigten Löslichkeitskurven des verunreinigten CUR (volle Kreise verbunden mit durchgezogenen Kurven) sowie der Nukleationsgrenzen des reinen CUR (leere Kreise verbunden mit gestrichelten Kurven) schematisch dargestellt. Die schwarzen gestrichelten/durchgezogenen Pfeile skizzieren die Richtung des Verlaufs der CUR-Konzentration in der Lösung während des Kristallisationsprozesses in Abhängigkeit der gewählten Start- und Endtemperaturen des Kühlvorgangs sowie der Temperatur der Impfkristallzugabe. Die Temperatur der Impfkristallzugabe wurde so gewählt, dass sie mindestens 5 K unter der Sättigungstemperatur und etwa im ersten Drittel des metastabilen Bereichs liegt. Wie in Abb. 8-8 gezeigt, ist der metastabile Bereich von CUR im 50/50 Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemisch mit ca. 10 K im Vergleich zu

den anderen Systemen deutlich schmaler. Aus diesem Grund lag hier die Impftemperatur ungefähr bei der Hälfte des metastabilen Bereichs.

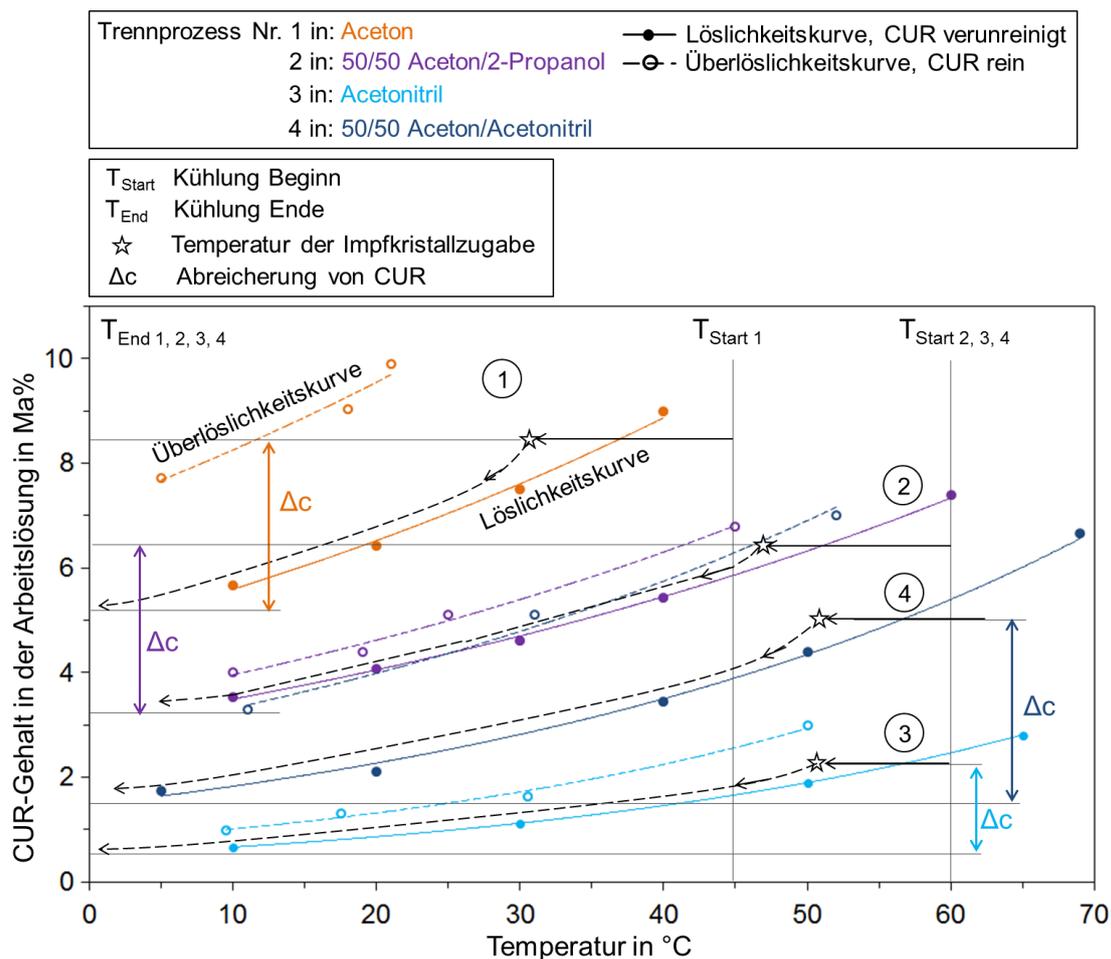


Abb. 8-8: Design der Kristallisationsprozesse Nr. 1 bis 4 von CUR auf der Basis der Löslichkeitskurven (durchgezogene Linien) des verunreinigten CUR und der Überlöslichkeitskurven (gestrichelte Linien) des reinen CUR in Abhängigkeit von der Temperatur. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Richtung der CUR-Konzentrationsänderung in der Lösung während der Kristallisation.

Tabelle 8-2 enthält die Übersicht über die abgeleiteten kristallisationsspezifischen Betriebsparameter.

Tabelle 8-2: Kristallisationsspezifische Betriebsparameter der Trennprozesse 1 bis 4. Indizes: c_{Start} (CUR) Anfangskonzentration von CUR in der Lösung, T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, $T_{\text{Sätt}}$ die Sättigungstemperatur von CUR, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe.

Prozess Nr.	Lösungsmittel	c_{Start}	T_{Start}	$T_{\text{Sätt}}$	T_{Impfen}	T_{End}	Kühlrate
		(CUR) Ma%	°C	(CUR) °C			
1	Aceton	8,4	45	37	30	0	10
2	50/50 Aceton/2-Propanol	6,4	60	51	46	0	10
3	Acetonitril	2,2	60	56	51	0	10
4	50/50 Aceton/Acetonitril	5,1	60	57	51	0	10

Um beim Trennprozess Nr. 1 das unkontrollierte Verdampfen von Aceton aus der CURD/Aceton-Arbeitslösung zu vermeiden, wurde 45°C als Starttemperatur gewählt. Bei den Trennprozessen Nr. 2, 3 und 4 wurde der Kühlvorgang bei einer höheren Temperatur von 60°C angesetzt. Entsprechend der festgelegten Starttemperaturen wurden die Anfangskonzentrationen des CUR in der Arbeitslösung (Tabelle 8-2, c_{Start}) so gewählt, dass zu Prozessbeginn eine bzgl. CUR untersättigte Lösung vorliegt. Die zur Herstellung der vier Ausgangslösungen verwendeten Mengen des zu trennenden CURD-Gemisches $m(\text{CURD})$ sowie der Prozesslösungsmittel $m(\text{LM})$ sind in Tabelle 8-3 aufgelistet.

Tabelle 8-3: Übersicht über die zur Herstellung der Ausgangslösungen für die Trennprozesse Nr. 1 bis 4 verwendeten Substanzen und die berechneten/abgelesenen CUR-Konzentrationen. Abkürzungen: CURD ternäres Curcuminoid-Gemisch, LM Prozesslösungsmittel. Indizes: Δc_{TD} thermodynamisch maximal mögliche Änderung der CUR-Konzentration in der Lösung am Ende der Kühlung, m_{max} die thermodynamisch maximal erzielbare Masse des CUR im kristallinen Produkt.

Prozess	m (CURD)	CUR Gehalt	m_{Start} (CUR)	m (LM)	c_{Start} (CUR)	$c_{\text{End}}=c_{\text{Sätt}}$ (CUR)	Δc_{TD} (CUR)	m_{max} (CUR)
Nr.	g	%	g	g	Ma%	Ma%	Ma%	g
1	19,0	75,0	14,3	150	8,4	4,8	3,6	5,8
2	14,0	70,8	9,9	150	6,4	3,0	3,4	5,1
3	5,2	67,2	3,5	150	2,2	0,5	1,7	2,7
4	11,5	67,2	7,7	140	5,1	1,4	3,7	5,5

Die Werte der Anfangskonzentrationen c_{Start} (CUR) des CUR wurden aus den Einwaagen m (CURD), m (LM) unter Berücksichtigung des CUR-Gehalts im jeweiligen CURD-Gemisch errechnet.

Die Werte der Endkonzentration des CUR c_{End} (CUR) in der Arbeitslösung entsprechen der jeweiligen CUR-Sättigungskonzentration in der Lösung $c_{\text{End}} = c_{\text{Sätt}}$ am Ende des Kühlvorgangs bei $T_{\text{End}} = 0^\circ\text{C}$. Aus der Differenz dieser Anfangs- und Endkonzentrationen ergibt sich die thermodynamisch maximal mögliche Abreicherung des CUR in der Lösung $\Delta c_{\text{TD}} = (c_{\text{Start}} - c_{\text{Sätt}})$. Demzufolge entspricht m_{max} (CUR) der thermodynamisch maximal erzielbaren Masse des CUR im Kristallinat. Die Werte der m_{max} (CUR) wurden zur Berechnung des am Ende der jeweiligen Kühlungskristallisation erzielten Anteils der thermodynamisch möglichen CUR-Ausbeute η_{TD} (nach Gl. 3.6.3.3) herangezogen. Die Gesamtproduktausbeute η wurde nach Gl. 3.6.3.5 ausgehend von der in der Ausgangslösung zu Prozessbeginn vorhandenen Masse des CUR m_{Start} (CUR) unter Berücksichtigung der gewonnenen Produktmasse errechnet.

Um sicherzustellen, dass die im ersten Prozessschritt für die Kristallisation hergestellte Lösung partikelfrei ist, wurden diese filtriert und anschließend in

den Kristallisationsbehälter (200 ml-Doppelmantelgefäß) überführt. Nach dem Einstellen der Starttemperatur (Tabelle 8-2, T_{Start}) im jeweiligen System, wurden die Arbeitslösungen mit 10 K/h linear auf 0°C heruntergekühlt. Während der Kühlprozedur wurden zum Initiieren des Kristallisationsvorgangs von CUR der übersättigten Arbeitslösung die Impfkristalle (ca. 50 mg) des reinen CUR (Reinstoffreferenz, stabile Form I) bei der Temperatur T_{Impfen} (Tabelle 8-2) hinzugefügt. Durch das Animpfen sollte die spontane heterogene Keimbildung unerwünschter Mischungskomponenten (DMC, BDMC) unterdrückt und das CUR aus der Lösung selektiv kristallisiert werden.

Die kontinuierliche Verfolgung des Kristallisationsfortschritts von CUR mittels ATR-FTIR-Sonde wird nicht vorgestellt, weil keine messbare Veränderung der CUR-Konzentration in Gegenwart von BDMC und DMC in der Arbeitslösung im Laufe des Kristallisationsprozesses erfasst werden konnte.

Am Ende des Kühlvorgangs bei 0°C wurden die gewonnenen Produktsuspensionen für weitere 30 min bei derselben Temperatur nachgerührt und danach die Fest/flüssig-Phasentrennung über Nutsche (Filterpapierporengröße 0,6 µm) durchgeführt. Das erhaltene Kristallisat wurde mit ca. 100 g kaltem (< 0°C) Aceton bzw. mit Acetonitril (im Prozess Nr. 3) gespült, bei 40°C getrocknet und anschließend bzgl. der CUR-Reinheit und -ausbeute analysiert. Aufgrund der hohen Löslichkeit von CUR in Aceton (etwa 5 Ma% bei 0°C) wurde während des Waschvorgangs der Produktfeststoffe ein sichtbares Auflösen des Filterkuchens beobachtet. Demzufolge wird von einer geringeren Gesamtproduktausbeute der Trennprozesse Nr. 1, 2 und 4 ausgegangen. Im folgenden Kap. 8.4 werden die Ergebnisse der vier Kühlungskristallisationen vorgestellt und diskutiert.

Untersuchungen zur Erhöhung der Gesamtausbeute mittels Antisolventzugabe

Aus den bei 0°C in der jeweiligen Lösung vorliegenden CUR-Sättigungskonzentrationen ist ersichtlich, dass die Gesamtproduktausbeute von CUR am Ende der Trennprozesse Nr. 1, 2 und 4 spürbar niedriger als im Trennprozess Nr. 3 sein wird. Mit dem Ziel, die Gesamtprozessausbeute am Ende dieser drei Prozesse zu erhöhen, wurde bei gleichbleibender Kühlprozedur die Antisolventzugabe angewendet.

Hierfür wurden zunächst drei gleiche Ausgangslösungen, bestehend aus dem CURD-gemisch in Aceton als Prozesslösungsmittel mit 8,5 Ma% Ausgangskonzentration von CUR hergestellt. Anschließend wurde der jeweiligen Lösung Wasser (Prozess Nr. 1-1), 2-Propanol (Prozess Nr. 1-2) oder Acetonitril (Prozess Nr. 1-4) als Antisolvent bis zu einem Aceton/Antisolvent-Lösungsmittelverhältnis von 25/75 (Ma%/Ma%) hinzugefügt.

Die für die Herstellung der jeweiligen CURD/Aceton-Ausgangslösung verwendeten Substanzmengen sowie die Menge des jeweiligen Antisolvents sind in Tabelle 8-4 zusammengefasst.

Tabelle 8-4: Auflistung der verwendeten Substanzen zur Durchführung der Antisolvent-Kristallisationen (Prozess Nr. 1-1, 1-2 und 1-4). Abkürzungen: CURD der ternäre Rohfeststoff, LM das Prozesslösungsmittel, AS das Antisolvent, T_{AS} die Temperatur der Antisolventzugabe.

Prozess Nr.	LM	m (CURD) g	m (LM) g	CUR-Gehalt %	m_{Start} (CUR) g	c_{Start} (CUR) Ma%	AS	m (AS) g	Anteil (AS) %	T_{AS} °C
1-1	Aceton	4,35	30	67,2	2,9	8,51	Wasser	90	75	26
1-2	Aceton	4,35	30	67,2	2,9	8,51	2-Propanol	90	75	0
1-4	Aceton	4,35	30	67,2	2,9	8,51	Acetonitril	90	75	0

Vorversuche hatten gezeigt, dass die Antisolventzugabe zu einer keimfreien metastabilen CURD/Aceton-Lösung eine unkontrollierte Fällung von DMC und BDMC neben CUR bewirkt und somit die CUR-Reinheit im kristallinen Produkt negativ beeinflusst. Aus diesem Grund wurde im zweiten Prozessschritt zunächst die bereits als Trennprozess Nr. 1 (Tabellen 8-2 und 8-3) vorgestellte geimpfte Kühlungskristallisation von CUR in Aceton durchgeführt. Am Ende des Kühlvorgangs, bei 0°C, wurde der Aceton-Produktsuspension das ca. 0°C kalte Antisolvent 2-Propanol (Prozess Nr. 1-2) oder Acetonitril (Prozess Nr. 1-4) bis zum geplanten Aceton/Antisolvent-Lösungsmittelverhältnis geregelt hinzugefügt. Nachdem die Antisolventzugabe abgeschlossen war, wurden die vorliegenden Suspensionen für weitere 3 h bei konstanten 0°C nachgerührt.

Um während des Prozesses Nr. 1-1 die Zugabe von 0°C kaltem Wasser als Antisolvent umzugehen, erfolgte die schrittweise Wasserdosierung bereits bei 26°C, kurz nach dem Animpfen der übersättigten CURD/Aceton-Lösung. Als die vorgelegte Wassermenge aufgebraucht war, wurde die Suspension bis zur geplanten Endtemperatur von 0°C heruntergekühlt und anschließend für weitere 3 h bei derselben Temperatur nachgerührt. Zu erwähnen ist, dass während der ersten Schritte der Wasserzugabe örtliche Kristallisationsschauer in der übersättigten Lösung beobachtet wurden. Da die gebildeten Primärkeime sich innerhalb von wenigen Sekunden wieder auflösten, wurde der Prozess, wie geplant, fortgeführt.

Am Ende der drei Antisolvent-Kristallisationen wurde die Fest/flüssig-Phasentrennung durchgeführt, das gewonnene Kristallinat bei 40°C getrocknet und bzgl. der CUR-Reinheit und -Ausbeute analysiert. Um das zuvor beim Waschvorgang mit Aceton beobachtete Auflösen des Filterkuchens und die damit verbundene Ausbeuteverluste zu vermeiden, wurde das hier gewonnene

Kristallisat nicht gewaschen. Die erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Kap. 8.4 ebenfalls präsentiert und diskutiert. Da keine Löslichkeitsmessung von CUR in den einzelnen 25/75-Aceton/Antisolvent-Lösungsmittelgemischen durchgeführt wurde, wurde nur die am Ende der Antisolvent-Kristallisationen erzielte Gesamtproduktausbeute η von CUR ausgewertet.

8.4 Ergebnisse und Diskussion

Die hier vorgestellten Trennprozesse wurden in erster Linie zur Aufreinigung des CUR aus dem ternären CURD-Gemisch und zur Bereitstellung der Zielkomponente in der unter Umgebungsbedingungen stabilen kristallinen Form I ausgelegt. Aus diesem Grund wurde die höchste Produktqualität mit der chemischen Reinheit von 99% sowie der strukturellen Reinheit bzgl. der kristallinen Form I des CUR im Kristallisat gleichgesetzt. Die Produktquantität wurde anhand des Werts der Gesamtproduktausbeute η nach Gl. 3.6.3.5 beurteilt.

In den Tabellen 8-5 und 8-6 sind jeweils die Ergebnisse der durchgeführten Kühlungskristallisationen (Trennprozess Nr. 1 bis 4) sowie der Kristallisationen mit Antisolventzugabe (Trennprozess Nr. 1-1, 1-2 und 1-4) zusammengefasst. Zur besseren Veranschaulichung dieser Ergebnisse sind die Tabellenspalten, die die Werte der CUR-Reinheit und Gesamtproduktausbeute η beinhalten, farblich hervorgehoben.

Tabelle 8-5: Übersicht der Ergebnisse der Kühlungskristallisationen (Trennprozess Nr. 1 – 4).
Abkürzungen: η_{TD} der Anteil der thermodynamisch möglichen Ausbeute von CUR, η die Gesamtproduktausbeute von CUR bezogen auf die im Rohgemisch vorhandene CUR-Masse m_{Start} .

Prozess Nr.	Lösungsmittel	Rohgemisch					kristallines Produkt					
		m_{Start} (CUR) g	CUR-Gehalt %	DMC-Gehalt %	BDMC-Gehalt %	m_{TD} (CUR Prod) g	m (Produkt) g	CUR-Gehalt %	DMC-Gehalt %	BDMC-Gehalt %	η_{TD} (CUR) %	η (CUR) %
1	Aceton 50/50	14,3	75,0	19,2	5,8	5,8	4,6	95,7	4,3	0	75	31
2	Aceton/ 2-Propanol	9,9	70,8	23,5	5,7	5,1	1,3	99,4	0,6	0	25	13
3	Acetonitril 50/50	3,5	67,2	25,5	7,3	2,7	2,1	92,3	7,7	0	72	56
4	Aceton/ Acetonitril	7,7	67,2	25,5	7,3	5,5	5,3	90,1	9,9	0	86	62

Aus der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Kühlungskristallisationen in Tabelle 8-5 ist ersichtlich, dass am Ende des Trennprozesses Nr. 2, welcher im 50/50 Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemisch durchgeführt wurde, die höchste CUR-Reinheit von 99,4% im kristallinen Produkt erreicht wurde. Leider wurden bei dieser Prozessführung lediglich 13% der im Rohgemisch ursprünglich vorhandenen CUR-Masse gewonnen. Die anderen Kühlungskristallisationen lieferten kristallines CUR geringerer Reinheit (zw. 90 und 96%) aber deutlich höherer Gesamtproduktausbeute (zw. 31 und 62%).

Mit den umgesetzten Kühlungskristallisationen konnte BDMC komplett aus dem kristallinen Produkt entfernt und der Gehalt des DMC mindestens um 2/3 reduziert werden. Der am Ende der vier Kühlungskristallisationen erzielte Anteil der thermodynamisch möglichen CUR-Ausbeute η_{TD} (Tabelle 8-5) liegt unter den gewünschten 100%. Das bedeutet, dass das Fest/flüssig-Phasengleichgewicht von CUR in dem jeweiligen System bei $T_{End} = 0^{\circ}C$ nicht erreicht und das CUR aus der Arbeitslösung nicht bis zur Sättigungskonzentration abgereichert wurde. Möglicherweise liegt dies an der langsamen Kristallisationskinetik des CUR, welche einerseits durch die vorgegebene Kühlrate von 10 K/h, andererseits durch die Anwesenheit der beiden anderen CURD in der Lösung beeinträchtigt wird. Da das DMC, welches dem CUR strukturell am ähnlichsten ist, die einzige Verunreinigung des CUR im kristallinen Produkt darstellt, kann lediglich vermutet werden, dass es mit dem CUR beim Einbau in das CUR-Hauptkristallgitter konkurriert und dadurch das kristalline Produkt verunreinigt. Das beobachtete Auflösen der Filterkuchen beim Waschvorgang der Produktfeststoffe der Kühlungskristallisationen Nr. 1, 2 und 4 mit kaltem Aceton könnte ebenfalls ein Grund für die geringe Produktausbeute sein.

