

**Polymorph Screening molekularer Festkörper
mit populärer Anwendung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Promotionsprogramm Materialchemie und Katalyse

an der Bayreuther Graduiertenschule

für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Thomas Martin

geboren in Selb

Bayreuth

2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis Mai 2016 am Lehrstuhl für Anorganische Chemie I (ACI) der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Josef Breu angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Dissertation eingereicht am: 4. Mai 2016
Zulassung durch das Leitungsgremium: 30. Mai 2016
Wissenschaftliches Kolloquium: 26. Oktober 2016

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Stephan Kümmel

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Josef Breu (Erstgutachter)
Prof. Dr. Jürgen Senker (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Markus Retsch (Vorsitz)
Prof. Dr. Rainer Schobert

Meiner Familie

La sapienza è figliola della speriienza.

Leonardo da Vinci (1452-1519)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Polymorphie molekularer Festkörper.....	7
1.1.1 Begriffe	7
1.1.2 Ursachen für Polymorphie	9
1.1.3 Konsequenzen von Polymorphie	10
1.2 Thermodynamik der Polymorphie	12
1.2.1 Keimbildung und Kristallwachstum	12
1.2.2 Stabilität und Umwandlung	15
1.3 Polymorph Screening	17
1.3.1 Kristallisationsmethoden	17
1.3.2 Charakterisierungsmethoden	19
1.4 Untersuchte Systeme	21
1.4.1 Natriumbenzoat.....	21
1.4.2 Luminol.....	22
1.4.3 Natriumluminolat.....	22
2 Synopsis.....	25
2.1 Motivation	25
2.2 Polymorphie des Natriumbenzoats	27
2.3 Polymorphie des Luminols	29
2.4 Polymorphie des Natriumluminolats.....	32
3 Publikationen und Manuskripte.....	35
4 Weitere Publikationen	39
5 Vorträge und Posterbeiträge	41

6	Literaturverzeichnis.....	43
	Danksagung.....	51
	Anhang	53
	Anhang A.1.....	53
	Anhang A.2.....	69
	Anhang A.3.....	81
	Erklärung des Verfassers	91

Abkürzungsverzeichnis

DFT	Dichtefunktionaltheorie
DFT-D	Dichtefunktionaltheorie mit semiempirischer Dispersionswechselwirkung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (von engl.: differential scanning calorimetry)
EtOH	Ethanol
FT	Fourier Transform
FTIR	Fourier Transform Infrared
G_x	Freie Enthalpie der Form x
HBz	Benzoessäure
HCl	Salzsäure
IR	Infrarot
NaBz	Natriumbenzoat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (von engl.: nuclear magnetic resonance)
T	Temperatur
T_t	Übergangstemperatur
vol%	Volumenprozent
w	Massenanteil

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Kristallisation und Charakterisierung von Polymorphen kleiner organischer Moleküle mit populären Anwendungen. Untersucht wurden dabei die Moleküle Natriumbenzoat (NaBz), Luminol und das Natriumsalz des Luminols. NaBz wird in großem Umfang als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie verwendet. Luminol mit seiner ausgeprägten, durch Schwermetalle katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion, ist für seine Anwendung in der Kriminalistik zum Nachweis geringster Mengen von Blut bekannt. Das Natriumsalz des Luminols (Na-Luminolat) findet durch seine immunomodulatorischen Eigenschaften Verwendung als pharmazeutischer Wirkstoff (englisch: Active Pharmaceutical Ingredient (API)) zur Regulierung der überschießenden Immunantwort im Rahmen entzündlicher und infektiöser Prozesse.

Im System NaBz konnte eine mehrstufige Umwandlung vom teilkristallinen kommerziellen Produkt zur bereits bekannten Struktur (Form I) dokumentiert werden. Ein aus dieser Rekristallisation resultierendes, bisher unbekanntes Polymorph des NaBz konnte unter Einsatz von Elektronendiffraktometrie und Röntgenpulverdiffraktometrie strukturell charakterisiert werden. Beide Formen des NaBz zeichnen sich durch eine Art Mikrophasensegregation aus. Dieses Phänomen, welches üblicherweise eher von Tensiden oder Blockcopolymeren bekannt ist, konnte bereits an der bekannten Struktur der NaBz Form I für dieses System beschrieben werden. Zugrunde liegt dieser Erscheinung der amphiphile Charakter des Benzoat-Moleküls und ein „Koordinations-Dilemma“, welches bei vielen Salzen mit kleinem Kation und vergleichsweise großem Gegenion mit entsprechendem sterischen Anspruch beobachtet werden kann. Auch bei zweizähliger Verbrückung ist die übliche sechsfache Koordination von Natrium nur durch eine hochgradige Ecken- und/oder Kantenverknüpfung von Koordinationspolyedern erreichbar und somit schwer zu realisieren. Beide NaBz-Formen bilden nahezu hexagonale Packungen von micellartigen Bändern aus. Form II unterscheidet sich von Form I durch die Anzahl von NaBz-Einheiten, welche entlang der längeren Hauptachse dieser elliptischen, micellaren Strukturen angeordnet sind. Die exotherme Umwandlung von NaBz Form II zu Form I

im DSC-Experiment und Ergebnisse aus DFT-D Rechnungen zur Energieoptimierung legen eine enantiotrope Phasenbeziehung und eine höhere thermodynamische Stabilität von NaBz Form II gegenüber Form I bei 0 K nahe.

Im System Luminol konnte mit der strukturellen Charakterisierung einer weiteren Form eine „unbemerkte“ Polymorphie aufgeklärt werden. Eine bereits bekannte Struktur des Luminols konnte nicht in Übereinstimmung mit dem kommerziell erhältlichen Produkt gebracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem vermarkteten Produkt um ein Polymorph von Luminol handelt. Durch die Optimierung der Kristallwachstumsbedingungen konnte hier letztendlich eine Verbesserung der Kristallinität dieser Form II erreicht und die Strukturlösung ermöglicht werden. Da beide Formen sich lediglich in der Stapelung von, aus Trimeren des Amid-Hydroxyimin-Tautomers von Luminol aufgebauten Schichten unterscheiden, stellen sie ein seltenes Beispiel für Polytypie in einer rein organischen Verbindung dar. Untersuchungen zur thermodynamischen Beziehung zeigten eine lösungsvermittelte Umwandlung von Form II (metastabil bei Raumtemperatur) zu Form I (thermodynamisch stabil bei Raumtemperatur).

Im System Na-Luminolat zeigte sich die Wichtigkeit einer genauen, über den „Finger-
print-Abgleich“ hinausgehenden Untersuchung im Bereich des Polymorph Screening. Na-Luminolat Form II und Form III zeichnen sich durch einen massiven Überlapp in ihren Röntgenpulverdiffraktogrammen aus. Durch die Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnten beide Formen phasenrein hergestellt und strukturell charakterisiert werden. Im Fall des Na-Luminolats führen fast identische Strukturen zu nahezu deckungsgleichen Ergebnissen in verschiedenen Analysemethoden. Die Tendenz des thermodynamischen Rankings der beiden Formen aus DFT-D Rechnungen zur Energieoptimierung konnte anhand experimenteller Befunde zur lösungsvermittelten Umwandlung untermauert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Form III thermodynamisch stabiler als Form II ist.

Diese Arbeit ist eine kumulative Dissertation. Die detaillierten Ergebnisse werden in den angefügten Publikationen näher beschrieben.

Summary

The present thesis deals with polymorphs of small organic molecules with widely known application, their crystallization and characterization. The main focus was set on the molecules sodium benzoate (NaBz), luminol and the sodium salt of luminol (Na-luminolate). NaBz is used as a preservative in food industry on a large scale. Luminol, being known for its intense chemiluminescence reaction catalyzed by heavy metal cations is popular for its application in forensic science to detect even small traces of blood. Due to its immunomodulatory effects the luminol sodium salt is applied as active pharmaceutical ingredient (API) to regulate an overshooting immune response caused by inflammatory and infective processes.

In the NaBz system a multilevel transition of the semicrystalline commercial product to the already known structure (Form I) could be observed. Resulting from this recrystallization a hitherto unknown polymorph of NaBz could be structurally characterized applying electron diffraction and powder X-ray diffraction experiments. Both forms of NaBz feature a kind of microphase separation. Usually being renowned for surfactants or block copolymers this phenomenon could already be described for this system based on the structure of the already known NaBz Form I. The amphiphilic character of benzoate and a “coordination dilemma” observed for many salts with small cations and comparatively large counterions with steric demands underlie this aspect. The common 6-fold coordination for sodium can only be reached by a high-grade sharing of corners and/or edges and is consequently difficult to achieve even for bidentate ligands. Both forms of NaBz exhibit a virtually hexagonal packing of micellar rods. Form II differs from Form I by the amount of NaBz moieties incorporated in the longer principal axis of these elliptical, micellar rods. The exothermic transformation of NaBz Form II to Form I in the DSC experiment as well as the results of DFT-D calculations for geometry optimization suggest an enantiotropic phase relation and an elevated thermodynamic stability of NaBz Form II as compared to Form I at 0 K.

In the luminol system an “unnoticed” polymorphism could be addressed by the structure elucidation of an additional form. Commercial available luminol could be shown not to

Summary

be in agreement with the already known structure. By optimizing the crystal growth conditions the crystallinity of Form II underlying the commercial product could be enhanced to allow for a crystal structure solution. Both forms of luminol represent a rare example of polytypism in purely organic compounds since the only difference between both forms is the stacking of layers which are in other respects identical built up by amide-hydroxy-imin-tautomer trimers of luminol. A solution mediated transition of Form II (metastable at room temperature) to Form I (thermodynamically stable at room temperature) could be observed when investigating the thermodynamical relationship of both forms.

In the Na-luminolate system the importance of scrutiny going beyond a fingerprint comparison could be depicted as far as polymorph screening is concerned. By optimizing the crystal growth conditions Forms II and III of Na-luminolate could be crystallized phase-pure and both crystal structures could be solved. Both forms exhibit a massive overlap of the corresponding powder X-ray diffraction patterns. Furthermore, Form II and III of Na-luminolate exhibit nearly identical results for different analytical methods due to shared structural motifs. A tendency for the thermodynamic ranking of both forms derived from DFT-D calculations for geometry optimization could be confirmed by experiments showing a solution mediated transition. Therefore, Form III is thermodynamically more stable than Form II.

This work is a cumulative dissertation describing the results explicitly in the attached publications.

1 Einleitung

Der Begriff „Festkörper“ bezeichnet Materie im festen Aggregatzustand. Während bei den klassischen Aggregatzuständen „flüssig“ und „gasförmig“ Teilchen aufgrund geringerer Wechselwirkungen eine höhere Mobilität aufweisen und somit nicht mehr ortsfest sind, definiert sich ein Festkörper über Teilchen, welche nur wenig in Bewegung und somit ortsfest sind. Es können verschiedene Wechselwirkungen zwischen den kleinsten Teilchen bestehen. Die Art und Stärke der Wechselwirkungen wird dabei durch den atomaren Aufbau bestimmt. Durch die, im Vergleich zu Flüssigkeiten und Gasen, starke Anziehung nehmen die Teilchen somit eng benachbarte Positionen ein.

Ist die Teilchenanordnung ähnlich ungeordnet wie in einer Flüssigkeit, die Materie jedoch formstabil, spricht man von einem „amorphen“^[1] Festkörper. Ein perfekt amorpher fester Reinstoff ist somit isotrop², besitzt statistische Homogenität³ und keinerlei dreidimensionale Periodizität.^[1] Der atomare Aufbau des Materials bildet keine geordnete Struktur, sondern lediglich ein unregelmäßiges Muster. Es kann innerhalb des Materials zu einer Nahordnung kommen, jedoch nicht zu einer Fernordnung. Als Beispiele für amorphe Materialien sind in erster Linie Silikat- sowie metallische Gläser, amorphe Thermoplaste oder amorphes Silicium zu nennen.^[2] Im Gegensatz dazu bezeichnet man einen Reinstoff, welcher anisotrop ist und translatorische Homogenität, sowie dreidimensionale Periodizität aufweist, als „kristallin“.^[3] Zeichnet sich ein Festkörper durch das Auftreten sowohl kristalliner als auch amorpher Domänen aus wird er als „teilkristallin“ bezeichnet.^[4,5] Der Übergang zwischen kristallinem und teilkristallinem Zustand ist fließend. Auf der Seite des kristallinen Zustands führt der Verlust der dreidimensionalen Periodizität durch Bruch der Translationssymmetrie, beispielsweise durch die Zunahme ausgedehnter Defekte in einem Realkristall hin zu einem teilkristallinen Material.^[6]

Der Begriff „Polymorphie“^[4] ist aus unterschiedlichen Fachrichtungen wie Sprachwissenschaft, Informatik, Biologie, Genetik und Kristallographie bekannt. Eine bedeutende

¹ ἄ (griech.) = un-; μορφή morphé (griech.) = Gestalt, Form; also etwa „ohne Gestalt“

² ἴσος isos (griech.) = gleich; τρόπος tropos (griech.) = Drehung, Richtung

³ ὁμός homós (griech.) = gleich; γένεσις genesis (griech.) = Erzeugung, Geburt; also etwa: von gleicher Beschaffenheit

⁴ πολύ poly (griech.) = viel; μορφή morphé (griech.) = Gestalt, Form; also etwa „Vielgestaltigkeit“

Rolle spielt Polymorphie innerhalb der letzten beiden genannten Bereiche in der Life Science Industrie. Einerseits kommt der Polymorphie von DNA-Sequenzen im Teilbereich der Genetik ein großes Interesse zu.^[7-9] Andererseits können viele organische und anorganische Festkörper bei gleicher chemischer Zusammensetzung in verschiedenen Kristallstrukturen mit einer unterschiedlichen Anordnung der allgemeinen Struktureinheiten (Atome, Ionen, Moleküle, ...) vorliegen.^[10] Neben dem Auftreten bei Pigmenten^[11-13], Pflanzenschutzmitteln^[14,15] und nicht linear-optischen Materialien^[16-18] ist Polymorphie ein weitverbreitetes Phänomen bei pharmazeutischen Wirkstoffen^[19], welche hauptsächlich (ca. 90%) auf kleinen organische Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 600 g mol⁻¹ basieren.^[20] Aus der Literatur sind Schätzwerte von 32-51% zur allgemeinen Verbreitung von Polymorphie bei kleinen organischen Molekülen bekannt.^[20,21] Für Wirkstoffe liegt das Auftreten von Polymorphie sogar bei 80%.^[22] Die Anzahl polymorpher Systeme welche über eine Kristallstruktur belegt sind, ist in einschlägigen Datenbanken wie der Cambridge Structural Database (CSD) jedoch deutlich geringer.

Die Polymorphie pharmazeutischer Wirkstoffe hat weitreichende Einflüsse und somit zu einer rapiden Zunahme des Interesses an der Disziplin des „Polymorph Screening“ in der Life Science Industrie geführt.^[19,23-27] Zum einen können sich unterschiedliche physikochemische Eigenschaften polymorpher Formen eines APIs in einer veränderten Stabilität, Verarbeitbarkeit und/oder Bioverfügbarkeit äußern. Aus medizinischer Sicht kann das Auftreten von Polymorphie somit fatale Konsequenzen nach sich ziehen.^[28-30] Zum anderen bezieht sich die Erteilung eines Patentschutzes in der Regel auf eine bestimmte Kristallstruktur. Somit ist das Wissen über alle möglichen metastabilen Polymorphe und das thermodynamisch stabile Polymorph sowie deren thermodynamische Beziehung untereinander vor der Einreichung eines Patentes essentiell. Somit liegt das Hauptaugenmerk zudem auf der Entwicklung von Kristallisationsmethoden, die eine phasenreine Herstellung einzelner Polymorphe erlauben, um im nächsten Schritt eine strukturelle und analytische Charakterisierung zu ermöglichen.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit umfasste die Untersuchung der Kristallisation und das Polymorph Screening einfacher organischer Substanzen (Natriumbenzoat, Luminol, Na-Luminolat) mit etablierten Anwendungen.

1.1 Polymorphie molekularer Festkörper

Ergänzend zu der Einteilung von Festkörpern in kristalline, teilkristalline und amorphe Phasen kann die kristalline Phase gemäß der jeweiligen Zusammensetzung weiter in verschiedene Varianten unterteilt werden (Abb. 1.1). Sowohl in diesen Varianten als auch in amorphen Phasen kann es zur Bildung von Polymorphen kommen. Die Gründe für das Auftreten von Polymorphie, sowie dessen Konsequenzen, sollen im Folgenden betrachtet werden.



Abb. 1.1 Überblick über Festkörpervarianten, eingeteilt nach möglichen Phasen und Zusammensetzungen.

1.1.1 Begriffe

Polymorphie. Im Rahmen der Festkörperchemie fand der Begriff der Polymorphie erstmals 1822 Anwendung.^[31] 1832 wurde das Auftreten von Polymorphie erstmals bei einem organischen molekularen Festkörper beobachtet.^[32] Das Phänomen der Polymorphie in der Festkörperchemie beschreibt das Auftreten von mindestens zwei kristallinen Phasen einer Verbindung. Wie bereits erwähnt, ändert sich bei gleicher chemischer Zusammensetzung lediglich die Anordnung der jeweiligen Struktureinheiten.^[10] Werden elementare Festkörper betrachtet, spricht man beim Auftreten verschiedener Zustandsformen von Allotropie⁵.^[33] Für molekulare Festkörper und deren Varianten zeigt Abb. 1.2 eine schematische Darstellung zweier Anordnungsmöglichkeiten von Struktureinheiten auf zweidimensionaler Ebene. Eine besondere Form von Polymorphie, bei der sich

⁵ ἄλλως ἄλλος (griech.) = anders; τρόπος τρόπος (griech.) = Art, Weise

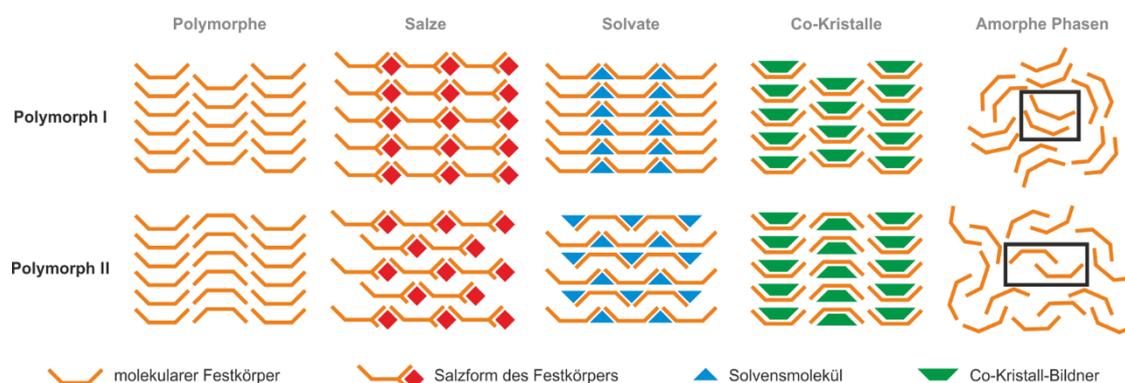


Abb. 1.2 Schematische Darstellung von Polymorphen in jeweiligen Festkörpervarianten.

Formen einer Verbindung lediglich in der Abfolge und Orientierung schichtartiger Struktureinheiten, nicht jedoch in deren Aufbau und Zusammensetzung unterscheiden, wird als Polytypie⁶ bezeichnet.^[34] Hauptsächlich anorganische Verbindungen, wie SiC, ZnS und CdI₂, sind für das Auftreten polytyper Formen bekannt.^[35] Bei röntgenographisch amorphen Phasen bezeichnet man das Auftreten von Polymorphie als Polyamorphie.^[36] Hierbei kommt es aufgrund von unterschiedlichen lokalen Strukturen (Abb. 1.2) zur Ausbildung amorpher Phasen mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise unterschiedlicher Dichte.^[37–39]

Salz. Definitionsgemäß ist ein Salz eine chemische Verbindung aus Kationen und Anionen.^[40] Die Darstellung eines anorganischen oder organischen molekularen Salzes setzt das Vorhandensein einer entsprechenden protonierbaren bzw. deprotonierbaren funktionellen Gruppe in einem Molekül voraus. Unter Verwendung der entsprechenden Säure bzw. Base kann sodann die Umsetzung zum Salz erfolgen. Da Salze meist polarer sind als die ursprünglichen ungeladenen Stoffe und dementsprechend eine höhere Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit aufweisen, sind sie eine populäre Wahl für pharmazeutische Wirkstoffe. Rund die Hälfte aller APIs werden als Salz vermarktet.^[41]

Solvat / Hydrat. Als Solvat (gelegentlich auch Pseudopolymorph^[42–44]) werden Verbindungen bezeichnet, in denen Solvensmoleküle im stöchiometrischen oder nicht-stöchiometrischen Verhältnis in das Kristallgitter eingebaut sind.^[45–47] Handelt es sich bei dem

⁶ polýs (griech.) = viel; týpos (griech.) = Schlag, Gepräge

eingebundenen Lösungsmittelmolekül um Wasser, wird die Verbindung als Hydrat bezeichnet.

Co-Kristall. Die exakte Definition des Begriffs „Co-Kristall“ ist weiterhin umstritten.^[48–51] Allgemein anerkannt ist die Beschreibung als einphasiger kristalliner Feststoff, welcher aus zwei oder mehr unterschiedlichen molekularen und/oder ionischen Komponenten in stöchiometrischem Verhältnis zusammengesetzt ist und kein Solvat oder einfaches Salz darstellt.^[52] Im Gegensatz zu einem Solvensmolekül bei Solvaten wird bei Co-Kristallen also eine nicht flüchtige, neutrale Komponente eingebunden. Co-Kristalle finden ebenfalls Anwendung als Arzneistoffe, da die Veränderung der Struktur und Zusammensetzung eines API die Bioverfügbarkeit stark beeinflussen kann.^[53] Der Grundgedanke ist es, die Bioverfügbarkeit zu steigern und im Idealfall ein komplementäres Wirkungsspektrum aufgrund der spezifischen Eigenschaften jeder einzelnen Komponente eines Co-Kristalls zu erreichen.

1.1.2 Ursachen für Polymorphie

Das Auftreten von Polymorphie einer Verbindung kann sowohl auf interne wie auch auf externe Einflüsse zurückgeführt werden.

Innerhalb eines kristallinen molekularen Festkörpers herrschen sowohl intra- (kovalent, ionisch) als auch intermolekulare Wechselwirkungskräfte (ionisch, Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol). Ein einzelnes Molekül kann je nach auftretenden Freiheitsgraden unterschiedliche Konformationen annehmen, welche mehr oder weniger energetisch günstig sein können. Tritt Polymorphie aufgrund der Existenz verschiedener Konformere eines Moleküls auf, so spricht man von „conformational polymorphism“.^[54] Andererseits wird das Zustandekommen von Polymorphen aufgrund der Anordnung von Molekülen im Kristall in verschiedenen energetisch ähnlichen Packungsmotiven als „packing polymorphism“ bezeichnet.^[55,56]

Neben den internen, molekularen Wechselwirkungen spielen auch äußere Einflüsse eine Rolle bei der Bildung von Polymorphen. Abgesehen von der klassischen Keimbildungstheorie, auf welche im Verlauf des nächsten Kapitels noch genauer eingegangen wird, haben verschiedenste Bedingungen während der Kristallisation einen strukturdirigierenden Effekt. So kann beispielsweise die Polarität des Lösungsmittels, aus dem kristallisiert

wird, die Kristallpackung beeinflussen.^[57–59] Entsprechende Verunreinigungen oder Additive können die Ausbildung eines gewissen Strukturmotivs hemmen und das Kristallwachstum einer metastabilen Form begünstigen^[60,61] Selbst vergleichsweise einfache Veränderungen der Kristallisationsbedingungen, wie die Änderung der Reaktionstemperatur oder der Rührgeschwindigkeit eines experimentellen Ansatzes können zur Keimbildung und Kristallisation einer polymorphen Form führen.

1.1.3 Konsequenzen von Polymorphie

Während polymorphe Formen einer Verbindung mit Analysemethoden, welche ausschließlich eine Sensitivität für die chemische Zusammensetzung aufweisen (z.B. Elementaranalyse) nicht greifbar sind, unterscheiden sie sich doch aufgrund der vorliegenden inter- und intramolekularen Wechselwirkungen in ihrer thermodynamischen Stabilität und ihren physikochemischen Eigenschaften (chemische Stabilität, Hygroskopie, Löslichkeit, Schmelzpunkt, Dichte, rheologische Eigenschaften, etc.). Der Unterschied dieser genannten Eigenschaften spielt vor allem bei der Entwicklung und Patentierung eines pharmazeutischen Wirkstoffs eine bedeutende und kritische Rolle.^[28–30] Die Haltbarkeitsdauer eines API ist von zentraler Bedeutung für seine Zulassung, da die Stabilität über den gesamten angegebenen Zeitraum der Haltbarkeit gegeben sein muss. Ferner muss die Stabilität gegen Umwelteinflüsse wie Licht, Temperatur, Druck, Luftfeuchte, etc. gewährleistet sein. Auch die Verarbeitbarkeit des API bei der Produktion hängt grundlegend von den genannten Parametern ab. Das Aufmahlen eines festen Wirkstoffs zur Homogenisierung der Partikelgrößenverteilung ist nur möglich, sofern dieser tribochemisch stabil ist. Die Konstanz der Rieselfähigkeit, Schütt- und Stampfdichte ist nur gegeben, sofern die Morphologie, Partikelgröße und Oberflächenbeschaffenheit unverändert bleiben. Nicht zuletzt spielt die Bioverfügbarkeit, welche vor allem durch die Lösungsgeschwindigkeit, Löslichkeit, Partikelform und –größenverteilung bestimmt wird, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung eines API. Aus patentrechtlicher Sicht lassen sich Polymorphe gemäß der drei Kriterien Neuheit, Nutzen und erfinderische Tiefe^[19,62] patentieren, sofern sie einen signifikanten Vorteil haben. Sowohl mit dem thermodynamisch stabilen, als auch möglichen metastabilen Polymorphen eines Wirkstoffs, kann im Hinblick auf Neuheit und Nutzen argumentiert werden. Ein thermodynamisch stabiles Polymorph ist unempfindlich gegen Umwandlungserscheinungen und bietet damit in puncto Stabilität

Vorteile. Bei einer möglichen geringeren Löslichkeit der thermodynamisch stabilen Form kann im Hinblick auf eine Verzögerung oder länger anhaltenden Freisetzung des Wirkstoffes mit einem Vorteil argumentiert werden. Metastabile Polymorphe zeigen zumeist eine höhere Löslichkeit und damit eine größere und schnellere Bioverfügbarkeit. Problematisch ist für gewöhnlich der Punkt der erfinderischen Tiefe, wobei hier auf die gezielte Kristallisation eines jeweiligen Polymorphs verwiesen werden kann und dass diese (bisher) alles andere als trivial ist.

1.2 Thermodynamik der Polymorphie

In diesem Abschnitt sollen thermodynamische Aspekte der Polymorphie genauer betrachtet werden. Zunächst wird anhand der klassischen Keimbildungstheorie in einer übersättigten Lösung auf die Theorie der Kristallisation eingegangen. Im zweiten Teil werden die relative Stabilität und die thermodynamische Beziehung von Polymorphen behandelt.

1.2.1 Keimbildung und Kristallwachstum

Der Prozess der Kristallisation kann in Keimbildung und Kristallwachstum eingeteilt werden.