Mit dem Ziel der Erhöhung der Gesamtprozessausbeuten der Trennprozesse 1, 2 und 4 wurde die Zugabe von Wasser, 2-Propanol und Acetonitril während der Antisolvent-Kristallisationen 1-1, 1-2 und 1-4 untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 8-6 zusammengefasst.

Tabelle 8-6: Übersicht der Ergebnisse der Antisolvent-Kristallisationen (Trennprozess Nr. 1-1, 1-2 und 1-4). Abkürzungen: η ist die Gesamtproduktausbeute von CUR bezogen auf die im Rohgemisch vorhandene CUR-Masse m_{Start} .

Prozess Nr.	Lösungsmittel	Rohgemisch				kristallines Produkt				
		m_{Start} (CUR)	CUR-Gehalt	DMC-Gehalt	BDMC-Gehalt	m (Produkt)	CUR-Gehalt	DMC-Gehalt	BDMC-Gehalt	η (CUR)
		g	%	%	%	g	%	%	%	%
1-1	25/75 Aceton/Wasser	2,9	67,2	25,5	7,3	2,7	85,5	13,4	1,1	79
1-2	25/75 Aceton/2-Propanol	2,9	67,2	25,5	7,3	1,1	96,2	3,7	0,1	36
1-4	25/75 Aceton/Acetonitril	2,9	67,2	25,5	7,3	2,3	88,3	10,8	0,9	70

Wie die Zahlenwerte von η zeigen, konnte die Gesamtproduktausbeute mit dem Einsatz von Wasser (Prozess Nr. 1-1) und 2-Propanol (Prozess Nr. 1-2) als Antisolvent mindestens verdoppelt und unter Zugabe von Acetonitril (Prozess Nr. 1-4) um 11% gegenüber der jeweiligen Kühlungskristallisation erhöht werden. Leider war das mit einer Abnahme der Produktreinheit um 2 bis 10% verbunden. Dennoch wurde unter Verwendung von 2-Propanol als Antisolvent wieder kristallines Produkt mit der vergleichsweise höchsten CUR-Reinheit von über 96%, aber der geringsten Ausbeute von 36% gewonnen.

In allen drei Fällen enthielt das CUR beide Verunreinigungen DMC und BDMC im Kristallisat. Es ist anzunehmen, dass höchstwahrscheinlich aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der drei CURD Wasser, 2-Propanol und Acetonitril auch für DMC und BDMC als Antisolvent agierten und zur Kontamination des Zielprodukts führten. Der geringe BDMC-Gehalt in den Produktfeststoffen (max. 1,1%) lässt jedoch vermuten, dass das BDMC in Form anhaftender Mutterlauge im Kristallisat vorliegt und demzufolge in einem nachgeschalteten Waschschritt aus dem Kristallisat entfernt werden könnte.

Aufgrund des bereits im CURD-Rohgemisch vorliegenden hohen DMC-Anteils von über 25% bei den Versuchen 3, 4, 1-1, 1-4, stellte es mit dem jeweiligen Anteil von 7,7%, 9,9%, 13,4%, 10,8%, die Hauptverunreinigung des CUR in den kristallinen Produkten dar. Vermutlich hängt auch der während der Antisolvent-Kristallisation mit Wasser örtlich beobachtete Kristallschauer mit der Primärkeimbildung von DMC zusammen, welches mit dem Gehalt von ca. 3,2 Ma% die zweithöchstkonzentrierte Komponente nach CUR in der Arbeitslösung repräsentiert. Dennoch konnte in den Versuchen 1, 2 und 1-2 der DMC-Anteil von anfänglichen 19,2%, 23,5% und 25,5% bis auf 4,3%, 0,6% und 3,5% im Produktfeststoff erheblich reduziert werden.

Basierend auf den publizierten Ergebnissen, ist es ausschließlich (Ukrainczyk et al. 2016) gelungen, ausgehend von 78% CUR im CURD-Gemisch innerhalb von drei aufeinanderfolgenden Kristallisationszyklen in 2-Propanol CUR (Form I) mit einer Reinheit von 98,9% und einer Gesamtproduktausbeute von 48% zu gewinnen. Auch nach dem Animpfen der übersättigten Lösung mit CUR Form II waren drei Kristallisationszyklen zur Herstellung von 99,8% reinem kristallinen CUR notwendig. In der Publikation wurde ebenfalls berichtet, dass das BDMC bereits nach dem ersten Kristallisationszyklus erfolgreich aus dem Gemisch abgetrennt werden konnte. Dabei lag das DMC neben dem CUR auch am Ende des dritten Rekristallisationsschritts und nach dem Waschvorgang in den kristallinen Produkten vor.

Die im Laufe dieser Untersuchungen erzielten Trennergebnisse haben gezeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, innerhalb eines Kristallisationsschritts im 50/50 Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemisch die CUR-Reinheit von den ursprünglichen 70,8% auf 99,4% zu erhöhen. Mit jeder der vier vorgestellten Kühlungskristallisationen wurde ein BDMC-freier Produktfeststoff hergestellt. Wie in der oben genannten Publikation, waren, je nach gewähltem Prozesslösungsmittel, zwischen 0,6% und 9,9% DMC in gewonnenen kristallinen Produkten vorhanden.

Die mittels Antisolventeinsatz angestrebte Erhöhung der Gesamtproduktausbeute wurde generell erreicht, jedoch auf Kosten der CUR-Reinheit.

Charakterisierung der gewonnenen Produktfeststoffe mittels XRPD und DSC

Zum Nachweis von kristallinem DMC in den Produktfeststoffen der Kühlung- sowie Antisolvent-Kristallisationen wurden die Feststoffproben mittels XRPD und DSC untersucht. Die zugehörigen Analyseergebnisse sind jeweils in der Abb. 8-9 und 8-10 mit abnehmender CUR-Reinheit (von unten nach oben) dargestellt und den Referenzproben des reinen CUR Form I (unten) sowie DMC (oben) gegenübergestellt.

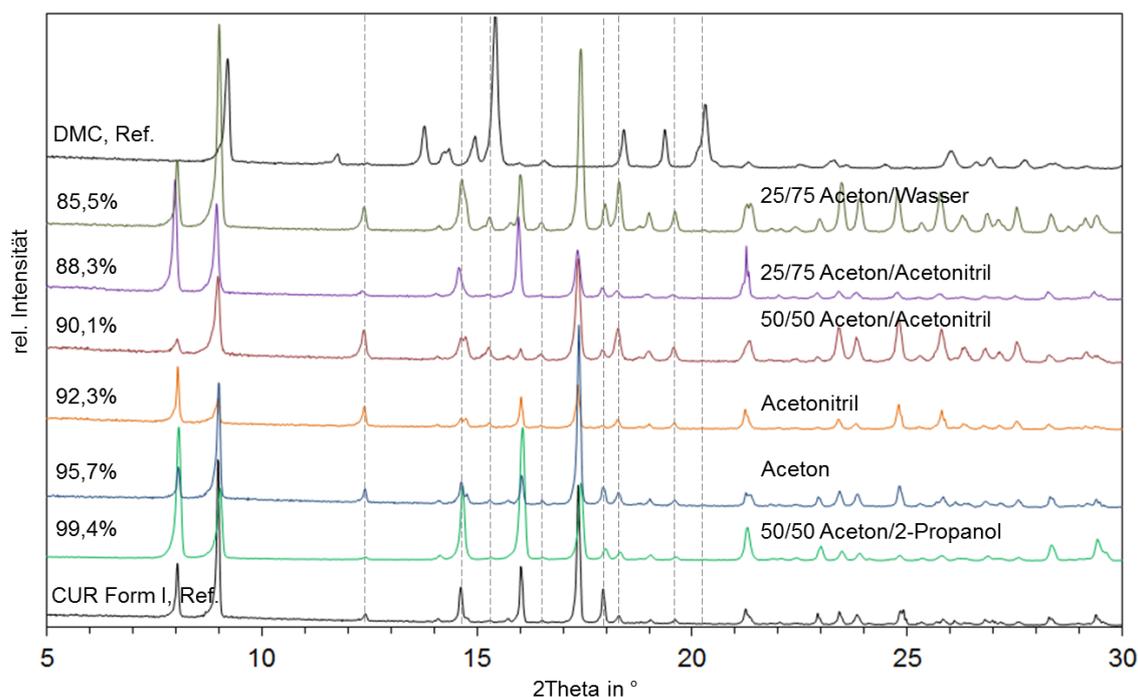


Abb. 8-9: Röntgenpulverdiffraktogramme der kristallinen Produkte sowie der Referenzproben der reinen CUR Form I (unten) und DMC (oben). Dargestellt in Abhängigkeit des abnehmenden CUR-Gehalts (in %) von unten nach oben.

Bei Betrachtung der in Abb. 8-9 vorgestellten Röntgenpulverdiffraktogramme wird deutlich, dass diese trotz des steigenden DMC-Gehalts von 0,6% auf 13,4% in der Anzahl der vorhandenen Reflexe mit denen der CUR-Reinstoffreferenz (stabile Form I) nahezu komplett übereinstimmen. Keiner der Röntgenreflexe kann eindeutig dem DMC-Standard zugeordnet werden. Eine leichte Verschiebung einzelner Röntgenreflexe der Mischproben mit hohem DMC-Anteil ist jedoch angedeutet.

Nach (Clevers et al. 2012) sind kristalline Verunreinigungen mit einem Gehalt unter 5% im Produktfeststoff mittels XRPD nicht nachweisbar. Jedoch ist diese Nachweisgrenze ausschließlich auf die Produktfeststoffe mit dem CUR-Gehalt von 99,4% und 95,7% zutreffend. In allen anderen kristallinen Produkten ist das DMC deutlich höher konzentriert (zwischen 7,7% bis 13,4%) und sollte dementsprechend, falls es kristallin vorliegt und eine von CUR abweichende Röntgenstruktur aufweist, mittels XRPD detektierbar sein. Da alle in Abb. 8-9 vorgestellten Diffraktogramme gleichmäßig auf der Basislinie liegen, kann von der Gegenwart eines amorphen Anteils in den gewonnenen Produktfeststoffen nicht ausgegangen werden. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von CUR und DMC wäre die Ausbildung von CUR/DMC-Mischkristallen ebenfalls eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit der DMC-Röntgenreflexe in den Diffraktogrammen der Produktfeststoffe.

Die DSC-Analyse der kristallinen Produkte sollte zur Aufklärung des Sachverhalts beitragen. Die aufgenommenen Schmelzkurven sind in Abb. 8-10 in

Abhängigkeit der abnehmenden CUR-Reinheit (von unten nach oben) dargestellt und den Schmelzkurven der reinen CUR Form I (unten) sowie DMC (oben) gegenübergestellt.

Aus der Darstellung in Abb. 8-10 ist ersichtlich, dass der sinkende CUR-Gehalt von 99,4% zu 85,5% eine stetige Verschiebung des gemessenen Schmelzpunkts (ϑ_{Onset}) zu niedrigeren Temperaturen von 183,8°C auf 174,6°C verursacht. Ebenfalls mit abnehmender CUR-Reinheit kann eine Zunahme der Peakbreite mit leichtem ‚Peakfronting‘ beobachtet werden. Nach (Cammenga and Epple 1995) entspricht das gemessene Schmelzverhalten dem einer verunreinigten Substanz.

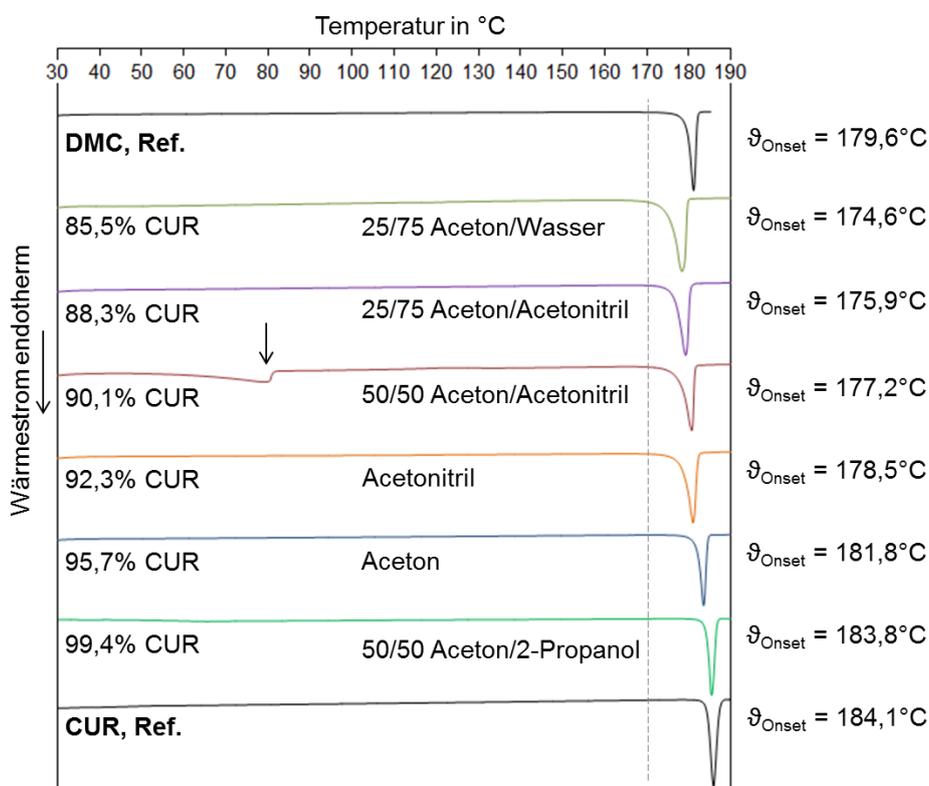


Abb. 8-10: Von unten nach oben: die Schmelzkurven der CUR-Produktfeststoffe mit abnehmender CUR-Reinheit in %; Schmelzkurve des reinen des CUR Form I (unten) bzw. des reinen DMC (oben). Die gemessenen Schmelztemperaturen sind angegeben als ϑ_{Onset} in °C.

Bei Betrachtung der DSC-Messergebnisse fällt auf, dass die Schmelzkurve des Produktfeststoffs, gewonnen im 50/50 Aceton/Acetonitril-Lösungsmittelgemisch, einen zusätzlichen breiten endothermen Peak zwischen 46°C und 80°C aufweist. Da dieser deutlich unter der zu 156°C unter Verwendung von Reinstoffschmelzdaten berechneten eutektischen Temperatur liegt, entspricht dieser endotherme Effekt höchstwahrscheinlich der Freisetzung von Restlösungsmittel aus dem Produktfeststoff. Vielmehr ist die Abwesenheit eines zweiten scharfen endothermen Peaks im Bereich von 156°C in den Schmelz-

kurven der Mischproben ein zusätzlicher Hinweis auf die vermutete CUR/DMC-Mischkristallbildung.

Fest/flüssig-Phasenverhalten von DMC in ausgewählten Lösungsmitteln

Wie in der Publikation von (Ukrainczyk et al. 2016) erwähnt und mit diesen Untersuchungen bestätigt, stellt das dem CUR strukturell am ähnlichsten aufgebaute DMC die Hauptverunreinigung des CUR im kristallinen Produkt dar.

Aufgrund des sehr hohen Preises von DMC (HPLC-Reinheit > 99%) (ca. 5.470 EUR/g bei Fa. ChemFaces China) wurde zu Beginn dieser Untersuchungen lediglich eine geringe, ausschließlich zu Referenzzwecken ausreichende Feststoffmenge von 100 mg erworben. Zur Aufklärung der erzielten Kristallisationsergebnisse waren die Untersuchungen zum Fest/flüssig-Phasenverhalten des reinen DMC in Prozesslösungsmitteln notwendig. Daraufhin wurden weitere 2 g DMC bei einem anderen Anbieter (Fa. Cfm Oskar Tropitzsch GmbH) für einen niedrigeren Preis von 770 EUR/g etwas niedrigerer Reinheit von 98% im Nachhinein erworben.

Unter der Annahme, dass das DMC in Aceton eine ähnlich hohe Löslichkeit wie CUR aufweist, wurden zunächst Acetonitril und 2-Propanol für die Löslichkeitsuntersuchungen berücksichtigt. Die mittels polythermer und isothermer Methode erhaltenen Löslichkeitswerte sind in Abb. 8-11 dargestellt. Alle im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem jeweiligen Lösungsmittel gebildeten kristallinen Phasen von DMC sowie aus der jeweiligen Lösung polytherm rekristallisierten Feststoffe wurden mittels XRPD charakterisiert. Die aufgezeichneten Röntgenpulverdiffraktogramme sind in Abb. 8-12 einerseits dem kristallinen DMC-Standard (Ref. 1, erworben bei Fa. ChemFaces China) und dem Ausgangsfeststoff dieser Untersuchungen (Ref. 2, erworben bei Fa. Cfm Oskar Tropitzsch GmbH) sowie andererseits der Referenzprobe des reinen CUR (Form I) gegenübergestellt.

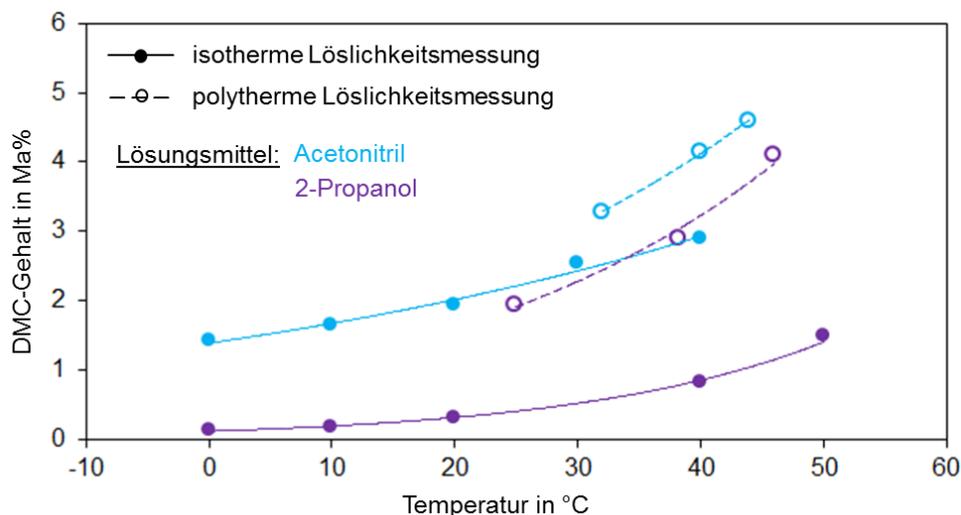


Abb. 8-11: Löslichkeitsverhalten des Reinstoffes DMC (erworben bei Fa. Cfm Oskar Tropitzsch GmbH) in: 2-Propanol (violett) und Acetonitril (blau) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Anhand der Abb. 8-11 aufgetragenen Messwerte kann zunächst abgeleitet werden, dass DMC eine deutlich höhere Löslichkeit in den untersuchten Lösungsmitteln im Vergleich zu CUR aufweist. Aus der graphischen Darstellung ist ebenfalls ersichtlich, dass in den untersuchten Lösungsmitteln die gemessenen Sättigungskonzentrationen von DMC unter den polytherm ermittelten Löslichkeitswerten liegen. Dieses unterschiedliche Löslichkeitsverhalten weist auf die Ausbildung verschiedener kristalliner Phasen von DMC hin.

Das Röntgenpulverdiffraktogramm des DMC-Ausgangsfeststoffs (Abb. 8-12, Ref. 2) zeigt das Vorliegen einer amorphen Substanz. Aus der Gegenüberstellung aller aufgezeichneten Röntgenspektren in Abb. 8-12 ist ersichtlich, dass sich die während der Löslichkeitsuntersuchungen gebildeten kristallinen Phasen von der Referenzstruktur des DMC-Reinstoffs (Ref. 1) unterscheiden.