Klassische Keimbildungstheorie. Der Prozess der Keimbildung (Nukleation) ist sehr komplex und daher noch nicht vollständig verstanden. Er stellt den ersten Schritt der Kristallisation eines Festkörpers dar, bei dem sich entscheidet, welches Polymorph gebildet wird.^[63,64] Erste Keime, welche sich in einer übersättigten Lösung bilden, können weiterhin als Kerne für eine weitere Kristallisation dienen. Man unterscheidet somit zwischen Primär- und Sekundärnukleation, wobei sich bei der primären Keimbildung im Gegensatz zur sekundären bei Kristallisationsbeginn keinerlei Kristalle eines anderen Polymorphs in der Lösung befinden. Zusätzlich kann die primäre Keimbildung in homogene und heterogene Keimbildung unterteilt werden. Eine homogene Nukleation erfolgt spontan aus Lösung. Da eine heterogene Nukleation an Oberflächen oder an Fremdpartikeln stattfindet, welche in der Lösung enthalten sind, ist auch eine sekundäre Keimbildung immer heterogen.

Betrachtet man die homogene Keimbildung in einer Lösung, so muss zunächst die Keimbildungsbarriere überwunden werden (beispielsweise in einer entsprechend übersättigten Lösung). Verantwortlich für die Kristallisation aus Lösung ist die Enthalpiedifferenz ΔG zwischen übersättigter und gesättigter Lösung.^[65]

$$\Delta G = G_{\text{gesättigt}} - G_{\text{übersättigt}} = -RT \ln \sigma = -RT \ln \frac{c_{\text{übersättigt}}}{c_{\text{gesättigt}}} \quad (1.1)$$

Das Verhältnis der Konzentration von übersättigter und gesättigter Lösung wird als Übersättigungsfaktor σ bezeichnet. Dieser ist ausschlaggebend für die Nukleation. Einerseits wird hier ein Energiebetrag aufgrund der Differenz zwischen Volumenenergie des Kristalls und der Lösung frei. Andererseits jedoch nimmt aufgrund der Bildung einer neuen

Oberfläche die freie Enthalpie zu. Unter Annahme des Kristallkeims als Kugel ergibt sich die Gesamtänderung der freien Enthalpie bei der Nukleation mit der neugebildeten Oberfläche eines Keims $O_k = 4\pi r^2$ und der freigesetzten Volumenenergie $\frac{v_k}{V_m}$.^[19]

$$\Delta G_{Keim} = -\frac{v_k RT \ln \sigma}{V_m} + O_k \gamma = -\frac{4\pi r^3 RT \ln \sigma}{3V_m} + 4\pi r^2 \gamma \quad (1.2)$$

mit v_k = Volumen des Keims; V_m = Molvolumen im Keim; γ = Oberflächenspannung; r = Größe des Kristallkeims.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der freien Enthalpie der Keimbildung zweier Polymorphe fällt die jeweilige Analogie zu einer chemischen Reaktion auf (Abb. 1.3). Entsprechend ist der Keimbildungsprozess vergleichbar mit einer Art Aktivierungsenergie. Die kritische Keimgröße r_c , welche sich für das jeweilige Polymorph aus der Lage des Maximums der Kurve ermitteln lässt, markiert den Übergangszustand bei dessen Überschreitung die Kristallisation freiwillig abläuft.

$$r_c = \frac{2\gamma V_m}{RT \ln \sigma} \quad (1.3)$$

Somit liegt das Maximum für metastabile Phasen bei größeren kritischen Keimen.

Keimbildungsarbeit oder Keimbildungsbarriere bezeichnet den Betrag der freien Enthalpie des kritischen Keims.

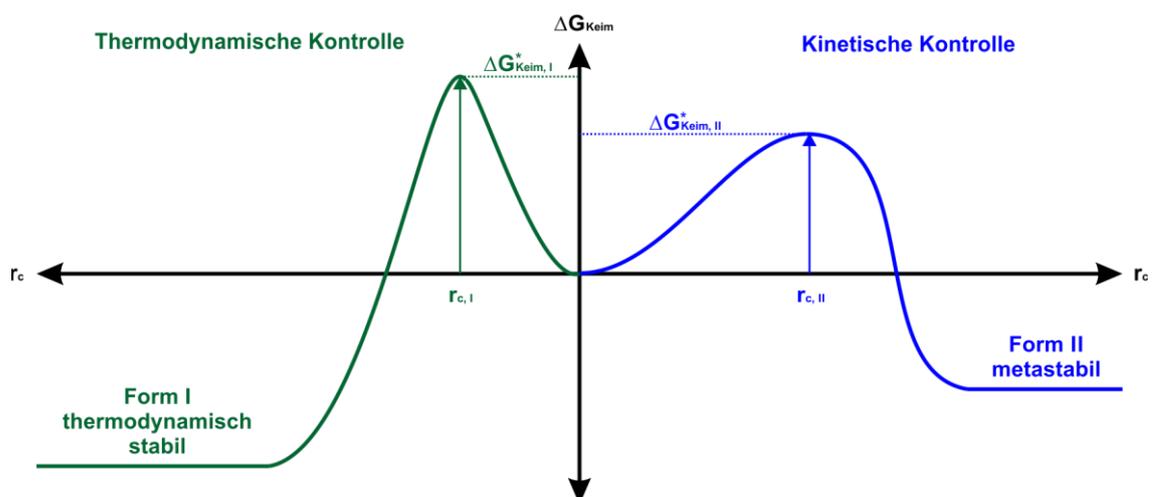


Abb. 1.3 Verlauf der freien Enthalpie bei der Nukleation eines thermodynamisch stabilen (grün) und eines metastabilen Polymorphs (blau)

$$\Delta G_{Keim}^* = \frac{\gamma V_m}{r_c} = \frac{RT \ln \sigma}{2} \quad (1.4)$$

Es zeigt sich somit, dass für die stabilere Modifikation eine höhere Keimbildungsbarriere überwunden werden muss.

Ostwaldsche Stufenregel.^[66] Die Ostwaldsche Stufenregel wurde 1897 durch Wilhelm Ostwald aufgestellt und besagt:

„..., dass beim Verlassen irgend eines Zustandes und dem Übergang in einen stabileren nicht der unter den vorhandenen Verhältnissen stabilste aufgesucht wird, sondern der nächstliegende.“

Sie steht damit in direktem Zusammenhang mit der klassischen Keimbildungstheorie. Ein chemisches System welches in mehreren Energiezuständen vorkommt, würde stufenweise in energieärmere Zustände übergehen. Da bei der Nukleation der jeweilig thermodynamisch stabileren Form eine immer höhere Keimbildungsbarriere überwunden werden muss, würde in einem System bei Abkühlung die metastabilste Phase zuerst nukleieren, dann nacheinander die jeweils thermodynamisch stabileren Phasen.

Eine universelle Anwendbarkeit der Regel ist nicht gegeben. Es zeigt sich, dass in der Regel solche Zwischenstufen gebildet werden, welche auch strukturell naheliegend sind. Unter Umständen werden Zwischenstufen auch vollständig übersprungen und es bildet sich die stabilste Form.^[67] Ein Faktor, welcher Einfluss auf die Bildung von energetischen Zwischenstufen hat, ist vor allem die Kristallwachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Form.

Kristallwachstum. Der zweite Schritt in der Kristallisation ist das Kristallwachstum nach der Keimbildung. Hierbei vergrößert der Kristallkeim seine Dimension durch Anlagerung weiterer Struktureinheiten in aufeinanderfolgenden Schichten.^[3] Dabei nimmt mit fortschreitendem Wachstum die Größe von langsam wachsenden Flächen immer weiter zu und die Größe schnell wachsender Flächen immer weiter ab.^[68] Zudem weisen Keime mit anisotroper Form in der Regel auch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf, wodurch sich die Ausbildung einer individuellen Morphologie begründet. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird durch zahlreiche physische Faktoren wie Temperatur,

Druck, Oberflächenspannung der Lösung, relative Geschwindigkeit des Kristalls in der Lösung usw. bestimmt.^[69–71]

1.2.2 Stabilität und Umwandlung

Die Stabilität einzelner Polymorphe, sowie mögliche auftretende Umwandlungsprozesse und die Phasenbeziehung zwischen Polymorphen stellen aus experimenteller Sicht wichtige Kenngrößen dar.

Relative Stabilität. Bei bestimmten experimentellen Bedingungen (Temperatur, Druck) besitzt ein Polymorph eine gewisse relative Stabilität. Diese hängt von der Gibbs'schen freien Enthalpie G des Polymorphs ab. Das thermodynamisch stabile Polymorph bei den gegebenen Bedingungen weist die niedrigste freie Enthalpie auf.^[19,23] Ebenso sind die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften jeweiliger Polymorphe auf ihre unterschiedlichen freien Enthalpien zurückzuführen.

Phasenbeziehung: Enantiotrop und Monotrop

Jegliche zwei Polymorphe können entweder monotrop (einseitig umwandelbar) oder enantiotrop (wechselseitig ineinander umwandelbar) zueinander sein. Abb. 1.4 zeigt den Verlauf der freien Enthalpien G_I , G_{II} zweier Polymorphe und deren Schmelze G_m in Abhängigkeit der Temperatur bei konstantem Druck. Eine monotrope Phasenbeziehung entsteht, wenn eine der beiden Formen (Form I) über den gesamten Temperaturbereich bis

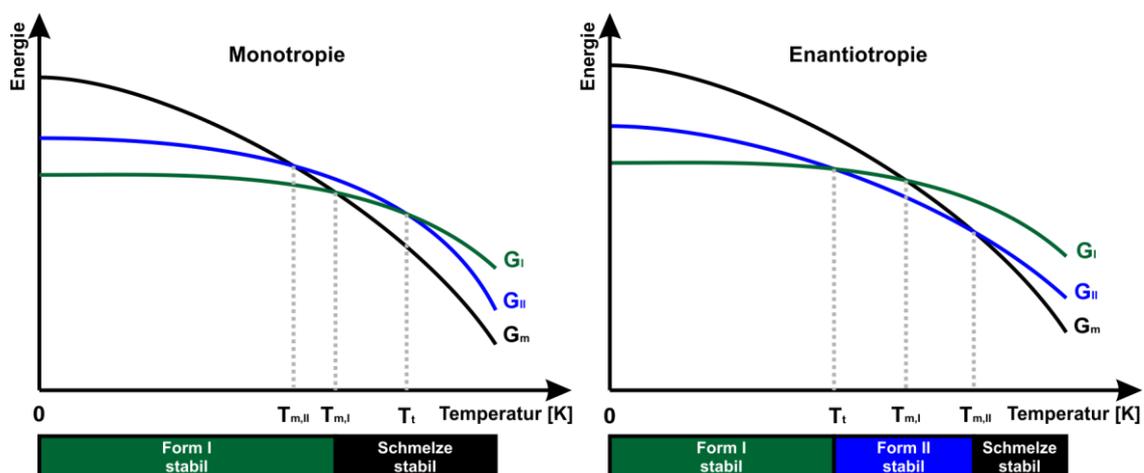


Abb. 1.4 Energie-Temperatur-Diagramm eines monotropen und eines enantiotropen Systems.

zum Schmelzpunkt stabil ist. In einem enantiotropen System liegt die Übergangstemperatur T_t , an welcher die freie Enthalpie beider Polymorphe gleich ist unterhalb der Schmelztemperatur ($T_{m,I}$, $T_{m,II}$) beider Formen. Folglich ist in einem enantiotropen System eine Form (I) unterhalb dieses Übergangspunktes stabil, die andere (Form II) oberhalb. Somit kann hier die bei Raumtemperatur metastabile Form II durch das Aufheizen der stabilen Form I über T_t erhalten werden. In einem monotropen System kann die bei Raumtemperatur stabile Form I durch das Tempern der metastabilen Form II bei jeglicher Temperatur erhalten werden. Ausgehend von der stabilen Form I ist es jedoch unmöglich die metastabile Form II durch thermische Aktivierung zu erhalten. Zu beachten ist jedoch, dass sich die jeweilige Phasenbeziehung auf einen bestimmten Druck bezieht.

Eine Abschätzung der relativen Stabilität und thermodynamischen Beziehung eines dimorphen Systems lassen die „thermodynamischen Regeln“ zu, welche auf Burger und Ramberger zurückzuführen sind. An dieser Stelle sei auf die entsprechende Literatur verwiesen.^[72,73]

1.3 Polymorph Screening

Das Wissen um polymorphe Formen eines Stoffes und deren thermodynamische Zusammenhänge ist, wie bereits beschrieben, essentiell. Gerade in der pharmazeutischen Industrie wird im Hinblick auf die Patentierung eines APIs eine möglichst vollständige Charakterisierung des jeweiligen Systems angestrebt. Bei der Durchführung eines Polymorph Screenings sind daher mehrere Fragen von zentraler Bedeutung:

- ❖ Warum kommt es zur Bildung von polymorphen Formen eines Feststoffs?
- ❖ Wie kann man polymorphe Formen verlässlich und reproduzierbar kristallisieren?
- ❖ Wie können polymorphe Formen charakterisiert werden?
- ❖ Wie kann die relative thermodynamische Stabilität zwischen Polymorphen bestimmt werden?

Die erste und letzte Frage sind wiederum eng mit der Thermodynamik der Polymorphie verbunden und wurden somit bereits im vorangegangenen Kapitel beleuchtet. Zur Behandlung der übrigen beiden Fragestellungen soll im Folgenden auf die praktischen Methoden zur Kristallisation und Charakterisierung von Polymorphen eingegangen werden.

1.3.1 Kristallisationsmethoden

Die erfolgreiche Darstellung einer polymorphen Form hängt im Wesentlichen von der erfolgreichen Kontrolle und Einstellung der Kristallisationsbedingungen ab. Dem Gedanken eines eingehenden Polymorph Screenings zur möglichst vollständigen Charakterisierung der auftretenden Formen in einem System steht zumeist der Zeit- und Geldaufwand entgegen, gerade während der frühen Entwicklungsphasen eines möglichen pharmazeutischen Wirkstoffs. Nichtsdestoweniger sind zur erfolgreichen Kontrolle des Kristallisationsprozesses in Richtung eines gewünschten Polymorphs inzwischen eine Vielzahl an Kristallisationsmethoden bekannt, welche nachfolgend mit entsprechenden Verweisen genannt werden sollen.^[74]

- ❖ Kristallisation aus einer/m Lösung(sgemisch) / High Throughput Screening^[75,76]
- ❖ Kristallisation aus der Schmelze^[77,78]
- ❖ Kristallisation aus einer überkritischen Flüssigkeit^[79,80]
- ❖ Seeding / Pseudoseeding^[81–83]

- ❖ Thermische Aktivierung eines festen Substrats^[84]
- ❖ Mechanische Aktivierung eines festen Substrats^[85,86]
- ❖ Lösungsvermittelte Umwandlung von Polymorphen (slurry conversion)^[87,88]
- ❖ Festphasenumwandlung von Polymorphen (solid-state conversion)^[89,90]
- ❖ Bedampfung bei niedrigen oder hohen Luftfeuchten^[91,92]
- ❖ Bedampfung mit organischen Komponenten^[93]
- ❖ Desolvatisierung/Dehydratisierung eines Solvats/Hydrats^[89,94]
- ❖ Kristallisation in eingegengten (nano-confined) Strukturen^[95,96]
- ❖ Gezielte Kristallisation auf molekularen Substraten^[97-99]
- ❖ Kristallisation unter Einsatz maßgeschneiderter Additive^[60,100-103]
- ❖ Laserinduzierte Kristallisation^[104,105]

Jede der aufgeführten Methoden für sich hat gewisse Vorteile im Hinblick auf das gewünschte Ziel der Kristallisation. Herausgestellt seien an dieser Stelle drei Beispiele.

Die Kristallisation aus Lösung(sgemischen) stellt einen vergleichsweise wenig aufwendigen Standard für ein Polymorph Screening dar, indem ein Feststoff durch Abkühlung, Verdunstung/Verdampfung einer Lösung oder der Zugabe von Antisolvent zu einer Lösung kristallisiert wird. In Verbindung mit einem High Throughput Screening können tausende von Kristallisationsexperimenten durchgeführt werden, mit einer jeweiligen Variation für Parameter, welche die Kristallisation beeinflussen.

Seeding („Impfung“) wiederum erleichtert die Kristallisation durch heterogene oder sekundäre Keimbildung. Zum Einsatz kommen hier einerseits Impfkristalle der gewünschten Form oder Pseudo-Impfkristalle (pseudo-seeds) welche isostrukturell zur gewünschten Form sind. Letztere werden verwendet, sofern die eigentlich gewünschte Form nicht verfügbar ist.^[106] Kristallisation durch Impfung mit der gewünschten Form wird aufgrund der Reproduzierbarkeit allgemein in der industriellen Kristallisation zur Kontrolle der Polymorphie eines Feststoffs eingesetzt.

Die lösungsvermittelte Umwandlung von Polymorphen (slurry conversion) ebenso wie die Festphasenumwandlung von Polymorphen oder thermische Aktivierung fester Substrate sind in vielerlei Hinsicht interessante Methoden. Einerseits bieten sie eine präparativ wenig aufwendige Möglichkeit des Zugangs zu einem entsprechenden Polymorph.

Bei der slurry conversion fällt im Normalfall schnell und verlässlich das jeweilig stabile Polymorph über einen Auflösungs- und Rekristallisationsprozess an. Somit dient diese Methode andererseits ebenfalls zur Einschätzung der relativen Stabilitäten jeweiliger Polymorphe. Die thermische Aktivierung fester Substrate wiederum baut auf der monotropen oder enantiotropen Phasenbeziehung von Polymorphen auf, welche bereits im vorangegangenen Kapitel behandelt wurde.

1.3.2 Charakterisierungsmethoden

Neben der Kontrolle der Polymorphie durch den entsprechenden Umgang mit experimentellen Parametern gewähren Analysemethoden für Festkörper Einblicke in den Reaktionsverlauf (On-line Monitoring), die Mikro- und Makrostruktur der kristallinen Feststoffe, sowie deren thermodynamische Beziehung.

In erster Linie muss die Röntgenpulverdiffraktometrie als Technologie zur Analyse von Polymorphen genannt werden. Die Anwendung dieser Methode reicht von der schnellen Charakterisierung bei einem High Throughput Screening bis zur quantitativen Analyse von Gemischen jeweiliger Polymorphe. Der letzte Punkt setzt die Kenntnis über die Kristallstruktur der einzelnen enthaltenen Formen oder zumindest das Vorhandensein von Diffraktogrammen der Reinformen voraus. Hier stellt die Röntgeneinkristalldiffraktometrie eine verlässliche und geradlinige Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur eines Stoffes dar.^[107] Aus der so bestimmten Struktur kann wieder das entsprechende Pulverdiffraktogramm berechnet werden. Leider ist es meist sehr schwierig ausreichend große Kristalle für eine Röntgeneinkristallanalyse zu generieren, wodurch die Pulverdiffraktometrie zur Kristallstrukturanalyse wiederum in den Vordergrund tritt. Durch die Weiterentwicklung technischen Equipments, wie entsprechender Detektoren, konnte die Datenqualität in den letzten Jahren enorm gesteigert werden. Auch die Zunahme der Rechenleistung von Computern spielt eine entscheidende Rolle, da je nach Komplexität der betrachteten Struktur die einzelnen Schritte einer Kristallstrukturanalyse rechenintensiv ausfallen können. Dies gewährleistet heutzutage die Strukturaufklärung in „nicht trivialen“ Fällen auch an Labordiffraktometern, wie ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Auf den genauen Vorgang der Strukturlösung mittels Pulverdaten von der Indizierung bis zur Strukturverfeinerung mittels der Rietveld-Methode soll an dieser Stelle

nicht genauer eingegangen werden. Es sei jedoch auf die einschlägige Literatur verwiesen.^[108–112]

Die Festkörper-Kernspinresonanzspektroskopie (Festkörper-NMR) lässt Aussagen zur Struktur und Dynamik von Molekülen durch die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und deren Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen zu. Festkörper-NMR und Röntgendiffraktometrie stellen somit komplementäre Methoden zur Strukturanalyse polykristalliner Pulver dar. Anders als bei der Röntgendiffraktometrie sind mittels Festkörper-NMR allerdings auch Informationen über Festkörper mit fehlender langreichweitiger Ordnung (amorphe Stoffe, Gläser) zugänglich.

Die Molekularspektroskopie (FTIR und FT-Raman) findet sowohl Anwendung beim Online Monitoring zur Verfolgung des Konzentrationsverlaufs einzelner Substanzen während der Reaktion, wie auch zur Charakterisierung molekularer Wechselwirkungen in den Reaktionsprodukten.

Die Thermoanalyse lässt über dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) Aussagen über mögliche Umwandlungserscheinungen und zur entsprechenden thermodynamischen Beziehung von Polymorphen eines Feststoffes zu. Die Thermogravimetrie (TG) lässt Rückschlüsse auf die Existenz und die thermische Stabilität möglicher Solvate/Hydrate, sowie die Stärke der Wechselwirkung innerhalb der Struktur zu. Die Quantifizierung des Massenverlusts bei Austritt des eingebauten Solvens aus der Struktur kann zudem zur Bestimmung der Stöchiometrie genutzt werden.

1.4 Untersuchte Systeme

In dieser Arbeit wurde die Polymorphie dreier molekularer Verbindungen mit einer breiten öffentlichen Anwendung bzw. von steigendem Interesse aufgrund pharmazeutischer Anwendbarkeit untersucht. Natriumbenzoat (NaBz) ist neben pharmazeutischen Anwendungen vor allem als Konservierungsmittel E211 aus der Lebensmittelindustrie bekannt.^[113] Luminol ist durch das Phänomen seiner Chemilumineszenz, der Emission von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts, hervorgerufen durch eine chemische Reaktion, bekannt.^[114] Das Natriumsalz des Luminols gewinnt aufgrund seiner immunomodulatorischen, entzündungshemmenden Eigenschaften zunehmend Interesse als API.

1.4.1 Natriumbenzoat

Trotz einer Produktionskapazität von 100 kT pro Jahr^[115] blieb die Kristallstruktur von NaBz lange unaufgeklärt. Technisch hergestelltes NaBz (aus Lösung kristallisiert) zeichnet sich in Röntgenpulverdiffraktogrammen durch wenige, sehr breite Reflexe aus. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um eine teilkristalline Struktur handelt, welche ein niederdimensionales Strukturmotiv mit einer Nahordnung in Kombination mit einer Fernordnung in nur einer Dimension aufweist. Eine nähere Charakterisierung dieser Struktur blieb bisher aufgrund dieser niederdimensionalen Baueinheiten, welche untereinander fehlgeordnet gepackt zu sein scheinen, erfolglos. 2005 konnten von van Deun et al. in einem DSC Thermogramm für NaBz unter Heliumstrom endotherme Phasenübergänge beobachtet werden.^[116] Diese wurden dem Übergang von einer kristallinen in eine smektisch A flüssigkristalline Phase (bei 431 °C) und dem Übergang zur Schmelze (bei 451 °C) zugeordnet. Von Butterhof et al. konnte gezeigt werden, dass sich in dem fehlgeordneten Material durch Temperaturerhöhung eine Kristallisation induzieren lässt.^[117,118] Langzeitiges Tempern bei 420 °C (unterhalb der Zersetzungstemperatur an Luft) führte zur Ausbildung von Einkristallen anhand derer die Kristallstruktur bestimmt werden konnte. Die erhaltene Struktur bietet eine Erklärung für das Auftreten des teilkristallinen Zustands im technischen Produkt von NaBz. Wie bei vielen pharmazeutischen Wirkstoffen kommt es auch bei NaBz zu einem koordinativen Dilemma. Während bei Co-Kristallen der Alkali-Metallsalze der Benzoesäure (Li-, Na-, KBz) durch die Einbindung des neutralen Co-Liganden Benzoesäure die Möglichkeit entsteht, den sterischen

Anspruch des an die Carboxylgruppe gebundenen organischen Rests durch eine Erhöhung der Stöchiometrie auszugleichen, kann unter Berücksichtigung der 1:1 Stöchiometrie das koordinative Bedürfnis des Kations im Fall des reinen NaBz nur durch eine Art Mikrophasensegregation gelöst werden.^[118–121] Der amphiphile Charakter des Benzoat Moleküls trägt hier zu einer Separation der hydrophilen und hydrophoben Teilstrukturen bei. Die beobachtete Packung besteht aus stark verzerrt hexagonal angeordneten, elliptischen, micellartigen Bändern. Diese weisen einen Kern aus Natrium-Ionen auf, welche über die Sauerstoffatome der Carboxylgruppe fünf- und sechsfach koordiniert sind.

1.4.2 Luminol

Die ausgeprägte Chemilumineszenz des Moleküls 5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion (auch 3-Aminophthalhydrazid) brachte ihm den Trivialnamen „Luminol“ ein. Während die erste dokumentierte Synthese von Schmitz 1902 durchgeführt wurde, fand der Begriff „Luminol“ zum ersten Mal 1934 durch Huntress et al. Verwendung.^[122–124] Die Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols, bei welcher Schwermetalle als Katalysator zur Oxidation des Luminols mit einem entsprechenden Oxidationsmittel (zumeist Wasserstoffperoxide oder Hydroxylionen) verwendet werden, findet Anwendung in der biochemischen und medizinischen Analytik.^[125] Populär geworden ist Luminol für seinen Einsatz in der Kriminalistik zum Nachweis selbst geringster Mengen von Blut anhand der vom Eisen im Hämoglobin ausgelösten Chemilumineszenz.^[126] Trotz der regen Anwendung wurde eine Kristallstruktur erst 1992 durch Paradies anhand von Röntgeneinkristalldiffraktometrie beschrieben.^[127]

1.4.3 Natriumluminolat

Durch die Umsetzung zum Natriumsalz wird das in wässrigen Medien schlecht lösliche Luminol für pharmazeutische Zwecke als API nutzbar. Na-Luminolat findet Anwendung als Immunomodulator, welcher in der Lage ist, die im Rahmen entzündlicher oder infektiöser Prozesse auftretende überschießende Immunantwort auf ein physiologisches Maß zu reduzieren. Somit werden Entzündungen, Infektionen und Wundheilungsprozesse positiv beeinflusst. Na-Luminolat steht unter dem Begriff „monosodium luminol“ in Verbindung mit dem anti-inflammatorisch wirkenden Arzneimittel GVT® und den in der Russischen Föderation seit 1997 registrierten Arzneimitteln Galavit® und Tamerit®.^{[128–}

^{132]} Der äußerst zweifelhafte Einsatz von Galavit® in der Behandlung von Krebserkrankungen erregte zudem zu Beginn der 2000er mediales Aufsehen.^[131–133] Neben dem pharmazeutischen Einsatz ist Na-Luminolat auch im Hinblick auf die im System auftretende Polymorphie interessant. 2014 wurden von Rybakov et al. Strukturen für ein Dihydrat des Na-Luminolats (welches dem Arzneimittel Tamerit® zugrunde liegt) und zwei Polymorphe (Form I und II) des Na-Luminolat Anhydrats (Strukturlösung und quantitative Verfeinerung anhand von Röntgenpulverdiffraktometrie an Galavit®) bestimmt.^[134] Die Struktur eines Hexahydrats des Na-Luminolats wurde neben anderen hydratisierten und nicht hydratisierten Formen von Alkalisalzen des Luminols von Guzei et al. 2013 beschrieben.^[135]

2 Synopsis

Trotz der potentiellen Auswirkungen der Polymorphie in Festkörpern, zeigt sich an verschiedenen Beispielen von Verbindungen, für welche erst weit nach ihrer Entdeckung oder der ersten Beschreibung einer Kristallstruktur noch weitere Formen gefunden wurden, dass das Phänomen „Polymorphie“ noch immer nicht gut verstanden ist.^[136–138] Gründe hierfür sind zum Teil, dass das Zusammenspiel molekularer Wechselwirkungen und äußerer Einflüsse, welche zur Bildung oder im schlimmeren Fall zum Verschwinden einer polymorphen Form führt^[42,139], wie bereits dargestellt wurde, entsprechend komplex ist. Andererseits finden sich ebenso übersehene oder sehr leicht zu übersehende Polymorphe in relativ populären Verbindungen.