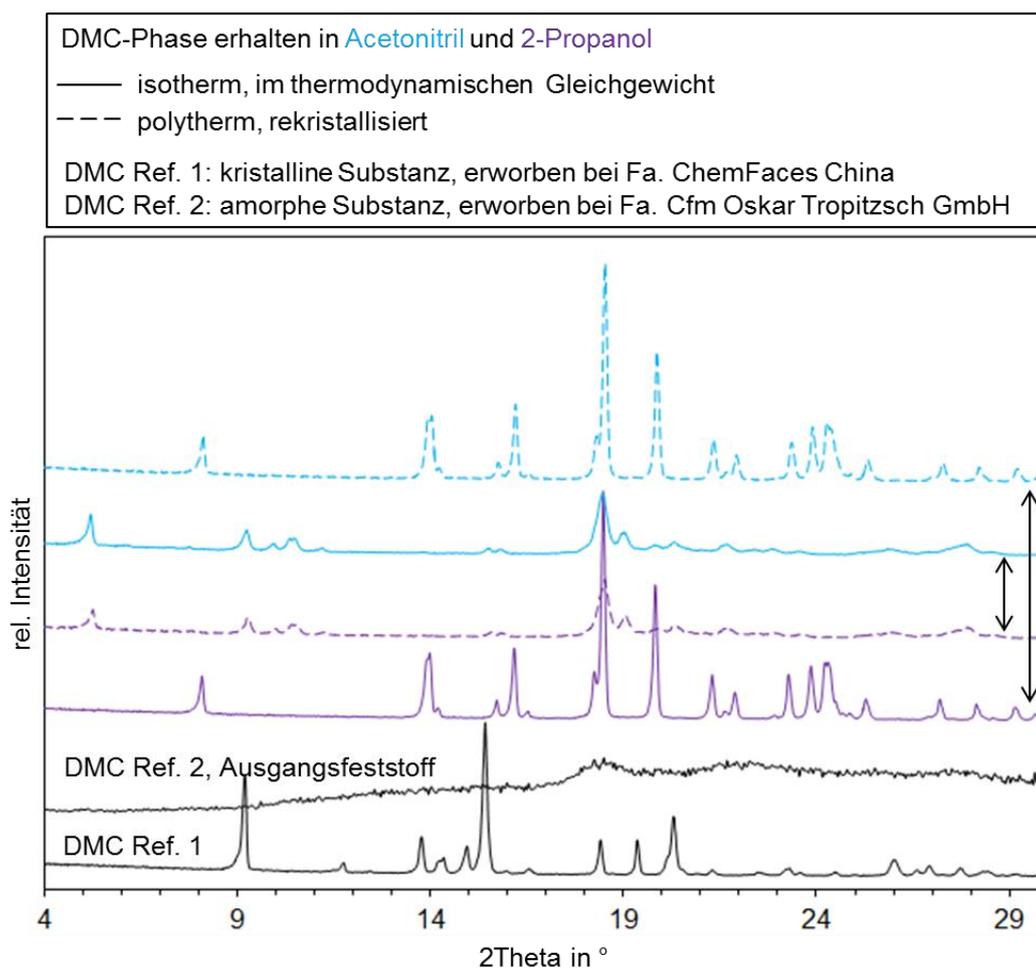


Abb. 8-12: Röntgenpulverdiffraktogramme der polytherm rekristallisierten sowie im thermodynamischen Gleichgewicht in der jeweiligen Lösung vorliegenden festen Phasen von DMC. Diffraktogramme der DMC-Reinstoffreferenzen sind gekennzeichnet mit der durchgezogenen schwarzen Linie.

Aus dem direkten Vergleich der Diffraktogramme ist deutlich zu erkennen, dass die in 2-Propanol isotherm erhaltene DMC-Phase (violette durchgezogene Linie) identisch dem aus Acetonitril polytherm gebildeten Feststoff (blaue gestrichelte Linie) ist. Umgekehrt gleicht die in Acetonitril isotherm erhaltene DMC-Phase dem in 2-Propanol polytherm gebildeten Feststoff. Da hier die gleichen kristallinen Phasen in verschiedenen Lösungsmitteln erhalten wurden, kann eine Solvatbildung an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Dagegen ist die Ausbildung neuer Polymorphe von DMC sehr wahrscheinlich.

Um ausschließen zu können, dass DMC in Form dieser Phasen die gewonnenen CUR-Produktfeststoffe verunreinigt, wurde die Darstellung in Abb. 8-9 um die zugehörigen Röntgenpulverdiffraktogramme in Abb. 8-13 erweitert.

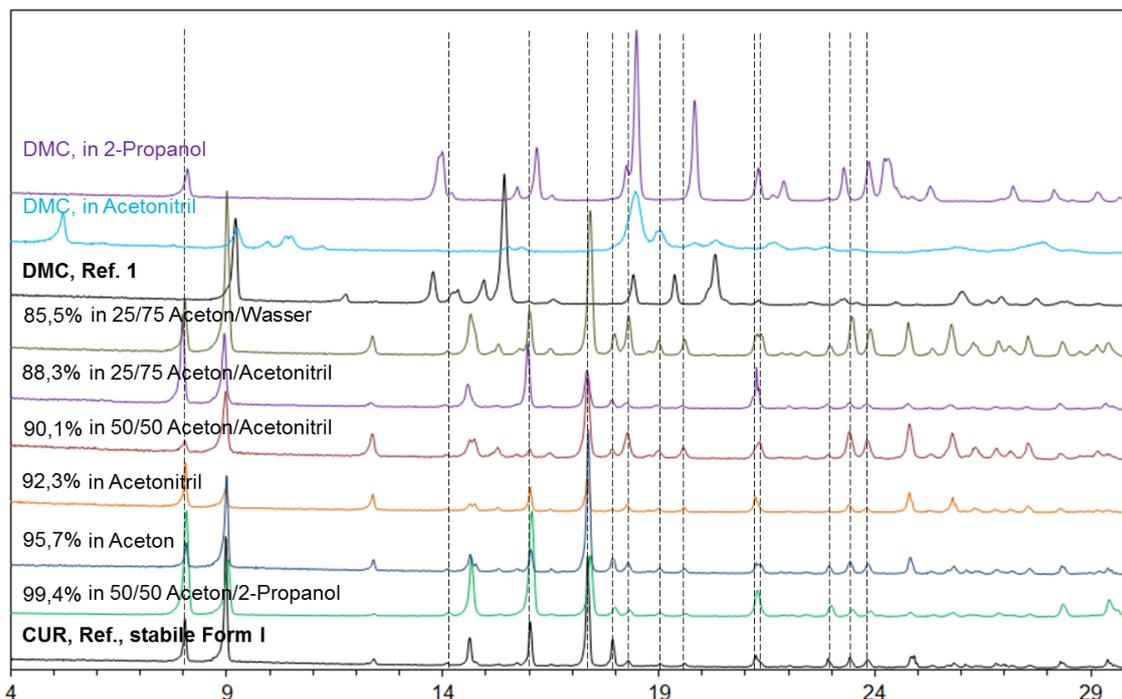


Abb. 8-13: Gegenüberstellung der Röntgenpulverdiffraktogramme der kristallinen Produkte, der in 2-Propanol und Acetonitril im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegenden kristallinen Phasen von DMC, der kristallinen DMC-Reinstoffreferenz (Fa. ChemFaces China, schwarze Linie oben) sowie der CUR-Reinstoffreferenz (stabile Form I, schwarze Linie, unten).

Anhand der senkrechten Linien in Abb. 8-13 ist ersichtlich, dass die Lage der für den CUR-Standard (Form I) charakteristischen Röntgenreflexe den einzelnen Reflexen verschiedener DMC-Phasen zwar ähnelt (z. B. bei 2Theta von 8°; 14,2°; 23,8°), jedoch können letztere keinem Röntgenreflex in den Diffraktogrammen der Produktfeststoffe eindeutig zugeordnet werden. Somit stellen die gewonnenen Produktfeststoffe keine kristallinen Gemische der im Laufe der Löslichkeitsuntersuchungen in 2-Propanol und Acetonitril gebildeten DMC-Phasen mit CUR (Form I) dar. Folglich ist die Möglichkeit einer CUR/DMC-Mischkristallbildung sehr wahrscheinlich. Diese Hypothese konnte jedoch aufgrund des fehlenden kristallinen DMC-Reinstoffs nicht mehr eindeutig experimentell nachgewiesen werden. Da kein DMC-Einkristall zur Strukturauflösung im Laufe dieser Untersuchungen gezüchtet werden konnte und in der Literatur keine Information zur Kristallstruktur von DMC vorliegt, soll im Folgenden die Möglichkeit einer CUR/DMC-Mischkristallbildung aus der räumlichen Anordnung der CUR-Moleküle im Kristallgitter der (Sanphui et al. 2011) stabilen Form I (Abb. 8-14) diskutiert werden.

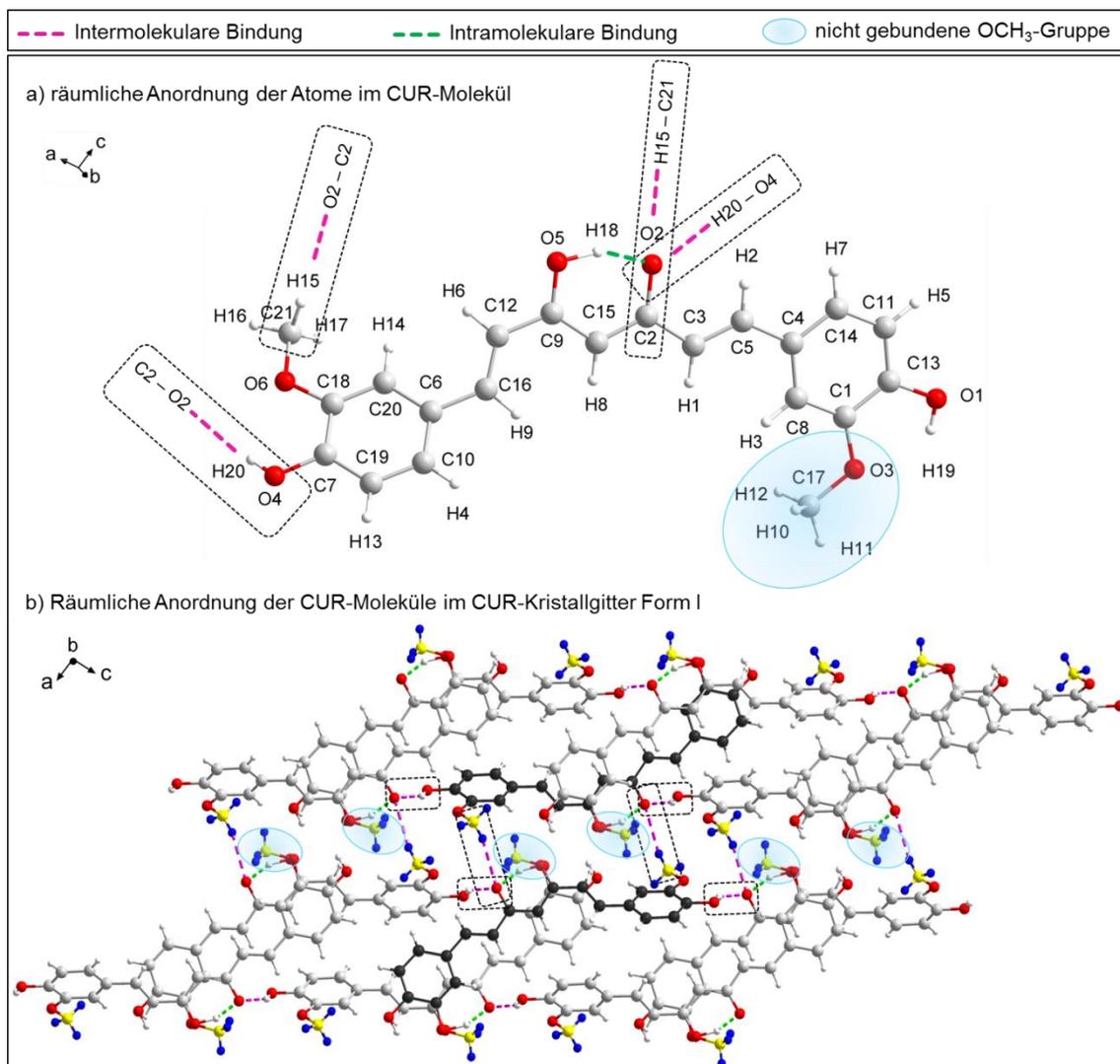


Abb. 8-14: Räumliche Darstellung der intermolekularen (pink markierten) und intra-molekularen (grün markierten) Wasserstoffbrückenbindungen im Kristallgitter der CUR Form I (CSD Strukturcode BINMEQ05 (Sanphui et al. 2011)): a) in einem CUR-Molekül, b) im Kristallgitter der CUR Form I. Die Abbildungen wurden mit der *Diamond Software* (Version 3.2) erstellt.

Die Darstellung der räumlichen Anordnung einzelner Atome im CUR-Molekül (Abb. 8-14, a)) sowie mehrerer CUR-Moleküle im CUR-Kristallgitter (Abb. 8-14, b)) wurde unter Verwendung der in der kristallographischen Datenbank vorhandenen Struktur von CUR Form I (Strukturcode BINMEQ05) in der *Diamond Software* (Version 3.2) erstellt.

Aus der Kristallstrukturanalyse folgt, dass die einzelnen CUR-Molekülen im dreidimensionalen Kristallgitter über zwei Arten intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen C21-H15...O2-C2 und C2-O2...H20-O4 (Abb. 8-14, gekennzeichnet mit pinken gestrichelten Linien) zusammengehalten werden. Weiter besteht im CUR-Molekül eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung O5-H18...O2-C2 (Abb. 8-14, gekennzeichnet mit grünen gestrichelten Linien).

In Abb. 8-14 ist schematisch dargestellt, dass immer nur eine OCH₃-Gruppe jedes CUR-Moleküls an der intermolekularen Bindung im Kristallgitter teilnimmt. Die zweite OCH₃-Gruppe liegt frei in den durch die Molekülanordnung erzeugten Gitterhohlräumen und ist am Kristallgitteraufbau nicht beteiligt (Abb. 8-14, gekennzeichnet mit der blauen Ellipse).

Aus dem Vergleich der Strukturformeln der drei CURD in Abb. 4.8 (Kap. 4.3) ist ersichtlich, dass sich das DMC-Molekül lediglich durch eine fehlende OCH₃-Gruppe vom CUR-Molekül unterscheidet.

Da in der Einheitszelle des CUR nur ein CUR-Molekül vorhanden und für das Aufrechterhalten des Gitters immer nur eine von zwei OCH₃-Gruppen im CUR-Molekül verantwortlich ist, könnten, hypothetisch, einzelne DMC-Moleküle CUR-Moleküle im Kristallgitter ersetzen, ohne das Hauptkristallgitter von CUR sichtbar zu verändern. Damit wäre die Ausbildung von CUR/DMC-Substitutionsmischkristallen sehr wahrscheinlich. Zum Nachweis einer partiellen oder vollständigen Mischkristallbildung ist jedoch die Durchführung weiterer detaillierterer Untersuchungen binärer CUR/DMC-Gemische erforderlich.

Da bei einer Mischkristallbildung der Einbau der Verunreinigung (hier DMC) in das kristalline Produkt (hier CUR) thermodynamisch kontrolliert ist, kann die innerhalb einer Kristallisationsstufe maximal erzielbare Produktreinheit nicht allein über die Optimierung von Kristallisationsprozessbedingungen erhöht werden.

Liegt eine partielle CUR/DMC-Mischkristallbildung vor, kann das CUR aus dem binären CUR/DMC-Gemisch innerhalb eines Kristallisationsschritts lediglich bis zur Grenze der partiellen Mischbarkeit im kristallinen Produkt unter den gegebenen Bedingungen angereichert werden. Bei einer vollständigen Mischbarkeit würde jeder Kristallisationsschritt lediglich zu einer stufenweisen Anreicherung und nicht vollständigen Aufreinigung von CUR im kristallinen Produkt führen.

Dennoch wurde in diesen Untersuchungen gezeigt, dass es mit der gewählten Kristallisationsprozessführung im 50/50 Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemisch möglich ist, innerhalb eines Trennschritts das BDMC komplett aus dem kristallinen Produkt zu entfernen sowie den DMC-Anteil von 23,5% auf 0,6% zu reduzieren und CUR mit einer Reinheit von 99,4% herzustellen.

Nach (Nandakumar, et al., 2006) ist der CUR-Anteil von 98% im CURD-Gemisch zur Herstellung von Artemisinin-Curcumin-Kombinationspräparate zur Malariabehandlung ausreichend. Da in der Literatur keine weiteren Angaben der im kristallinen CUR maximal zulässigen BDMC- bzw. DMC-Menge zu finden sind, stellt die hier erhaltene Aufreinigung eine signifikante „Qualitätsverbesserung“ innerhalb eines einzigen Kristallisationsschritts dar.

Literatur zum Kapitel 8

- Cammenga HK, Epple M (1995) Grundlagen der Thermischen Analysetechniken und ihre Anwendungen in der präparativen Chemie. *Angewandte Chemie* 107(11):1284-1301 doi:10.1002/ange.19951071105
- Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Torres MCL (2015) Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology (Campinas)* 35(1):115-119 doi:10.1590/1678-457x.6515
- Clevers S, Simon F, Dupray V, Coquerel G (2012) Temperature resolved second harmonic generation to probe the structural purity of m-hydroxybenzoic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 112(1):271-277 doi:10.1007/s10973-012-2763-y
- Gately S, Triezenberg SJ (2012) Solid Forms of Curcumin.
- ICH (2016) Guideline for Residual Solvents. In: ICH (ed) ICH Harmonised Guideline. vol Q3C(R6), Geneva, Switzerland, p 40
- Isakov AI, Kotelnikova EN, Muenzberg S, Bocharov SN, Lorenz H (2016) Solid Phases in the System l-Valine—l-Isoleucine. *Crystal Growth & Design* 16(5):2653-2661 doi:10.1021/acs.cgd.5b01766
- Jagannathan R, Abraham PM, Poddar P (2012) Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability. *J Phys Chem B* 116(50):14533-40 doi:10.1021/jp3050516
- Kühn FE, Schmidt A (2017) Metallkomplexe als Antikrebsmittel. *Chemie in unserer Zeit* 51(2):86-95 doi:10.1002/ciuz.201600756
- Liu J, Svard M, Hippen P, Rasmuson AC (2015) Solubility and crystal nucleation in organic solvents of two polymorphs of curcumin. *J Pharm Sci* 104(7):2183-9 doi:10.1002/jps.24463
- Mishra MK, Sanphui P, Ramamurty U, Desiraju GR (2014) Solubility-Hardness Correlation in Molecular Crystals: Curcumin and Sulfathiazole Polymorphs. *Crystal Growth & Design* 14(6):3054-3061 doi:10.1021/cg500305n
- Naama JH, Alwan GH, Obayes HR, et al. (2012) Curcuminoids as antioxidants and theoretical study of stability of curcumin isomers in gaseous state. *Research on Chemical Intermediates* 39(9):4047-4059 doi:10.1007/s11164-012-0921-2
- Péret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA (2005) Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38(8-9):1039-1044 doi:10.1016/j.foodres.2005.02.021
- Poornima B, Prasad KVSRRG, Bharathi K (2016) Evaluation of solid-state forms of curcuminoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7(10):4035-4044 doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.7
- Pothitirat W, Gritsanapan W (2005) Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin in the Crude Curcuminoid Extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC-Densitometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences* 32(1-2):23-30
- Ruby AJ, Kuttan G, Dinesh Babu K, Rajasekharan KN, Kuttan R (1995) Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters* 94:79-83
- Sanphui P, Goud NR, Khandavilli UB, Bhanoth S, Nangia A (2011) New polymorphs of curcumin. *Chem Commun (Camb)* 47(17):5013-5 doi:10.1039/c1cc10204d
- Thorat AA, Dalvi SV (2015) Solid-State Phase Transformations and Storage Stability of Curcumin Polymorphs. *Crystal Growth & Design* 15(4):1757-1770 doi:10.1021/cg501814q
- Tonnesen HH, Karlsen J, Mostad A (1982) Structural Studies of Curcuminoids. I. The Crystal Structure of Curcumin. *Acta Chemica Scandinavica* 36(B):475-479
- Ukrainczyk M, Hodnett BK, Rasmuson AC (2016) Process Parameters in the Purification of Curcumin by Cooling Crystallization. *Organic Process Research & Development* 20(9):1593-1602 doi:10.1021/acs.oprd.6b00153
- Yalkowsky SH (1981) Solubility and partitioning V: dependence of solubility on melting point. *J Pharm Sci* 70(8):971-3 doi:10.1002/jps.2600700845
- Zheng Y, Vassiljev N, Konstantinidis A, Griffiths J, Speller R (2015) Limit of Detection in X-ray Diffraction Measurements of Tissue Equivalent Samples. *J Phys Conf Ser* 637 doi:10.1088/1742-6596/637/1/012037

Schlussfolgerungen zu den Trennproblemen und Ableitung einer Vorgehensweise bei der Aufreinigung von Mehrkomponentengemischen

Zur Aufreinigung pharmazeutisch aktiver Substanzen, wie Rutin und Curcumin, aus natürlichen Pflanzenextrakten sowie Artemisinin, aus der Produktlösung der semi-synthetischen Reaktion, und der Bereitstellung dieser in kristalliner Form wurde das thermische Trennverfahren der Lösungskristallisation untersucht. Dabei wurde das Kristallisationsverfahren so ausgelegt, dass die Gewinnung der reinen Zielkomponente möglichst innerhalb einer Trennstufe erfolgt.

Aus der Gegenüberstellung der in Kap. 6, 7 und 8 vorgestellten Untersuchungen zur kristallisationsbasierten Aufreinigung von Artemisinin, Rutin und Curcumin können folgende stoffsystemübergreifende sowie –spezifische Eigenschaften zusammengefasst werden. Alle drei Zielsubstanzen sind:

- natürliche Bestandteile komplexer organischer Gemische strukturell sehr ähnlicher Komponenten,
- kristalline organische Verbindungen, welche zur Polymorphie und/oder Solvatbildung neigen,
- pharmazeutische Wirkstoffe, bei denen die chemische und strukturelle Reinheit eine entscheidende Rolle bei der Arzneimittelformulierung spielt.