2.1 Motivation

Alkalimetallsalze organischer Verbindungen, deren Kation einem entsprechend großen molekularen Anion gegenüber stehen, weisen oft eine schlechte Kristallinität oder einen hohen Grad an Fehlordnungen in der Kristallstruktur auf. NaBz als Vertreter der Benzozalsalze ist in seiner kommerziell erhältlichen Form ebenfalls teilkristallin. Die Strukturaufklärung der kristallinen Form, welche durch langzeitiges Tempern erhalten wurde, gewährte einen Einblick, wie in diesem System das beschriebene „koordinative Dilemma“ umgangen wird.^[117,118] Bei weiterführenden Untersuchungen zum Rekristallisationsprozess zwischen der bei Raumtemperatur teilkristallinen Form und der bereits bekannten Form kam es zur Entdeckung einer weiteren Phase. Diese kristallisiert bei niedrigerer Temperatur, konnte phasenrein isoliert und strukturell charakterisiert werden.

Bei der Durchführung des Polymorph Screening an Na-Luminolat konnten 2014 im Rahmen dieser Arbeit für den europäischen und amerikanischen Markt Substanzpatente mit dem Kooperationspartner MetrioPharm AG erwirkt werden.^[140–142] Bei weiterführenden Experimenten zur Kristallisation der bereits charakterisierten Phasen wurde anhand der genauen Prüfung einzelner geringfügiger Unstimmigkeiten in Röntgenpulverdiffraktogrammen die Existenz eines weiteren Polymorphs offensichtlich. Mittels genauer Einstel-

lung der Kristallisationsbedingungen gelang es, die sich in ihren Röntgenpulverdiffraktogrammen nahezu vollständig überlagernden Formen phasenrein darzustellen, strukturell zu charakterisieren und die Phasenbeziehung zu bestimmen.

Ebenso zeigte sich, dass Luminol in seiner kommerziell erhältlichen Form nicht mit einer bereits bekannten Kristallstruktur übereinstimmte. Es kann darüber spekuliert werden, ob es sich in diesem Fall um eine „übersehene“ Polymorphie handelt. Das kommerziell erhältliche Produkt weist allerdings eine schlechte Kristallinität auf, welche ebenso der Grund dafür gewesen sein dürfte, dass eventuelle Indizierungsversuche bisher erfolglos blieben. Die Wahl geeigneter Kristallisationsbedingungen führte auch in diesem Fall zu einer Verbesserung der Kristallinität und gewährleistete eine phasenreine Herstellung beider polymorpher Formen. Eine erfolgreiche strukturelle Charakterisierung der unbekannt Form, sowie die Bestimmung der Phasenbeziehung konnte ebenso durchgeführt werden.

2.2 Polymorphie des Natriumbenzoats

Im Modellsystem NaBz konnte bei der Untersuchung des Rekristallisationsprozesses des kommerziell erhältlichen, teilkristallinen Produktes zur bereits bekannten Form (Form I) ein weiteres Polymorph (Form II) identifiziert und charakterisiert werden.

Im Gegensatz zu Form I, für welche Kristalle ausreichender Qualität für eine Strukturbestimmung aus Röntgeneinkristalldiffraktometrie durch langzeitiges Tempern (420 °C, 5 Monate) erhalten werden konnten, kristallisiert Form II während einwöchigem Tempern bei 350 °C zu einem phasenreinen polykristallinen Pulver.

Eine Indizierung des entsprechenden Röntgenpulverdiffraktogramms der neuen Form II blieb jedoch aufgrund der massiven Überlagerung von Reflexen ohne Erfolg. Durch Elektronendiffraktometrie mittels ADT konnten Zellparameter ermittelt werden, anhand derer das Diffraktogramm erfolgreich indiziert werden konnte. Die Struktur von Form II konnte anschließend anhand eines, der Form I entlehnten Strukturmotivs gelöst und mittels der Rietveld-Methode verfeinert werden (Abb. 2.1).

Der amphiphile Charakter des Benzoat Moleküls führt in beiden Formen zu einer Mikrophasensegregation, einem Phänomen, welches eher aus dem Bereich der Tenside oder

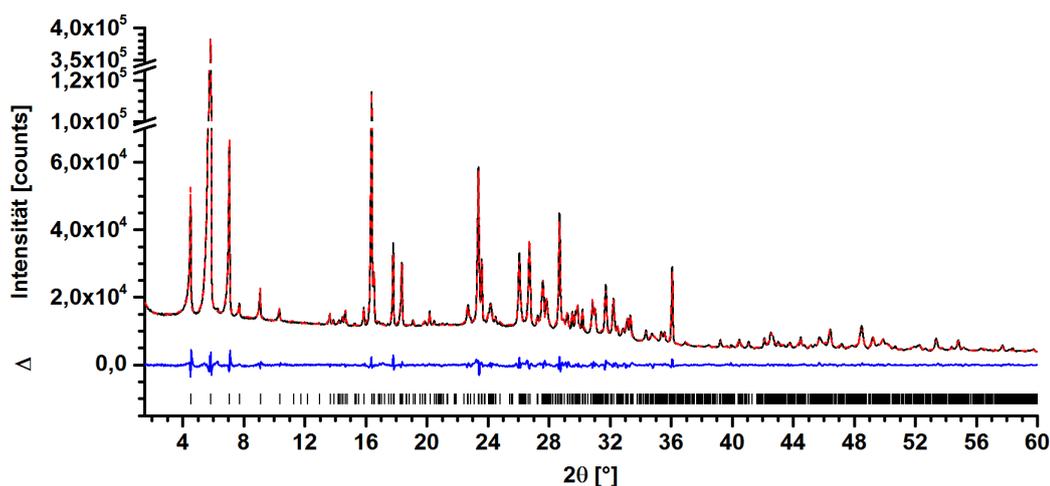


Abb. 2.1 Rietveld-Verfeinerung der Kristallstruktur von NaBz Form II. Die Verfeinerung zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenem und berechnetem Diffraktogramm.

— : gemessenes Profil; - - : Profil des Rietveld-Fits; | : Position der Bragg-Reflexe der Elementarzelle; Δ : Differenz zwischen gemessenem und errechnetem Profil.

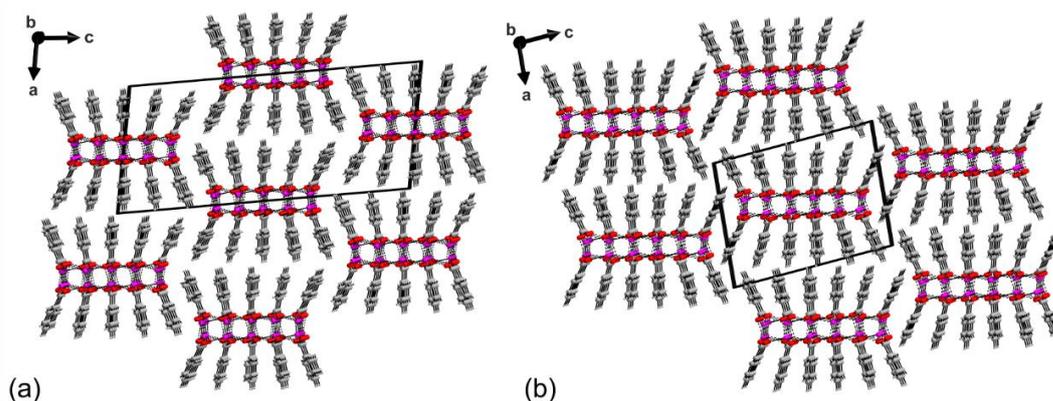


Abb. 2.2 Packungsmuster von NaBz Form I (a) und Form II (b). Annähernd hexagonale Packung elliptischer, micellartiger Bänder entlang *b*-Achse beider Formen mit unterschiedlicher NaBz Anzahl entlang der Hauptachse der Ellipse.

Blockcopolymer bekannt ist. NaBz bildet sowohl in Form I als auch in Form II eine pseudo-hexagonale Packung elliptischer, micellartiger Bänder mit einer hydrophoben Oberfläche (Phenylgruppen des Benzoats) und einem hydrophilen Kern (Na^+ koordiniert von den Carboxylgruppen der Benzoats). Den Unterschied zwischen beiden Formen stellt die Anzahl NaBz Einheiten (Form I: 10; Form II: 12) dar, welche entlang der längeren Hauptachse der Ellipse angeordnet sind (Abb. 2.2).

Eine Abschätzung zur thermodynamischen Beziehung beider Polymorphe konnte anhand von DFT-D Rechnungen durchgeführt werden. Form II liegt nach der Optimierung bei 0 K energetisch günstiger als Form I (+2,30 kJ/mol). Dieser energetische Unterschied lässt keine schlussendliche Aussage zur Phasenbeziehung beider Formen bei Raumtemperatur zu, steht allerdings im Einklang mit der Beobachtung einer endothermen Umwandlung von Form II zu Form I im DSC-Experiment. Beides weist auf eine enantiotrope Beziehung beider Formen hin.

2.3 Polymorphie des Luminols

Röntgenpulverdiffraktogramme kommerziell erhältlicher Formen von Luminol zeigten keine Übereinstimmung mit der bereits bekannten Kristallstruktur von Luminol (Form I). Eine erfolgreiche Indizierung und Strukturlösung des kommerziell erhältlichen Produktes wurde durch schlechte Kristallinität verhindert, die sich in den aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogrammen durch ein teils stark verbreitertes Reflexprofil äußerte.

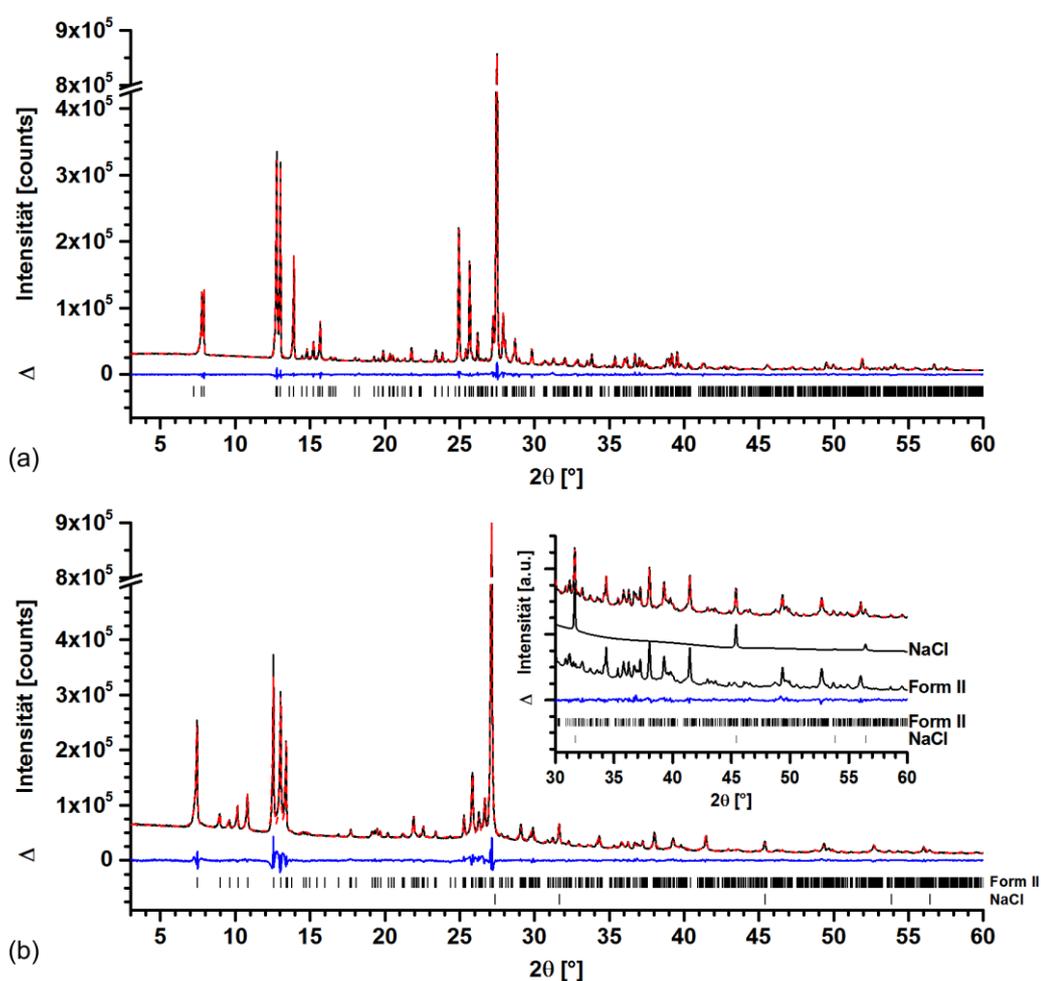


Abb. 2.3 Rietveld-Verfeinerung der Kristallstruktur von Luminol Form I (a) und quantitative Rietveld-Verfeinerung der Kristallstruktur von Luminol Form II und einem Fremdphasenanteil NaCl (b). Die Verfeinerungen zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenem und berechnetem Diffraktogramm. Im Einsatz oben links in (b) wird die Dekonvolution der berechneten Profile für Luminol Form II und NaCl gezeigt.

—: gemessenes Profil; --: Profil des Rietveld-Fits; | : Position der Bragg-Reflexe der Elementarzelle; Δ : Differenz zwischen gemessenem und errechnetem Profil.

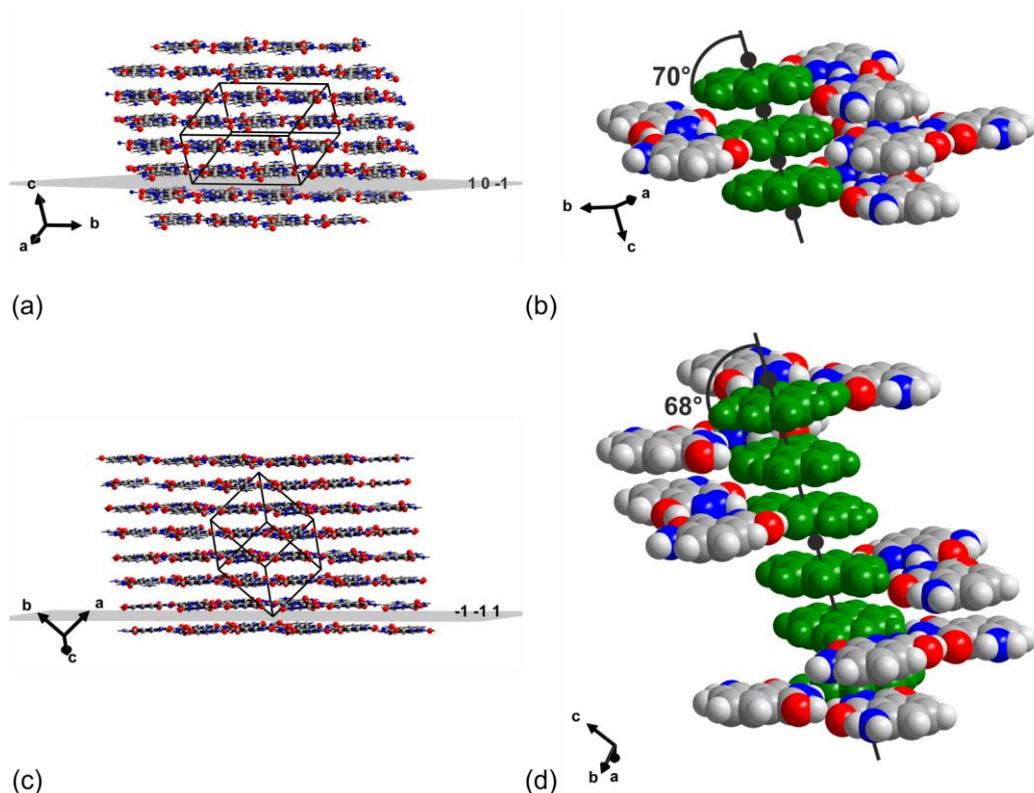


Abb. 2.4 Überblick über das Packungsmuster von Luminol Form I (oben) und Form II (unten). (a, c) Schichtaufbau beider Formen. (b, d) Verschobene Stapelung der Luminol-Trimere in benachbarten Schichten; grüne Luminol-Moleküle liegen auf einer, die Inversionszentren (●) verbindende Achse.

Form I konnte phasenrein aus einer EtOH-Wasser-Lösung (3:1, vol%:vol%; 80 °C) von Luminol durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur erhalten werden. Die bereits bekannte Kristallstruktur von Form I wurde zu Vergleichszwecken anhand des Röntgenpulverdiffraktogramms mittels Rietveld-Methode erneut verfeinert (Abb. 2.3a). Optimierte Kristallisationsbedingungen führten zur Verbesserung der Kristallinität der bislang nicht charakterisierten Form (Form II) von Luminol. Die Neutralisation einer wässrigen Na-Luminolat-Lösung mit HCl erlaubte die Kristallisation von Form II. Die Kristallstruktur von Form II konnte erfolgreich gelöst und gegen einen geringen Anteil von NaCl im Kristallisationsprodukt ($w = 1.8\%$) quantitativ verfeinert werden (Abb. 2.3b).

Beide Formen zeichnen sich durch einen Schichtaufbau aus (Abb. 2.4a, c). Innerhalb der Schichten bildet das Amid-Hydroxyimin-Tautomer des Luminols wasserstoffverbrückte Trimere, welche wiederum eine Ecken-Kanten-Verknüpfung zu benachbarten Trimeren über Wasserstoffbrücken eingehen. Der Unterschied zwischen beiden Formen des Luminols liegt lediglich in der Stapelung der beschriebenen Schichten (Abb. 2.4b, d). Daher

können die Formen I und II auch als Polytypen bezeichnet werden und stellen ein seltenes Beispiel für das Auftreten dieses Phänomens in rein organischen Verbindungen dar.

Die thermodynamische Beziehung zwischen beiden Polymorphen konnte anhand von Slurry-Experimenten bestimmt werden. Es zeigte sich bei Raumtemperatur eine lösungsvermittelte Umwandlung von Form II in Form I. Form I ist demnach thermodynamisch stabiler als Form II.

2.4 Polymorphie des Natriumluminolats

Während Luminol als freie Säure des Na-Luminolats differenzierbare Röntgenpulverdiffraktogramme bei sich gleichenden Strukturmotiven beider identifizierter Formen zeigt, stellt Na-Luminolat ein Extrembeispiel für Überlapp von Röntgenpulverdiffraktogrammen zweier Polymorphe (Form II und Form III) dar.

Eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen führte zu einer phasenreinen Kristallisation dieser beiden Formen. Form II konnte durch die Entwässerung der Dihydrat-Form des Na-Luminolats erhalten werden. Form III wurde aus einer gesättigten DMSO-Lösung

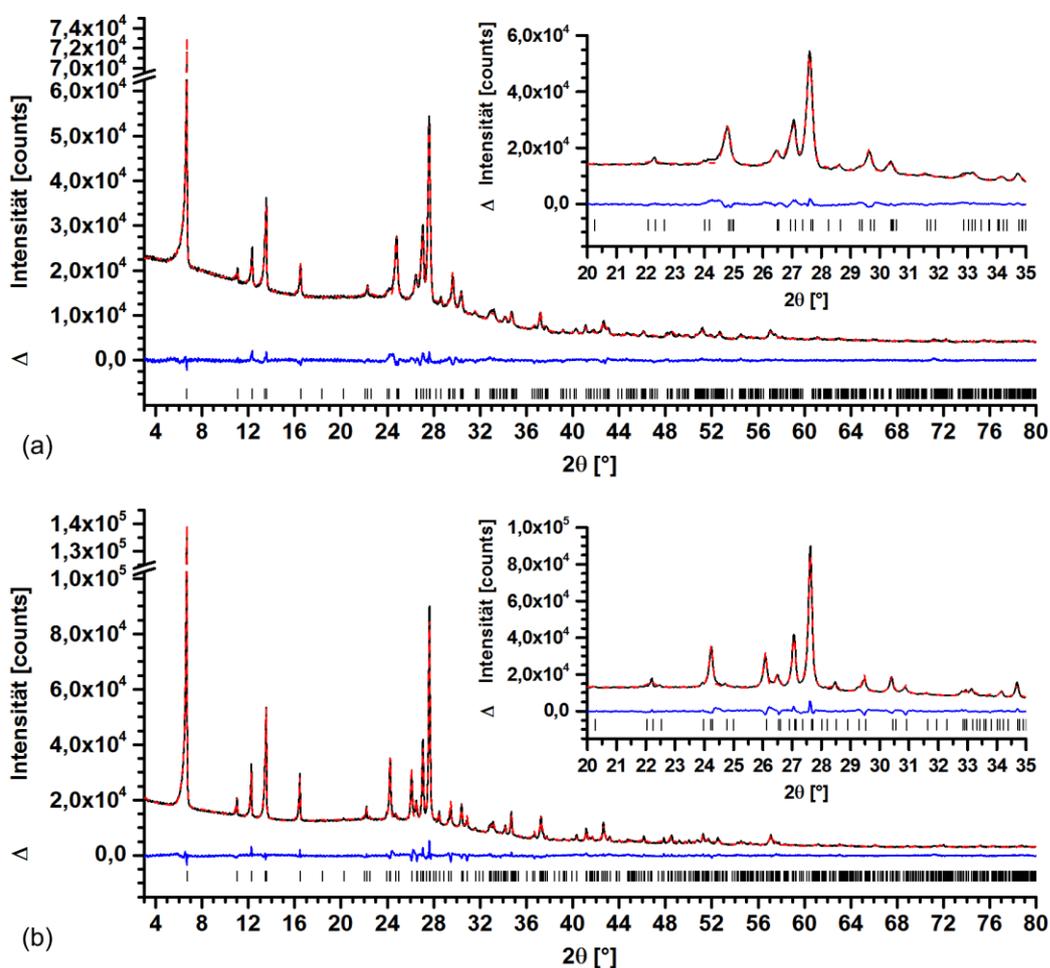


Abb. 2.5 Rietveld-Verfeinerung der Kristallstrukturen von Na-Luminolat Form II (a) und Form III (b). Die Verfeinerungen zeigen jeweils eine gute Übereinstimmung zwischen gemessenem und berechnetem Diffraktogramm. Jeweils oben rechts: Vergrößerung des Rietveld-Fits für Bereich mit singulären Reflexen der jeweiligen Form

— : gemessenes Profil; - - : Profil des Rietveld-Fits; | : Position der Bragg-Reflexe der Elementarzelle; Δ : Differenz zwischen gemessenem und errechnetem Profil.

des Na-Luminolats durch langsame Verdampfung (90 °C) kristallisiert. Die bereits bekannte Struktur von Form II konnte anhand des phasenreinen Produkts mittel Rietveld-Verfeinerung des Pulverdiffraktogramms verifiziert werden (Abb. 2.5a). Die wenigen singulären Reflexe im Röntgenpulverdiffraktogramm der bislang nicht charakterisierten Form III erlaubten dennoch eine erfolgreiche Indizierung und Strukturbestimmung mittels Rietveld-Verfeinerung (Abb. 2.5b).

Beide Formen zeichnen sich durch einen Schichtaufbau aus (Abb. 2.6a, c). Innerhalb dieser Schichten verlaufen um $\pm 25^\circ$ gegen die Schichtfläche geneigte Luminolat-Dimer-Stränge. Im Gegensatz zur alternierenden Neigungsrichtung benachbarter Dimer-Stränge

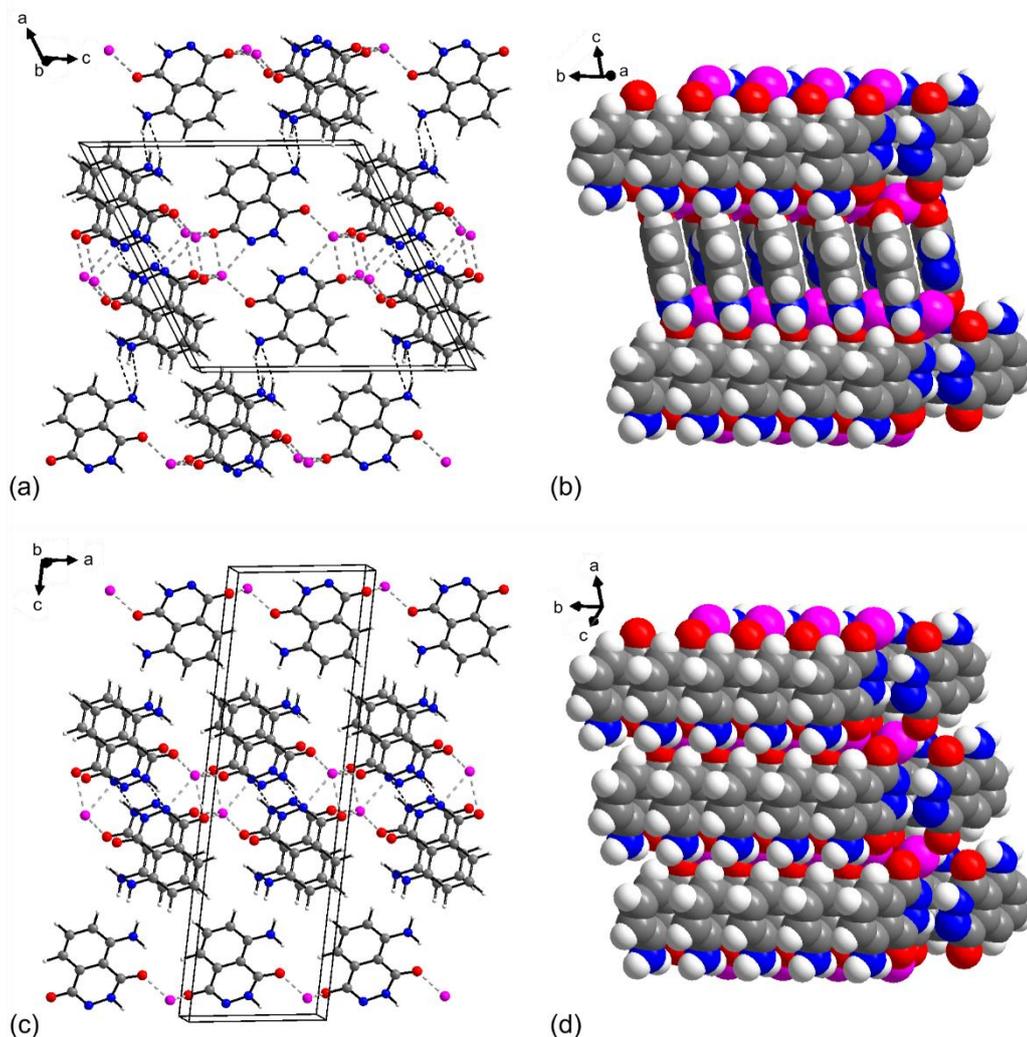


Abb. 2.6 Packungsmuster von Na-Luminolat Form II (oben) und Form III (unten). (a, c) Schichtaufbau der Strukturen. (b, d) Ansicht auf jeweils eine Schicht mit alternierend geneigten Luminolat Dimer-Strängen in Form II (b) und gleich geneigten Luminolat Dimer Strängen in Form III (c).

innerhalb einer Schicht bei Form II (Abb. 2.6b) bleibt die Neigungsrichtung der Dimer-Stränge in Form III innerhalb einer Schicht gleich (Abb. 2.6d) und ändert sich zwischen benachbarten Schichten.