Da für jeden Reinstoff eine stetige Zunahme der Löslichkeit mit zunehmender Temperatur im jeweiligen Prozesslösungsmittel gemessen wurde, konnte eine Kühlungskristallisation mit moderater Systemkühlung (zw. 0,1 - 0,2 K/min) angewendet werden. Um die selektive Kristallisation der jeweiligen Komponente in Gegenwart von Verunreinigungen einzuleiten und dabei die spontane Keimbildung der Verunreinigungen zu unterdrücken, wurden während des Kühlvorgangs Impfkristalle des zu kristallisierenden Feststoffs der jeweiligen metastabilen Lösung hinzugefügt.

Diese Vorgehensweise ermöglichte die Gewinnung der jeweiligen Zielkomponente ausgehend von Anteilen von 69% (Artemisinin), 80% (Rutin) und 70% (Curcumin) im zugehörigen Rohgemisch mit einer Reinheit von über 99% im kristallinen Produkt innerhalb einer Trennstufe. Jedoch variierte die erzielte

Gesamtproduktausbeute zw. 50% bei Artemisinin, über 79% bei Curcumin und erreichte den höchsten Wert von 95% bei der Aufreinigung von Rutin.

Um höhere Abreicherung von Curcumin und Artemisinin aus der jeweiligen Arbeitslösung zu ermöglichen, wurde die weitere Unterkühlung der Arbeitslösung bzw. Zugabe des geeigneten Antisolvents zur gewonnenen Produktsuspension angewendet. Die damit erzielte Erhöhung der Gesamtproduktausbeute war systematisch mit der Abnahme der Reinheit der jeweiligen Zielkomponente im kristallinen Produkt verbunden.

Besonderheiten des jeweiligen Trennproblems

Aufreinigung von ARTE aus der Produktlösung der semi-synthetischen Reaktion

Die Besonderheit dieses Trennproblems bestand darin, dass nach der Durchführung der konzipierten geimpften Kühlungskristallisation von ARTE im 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch das DCA, welches lediglich zu 0,05 Ma% in der Arbeitslösung zu Prozessbeginn vorlag, als einzige Verunreinigung im kristallinen Produkt zu einem Anteil von 1,2% verblieb. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die Kristallisation verschiedene Prozessoptionen untersucht, das DCA aus dem Kristallinat oder bereits aus der Originalsyntheselösung zu eliminieren.

In der ersten Option wurde die Abtrennung von DCA von ARTE aus dem kristallinen Produkt untersucht. Unter Verwendung von Acetonitril, welches als gutes Lösungsmittel für ARTE und gleichzeitig als Antisolvent für DCA agiert, konnte reines ARTE in gelöster Form sowie reines DCA in kristalliner Form gewonnen werden. Das somit erhaltene kristalline DCA kann für die nächste Synthese direkt eingesetzt werden.

In der zweiten Option unter dem Einsatz der kontinuierlichen SMB-Chromatographie konnte der DCA-Gehalt in der Originalsyntheselösung soweit herabgesetzt werden, dass es in der darauffolgenden Kühlungskristallisation untersättigt blieb und die Gewinnung des reinen kristallinen ARTE ermöglichte. Aufgrund der stark verdünnten Produktlösung der SMB-Chromatographie stieg die Anzahl notwendiger Prozessschritte im Up- und Downstream an.

Die Durchführung der geimpften Kühlungskristallisation von ARTE in reinem Toluol als Prozesslösungsmittel als letzte Option ermöglichte die Gewinnung des reinen kristallinen ARTE innerhalb eines Trennschritts im direkten Anschluss an die organische Synthese. Da sich DCA in Toluol sehr gut löst, blieb es während gesamten Kristallisationsprozesses untersättigt und beeinträchtigte die ARTE-Reinheit im kristallinen Produkt nicht.

Aufreinigung von Rutin aus dem trockenen Pflanzenextrakt

Die Besonderheit des Trennproblems besteht einerseits im extrem hohen Rutin-Gehalt von über 80% im trockenen Pflanzenextrakt gegenüber den restlichen Bestandteilen, andererseits in der Fähigkeit von Rutin unter Umgebungsbedingungen und im Trockenextrakt in Form des Trihydrats aufzutreten sowie in organischen Lösungsmitteln im thermodynamischen Gleichgewicht kristalline Solvate auszubilden.

Zur Bestimmung des Löslichkeitsverhaltens von Rutintrihydrat in Ethanol als Prozesslösungsmittel war insbesondere der dynamische Charakter polythermer Löslichkeitsmessung von großer Bedeutung. Dabei konnte die unerwünschte lösungsmittelvermittelte Fest/fest-Phasenumwandlung zum stabilen Rutinethanolat unterdrückt werden. Mittels isothermer Löslichkeitsmessungen wurde die Gleichgewichtslöslichkeit des Rutinethanols in Ethanol bestimmt.

Die Konzipierung des kristallisationsbasierten Aufreinigungsprozesses von Rutin erfolgte ausschließlich unter Verwendung der Reinstofflöslichkeitswerte und auf der Grundlage der ermittelten signifikanten Löslichkeitsunterschiede des in Ethanol metastabilen Rutintrihydrats gegenüber dem Rutinethanolat.

Aufreinigung von CUR aus dem Pflanzenextrakt

Im Gegensatz zu den anderen beiden Stoffsystemen war das CUR-haltige Rohgemisch in Bezug auf die Komponentenzusammensetzung deutlich weniger komplex und setzte sich überwiegend aus drei Curcuminoiden, dem Zielmolekül CUR (70%) sowie zwei CUR-Derivaten DMC und BDMC, zusammen. Daraufhin wurde das aufzureinigende Feststoffgemisch auf ein pseudo-ternäres CURD-Gemisch behandelt.

Im Laufe der Untersuchungen zur CUR-Aufreinigung hat sich jedoch insbesondere die Trennung des CUR von DMC als überaus schwer erwiesen. Einerseits war dies dem sehr ähnlichen strukturellen Molekülaufbau der beiden Komponenten, andererseits der ausgeprägten Neigung aller Curcuminoide zur Polymorphie und Solvatbildung geschuldet.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war ausschließlich das Festphasenverhalten des CUR in der Literatur detailliert beschrieben. Zum BDMC wurde über die Existenz von zwei Solvatphasen in 2-Propanol und Methanol berichtet. Zum Festphasenverhalten von DMC lagen, außer der Angabe von zwei 12 K auseinanderliegenden Schmelztemperaturen, keine Informationen in der Literatur vor. Basierend auf der großen Abweichung der publizierten Schmelzwerte zu dem hier gemessenen (7 K und 19 K) konnte die Komplexität des DMC-Festphasenverhaltens lediglich vermutet werden. Die anschließende Isolierung mehrerer, vom Ausgangsfeststoff abweichender, kristalliner Phasen von DMC bestätigte die Vermutung und betonte die Notwendigkeit einer systematischen Untersuchung des Festphasenverhaltens von DMC im Vorfeld

einer weiteren Optimierung des Kristallisationsprozesses, falls eine höhere als mit dem konzipierten Trennprozess erzielte Aufreinigung des CUR erforderlich ist.

Verallgemeinerung der Vorgehensweise

Das Hauptziel dieser Forschungsarbeit war die Erarbeitung einer innovativen und breit anwendbaren Strategie zur Aufreinigung pharmazeutisch relevanter Substanzen aus natürlichen Pflanzenextrakten oder Produktlösungen organischer Synthesen und die Bereitstellung dieser in kristalliner Form. Da diese Gemische gewöhnlich eine große Vielfalt mit dem Zielmolekül strukturell sehr ähnlicher Nebenkomponenten enthalten, stand das Verfahren der geimpften Kühlungskristallisation zur selektiven Stoffaufreinigung im besonderen Fokus dieser Arbeit.

Basierend auf den vorgestellten Untersuchungsergebnissen wird folgende Vorgehensweise zur Lösung ähnlicher Trennprobleme unter Verwendung der geimpften Kühlungskristallisation als Trennverfahren vorgeschlagen.

Im Laufe der Auslegung einer geimpften Kühlungskristallisation müssen Prozessparameter, wie die Start- und Endkonzentration der zu kristallisierenden Komponente in der Arbeitslösung, die Start- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, die Kühlrate, die Temperatur der Impfkristallzugabe und die Impfkristallform, festgelegt werden. Die Auswahl dieser Parameter basiert zum größten Teil auf den Untersuchungen zum Fest/flüssig-Phasenverhalten der reinen Zielkomponente in potentiellen Prozesslösungsmitteln. Aus den Ergebnissen des ersten Trennexperimentes können anschließend die Hauptverunreinigungen identifiziert, deren Einfluss auf die Produktqualität abgeleitet und der Trennprozess entsprechend optimiert werden.

In Abb. 9-1 ist eine mögliche Herangehensweise bei der Prozessauslegung unter Verwendung der reinen zu kristallisierenden Komponente sowie in Abb. 9-2 unter Berücksichtigung dieser in Gegenwart der Hauptverunreinigungen dargestellt.

Voraussetzung für die Durchführung dieser Untersuchungen ist die Verfügbarkeit der kristallinen Zielkomponente in ausreichender Reinheit und Menge (≥ 10 g).

Wie das Schema in Abb. 9-1 zeigt, stellt die Suche nach einem geeigneten Prozesslösungsmittel den Ausgangspunkt jeder Lösungskristallisation dar. Im Vorfeld der Löslichkeitsuntersuchungen sollte jedoch das aufzureinigende Gemisch bzgl. Komponentenzusammensetzung und -gehalt charakterisiert und der ermittelte Anteil der Zielkomponente im Rohgemisch berücksichtigt werden. Für die Anwendung einer Kühlungskristallisation ist es notwendig, dass die

Löslichkeit der zu kristallisierenden Komponente im Prozesslösungsmittel mit zunehmender Temperatur möglichst steil ansteigt. Im Antisolvent, welches entweder als Bestandteil des Prozesslösungsmittels oder am Ende der Kühlung zur Ausbeutesteigerung eingesetzt werden kann, sollte sich die Zielkomponente wenig oder gar nicht lösen. Beide, Antisolvent und Prozesslösungsmittel, sollten idealerweise gering toxisch sein und, zur Herstellung eines lösungsmittelfreien Produktfeststoffs, einen hohen Dampfdruck aufweisen. Das gewählte Antisolvent sollte mit dem Prozesslösungsmittel mischbar sein.

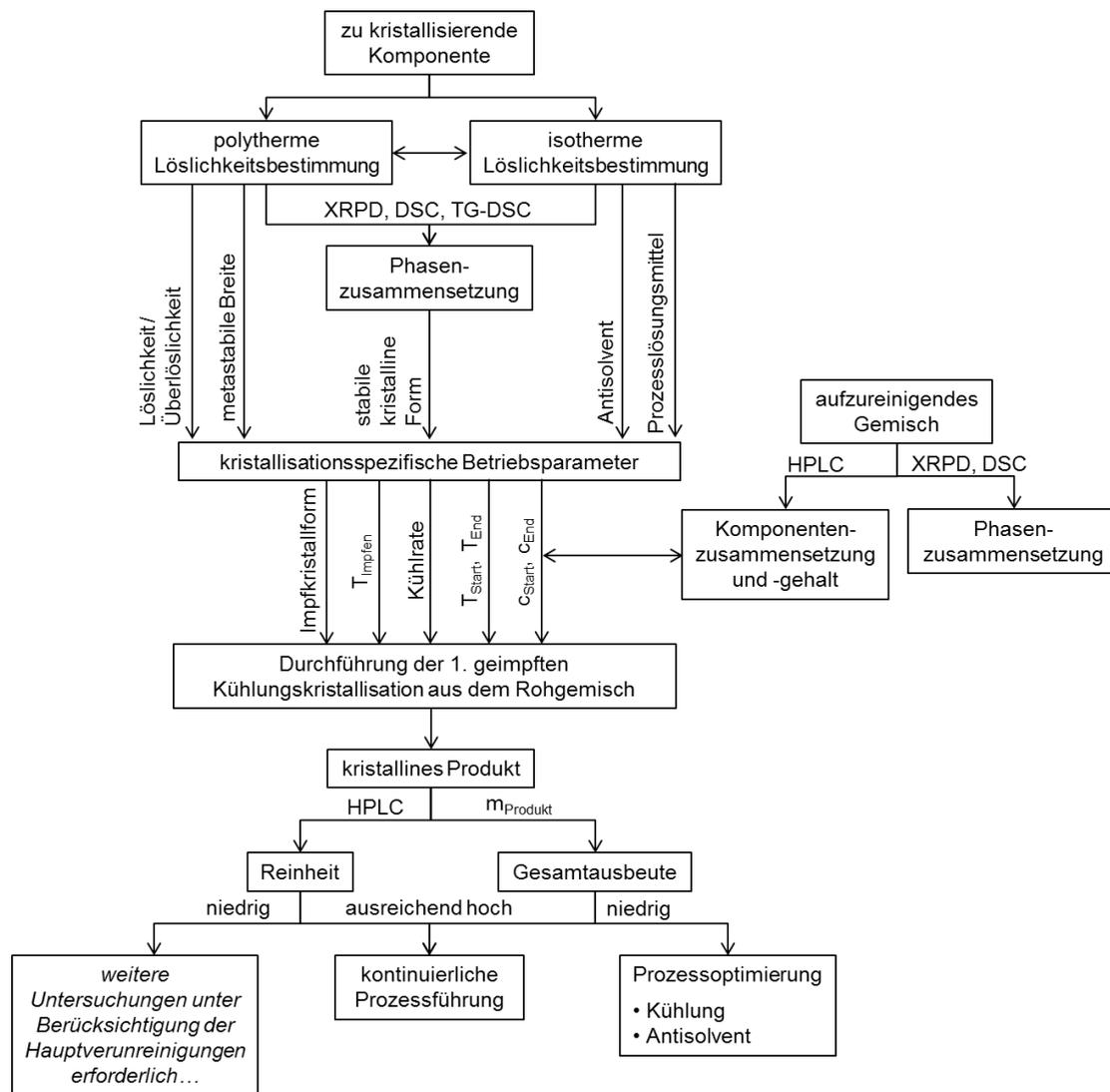


Abb. 9-1: Vorgehensweise bei der Auslegung einer geimpften Kühlungskristallisation unter Berücksichtigung der reinen zu kristallisierenden Komponente.

Wie am Beispiel von Rutin vorgestellt, ermöglicht der dynamische Charakter polythermer Löslichkeitsmessungen die Ermittlung des Löslichkeitsverhaltens der unter Umgebungsbedingungen stabilen kristallinen Phase der Zielkomponente in verschiedenen Lösungsmitteln. Mittels isothermer Löslichkeitsmessung wird anschließend die Sättigungskonzentration der im gewählten Prozesslösungsmittel thermodynamisch stabilen Phase der Ziel-

komponente im relevanten Temperaturbereich bestimmt. Der Verlauf der Überlöslichkeitskurve kann ebenfalls im Laufe polythermer Messungen ermittelt werden. Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse können die kristallisationsspezifischen Betriebsparameter (Abb. 9-1) abgeleitet und die erste geimpfte Kühlungskristallisation der Zielkomponente aus dem Rohgemisch durchgeführt werden. Anhand der chemischen und strukturellen Reinheitsanalyse des gewonnenen Kristallisats kann der Trennprozesserfolg bewertet und die Hauptverunreinigungen der Zielkomponente können identifiziert werden.

Zeigen die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reinheit der Zielkomponente im kristallinen Produkt, so kann die auf der Basis von Reinstofflöslichkeiten konzipierte Kühlungskristallisation bzgl. der Gesamtproduktausbeute weiter optimiert bzw. bei ausreichend hoher Ausbeute der bestehende Batch-Prozess zu einem kontinuierlichen erweitert werden.

Beeinträchtigen die Verunreinigungen die Reinheit der Zielkomponente im kristallinen Endprodukt, sind, wie das Schema in Abb. 9-2 zeigt, weitere Untersuchungen der Zielkomponente unter Berücksichtigung der Verunreinigungen erforderlich. Dabei lässt sich insbesondere aus der Struktur (XRPD) und Schmelzanalyse (DSC) des gewonnenen Produktfeststoffs ableiten, wie Verunreinigungen in das kristalline Produkt eingebaut sind.

Neigen die Zielkomponente und Verunreinigung zur partiellen oder vollständigen Mischkristallbildung (Abb. 9-2, linker Ast) ist der Einbau der Verunreinigung in das kristalline Produkt thermodynamisch kontrolliert. In diesem Fall ist eine vollständige Aufreinigung der Zielkomponente innerhalb einer einzigen Kristallisationsstufe nicht allein über die Optimierung von Kristallisationsprozessbedingungen möglich. Bei einer partiellen Mischkristallbildung erfolgt innerhalb eines Kristallisationsschritts lediglich eine Anreicherung der Zielkomponente im kristallinen Produkt bis zur Grenze der partiellen Mischbarkeit unter den gegebenen Bedingungen. Bei einer vollständigen Mischbarkeit würde jeder Kristallisationsschritt lediglich zu einer stufenweisen Anreicherung und nicht vollständigen Aufreinigung der Zielkomponente im kristallinen Produkt führen. Wenn die Aufreinigung mehrerer Mischungskomponenten erwünscht ist, wird die fraktionierten Kristallisation, die Hintereinanderschaltung mehrerer Kristallisationsschritte unter Verwendung der im vorgehenden Schritt gewonnenen kristallinen Phase als Ausgangsphase des nachgeschalteten Schritts, angewendet.

Liegt keine Mischkristallbildung vor, bestehen mehrere Möglichkeiten, die Reinheit des kristallinen Produkts mittels der Kristallisationsprozessoptimierung zu erhöhen (Abb. 9-2, rechter Ast).

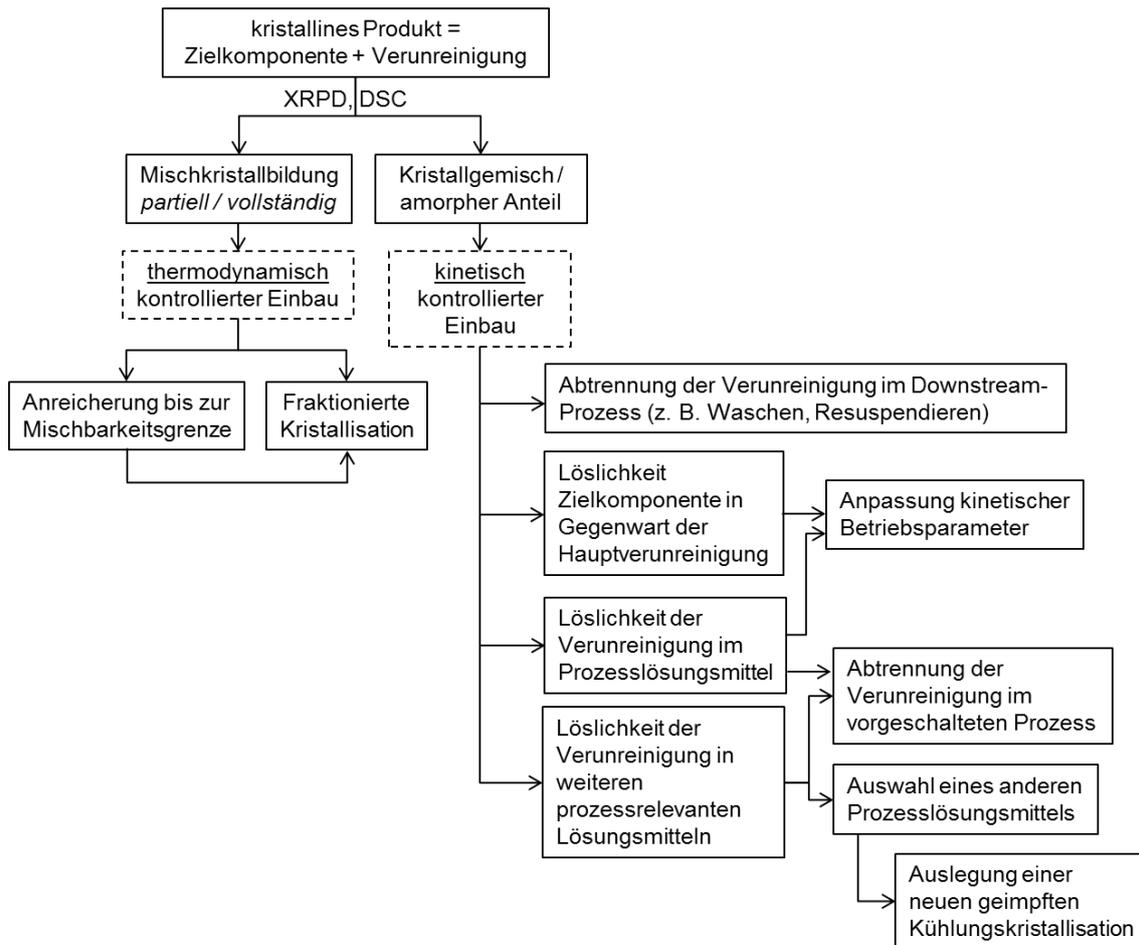


Abb. 9-2: Vorgehensweise bei der Prozessoptimierung zur Erhöhung der Produktreinheit unter Berücksichtigung der zu kristallisierenden Komponente in Gegenwart von Hauptverunreinigungen.