Die Übereinstimmung der Struktur motive beider Formen II und III mit Ausnahme der Neigungsrichtung der Dimer-Stränge führt zusätzlich zur Ähnlichkeit der jeweiligen Röntgenpulverdiffraktogramme auch zu sehr ähnlichen FT-IR und Raman Spektren. Die Unterschiede in den jeweiligen Spektren für beide Formen II und III beschränken sich auf den Phononenbereich und unterstreichen die Einordnung von Form II und Form III als zwei unterschiedliche Polymorphe des Na-Luminolats.

Die thermodynamische Beziehung zwischen beiden Polymorphen konnte anhand von DFT-D Rechnungen nicht aussagekräftig geklärt werden. Form III liegt nach der Optimierung bei 0 K energetisch günstiger als Form II (+1,708 kJ/mol). Slurry-Experimente zeigten eine lösungsvermittelte Umwandlung von Form II in Form III bei Raumtemperatur. In Übereinstimmung mit den DFT-D-Rechnungen ist Form III demnach stabiler als Form II.

3 Publikationen und Manuskripte

Folgende Publikationen und Manuskripte sind Bestandteile dieser Dissertation:

- Anhang A.1

**Microphase Separation upon Crystallization of Small Amphiphilic Molecules:
'Low' Temperature Form II of Sodium Benzoate (E 211)**

Reproduced from T. Martin, T. Gorelik, D. Greim, C. Butterhof, U. Kolb, J. Senker, and J. Breu, *CrystEngComm*, 2016, 18, 5811-5817 with permission from The Royal Society of Chemistry.

Darstellung des Eigenanteils:

Das Konzept der Publikation wurde von Prof. Dr. Josef Breu, Dr. Butterhof und mir erarbeitet. Elektronendiffraktionsmessungen und die damit verbundenen Auswertungen wurden von Dr. Tatiana Gorelik und Dr. Ute Kolb durchgeführt. DFT-D Rechnungen zur Geometrieoptimierung der beschriebenen Phasen wurden von M.Sc. Dominik Greim und Prof. Dr. Jürgen Senker durchgeführt. Alle praktischen Arbeiten und übrigen Messungen, sowie damit verbundene Auswertungen und Interpretationen wurden von mir durchgeführt.

Die Publikation wurde von Prof. Josef Breu und mir verfasst.

Der Eigenanteil beläuft sich auf etwa 70%.

- Anhang A.2

Behind Crime Scenes: The Crystal Structure of Commercial Luminol

Reprinted with permission from T. Martin, J. Fleissner, W. Milius, and J. Breu, *Cryst. Growth Des.*, **2016**, *16* (5), 3014-3018. Copyright 2016 American Chemical Society.

Darstellung des Eigenanteils:

Das Konzept der Publikation wurde von Prof. Dr. Josef Breu, Dr. Wolfgang Milius und mir erarbeitet. Praktische Arbeiten wurden von B.Sc. Juliane Fleissner durchgeführt. Alle Messungen, sowie damit verbundene Auswertungen und Interpretationen wurden von mir durchgeführt.

Die Publikation wurde von Prof. Josef Breu und mir verfasst.

Der Eigenanteil beläuft sich auf etwa 80%.

- Anhang A.3

The Same at a First Glance: The Diffractogram of a New Polymorph of Anhydrous Sodium Luminolate Almost Perfectly Resembles the Diffraction Trace of An Already Known Polymorph

Copyright 2016 Wiley. Used with permission from T. Martin, D. Greim, W. Milius, M. Niedermaier, B. Ludescher, J. von Wegerer, W. Brysch, K. Bärwinkel, J. Senker und J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2015**, 641 (2), 332-338.

Darstellung des Eigenanteils:

Das Konzept der Publikation wurde von Prof. Dr. Josef Breu, Dr. Wolfgang Milius, Dr. Michael Niedermaier, Dr. Beate Ludescher, Dr. Jörg von Wegerer, Dr. Wolfgang Brysch und mir erarbeitet. Alle praktischen Arbeiten, Messungen und damit verbundene Auswertungen und Interpretationen wurden von mir durchgeführt. DFT-D Rechnungen zur Geometrieoptimierung der beschriebenen Phasen wurden von M.Sc. Dominik Greim, M.Sc. Kilian Bärwinkel und Prof. Dr. Jürgen Senker durchgeführt.

Die Publikation wurde von Prof. Josef Breu und mir verfasst.

Der Eigenanteil beläuft sich auf etwa 85%.

4 Weitere Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende weitere Veröffentlichungen, welche nicht Inhalt dieser kumulativen Dissertation sind:

- C. Butterhof, T. Martin, P. Ectors, D. Zahn, P. Niemiets, J. Senker, C. Näther, J. Breu, *Cryst. Growth Des.*, 2012, **12** (11), 5365-5372.
- M. Schieder, T. Lunkenbein, T. Martin, W. Milius, G. Auffermann, J. Breu, *J. Mater. Chem. A*, 2013, **1** (2), 381-387.
- C. Butterhof, T. Martin, W. Milius, J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2013, **639** (15), 2816-2821
- J. Hausner, C. Butterhof, T. Martin, W. Milius, J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2014, **640** (14), 2871-2875
- S. Rosenfeldt, M. Stöter, M. Schlenk, T. Martin, R. Q. Albuquerque, S. Förster, J. Breu, *Langmuir*, 2016, DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02206

5 Vorträge und Posterbeiträge

- **Polymorphie von Benzamid-Molekülkristallen – Synthese (Poster)**
C. Butterhof, T. Martin und J. Breu, 1. Berichtskolloquium des SPP 1415, Boppard, Oktober 2011

- **Polymorphie von Benzamid-Molekülkristallen – Synthese (Poster)**
C. Butterhof, T. Martin und J. Breu, in-situ-Analysemethoden Workshop des SPP 1415, Wismar, März 2012

- **Neue polymorphe Form des Benzamids (Poster)**
C. Butterhof, T. Martin, I. Andrusenko, U. Kolb und J. Breu, 16. Vortragstagung der GDCh Fachgruppe Festkörperchemie und Materialforschung, Darmstadt, September 2012

- **Polymorphe Formen des Natrium-Luminolats (Poster)**
T. Martin, W. Milius und J. Breu, 16. Vortragstagung der GDCh Fachgruppe Festkörperchemie und Materialforschung, Darmstadt, September 2012

- **Polymorphie von Benzamid-Molekülkristallen – Synthese (Poster)**
C. Butterhof, T. Martin und J. Breu, Vernetzungstreffen des SPP 1415, Eisenach, April 2013

- **Polymorphie von Benzamid-Molekülkristallen – Synthese (Poster & Vortrag)**
T. Martin und J. Breu, Berichtskolloquium für 2. Periode des SPP 1415, Bad Sooden Allendorf, Mai 2015

6 Literaturverzeichnis

- [1] Z. H. Stachurski, *Fundamentals of Amorphous Solids: Structure and Properties*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [2] W. Schatt, H. Worch, *Werkstoffwissenschaft*, Wiley-VCH, **2003**.
- [3] W. Borchardt-Ott, H. Sowa, *Kristallographie: Eine Einführung Für Naturwissenschaftler*, Springer-Verlag, **2013**.
- [4] B. Tieke, *Makromolekulare Chemie: Eine Einführung*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [5] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie: Ein Lehrbuch Für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler Und Verfahrenstechniker*, Springer-Verlag, **2014**.
- [6] W. Kleber, H.-J. Bautsch, J. Bohm, *Einführung in Die Kristallographie*, Verlag Technik, Berlin, **1998**.
- [7] J. A. Goldstein, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *52*, 349–355.
- [8] P. E. Thomas, R. Klinger, L. I. Furlong, M. Hofmann-Apitius, C. M. Friedrich, *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, S4.
- [9] M. Fareed, M. Afzal, *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **2013**, *14*, 123–134.
- [10] J. Halebian, W. McCrone, *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911–929.
- [11] J. Bernstein, in *Polymorph. Mol. Cryst.*, Oxford University Press, Oxford, **2007**, pp. 257–274.
- [12] K. Kadish, R. Guilard, K. M. Smith, *The Porphyrin Handbook: Applications of Phthalocyanines*, Elsevier Science, **2012**.
- [13] J. M. Oyarzún, *Pigment Processing: Physico-Chemical Principles*, Vincentz Network GmbH & Co KG, **2000**.
- [14] B. Olenik, G. Thielking, in *Mod. Methods Crop Prot. Res.*, Wiley-VCH, **2012**, pp. 249–272.
- [15] R. J. Davey, N. Blagden, G. D. Potts, R. Docherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1767–1772.
- [16] S. Hall, P. Kolinsky, R. Jones, S. Allen, P. Gordon, B. Bothwell, D. Bloor, P. A. Norman, M. Hursthouse, A. Karaulov, et al., *J. Cryst. Growth* **1986**, *79*, 745–751.
- [17] W. Wang, M. Aggarwal, J. Choi, T. Gebre, A. D. Shields, B. G. Penn, D. O. Frazier, *J. Cryst. Growth* **1999**, *198-199*, 578–582.
- [18] B. Ruiz, B. J. Coe, R. Gianotti, V. Gramlich, M. Jazbinsek, P. Günter, *CrystEngComm* **2007**, *9*, 772.
- [19] R. Hilfiker, *Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry*, John Wiley & Sons,

2006.

- [20] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 4–17.
- [21] R. Storey, R. Docherty, P. Higginson, C. Dallman, C. Gilmore, G. Barr, W. Dong, *Crystallogr. Rev.* **2004**, *10*, 45–56.
- [22] A. Grunenberg, J.-O. Henck, H. W. Siesler, *Int. J. Pharm.* **1996**, *129*, 147–158.
- [23] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Oxford University Press, Oxford, **2007**.
- [24] T. Threlfall, *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 384–390.
- [25] S. R. Vippagunta, H. G. Brittain, D. J. W. Grant, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *48*, 3–26.
- [26] J. Lu, S. Rohani, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 884–905.
- [27] D. Mangin, F. Puel, S. Veessler, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1241–1253.
- [28] J. T. Carstensen, *Advanced Pharmaceutical Solids*, CRC Press, **2000**.
- [29] K. H. Bauer, K.-H. Frömming, H. Egermann, B. C. Lippold, C. Führer, *Lehrbuch Der Pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2006**.
- [30] D. Fischer, J. Breitenbach, *Die Pharmaindustrie: Einblick - Durchblick - Perspektiven*, Springer-Verlag, **2012**.
- [31] E. Mitscherlich, *ADB*, **1822**, pp. 43–48.
- [32] F. Wöhler, J. F. von Liebig, *Ann. Pharm.* **1832**, *3*, 249.
- [33] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch Der Anorganischen Chemie*, De Gruyter, **2007**.
- [34] International Union of Crystallography (IUCr), “Online Diktionary of Crystallography: Polytypism,” can be found under <http://reference.iucr.org/dictionary/Polytypism>, **2015**.
- [35] A. Guinier (Chairman), G. B. Bokij, K. Boll-Dornberger, J. M. Cowley, S. Đurovič, H. Jagodzinski, P. Krishna, P. M. de Wolff, B. B. Zvyagin, D. E. Cox, et al., *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **1984**, *40*, 399–404.
- [36] B. C. Hancock, E. Y. Shalaev, S. L. Shamblin, *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 1151–1152.
- [37] H. Schober, M. Koza, A. Tölle, F. Fujara, C. A. Angell, R. Böhmer, *Phys. B Condens. Matter* **1997**, *241-243*, 897–902.
- [38] T. Morishita, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 055503–1–055503–4.
- [39] C. J. Benmore, R. T. Hart, Q. Mei, D. L. Price, J. Yarger, C. A. Tulk, D. D. Klug, *Phys. Rev. B* **2005**, *72*, 132201–1–132201–4.
- [40] A. D. McNaught, A. Wilkinson, “salt,” DOI 10.1351/goldbook.S05447can be

- found under <http://goldbook.iupac.org/S05447.html>, **2014**.
- [41] P. H. Stahl, C. G. Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection, and Use*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [42] J. D. Dunitz, J. Bernstein, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 193–200.
- [43] G. R. Desiraju, *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 1089–1090.
- [44] J. Bernstein, *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1661–1662.
- [45] U. J. Griesser, A. Burger, *Int. J. Pharm.* **1995**, *120*, 83–93.
- [46] G. A. Stephenson, E. G. Groleau, R. L. Kleemann, W. Xu, D. R. Riggsbee, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 536–542.
- [47] R. L. Te, U. J. Griesser, K. R. Morris, S. R. Byrn, J. G. Stowell, *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*, 997–1004.
- [48] A. D. Bond, *CrystEngComm* **2007**, *9*, 833–834.
- [49] G. P. Stahly, *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 1007–1026.
- [50] G. P. Stahly, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 4212–4229.
- [51] J. H. ter Horst, M. A. Deij, P. W. Cains, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 1531–1537.
- [52] S. Aitipamula, R. Banerjee, A. K. Bansal, K. Biradha, M. L. Cheney, A. R. Choudhury, G. R. Desiraju, A. G. Dikundwar, R. Dubey, N. Duggirala, et al., *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 2147–2152.
- [53] P. Vishweshwar, J. a McMahon, M. L. Peterson, M. B. Hickey, T. R. Shattock, M. J. Zaworotko, *Chem. Commun.* **2005**, *10*, 4601.
- [54] A. J. Cruz-Cabeza, J. Bernstein, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2170–2191.
- [55] D. E. Braun, T. Gelbrich, V. Kahlenberg, G. Laus, J. Wieser, U. J. Griesser, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1677–1685.
- [56] N. C. Kasuga, Y. Saito, H. Sato, K. Yamaguchi, *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* **2015**, *71*, 483–486.
- [57] I. Weissbuch, V. Y. Torbeev, L. Leiserowitz, M. Lahav, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 3226–3229.
- [58] M. Mirmehrabi, S. Rohani, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1560–1576.
- [59] L. Kampschulte, M. Lackinger, A.-K. Maier, R. S. K. Kishore, S. Griessl, M. Schmittl, W. M. Heckl, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 10829–10836.
- [60] E. H. Lee, S. R. Byrn, M. T. Carvajal, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 2375–2380.
- [61] A. Mattei, T. Li, *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 460–470.
- [62] J. Wouters, L. Quere, *Pharmaceutical Salts and Co-Crystals*, Royal Society Of Chemistry, **2011**.