Verbleiben die Verunreinigungen im kristallinen Produkt in Form anhaftender Mutterlaugenreste, können diese in einem nachgeschalteten Waschschrift oder durch das Resuspendieren des gewonnenen Kristallisats im geeigneten Lösungsmittel aus dem kristallinen Produkt entfernt werden.

Unter Berücksichtigung der Löslichkeit der Zielkomponente in Gegenwart von Verunreinigungen im prozessrelevanten Lösungsmittel kann der bestehende Kristallisationsprozess über die Modifikation der Betriebsparameter optimiert werden.

Weist die Verunreinigung eine gegenüber der Zielkomponente geringere Löslichkeit im Prozesslösungsmittel auf, so kann der Gehalt der Verunreinigung in der Arbeitslösung in einem vorgeschalteten Trennschritt reduziert werden.

Manchmal, wie es am Beispiel von Artemisinin gezeigt werden konnte, bietet sich an, ein neues Prozesslösungsmittel einzusetzen und dabei die Gleichgewichtslöslichkeit der Zielkomponente und Verunreinigung so zu beeinflussen, dass während der Kristallisation der Zielkomponente die Verunreinigung untersättigt vorliegt und in der Arbeitslösung verbleibt. Hierfür

sind jedoch Kenntnisse des Löslichkeits- und Rekrystallisationsverhaltens der Verunreinigung als Reinstoff in potentiellen Prozesslösungsmitteln notwendig.

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Forschungsarbeit war die Erarbeitung einer breiter einsetzbaren Vorgehensweise zur Aufreinigung von pharmazeutisch relevanten Naturstoffen und organischen Mehrkomponentengemischen. Ziel war deren Bereitstellung in reiner kristalliner Form möglichst innerhalb eines einzigen Trennschritts. Als Beispiele dienten drei pharmazeutisch relevante Wirkstoffe, das semi-synthetisch hergestellte Artemisinin, Rutin und Curcumin als Bestandteile der Pflanzenextrakte.

Aufgrund der geringen Selektivität von Extraktions- und Syntheseprozessen lassen sich die Zielkomponenten mittels dieser Verfahren ausschließlich im Gemisch mit einer Vielzahl unerwünschter strukturähnlicher Nebenkomponten herstellen. Um den Qualitätsanforderung der spezifischen Anwendung zu genügen, war der Einsatz von Kristallisationsprozessen zur vollständigen Aufreinigung der Zielkomponente aus dem zugehörigen Rohgemisch erforderlich.

Um eine selektive Kristallisation der Zielsubstanz aus dem zugehörigen flüssigen Mehrkomponentengemisch zu ermöglichen, ist die Kenntnisse grundlegender Fest/flüssig-Lösungsgleichgewichte essentiell. Zur Ermittlung thermodynamischer Funktionen und zur Entwicklung einer geeigneten Kristallisationsstrategie wurden folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- Das zu trennende Rohgemisch zunächst bzgl. der Komponenten- sowie Phasenzusammensetzung charakterisiert.
- Unter Verwendung von Reinstoffreferenzen wurde das Löslichkeits- und Rekristallisationsverhalten der Zielkomponente in potentiell interessanten Prozesslösungsmitteln untersucht.
- Basierend darauf wurde das Lösungsmittel festgelegt und die grundlegenden Fest/flüssig-Phasengleichgewichte der reinen Zielkomponenten wurden mittels isothermer Methode bestimmt.
- Auf der Grundlage polythermer und isothermer Löslichkeitsuntersuchungen wurde eine geeignete Kristallisationsstrategie abgeleitet, welche die Bereitstellung der unter Umgebungsbedingungen stabilen kristallinen Formen der Zielkomponenten im Endprodukt sicherstellt.
- Um den möglichen Einfluss der Verunreinigungen auf den Trennerfolg der Zielkomponente zu beurteilen, wurde die Löslichkeit der Zielkomponente im

jeweiligen Rohgemisch bzw. in Gegenwart zur Verfügung stehender Verunreinigungen für gewählte Prozesslösungsmittel ermittelt.

- Je nach Güte der erzielten Trennergebnisse wurde untersucht, ob die Produktreinheit bzw. Gesamtproduktausbeute über die Optimierung kristallisationsspezifischer Betriebsparameter des bestehenden Prozesses verbessert werden können oder der Einsatz anderer Prozesslösungsmittel hierzu erforderlich ist.

Bei der Bearbeitung der drei betrachteten Trennprobleme wurde gezeigt, dass die geimpfte Kühlungskristallisation eine selektive Trennung der jeweiligen Zielkomponente ausgehend von Anteilen von 69% (Artemisinin), 81% (Rutin) sowie 70,8% (Curcumin) in dem zugehörigen Rohgemisch mit einer Reinheit von über 99% im kristallinen Endprodukt innerhalb einer Trennstufe ermöglicht.

Durch gezielte Ausnutzung der Neigung des kristallinen **Rutins** an der Umgebungsluft ein Trihydrat und in Ethanol ein entsprechendes Solvat auszubilden sowie unter Verwendung der ermittelten starken Löslichkeitsunterschiede beider Rutinsolvate in Ethanol, gelang nicht nur die Gewinnung von über 99% reinem kristallinem Rutin, sondern es wurde auch eine hohe Gesamtausbeute von 95% erzielt. Die Untersuchungen zur relativen Stabilität der Rutinsolvate in verschiedenen Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemischen zeigten, dass auch unter Verwendung des deutlich günstigeren Ethanols von technischer Qualität (Reinheit > 94%) die Herstellung des kristallinen Rutin-trihydrats im Endprodukt möglich war. Da bereits der erste Batch-Versuch das erwünschte Trennergebnis lieferte, wurde eine semikontinuierliche Prozessführung mit darauffolgendem Prozess-Up-Scaling von 200 ml- auf 1 l-Maßstab realisiert. Nach einmaligem Animpfen der in technischem Ethanol vorgelegten und auf 25°C abgekühlten Arbeitslösung konnte die semikontinuierliche Prozessführung bei konstanter Temperatur (25°C) mit periodischem Produktabzug und periodischer Rohlösungszufuhr für beide getesteten Behältergrößen erfolgreich umgesetzt werden. Beide Prozesse lieferten kristallines Rutintrihydrat mit gleich hoher Reinheit von über 99%. Die kontinuierliche Verfolgung des Kristallisationsfortschritts von Rutin im Laufe der semikontinuierlichen Kristallisation im 1 l-Maßstab zeigte, dass die Erhöhung der Gesamtausbeute über die Optimierung der Verweilzeit der Impf- bzw. Produktsuspension in der Arbeitslösung erzielt werden kann.

Der entwickelte Trennprozess ist zum Einsatz als sukzessiver Schritt nach der Extraktion zur Aufreinigung von Rutin vor Ort in Vietnam sehr gut geeignet. Er ist aus verfahrenstechnischer Sicht sehr einfach, robust, sicher und kostengünstig, weil damit ohne strenge Kontrolle der Prozesstemperatur und der Rutinkonzentration innerhalb eines einzigen Trennschritts das kristalline Rutin

von hoher Qualität aus dem Rohextrakt nahezu vollständig gewonnen wird. Die laufenden Prozesskosten können einerseits über den Einsatz von technischem Ethanol als Prozesslösungsmittel sowie über das Recycling und die Rückführung des Lösungsmittels zusätzlich reduziert werden.

Mit dem Ziel, kristallines **Artemisinin** mit einer Reinheit von mind. 97% unmittelbar aus der toluolenthaltenden Syntheselösung zu gewinnen, wurde die geimpfte Kühlungskristallisation aus dem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Diese ermöglichte die Aufreinigung von Artemisinin von einem Anfangsgehalt von 69% in der Syntheselösung auf 98,8% im kristallinen Produkt bei einer Gesamtproduktausbeute von 43,2%. Bis auf 1,2% des Photokatalysators 9,10-Dicyanoanthracen (DCA) wurden alle Verunreinigungen in einem Trennschritt entfernt. Die Untersuchungen zur Erhöhung der Gesamtproduktausbeute von Artemisinin mittels weiterer Kühlung der Arbeitslösung bzw. Zugabe von Ethanol als Antisolvent ermöglichten eine deutliche Steigerung der Ausbeute auf jeweils 63% bzw. 74%, führten jedoch gleichzeitig zum 6-fachen Anstieg des DCA-Gehalts im Kristallinat. Aufgrund der hohen Toxizität von DCA wurden weitere Möglichkeiten untersucht, die DCA-Konzentration im kristallinen Produkt auf einen maximalen Wert von 0,5% zu reduzieren. Dazu wurden drei Möglichkeiten zur Verfahrensverbesserung untersucht.

Mit einem nachgeschalteten Downstream-Prozess konnte zunächst der DCA-Gehalt im nach der Kühlungskristallisation gewonnenen Produkt von 1,2% auf 0,05% reduziert und die Reinheit von Artemisinin von 98,8% auf 99,5% erhöht werden. Dabei konnte das über 99% reine kristalline DCA aus der Lösung zurückgewonnen werden, welches sehr effizient als Katalysator für die nächste Synthese eingesetzt werden könnte.

In der zweiten Option wurde in einem Kooperationsprojekt die Kombination von Gegenstrom-Flüssigchromatographie und Kühlungskristallisation zur Aufreinigung von Artemisinin aus der Syntheselösung untersucht. Dabei wurde mittels kontinuierlicher Chromatographie der Gehalt von DCA in der Originalsyntheselösung soweit herabgesetzt (0,0008 Ma%), dass in der darauffolgenden Kühlungskristallisation Artemisinin mit einer Reinheit von 99,9% und einer Ausbeute von 61,5% gewonnen werden konnte.

Als letzte Option wurde auch noch die geimpfte Kühlungskristallisation von Artemisinin in Toluol untersucht. Aufgrund der vergleichsweise hohen Löslichkeit von DCA in Toluol, blieb dieses während der Kühlungskristallisation von Artemisinin untersättigt und verunreinigte das kristalline Produkt am Prozessende nicht. Somit konnte über 99,9% reines Artemisinin mit einer Ausbeute von über 50% innerhalb eines Trennschritts im direkten Anschluss an die kontinuierliche Synthese gewonnen werden. Da die dabei erzielte Gesamtproduktausbeute durch den Verlauf der Artemisinin-Löslichkeitskurve in Toluol

begrenzt ist, sollte in künftigen Arbeiten eine weitere Verbesserung der Ausbeute entweder über die Erhöhung der Ausgangskonzentration der Zielkomponente in der Lösung und/oder das Herabsetzen der Endtemperatur des Kühlvorgangs in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Stoffsystemen war das **curcuminhaltige** Rohgemisch in Bezug auf die Komponentenzusammensetzung deutlich weniger komplex. Es setzte sich überwiegend aus drei Curcuminoiden, dem Zielmolekül Curcumin (Anteil 70,8%) sowie den beiden Derivaten Demethoxycurcumin (Anteil 23,5%) und Bisdemethoxycurcumin (Anteil 5,7%), zusammen. Deshalb entsprach das aufzureinigende Feststoffgemisch einem pseudo-ternäres Trennproblem. Unter Berücksichtigung der Löslichkeitskurvenverläufe des reinen CUR in Gegenwart seiner Derivate wurden vier geimpfte Kühlungskristallisationen in Aceton, Acetonitril und 50/50 Aceton/2-Propanol sowie Aceton/Acetonitril-Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Die im Laufe dieser Untersuchungen erzielten Trennergebnisse zeigten, dass es grundsätzlich möglich ist, innerhalb eines Kristallisationsschritts im 50/50 Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemisch die CUR-Reinheit von den ursprünglichen 70,8% auf 99,4% zu erhöhen. Mit jeder der vier vorgestellten Kühlungskristallisationen wurde ein DMC-freier Produktfeststoff hergestellt. Dabei waren je nach gewähltem Prozesslösungsmittel zw. 0,6% und 9,9% DMC in den gewonnenen kristallinen Produkten vorhanden, wodurch sich die Trennung des CUR von DMC als besonders schwer erwies. Einerseits war dies dem sehr ähnlichen strukturellen Molekülaufbau der beiden Komponenten, andererseits der ausgeprägten Neigung aller Curcuminoide zur Polymorphie und Solvatbildung geschuldet.

Da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen in der Literatur weder zur kristallinen Struktur von DMC noch zu seinem Festphasenverhalten Informationen zu finden waren, und zudem eine große Abweichung der publizierten DMC-Schmelzwerte zu den hier gemessenen auftrat, konnte die Komplexität des DMC-Festphasenverhaltens lediglich vermutet werden. Die anschließende Isolierung mehrerer von dem ursprünglichen Ausgangsfeststoff abweichender kristalliner Phasen von DMC bestätigte die Vermutung und unterstrich die Notwendigkeit einer systematischen Untersuchung des Festphasenverhaltens von DMC im Vorfeld einer weiteren Optimierung des Kristallisationsprozesses von CUR. Auf der Basis von Struktur- und Schmelzanalyse der gewonnenen Produktfeststoffe sowie aus der räumlichen Anordnung der CUR-Moleküle im Kristallgitter (stabile Form I) konnte geschlussfolgert werden, dass die Ausbildung von CUR/DMC-Substitutionsmischkristallen sehr wahrscheinlich ist. Zum Nachweis ist die Durchführung weiterer detaillierterer Untersuchungen binärer CUR/DMC-Gemische erforderlich. Zum aktuellen Zeitpunkt stellt die hier berichtete und

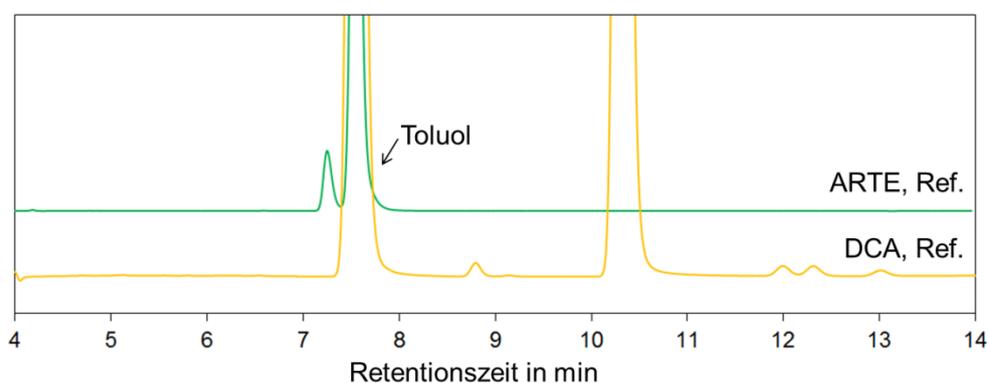
innerhalb eines Trennschritts erhaltene Aufreinigung von Curcumin eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu Vorarbeiten dar.

ANHANG

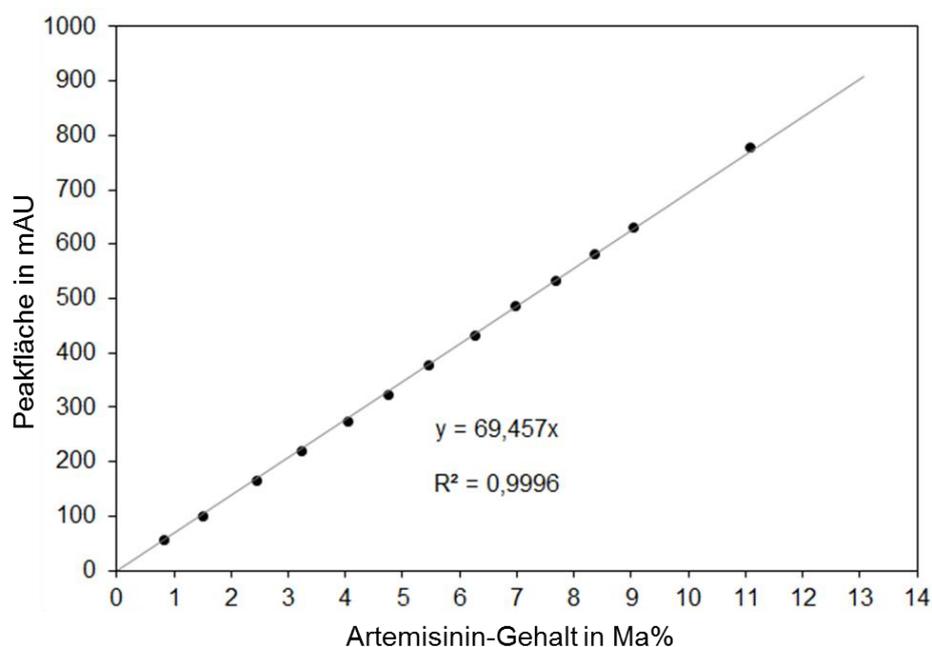
A HPLC Referenzchromatogramme und Erstellung der Kalibriergeraden zur Konzentrationsbestimmung

Zielkomponente Artemisinin

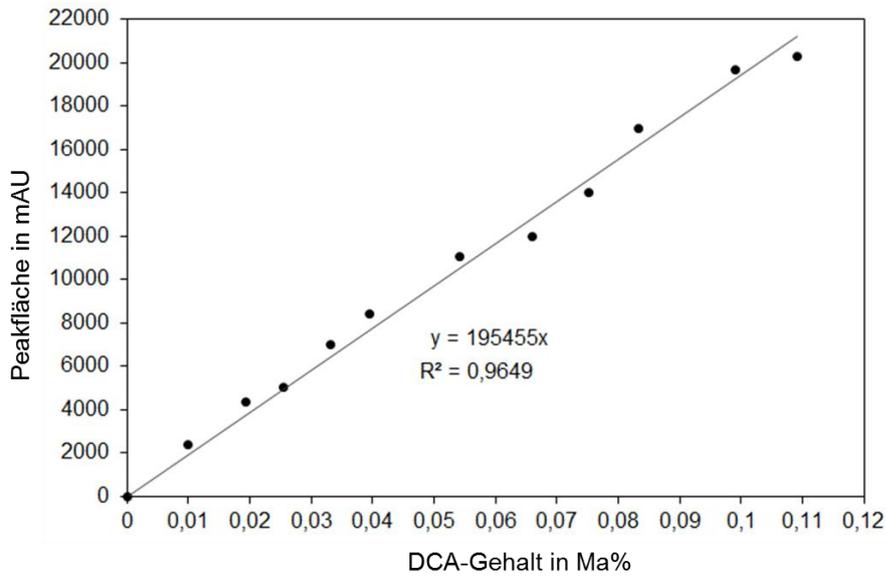
Referenzchromatogramme von Artemisinin und 9,10-Dicyanoanthracen (Abk. DCA) in Toluol:



Kalibriergerade Artemisinin:

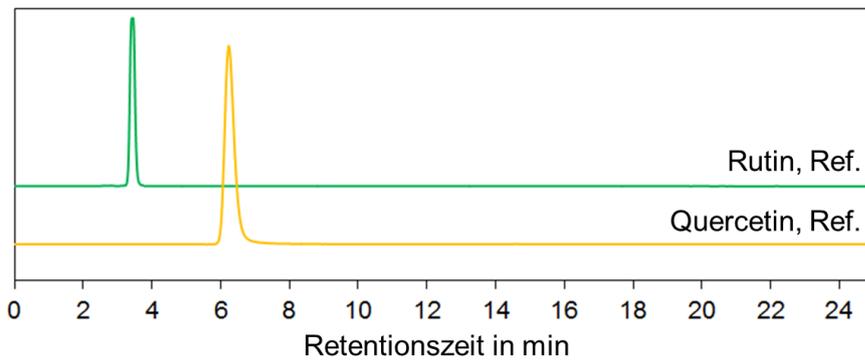


Kalibriergerade Verunreinigung 9,10-Dicyanoanthracen (Abk. DCA):

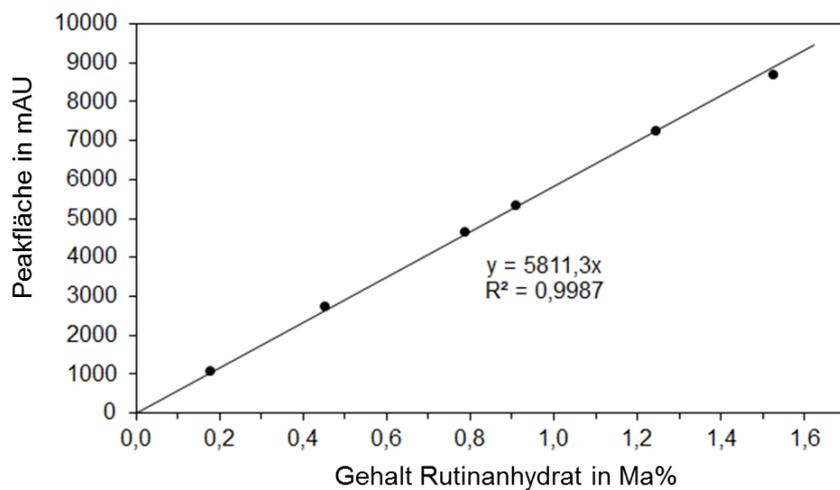


Zielkomponente Rutin

Referenzchromatogramme von Rutin und Quercetin in Methanol:

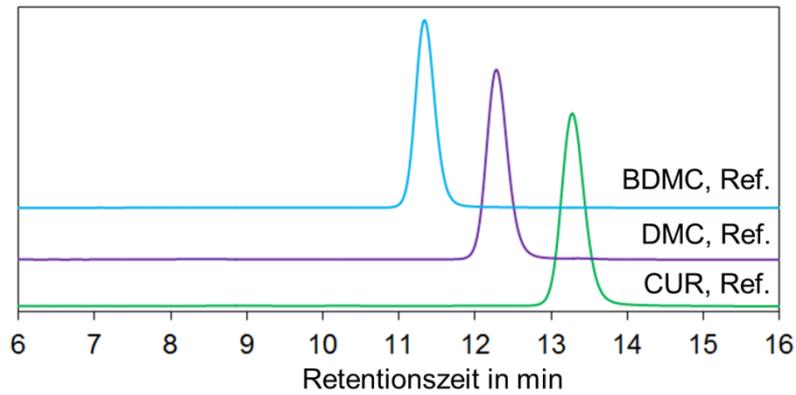


Kalibriergerade Rutin:

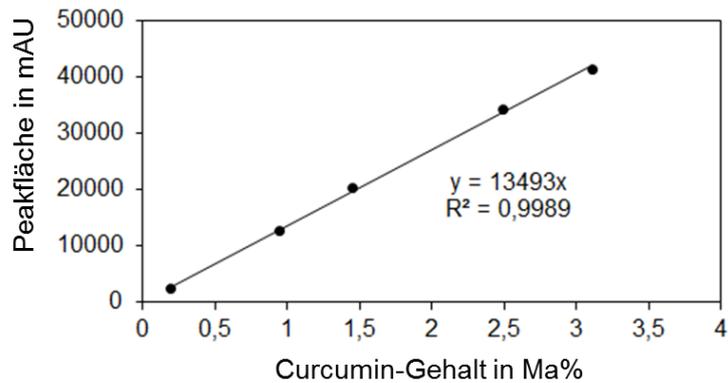


Zielkomponente Curcumin

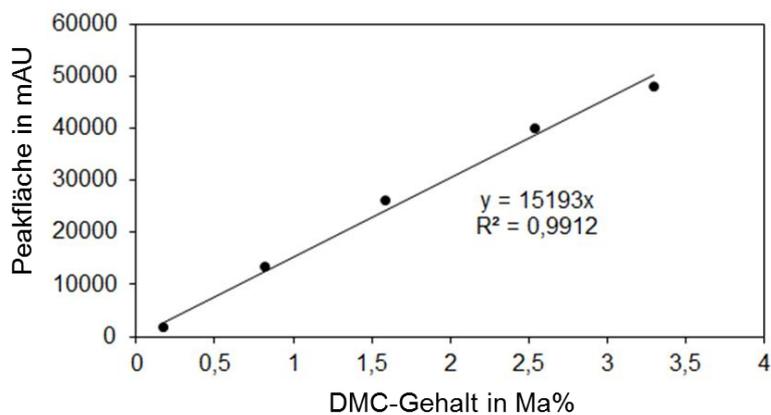
Referenzchromatogramme von Curcumin (Abk. CUR), Demethoxycurcumin (Abk. DMC) und Bisdemethoxycurcumin (Abk. BDMC) in Acetonitril:



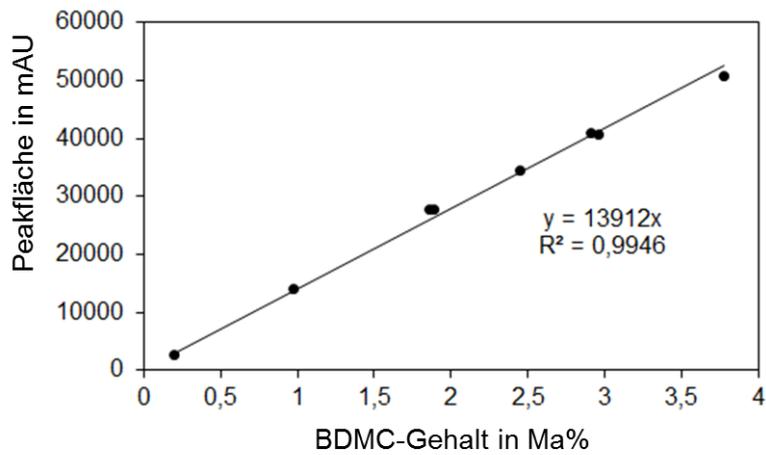
Kalibriergerade Zielkomponente Curcumin:



Kalibriergerade Verunreinigung Demethoxycurcumin:

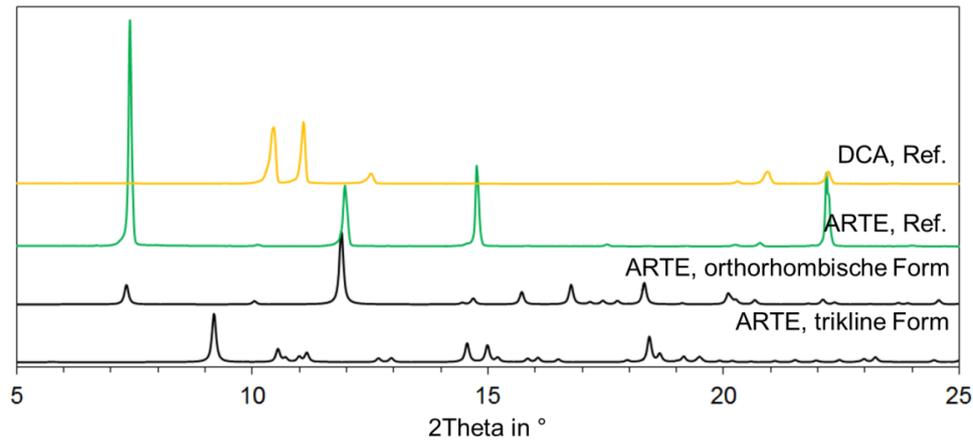


Kalibriergerade Verunreinigung Bisdemethoxycurcumin:

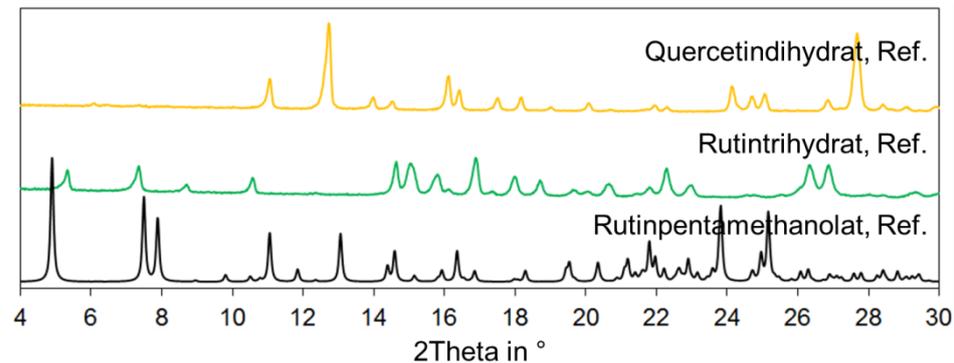


B XRPD Referenzdiffraktogramme

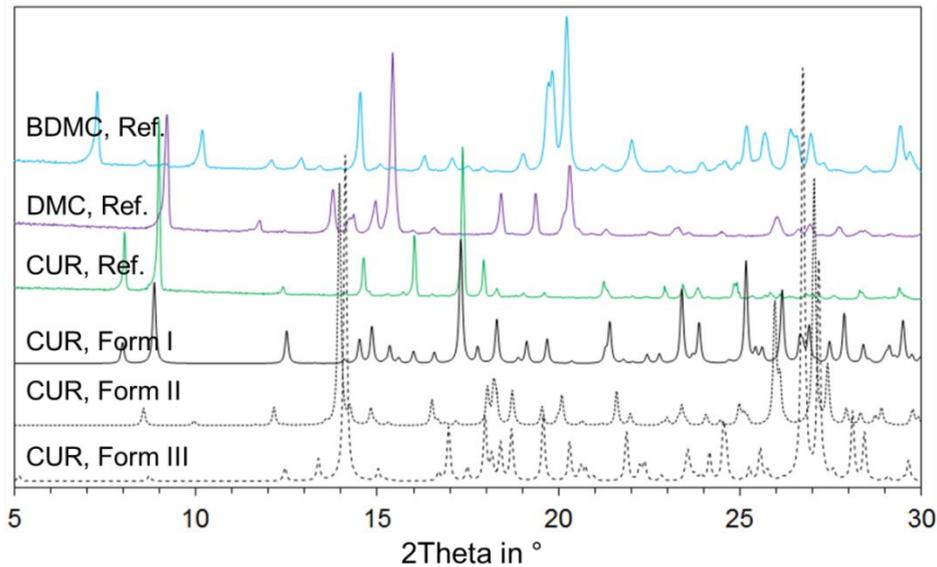
Artemisinin und 9,10-Dicyanoanthracen (Abk. DCA):



Rutinrihydrat, Quercetindihydrat und Rutinpentamethanolat.



Curcumin (Abk. CUR), Demethoxycurcumin (Abk. DMC) und Bisdemethoxycurcumin (Abk. BDMC).



C Messdaten Löslichkeitsbestimmung (polytherm/isotherm)

Zielkomponente Artemisinin

Isotherm ermittelte Löslichkeit von Artemisinin in Acetonitril, Ethylacetat, Ethanol und Toluol

Temperatur in °C	Acetonitril	Ethylacetat	Ethanol	Toluol
	Konzentration in Ma%			
5	15,4	7,8	1,9	11,6
10	16,0	8,6	2,3	13,2
20	17,0	11,0	3,3	16,7
30	17,6	14,1	4,9	20,9
40	18,8	17,9	7,3	25,9

Isotherm ermittelte Löslichkeiten des reinen und verunreinigten (grau hinterlegt) Artemisinin in verschiedenen Ethanol/Toluol-Lösungsmittelgemischen

Temperatur in °C		5	10	20	30	40
% - Anteil		Konzentration in Ma%				
Toluol	Ethanol					
0,5	0,5	12,3	14,0	18,4	23,4	29,6
0,3	0,7	6,8	8,0	11,2	15,4	20,9
0,2	0,8	4,9	5,4	7,7	11,0	15,6
0,2	0,8	5,2	5,5	6,8	9,4	13,5

Isotherm ermittelte Löslichkeiten von 9,10-Dicyanoanthracen, der Hauptverunreinigung von Artemisinin, in Acetonitril, 20/80 (Ma%/Ma%) Ethanol/Toluol-Lösungsmittelgemisch und Toluol.

Temperatur in °C	Acetonitril	20/80 Toluol/Ethanol	Toluol
	Konzentration in Ma%		
5	0,015	0,015	0,111
10			0,129
15	0,019	0,023	
20			0,147
30	0,028	0,036	0,197
40		0,053	0,251

Zielkomponente Rutin

Polytherm ermittelte Temperaturen der „clear point“ und „cloud point“ von Rutintrihydrat in Methanol, Ethanol und 2-Propanol

Methanol			Ethanol		2-Propanol	
Konzentration in Ma%	Temperatur in °C		Konzentration in Ma%	Temperatur in °C	Konzentration in Ma%	Temperatur in °C
	clear point	cloud point		clear point		clear point
2,5	7,6		2,69	6,85	0,36	20,7
3,4	15	-13	3,25	11,4	1,11	34,5
4,7	24,9	-2,2	4	17,2	1,62	42,2
5,5		-0,5	4,98	26,1	2,09	45,5
5,6	26,7		6,27	33,7	2,44	49,4
6,8	32,1		9,26	45,6	3,24	56,2
7,0		6,9	9,73	49,2		
7,7	38,7		10,46	53,2		
9,0	41,3		11,14	54,7		
9,1		13,3	11,83	56,8		

Zielkomponente Curcumin

Isotherm ermittelte Löslichkeiten des reinen Curcumins in Aceton, Acetonitril (Abk. ACN), Methanol (Abk. MeOH), Ethanol (Abk. EtOH), 2-Propanol (Abk. 2-Prop) sowie in 50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/Acetonitril- und Aceton/2-Propanol-Lösungsmittelgemischen.

Temperatur in °C	Aceton	ACN	MeOH	EtOH	2-Prop	50/50 Aceton/ 2-Prop	50/50 Aceton/ ACN
	Konzentration in Ma%						
10	5,4	0,57	0,47	0,39	0,08	3,4	1,5
20	6,4	0,61	0,45	0,41	0,12	3,6	1,8
30	6,8	0,97	0,65	0,50	0,16	4,0	2,7
40	8,6	1,17	0,87	0,60	0,17	4,9	3,2

Polytherm ermittelte Temperaturen der „cloud point“ des reinen Curcumin in verschiedenen Lösungsmitteln.

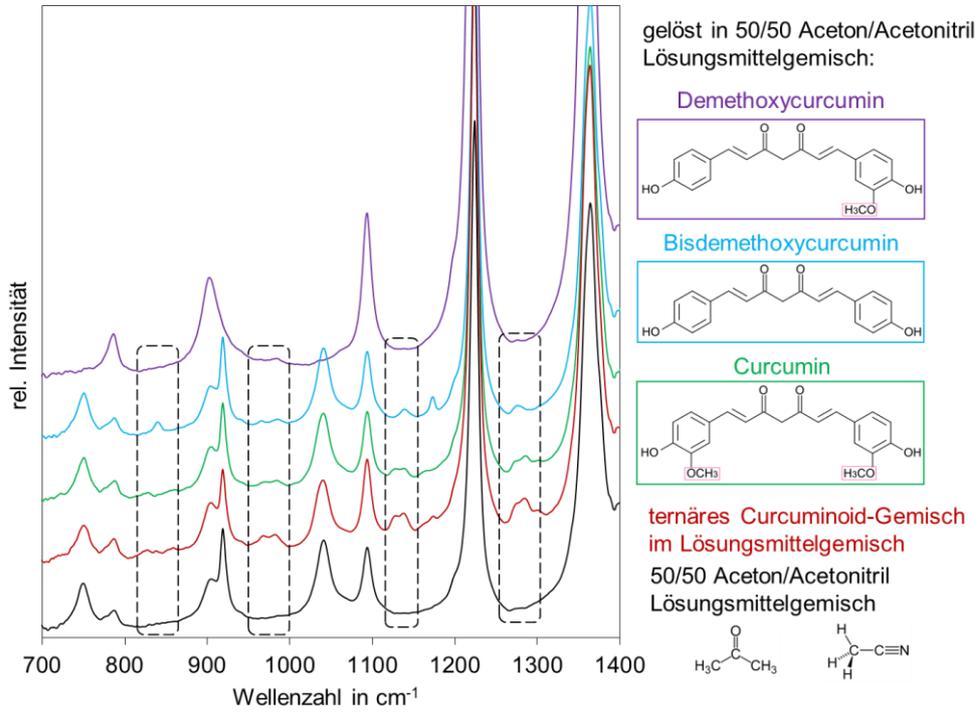
Aceton		50/50 Aceton/ 2-Propanol		Acetonitril		50/50 Aceton/ Acetonitril	
Konzentr. in Ma%	cloud point in °C	Konzentr. in Ma%	cloud point in °C	Konzentr. in Ma%	cloud point in °C	Konzentr. in Ma%	cloud point in °C
9,9	21,1	6,8	45,2	3,0	49,9	7,0	52,1
9,0	17,9	5,1	24,9	1,6	30,5	5,1	30,9
7,7	5,1	4,4	19,1	1,3	17,4	3,3	11,2
		4,0	10,2	0,98	9,5		

Isotherm ermittelte Löslichkeiten des verunreinigten Curcumins in verschiedenen Lösungsmitteln.

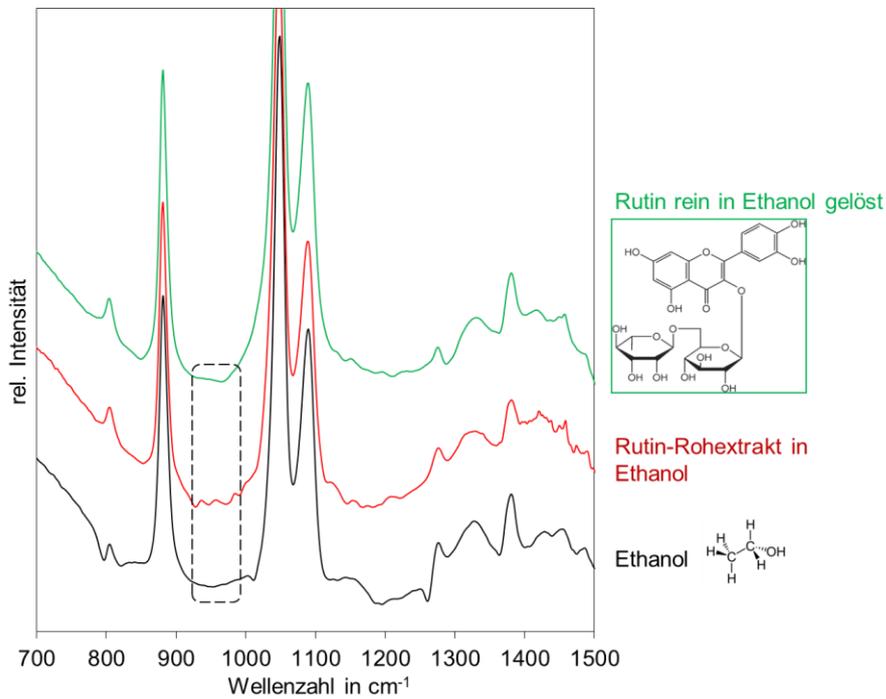
Temperatur	Aceton	Acetonitril	50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/2-Propanol	50/50 (Ma%/Ma%) Aceton/Acetonitril
5				1,7
10	5,7	0,7	3,5	
20	6,4		4,1	2,1
30	7,5	1,1	4,6	
40	9,0		5,4	3,4
50		1,9		4,4
60			7,4	
65				
69		2,8		6,7

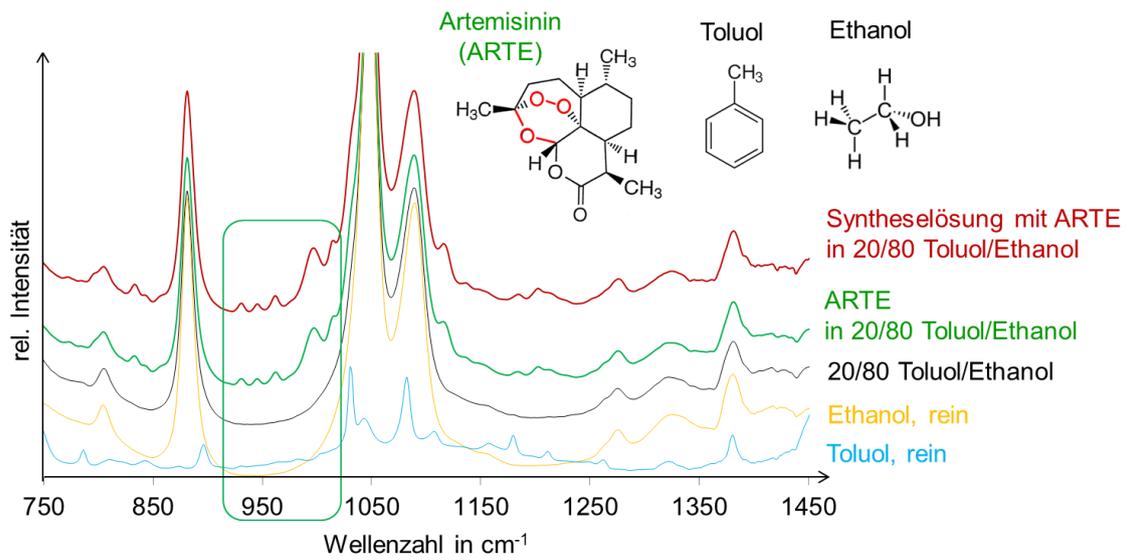
D Inline-ATR-FTIR Spektroskopie

Zielkomponente Curcumin

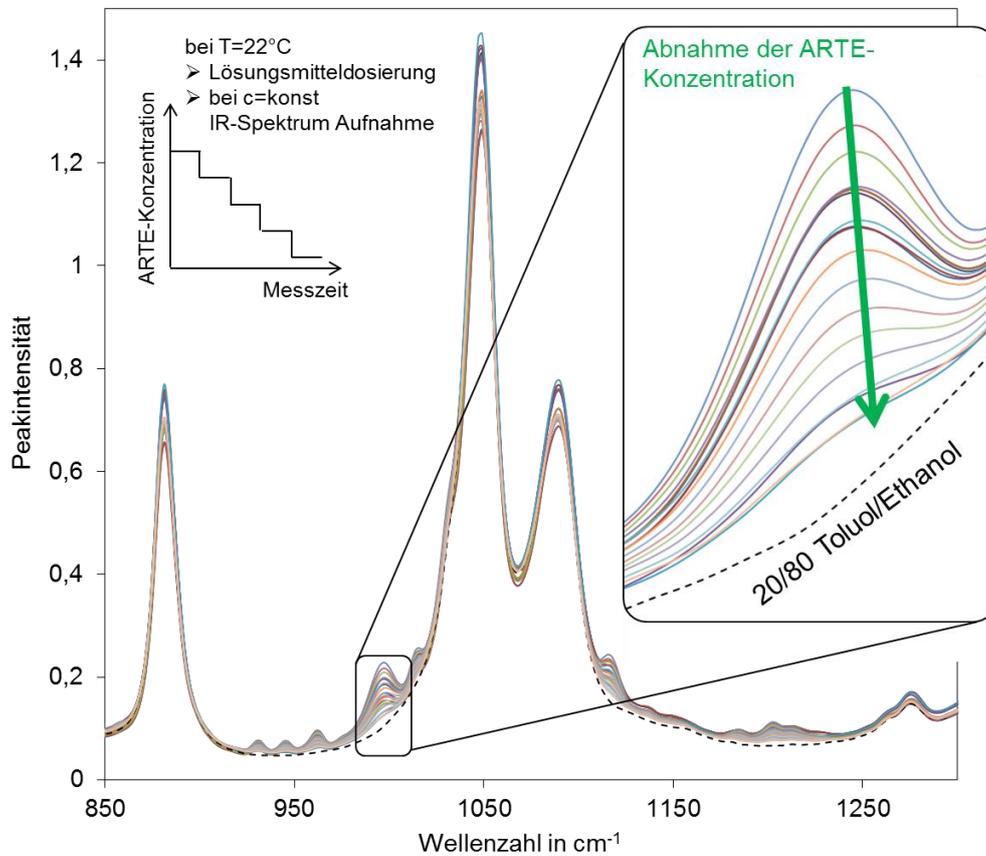


Zielkomponente Rutin



Zielkomponente Artemisinin

- a) Beispiel ATR-FTIR-Aufzeichnung während der Kalibration der Artemisinin-Konzentration in dem 20/80 Toluol/Ethanol Lösungsmittelgemisch bei $T=22^\circ\text{C}$.

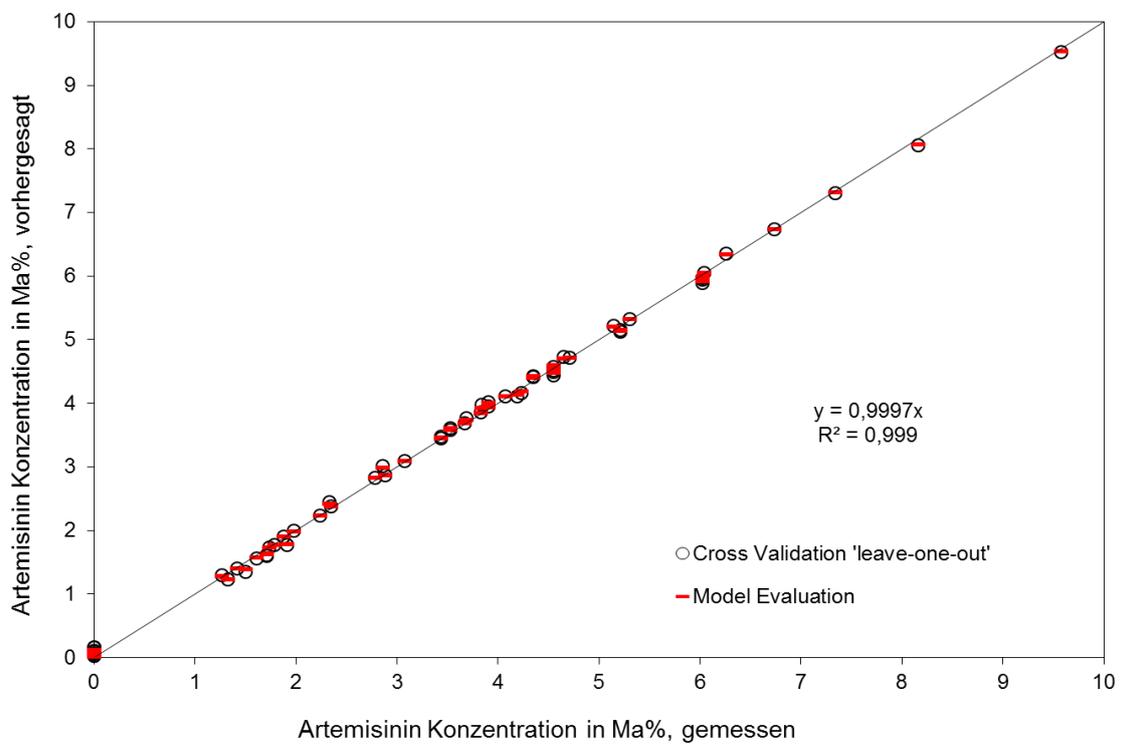


Kalibration der Konzentration von Artemisinin in verschiedenen Ethanol/Toluol-Lösungsmittelgemischen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Spektrum	c (Artemisinin)	c (Ethanol)	c (Toluol)	Temperatur
Nr.	Ma%	Ma%	Ma%	°C
1	0,82	73,80	25,38	22
2	1,26	78,99	19,75	40
3	1,33	86,64	12,03	22
4	1,41	69,61	28,98	21
5	1,50	66,96	31,54	6,9
6	1,61	65,35	33,03	21
7	1,69	62,50	35,81	5
8	1,71	62,48	35,81	25
9	1,74	78,61	19,65	40
10	1,78	78,57	19,64	22
11	1,88	59,63	38,49	21
12	1,91	80,77	17,33	22
13	1,97	56,59	41,43	5
14	2,25	51,85	45,91	21
15	2,33	48,66	49,01	5
16	2,59	77,88	19,53	40
17	2,79	40,17	57,05	21
18	2,86	37,10	60,04	5
19	2,90	77,70	19,40	40
20	3,08	68,97	27,95	22
21	3,13	77,55	19,31	21
22	3,44	77,25	19,31	40
23	3,52	64,47	32,01	22
24	3,52	64,47	32,01	22
25	3,67	21,18	75,15	21
26	3,68	19,00	77,32	5
27	3,83	15,84	80,33	5
28	3,84	17,59	78,57	11
29	3,91	71,48	24,61	21,8
30	3,91	71,48	24,61	31,9
31	4,07	76,74	19,19	40
32	4,19	7,88	87,93	5
33	4,23	9,05	86,72	21
34	4,35	68,29	27,36	21,2
35	4,35	68,29	27,36	21,5
36	4,55	0,00	95,45	5
37	4,55	0,00	95,45	15,2
38	4,55	0,00	95,45	22
39	4,55	0,00	95,45	32
40	4,65	0,00	95,35	40
41	4,71	76,23	19,06	40
42	5,14	75,89	18,97	22

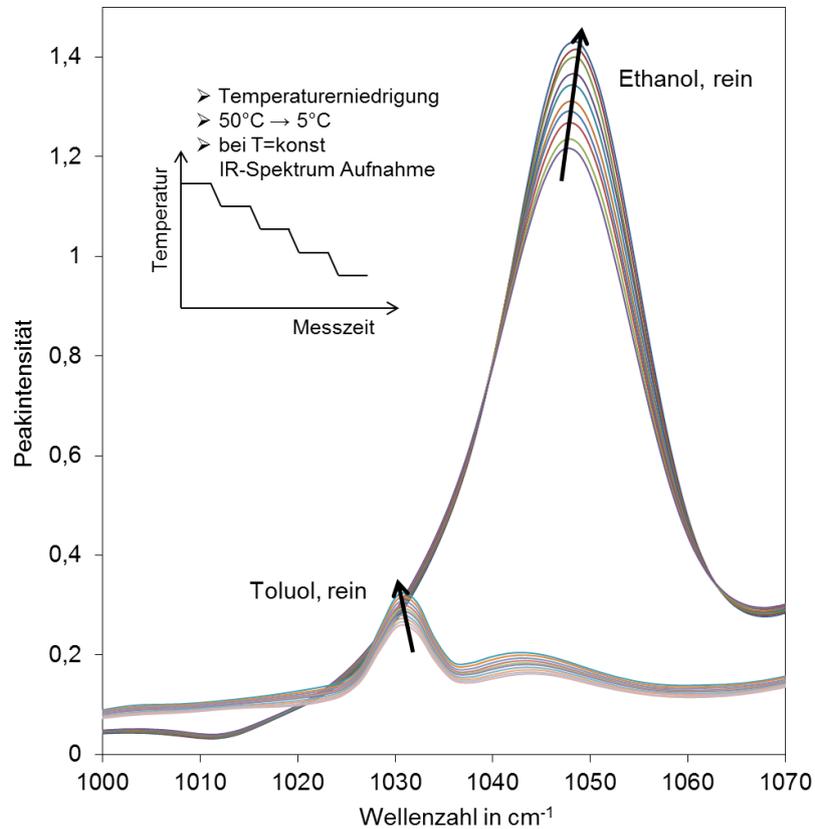
43	5,21	81,94	12,84	21,6
44	5,21	81,94	12,84	21,7
45	5,31	75,76	18,94	40
46	6,03	79,12	14,85	11,3
47	6,03	79,12	14,85	21,4
48	6,03	79,12	14,85	31,5
49	6,04	75,17	18,79	40
50	6,26	74,99	18,75	21
51	6,74	74,61	18,65	40
52	7,34	74,13	18,53	40
53	8,16	73,47	18,37	40
54	9,58	72,34	18,08	22

Erstellte Kalibriergerade zur Konzentrationsbestimmung von Artemisinin.



b) Kalibrierung der Temperaturabhängigkeit des ATR-FTIR-Signals in reinen Toluol und Ethanol sowie in binären Gemischen der beiden.

Beispiel ATR-FTIR-Aufzeichnung: Zunahme der Peakintensität sowie -fläche mit abnehmender Temperatur, dargestellt für reine Toluol und Ethanol.

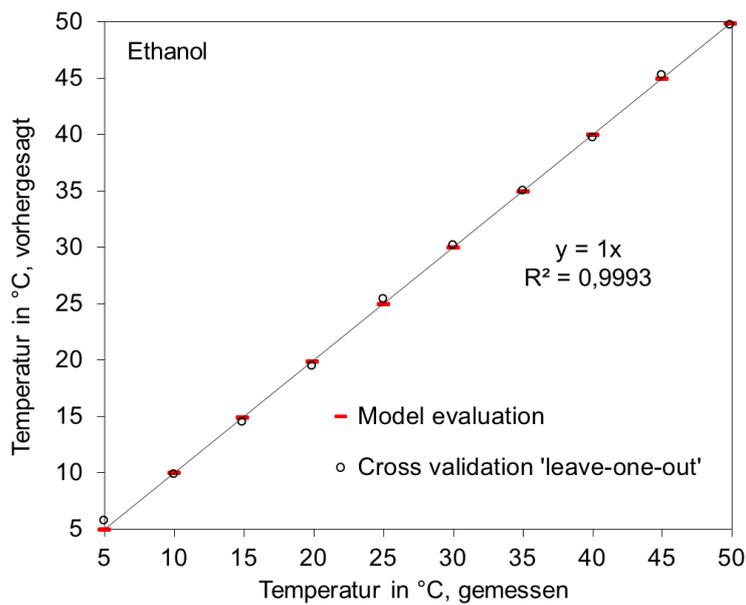


Kalibration der Lösungsmittelzusammensetzung und Temperatur.

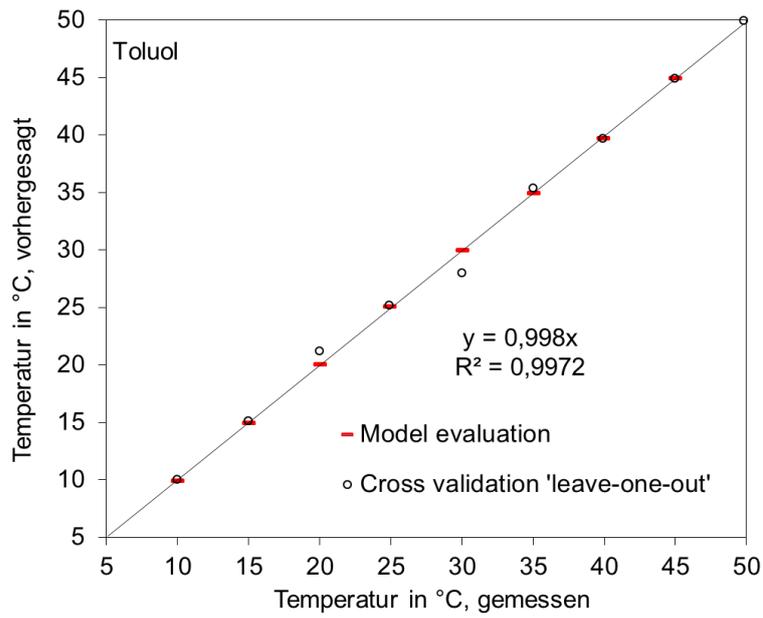
Spektrum Nr.	c (Ethanol) Ma%	c (Toluol) Ma%	Temperatur °C
1	0	100	4,9
2	0	100	10
3	0	100	15
4	0	100	20
5	0	100	24,9
6	0	100	30
7	0	100	35
8	0	100	39,9
9	0	100	45
10	0	100	49,8
11	100	0	5
12	100	0	10
13	100	0	14,9
14	100	0	19,9

15	100	0	21,3
16	100	0	25
17	100	0	30
18	100	0	35
19	100	0	40
20	100	0	45
21	100	0	49,9
22	80	20	5,1
23	80	20	10
24	80	20	14,9
25	80	20	20
26	80	20	22
27	80	20	25
28	80	20	30
29	80	20	35
30	80	20	40
31	80	20	45
32	80	20	50
33	100	0	21
34	89,8	10,2	21
35	81,5	18,5	21
36	74,3	25,7	21
37	67,6	32,4	22
38	57,8	42,2	22
39	49,9	50,1	22
40	43,4	56,6	22
41	80	20	21

Kalibriergerade Temperaturabhängigkeit des ATR-FTIR-Signals für Ethanol.



Kalibriergerade Temperaturabhängigkeit des ATR-FTIR-Signals für Toluol.



Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
A	Komponente; kristalline Form	-
a	Aktivität	-
B	Komponente; kristalline Form	-
c	Konzentration	Ma%
$C_{P,m}$	molare Wärmekapazität	J/(mol·K)
d	Durchmesser; Kristallgitterebenenabstand	m
E	Eutektikum	-
F	Anzahl der Freiheitsgrade	-
G	freie Gibbs-Enthalpie	J/mol
H_f	Schmelzenthalpie	J/mol
L; liq	liquid, flüssige Phase	-
m	Masse	g
N	Anzahl der Komponenten	-
n	Stoffmenge; Reflexionsordnung	mol; -
P	Anzahl der Phasen	-
p	Druck	Pa
R	ideale Gaskonstante	J/(mol·K)
r	Keimradius	m
S	Entropie; Übersättigung; solid, kristalline Phase	J/mol ; - ; -
t	Zeit	s
T	Temperatur	°C; K
T_E	eutektische Temperatur	°C
$T_{f,i}$	Schmelztemperatur der Komponente i	°C
U	innere Energie	J/mol
V	Volumen	l
X	Komponente	-
x_E	eutektische Zusammensetzung	-
x_i	Molenbruch der Komponente i	-
Y	Komponente	-

Griechische Buchstaben

Symbol	Bedeutung	Einheit
α	kristalline Phase der Komponente A	-
β	kristalline Phase der Komponente B	-
γ	Aktivitätskoeffizient	-
η	Ausbeute	%
θ	Einfallswinkel	°
λ	Wellenlänge	m
μ	chemisches Potential	J/mol
σ	relative Übersättigung	-
ϑ	Temperatur	°C
τ	polymorpher Fest/fest-Phasenübergang	-

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
AA	Artemisininsäure
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ARTE	Artemisinin
AS	Antisolvent
ATR-FTIR	abgeschwächte Totalreflektion-Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
CUR	Curcumin
CURD	Curcuminoide
DCA	9,10-Docyanoanthracen
DHAA	Dihydroartemisininsäure
DMC	Demethoxycurcumin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EtOH	Ethanol
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
MK	Mischkristall
Sätt	Sättigung
TD	thermodynamisch
TG-DSC	Thermogravimetrische Analyse gekoppelt mit DSC
WHO	World Health Organisation
XRPD	Röntgenpulverdiffraktometrie

Abbildungsverzeichnis

2-1	Einteilung der Naturstoffe in drei Gruppen.	5
3-1	Phasendiagramm eines binären Gemisches, dargestellt auf dem Temperatur-Zusammensetzungs-Plot bei konstantem Druck. Die zwei Komponenten A und B bilden ein Eutektikum mit vollständiger Mischbarkeit in der flüssigen und vollständigen Unmischbarkeit in der festen Phase.	13
3-2	Phasendiagramme binärer Gemische, dargestellt auf dem Temperatur-Zusammensetzungs-Plot bei konstantem Druck. Links: die Komponenten A und B bilden ein Eutektikum mit vollständiger Mischbarkeit in der flüssigen und beschränkter Mischbarkeit in der festen Phase. Rechts: die Komponenten A und B zeigen vollständige Mischbarkeit in flüssiger und fester Phase.	15
3-3	Zusammenhang zwischen der Liquiduslinie der Komponenten A im binären Stoffsystem und der Löslichkeitskurve des Feststoffs A im Lösungsmittel B bei konstantem Druck.	17
3-4	Schematische Darstellung der Stabilitätsbereiche einer binären Lösung in einem c-T-Phasendiagramm. Kennzeichnung der Breite des metastabilen Bereichs inklusive der Keimbildungsarten.	19
3-5	Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Erzeugung von Übersättigung.	21
3-6	Schematische Darstellung der theoretisch möglichen kristallinen Formen eines beliebigen Moleküls.	25
3-7	Qualitative Darstellung der freien Gibbs-Enthalpie zweier polymorpher Formen einer chemischen Verbindung: thermodynamisch metastabile Form A und stabile Form B.	27
3-8	Illustration des Kristallisationsvorgangs einer beliebigen Substanz, welche eine n-te Anzahl kristalliner Formen aufweist. Anwendung der Ostwald'schen Stufenregel anhand der qualitativen Kurvenverläufe der freien Gibbs-Enthalpie einzelner polymorpher Formen. Ausgehend von der Form I mit der geringsten thermodynamischen Stabilität stufenweise Fest/fest-Phasenumwandlung zu Form n mit der höchsten Stabilität und niedrigsten freien Gibbs-Enthalpie.	28
3-9	Schematische Darstellung von zwei typischen Energie-Temperatur-Diagrammen mit der Kennzeichnung der Stabilitätsbereiche der kristallinen Phasen A und B eines dimorphen a) monotropen sowie b) enantiotropen Systems.	30
3-10	Schematische Darstellung der Richtung der Enthalpieänderung $\Delta H_{T,AB}$ beim Aufheiz- bzw. Abkühlvorgang während des reversiblen dimorphen enantiotropen Fest/fest-Phasenübergangs.	31
3-11	Links: Fragment eines binären Schmelzdiagramms einer beliebigen Komponente X mit einer beliebigen Komponente Y. Die Komponente X stellt im kristallinen Zustand ein dimorphes monotropes System dar, wobei die Modifikation A im gesamten Temperaturbereich stabil ist. Rechts: Skizze des Löslichkeitsdiagramms der Dimorphe A und B der Komponente X in Y.	32
3-12	Links: Fragment eines binären Schmelzdiagramms einer beliebigen Komponente X mit einer beliebigen Komponente Y. Die Komponente X stellt im kristallinen Zustand ein dimorphes enantiotropes System dar, wobei Modifikation A die niedertemperaturstabile Form ist. Rechts: Skizze des Löslichkeitsdiagramms der Dimorphe A und B der Komponente X in Y.	33
3-13	Ableitung der maximal erzielbaren Menge des kristallinen Produktes am Ende einer geimpften Kühlungskristallisation.	40
4-1	Von links nach rechts: die Pflanze Einjähriger Beifuß (Lat. <i>Artemisia annua</i> L.), die Strukturformel des Pflanzeninhaltsstoffs Artemisinin (Chin. <i>Qinghaosu</i>) (rot: das Trioxanringsystem mit der Endoperoxid-Funktion) sowie die weißen nadelförmigen Artemisininkristalle.	45
4-2	Strukturformel der semi-synthetischen Derivate des Artemisinins.	46

4-3	Strukturformel biosynthetischen Vorstufen von Artemisinin, Artemisininsäure und Dihydroartemisininsäure.	47
4-4	Molekülaufbau des Zielprodukts Artemisinin sowie seiner Verunreinigungen in der Produktlösung der organischen Synthese: Photokatalysator 9,10-Dicyanoanthracen (DCA), Reaktionsedukt Dihydroartemisininsäure (DHAA) sowie zyklische Nebenprodukte.	48
4-5	Der gelbe Rutinpulver und die Strukturformeln des Rutins sowie seiner zwei Hydrolyseprodukte Quercetin und Rutinose.	49
4-6	Der Japanischen Schnurbaum (Lat. <i>Sophora japonica</i> L.) mit frisch geernteten und getrockneten Blütenknospen sowie der trockene Rohextrakt.	50
4-7	Pflanze Kurkuma (Lat. <i>Curcuma Longa</i> L.) und der Wurzelstock.	52
4-8	Strukturformeln, Molmassen und Schmelzpunkte des Curcumins (CUR) und der CUR-Derivate, des Demethoxycurcumins (DMC), Bisdemethoxycurcumins (BDMC) und Cyclocurcumins.	53
5-1	Oben: Versuchsaufbau zur ReactIR™-Gerätekalibration; unten: schematische Darstellung der abgeschwächten Totalreflexion des IR-Strahls in dem internen Reflexionselement (IRE).	67
5-2	Funktionsprinzip der FBRM® - Inlinesonde und Ausgabe des Messergebnisses in Form der zeitlichen Änderung der Partikel verschiedener Sehnenlänge.	69
5-3	Messprinzip auf der Grundlage der Bragg'schen Gleichung: konstruktive Interferenz, wenn die Wegdifferenz von Röntgenstrahlen gleich λ bzw. einem Vielfachen davon ist.	70
6-1	Analytische HPLC-Chromatogramme der Syntheselösung (rot) sowie der vorhandenen Referenzen der Zielkomponente ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb), des Reaktionsedukts DHAA (blau). Links oben: Fotographische Aufnahme der Originalsyntheselösung.	74
6-2	Löslichkeitsverhalten von ARTE in Acetonitril (blau), Toluol (violett), Ethylacetat (rot) und Ethanol (grün) in Abhängigkeit von der Temperatur.	75
6-3	Änderung der ARTE-Löslichkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Ethanol-Gehalt in Toluol. Volle Kreise sind Messwerte aus isothermen Löslichkeitsuntersuchungen; durchgezogene Kurven entsprechen verschiedenen Toluol /Ethanol-Lösungsmittelgemischen (Ma%/Ma%): 100/0 (violett), 50/50 (orange), 30/70 (rot), 20/80 (blau) und 0/100 (grün).	77
6-4	Röntgenpulverdiffraktogramme der im thermodynamischen Gleichgewicht stehenden festen Phase von ARTE in Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemischen (Ma%/Ma%): 100/0 (violett), 50/50 (orange), 30/70 (rot), 20/80 (blau) und 0/100 (grün). Die zwei unteren Diffraktogramme entsprechen jeweils der orthorhombischen (CSD Strukturcode QNGHSU10) und triklinen (CSD Strukturcode QNGHSU01) Modifikation des ARTE, entnommen aus der internationalen kristallographischen Datenbank (Cambridge Structural Database, CSD).	79
6-5	Design des Kristallisationsprozesses von ARTE auf der Basis der Löslichkeitskurve (durchgezogene Linien) und der Überlöslichkeitskurve (gestrichelte Linien) des verunreinigten ARTE in Abhängigkeit von der Temperatur im 20/80 Toluol/Ethanol- Lösungsmittelgemisch. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Richtung der ARTE-Konzentrationsänderung in der Lösung.	80
6-6	Fotographische Aufnahme (links) und schematischer Aufbau (rechts) der Batch-Kristallisationsapparatur: 100ml Glasgefäß mit einem Kühlmantel ausgestattet mit einem Propellerrührer.	82
6-7	Kontinuierliche Verfolgung des Kristallisationsprozesses von ARTE während des Abkühlvorgangs der angeimpften Arbeitslösung.	83
6-8	Fotographische und mikroskopische Aufnahme des Kristallisats (oben) sowie Röntgenpulverdiffraktogramme des kristallinen Produkts, der Referenzprobe des reinen ARTE (orthorhombische Modifikation) und des Photokatalysators DCA (unten).	84

6-9	Konzentrationsverlauf der gelösten Komponente (ARTE (oben) und DCA (unten)) in der Arbeitslösung während des Trennprozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven. Punkte: Messwerte; durchgezogene Linien: skizzierte Trajektorien; gestrichelte senkrechte Linien kennzeichnen: T_{Start} die Anfangstemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe sowie die Temperatur der spontanen Keimbildung von DCA.	85
6-10	HPLC-Chromatogramme des Produkts (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot).	86
6-11	Skizze des Downstream-Prozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven von ARTE (oben) und DCA (unten) in Acetonitril. Punkte: Messwerte; durchgezogene / gestrichelte Linien: skizzierte Trajektorien.	89
6-12	Fotographische Aufnahmen links- gelbe nadelförmige Kristalle des zurückgewonnenen reinen DCA auf dem weißen Filterpapier; rechts- das kristalline Produkt: weiße Bereiche - reines ARTE, gelbe Bereiche - ARTE mit DCA verunreinigt. Beide Feststoffe erhalten im Downstream-Prozess.	89
6-13	Prinzip einer Dreizonen-SMB mit offenem Kreislauf und einer Regenerations- bzw. Equilibrierungszone anhand des chromatographischen Elutionsprofils der Syntheselösung.	91
6-14	HPLC-Chromatogramme der Produktlösung aus der SMB (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot).	91
6-15	Konzentrationsverlauf der gelösten Komponente ARTE (oben) und DCA (unten) in der Arbeitslösung während des Trennprozesses auf der Basis der Löslichkeitskurven. Punkte: Messwerte; durchgezogene Linien: skizzierte Trajektorien; gestrichelte senkrechte Linien kennzeichnen: T_{Start} und T_{End} die Anfangs- und Endtemperatur des Kühlvorgangs, T_{Impfen} die Temperatur der Impfkristallzugabe.	93
6-16	HPLC-Chromatogramme (links) des kristallinen Produkts (violett), des reinen ARTE (grün), des Photokatalysators DCA (gelb) sowie der Syntheselösung (rot). Fotographische und mikroskopische Aufnahmen des kristallinen Produkts (rechts).	94
7-1	Analytische HPLC-Chromatogramme des Rohextrakts, der Zielkomponente Rutin und der Verunreinigung Quercetin.	100
7-2	Röntgenpulverdiffraktogramm des trockenen Rohextrakts (rote Linie) sowie der Referenzprobe des Rutintrihydrats, $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (grüne Linie) und des Quercetindihydrats (gelbe Linie).	101
7-3	Charakterisierung der Referenzprobe des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mittels TG-DSC: Änderung des Wärmestroms (durchgezogene Linie) und Änderung der Probenmasse (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der steigenden Temperatur.	102
7-4	Charakterisierung der Referenzprobe des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mittels temperaturaufgelöster XRPD.	103
7-5	Kurven der scheinbaren Löslichkeit (durchgezogene Linien) der Referenzprobe des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in Methanol (*), Ethanol (o) und 2-Propanol (Δ) sowie die Überlöslichkeitskurve (gestrichelte Linie) von Rutinmethanolat in Methanol in Abhängigkeit von der Temperatur. Kennzeichnung: ΔT_{max} in K die Breite des metastabilen Bereichs von Rutinmethanolat in Methanol.	104
7-6	Änderung der Sättigungskonzentration (rot, isotherm bestimmt) sowie der scheinbaren Löslichkeit (blau, polytherm bestimmt) von Rutin in Ethanol als Funktion der Temperatur.	106
7-7	Röntgenpulverdiffraktogramm der kristallinen Phase von Rutin gebildet in Ethanol im thermodynamischen Gleichgewicht (rot) sowie das Diffraktogramm der $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Referenzprobe (blau).	106
7-8	Photographische sowie mikroskopische Aufnahmen des Ausgangsfeststoffs des $\text{Ru}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (oben) sowie des kristallinen Rutins, gebildet im thermodynamischen Gleichgewicht in Ethanol bei 20°C (unten).	107

7-9	Zeitlich aufgelöste XRPD-Messung der Fest/fest-Phasenumwandlung von dem in Ethanol im Gleichgewicht gebildeten Ru·nEtOH (rote Röntgenreflexe) zum unter Umgebungsbedingungen stabilen Ru·3H ₂ O (blaue Röntgenreflexe). Gescannt für 2Theta Winkeln von 4° bis 11°; Dauer eines Scandurchlaufs 1 min.	108
7-10	Röntgenpulverdiffraktogramme des kristallinen Rutins gebildet im 94/6 (Ma%/Ma%) Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch bei 25°C innerhalb von 6 Tagen. Ausgangsfeststoff Ru·3H ₂ O (blaues Referenzdiffraktogramm); Endfeststoff Ru·nEtOH (rotes Referenzdiffraktogramm).	110
7-11	Drei charakteristische Bereiche im Konzentrations-Temperatur-Diagramm von Rutin in Ethanol. Weißer Bereich: Lösung bzgl. beider Formen (Ru·nEtOH und Ru·3H ₂ O) untersättigt; roter Bereich: Lösung bzgl. Ru·nEtOH übersättigt und bzgl. Ru·3H ₂ O untersättigt; blauer Bereich: Lösung bzgl. beider Formen (Ru·nEtOH und Ru·3H ₂ O) übersättigt.	111
7-12	Erster Prozessschritt: Herstellung der Arbeitslösung für die Kristallisation aus dem Ru·3H ₂ O haltigen Trockenextrakt in Ethanol.	112
7-13	Schematische Darstellung der Konzentrationsänderung von Rutin in der Arbeitslösung (grüne Pfeile) während der geimpften Kristallisation auf der Basis der scheinbaren Löslichkeit des Ru·3H ₂ O (blau) und der Löslichkeit des Ru·nEtOH (rot) in Ethanol.	113
7-14	Von links nach rechts: photographische Aufnahme des Keimbildungsschauers kurz nach dem Animpfen der Arbeitslösung sowie von der Produktsuspension nach ca. 30 min; mikroskopische Aufnahme der Produktkristalle.	114
7-15	Links: photographische Aufnahme der Nutsche a) während der Filtration mit dem feuchten Produktfeststoff und b) nach dem Filtriervorgang. Rechts: Röntgenpulverdiffraktogramme des feuchten (rot) sowie des luftgetrockneten (blau) Produktfeststoffs.	115
7-16	Analytische HPLC-Chromatogramme der kristallinen Produkte aus den Versuchen Nr. 1 und 2 im Vergleich zu dem des Rohextrakts sowie der Rutin-Referenzprobe.	116
7-17	Aufbau des semikontinuierlichen Kristallisationsprozesses in einem temperierten 200 ml-Doppelmantelglasbehälter mit periodischer Feed-Zugabe und periodischem Abzug der Produktsuspension.	118
7-18	Fest/fest-Phasenumwandlung von aus der Ethanol-Lösung gewonnenem Ru·nEtOH (links) zum unter Umgebungsbedingungen stabilen Ru·3H ₂ O (rechts).	119
7-19	Kontinuierliche Verfolgung der semikontinuierlichen Kristallisation von Rutin in 1l-Behälter. Das ART-FTIR-Signal (Peakhöhe zwischen 910 und 1000 cm ⁻¹), gekennzeichnet mit der grünen Linie, zeigt die qualitative Konzentrationsänderung von Rutin in der flüssigen Phase. Das FBRM-Signal, gekennzeichnet mit der hell blauen, dunkel blauen und violetten Linien, zeigt die Änderung der Anzahl der Teilchen der Größe < 10 µm, 10-50 µm und 50-150 µm. Die senkrechten gestrichelten Linien kennzeichnen Ende des Kühlvorgangs, den Zeitpunkt des Animpfens sowie der periodischen Produktentnahme und Feed-Zugabe.	121
8-1	Analytische HPLC-Chromatogramme der vorhandenen Curcumin-Referenzen der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange), der Referenzproben des CUR (Fa. TCI Chemicals) (grün), DMC (Fa. ChemFaces China) (violett) und BDMC (Fa. TCI Chemicals) (blau) sowie des Rohextrakts (weinrot) und Curcumin-Handelspräparates zur Nahrungsergänzung (Fa. Curcuma L.) (rosa).	126
8-2	Schmelzkurven der Reinstoffe des CUR (grün), DMC (violett) und BDMC (blau) sowie der vorhandenen Referenzproben der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange).	128

8-3	Röntgenpulverdiffraktogramme der vorhandenen Curcumin Referenzproben der Fa. Sigma Aldrich (rot) und Acros (orange) sowie der Reinstoffreferenzen des CUR (grün), DMC (violett) und BDMC (blau). Die drei unteren Diffraktogramme entsprechen den drei polymorphen Formen des CUR (Form I CSD Strukturcode BINMEQ05; Form II CSD Strukturcode BINMEQ06; Form III CSD Strukturcode BINMEQ07), publiziert in der kristallographischen Datenbank (Cambridge Structural Database, CSD).	130
8-4	Sättigungskonzentrationen der Reinstoffreferenz von CUR (stabile Form I) in 2-Propanol (violett), Ethanol (grün), Methanol (rot), Acetonitril (blau) und Aceton (orange) bei 10°C, 20°C, 30°C und 40°C.	132
8-5	Röntgenpulverdiffraktogramme der im thermodynamischen Gleichgewicht gebildeten festen Phasen des CUR (oberes Diffraktogramm) sowie während der polythermen Rekristallisationsversuche gebildeten CUR-Phasen aus: Aceton (orange), Acetonitril (blau), Methanol (rot), Ethanol (grün) und 2-Propanol (violett). Die drei unteren Diffraktogramme entsprechen den drei polymorphen Formen des CUR (Form I CSD Strukturcode BINMEQ05; Form II CSD Strukturcode BINMEQ06; Form III CSD Strukturcode BINMEQ07), publiziert in der kristallographischen Datenbank (<i>Cambridge Structural Database</i> , CSD)	133
8-6	Effekt verschiedener Antisolvents auf die Löslichkeit von CUR in Aceton bei 30°C. Untersuchte Antisolvents: 2-Propanol (violett), Ethanol (grün), Methanol (rot) und Acetonitril (blau). Die durchgezogenen Linien geben den linearen Zusammenhang zwischen der CUR Löslichkeit in reinem Aceton gegenüber dem Antisolvent wieder. Die gestrichelten Kurven stammen aus der Verbindung der Löslichkeitswerte des CUR im jeweiligen Lösungsmittelgemisch.	134
8-7	Löslichkeitsverhalten von CUR in Anwesenheit der Hauptverunreinigungen des Pflanzenextraktes BDMC und DMC in Aceton (orange), dem 50/50 Aceton/2-Propanol-Gemisch (violett), dem 50/50 Aceton/Acetonitril-Gemisch (dunkelblau) sowie in Acetonitril (blau) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Gleichgewichtskonzentrationen des reinen CUR in denselben Lösungsmitteln sind mit leeren Kreisen gekennzeichnet und grau hinterlegt.	136
8-8	Design der Kristallisationsprozesse Nr. 1 bis 4 von CUR auf der Basis der Löslichkeitskurven (durchgezogene Linien) des verunreinigten CUR und der Überlöslichkeitskurven (gestrichelte Linien) des reinen CUR in Abhängigkeit von der Temperatur. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Richtung der CUR-Konzentrationsänderung in der Lösung während der Kristallisation.	138
8-9	Röntgenpulverdiffraktogramme der kristallinen Produkte sowie der Referenzproben der reinen CUR Form I (unten) und DMC (oben). Dargestellt in Abhängigkeit des abnehmenden CUR-Gehalts (in %) von unten nach oben.	146
8-10	Von unten nach oben: die Schmelzkurven der CUR-Produktfeststoffe mit abnehmender CUR-Reinheit in %; Schmelzkurve des reinen des CUR Form I (unten) bzw. des reinen DMC (oben). Die gemessenen Schmelztemperaturen sind angegeben als ϑ_{Onset} in °C.	147
8-11	Löslichkeitsverhalten des Reinstoffes DMC (erworben bei Fa. Cfm Oskar Tropitzsch GmbH) in: 2-Propanol (violett) und Acetonitril (blau) in Abhängigkeit von der Temperatur.	149
8-12	Röntgenpulverdiffraktogramme der polytherm rekristallisierten sowie im thermodynamischen Gleichgewicht in der jeweiligen Lösung vorliegenden festen Phasen von DMC. Diffraktogramme der DMC-Reinstoffreferenzen sind gekennzeichnet mit der durchgezogenen schwarzen Linie.	150
8-13	Gegenüberstellung der Röntgenpulverdiffraktogramme der kristallinen Produkte, der in 2-Propanol und Acetonitril im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegenden kristallinen Phasen von DMC, der kristallinen DMC-Reinstoffreferenz (Fa. ChemFaces China, schwarze Linie oben) sowie der CUR-Reinstoffreferenz (stabile Form I, schwarze Linie, unten).	151

8-14	Räumliche Darstellung der <u>inter</u> molekularen (pink markierten) und <u>intra</u> -molekularen (grün markierten) Wasserstoffbrückenbindungen im Kristallgitter der CUR Form I (CSD Strukturcode BINMEQ05) a) in einem CUR-Molekül, b) im Kristallgitter der CUR Form I.	152
9-1	Vorgehensweise bei der Auslegung einer geimpften Kühlungskristallisation unter Berücksichtigung der reinen zu kristallisierenden Komponente.	159
9-2	Vorgehensweise bei der Prozessoptimierung zur Erhöhung der Produktreinheit unter Berücksichtigung der zu kristallisierenden Komponente in Gegenwart von Hauptverunreinigungen.	161

Tabellenverzeichnis

3-1	Ausgewählte analytische Methoden zur Untersuchung von Polymorphen und Solvatphasen.	36
4-1	Überblick über die Ergebnisse der publizierten Untersuchungen zur Aufreinigung von CUR mittels Kristallisation.	55
5-1	Übersicht über die verwendeten käuflich erworbenen Feststoffe.	61
5-2	Übersicht über die durchgeführten Löslichkeitsmessungen der reinen Zielkomponente (Artemisinin, Rutin und Curcumin) in dem jeweiligen Lösungsmittel bzw. -gemisch (Ma%/Ma%)	62
5-3	Übersicht über die durchgeführten Löslichkeitsmessungen der verunreinigten Zielkomponente (Artemisinin und Curcumin) in dem jeweiligen Lösungsmittel bzw. -gemisch (Ma%/Ma%).	63
5-4	Verwendete chromatographische Säulen und eingestellte Messbedingungen für die Analyse und Kalibration im Laufe der Untersuchungen von Artemisinin, Rutin und Curcumin.	66
6-1	Kristallisationsspezifische Betriebsparameter für die ARTE-Aufreinigung in 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch.	81
6-2	Ergebnisse der Kühlungskristallisation von ARTE aus der Syntheselösung in einem 20/80 Toluol/Ethanol-Lösungsmittelgemisch.	86
6-3	Ergebnisse der Untersuchungen zur Erhöhung der Gesamtproduktausbeute von ARTE.	87
6-4	Ergebnisse der Aufreinigung von ARTE nach der Kopplung von zwei Trennverfahren SMB-Chromatographie und Kristallisation.	92
6-5	Kristallisationsspezifische Betriebsparameter für die ARTE-Aufreinigung in Toluol.	94
6-6	Ergebnisse der Kühlungskristallisation von ARTE aus der Syntheselösung in reinem Toluol.	95
7-1	Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats bei den Kristallisationsversuchen 1 und 2.	116
7-2	Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung für die semikontinuierliche Kristallisation im 200 ml-Maßstab sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats.	119
7-3	Übersicht über die verwendeten Substanzmengen bei der Herstellung der Ausgangslösung für die semikontinuierliche Kristallisation im 1 l-Maßstab sowie über die Quantität und Qualität des gewonnenen Kristallisats.	122
8-1	Übersicht über die verwendeten Lösungsmittel und die zu trennenden CURD-Gemische.	137
8-2	Kristallisationsspezifische Betriebsparameter der Trennprozesse 1 bis 4.	138
8-3	Übersicht über die zur Herstellung der Ausgangslösungen für die Trennprozesse Nr. 1 bis 4 verwendeten Substanzen und die berechneten/abgelesenen CUR-Konzentrationen.	139
8-4	Auflistung der verwendeten Substanzen zur Durchführung der Antisolvent-Kristallisationen (Prozess Nr. 1-1, 1-2 und 1-4).	141
8-5	Übersicht der Ergebnisse der Kühlungskristallisationen (Trennprozess Nr.1-4).	142
8-6	Übersicht der Ergebnisse der Antisolvent-Kristallisationen (Trennprozess Nr. 1-1, 1-2 und 1-4).	144