- [63] P. G. Vekilov, *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 5007–5019.
- [64] P. G. Vekilov, *Nanoscale* **2010**, *2*, 2346–2357.
- [65] K. Roth, *Chemie unserer Zeit* **2006**, *40*, 398–406.
- [66] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1897**, *22*, 289–330.
- [67] T. Threlfall, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 1017–1027.
- [68] R. J. Davey, J. Garside, *From Molecules to Crystallizers - An Introduction to Crystallization*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- [69] R. Beck, J.-P. Andreassen, *AIChE J.* **2012**, *58*, 107–121.
- [70] C. Chen, Z. Huang, W. Yuan, J. Li, X. Cheng, R. Chi, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 1632–1637.
- [71] S. H. Ju, Y. C. Kang, *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *126*, 133–137.
- [72] A. Burger, R. Ramberger, *Mikrochim. Acta* **1979**, *72*, 259–271.
- [73] A. Burger, R. Ramberger, *Mikrochim. Acta* **1979**, *72*, 273–316.
- [74] E. H. Lee, *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 163–175.
- [75] S. Morissette, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 275–300.
- [76] A. J. Florence, A. Johnston, S. L. Price, H. Nowell, A. R. Kennedy, N. Shankland, *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1918–1930.
- [77] Y. Sun, H. Xi, S. Chen, M. D. Ediger, L. Yu, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5594–5601.
- [78] L. Zhu, L. Wong, L. Yu, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 921–926.
- [79] R. Bettini, L. Bonassi, V. Castoro, A. Rossi, L. Zema, A. Gazzaniga, F. Giordano, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 281–286.
- [80] I. Pasquali, R. Bettini, F. Giordano, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 399–410.
- [81] W. Beckmann, K. Nickisch, U. Budde, *Org. Process Res. Dev.* **1998**, *2*, 298–304.
- [82] W. Beckmann, *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 372–383.
- [83] T. Friščić, W. Jones, *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 1621–1637.
- [84] J. J. Krc, *Microscope* **1977**, *25*, 31–45.
- [85] D. Braga, F. Grepioni, L. Maini, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6232–6242.
- [86] S.-Y. Lin, *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1619–1631.
- [87] C.-H. Gu, V. Young, D. J. W. Grant, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1878–1890.
- [88] H. Qu, M. Louhi-Kultanen, J. Kallas, *Int. J. Pharm.* **2006**, *321*, 101–107.
- [89] D. Albers, M. Galgoci, D. King, D. Miller, R. Newman, L. Peerey, E. Tai, R. Wolf, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 846–860.

-
- [90] E. H. Lee, S. R. Byrn, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4013–4022.
- [91] M. Otsuka, T. Ofusa, Y. Matsuda, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **1999**, *13*, 263–273.
- [92] K. Terada, H. Kurobe, M. Ito, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Fujii, H. Uekusa, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2013**, *113*, 1261–1267.
- [93] J. Lee, S. X. M. Boerrigter, Y. W. Jung, Y. Byun, S. H. Yuk, S. R. Byrn, E. H. Lee, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50*, 253–262.
- [94] A. M. Campeta, B. P. Chekal, Y. A. Abramov, P. A. Meenan, M. J. Henson, B. Shi, R. A. Singer, K. R. Horspool, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3874–3886.
- [95] J.-M. Ha, J. H. Wolf, M. A. Hillmyer, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3382–3383.
- [96] M. Beiner, Rengarajan, S. Pankaj, D. Enke, M. Steinhart, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1381–1385.
- [97] P. W. Carter, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11521–11535.
- [98] C. A. Mitchell, L. Yu, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10830–10839.
- [99] C. C. Seaton, A. Parkin, C. C. Wilson, N. Blagden, *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 363–368.
- [100] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1992**, *31*, 153–169.
- [101] I. Weissbuch, R. Popovitz-Biro, M. Lahav, L. Leiserowitz, Rehovot, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **1995**, *51*, 115–148.
- [102] R. J. Davey, N. Blagden, G. D. Potts, R. Docherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1767–1772.
- [103] I. Weissbuch, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*, 125–150.
- [104] B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young, A. S. Myerson, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3475–3476.
- [105] J. Zaccaro, J. Matic, A. S. Myerson, B. A. Garetz, *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 5–8.
- [106] T. Friščić, L. R. MacGillivray, *Chem. Commun.* **2009**, 773–775.
- [107] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, Vieweg+Teubner Verlag, **2011**.
- [108] R. A. Young, R. A. Young, *The Rietveld Method*, Oxford University Press, **1995**.
- [109] L. Spieß, *Moderne Röntgenbeugung: Röntgendiffraktometrie Für Materialwissenschaftler, Physiker Und Chemiker*, Teubner, **2005**.
- [110] P. Scardi, R. E. Dinnebier, *Extending the Reach of Powder Diffraction Modelling by User Defined Macros: Special Topic Volume with Invited Peer Reviewed Papers Only*, Trans Tech, **2010**.
- [111] R. Allmann, A. Kern, *Röntgen-Pulverdiffraktometrie: Rechnergestützte*

- Auswertung, Phasenanalyse Und Strukturbestimmung*, Springer-Verlag, **2013**.
- [112] H. Krischner, B. Koppelhuber-Bitschnau, *Röntgenstrukturanalyse Und Rietveldmethode: Eine Einführung*, Springer-Verlag, **2013**.
- [113] E. Lück, *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale, B, Hygiene*. **1985**, *180*, 311–318.
- [114] H. O. Albrecht, Über Die Chemilumineszenz von Aminophthalsäurehydrazid, Leipzig, **1928**.
- [115] UNEP Publications, *SIDS Initial Assessment Report on Benzoates*, **2012**.
- [116] R. Van Deun, J. Ramaekers, P. Nockemann, K. Van Hecke, L. Van Meervelt, K. Binnemans, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 563–571.
- [117] C. Butterhof, T. Martin, W. Milius, J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2013**, *639*, 2816–2821.
- [118] C. Butterhof, *Crystal Engineering Molekularer Festkörper*, Universität Bayreuth, **2013**.
- [119] C. Butterhof, W. Milius, J. Breu, *CrystEngComm* **2012**, *14*, 3945–3950.
- [120] C. Butterhof, K. Bärwinkel, J. Senker, J. Breu, *CrystEngComm* **2012**, *14*, 6744–6749.
- [121] C. Butterhof, W. Milius, J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2013**, *639*, 308–311.
- [122] A. J. Schmitz, Ueber Das Hydrazid Der Trimesinsäure Und Der Hemimellithsäure (On the Hydrazide of Trimesic Acid [1,3,5-Benzenetricarboxylic Acid] and of Hemimellitic Acid [1,2,3-Benzenetricarboxylic Acid]), Universität Heidelberg, **1902**.
- [123] E. Huntress, L. Stanley, A. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 241–242.
- [124] E. H. Huntress, L. N. Stanley, A. S. Parker, *J. Chem. Educ.* **1934**, *11*, 142–145.
- [125] L. L. Klopff, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1080–1083.
- [126] F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, G. Lago, *Talanta* **2007**, *72*, 896–913.
- [127] H. H. Paradies, *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1992**, *96*, 1027–1031.
- [128] V. L. Scofield, M. Yan, X. Kuang, S.-J. Kim, D. Crunk, P. K. Y. Wong, *Immunol. Lett.* **2009**, *122*, 159–169.
- [129] V. L. Scofield, M. Yan, X. Kuang, S.-J. Kim, P. K. Y. Wong, *Immunol. Lett.* **2009**, *122*, 150–158.
- [130] P. V. B. Reddy, G. Lungu, X. Kuang, G. Stoica, P. K. Y. Wong, *Neurochem. Int.* **2010**, *56*, 780–788.
- [131] Schweizerische Studiengruppe für Komplementäre und Alternative Methoden bei

- Krebs (SKAK), *Galavit – Ein «Wundermittel», Das Der Überprüfung Nicht Standhält*, Bern, **2011**.
- [132] Schweizerische Studiengruppe für Komplementäre und Alternative Methoden bei Krebs (SKAK), *Galavit*, Bern, **2011**.
- [133] K. Zinkant, “Medikamentenbetrug - Böses Spiel mit Todgeweihten,” **2008**.
- [134] V. B. Rybakov, V. V. Chernyshev, K. A. Paseshnichenko, V. D. Sheludyakov, N. G. Belyakov, R. S. Boziev, V. N. Mochalov, P. A. Storozhenko, *Crystallogr. Reports* **2014**, *59*, 383–393.
- [135] I. A. Guzei, M.-H. Kim, R. West, *J. Coord. Chem.* **2013**, *66*, 3722–3739.
- [136] K. R. Seddon, M. Zaworotko, *Crystal Engineering: The Design and Application of Functional Solids, Volume 539*, Springer Science & Business Media, **1999**.
- [137] P. K. Thallapally, R. K. R. Jetti, A. K. Katz, H. L. Carrell, K. Singh, K. Lahiri, S. Kotha, R. Boese, G. R. Desiraju, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 1149–1155.
- [138] G. M. Day, A. V Trask, W. D. S. Motherwell, W. Jones, *Chem. Commun.* **2006**, 54–56.
- [139] P. G. Jones, H. Hopf, A. Silaghi, C. Näther, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **2011**, *67*, o405–o408.
- [140] J. Breu, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *Crystalline Forms for 5-Amino-2,3-Dihydrophthalazine-1,4-Dione Sodium Salt, Pharmaceutical Preparations Containing the Same and Method for the Production of Said Forms*, **2011**, WO 2011107295 A1.
- [141] J. Breu, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *Crystalline Forms for 5-Amino-2,3-Dihydrophthalazine-1,4-Dione Sodium Salt, Pharmaceutical Preparations Containing the Same and Method for the Production of Said Forms*, **2014**, EP 2542535 B1.
- [142] J. Breu, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *Crystalline Forms for 5-Amino-2,3-Dihydrophthalazine-1,4-Dione Sodium Salt, Pharmaceutical Preparations Containing the Same and Method for the Production of Said Forms*, **2014**, US 8772294 B2.

Danksagung

Meinem Betreuer Prof. Dr. Josef Breu gilt besonderer Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung, sowie in meiner Funktion als IT-Verantwortlicher des Lehrstuhls. Die sehr gute Ausstattung des Lehrstuhls ermöglichte produktives Arbeiten und die sehr gute Betreuung äußerte sich in meist entspannten und stets zielführenden Diskussionen.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der MetrioPharm Deutschland GmbH, vorrangig bei Dr. Wolfgang Brysch, Dr. Michael Niedermaier, Dr. Beate Ludescher und Dr. Jörg von Wegerer für die Betrauung mit den interessanten Themen und das entgegengebrachte Vertrauen bei dieser Kooperation bedanken.

Dr. Wolfgang Milius gilt mein Dank für seine stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Auch abseits zahlreicher fachlicher Fragen hatte er stets ein offenes Ohr für verschiedenste Belange.

Ich danke auch meinen Laborkollegen Lena Geiling und Dr. Christian Butterhof für die stets gute Atmosphäre und lockere Stimmung im BZKG Labor. Zusätzlich gilt Dr. Christian Butterhof mein besonderer Dank für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft in fachlichen Belangen sowie vor allem für zahlreiche unvergessliche Momente auch außerhalb der Universität.

Für die allgemeine Unterstützung und großartige Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen Belangen und darüber hinaus möchte ich mich bei den Lehrstühlen ACI und ACIII und insbesondere bei Lena Geiling, Josef Hausner, Dr. Wolfgang Milius, Paul Niemietz, Dominik Greim, Christoph Klumpen, Carina Bojer, Matthias Stöter, Florian Puchter, Dr. Markus Heidebrecht (geb. Herling) und Bernd Putz bedanken.

Den technischen Angestellten Lena Geiling, Dieter Will, Beate Bojer, Marco Schwarzmann und Bernd Putz gilt mein Dank für zahlreiche durchgeführte Messungen. Den Sekretärinnen Petra Seidler und Iris Raithel danke ich für stets freundliche und zügige Hilfe bei allen organisatorischen Belangen.

Danksagung

Eine große Unterstützung in den einzelnen Projekten waren auch die stets diskussionsfreudigen und engagierten Kooperationspartner: Universität Bayreuth, Anorganische Chemie III (Prof. Dr. Jürgen Senker, Paul Niemietz und Dominik Greim) für NMR Messungen, Simulationen und vieles mehr. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Zentrum für hochauflösende Elektronenmikroskopie (Dr. Ute Kolb und Dr. Tatiana Gorelik) für die durchgeführte ADT Elektronenbeugung. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Prof. Dr. Dirk Zahn und Philipp Ectors) für die Computersimulationen und deren Diskussion.

Eine gute Unterstützung waren auch alle Mitarbeiterpraktikanten und Bachelorstudenten (Juliane Fleissner, Annalena Beck, Michael Mader, Juliane Gaß, Lina Mayr, Christoph Klumpen, Katrin Spinnler, Thomas Weiß, Anne Borschlegel und Simon Schramm).

Meiner Familie gilt mein größter Dank. Meinen Eltern danke ich für die anhaltende und immerwährende Unterstützung während der gesamten Ausbildung und bis zum heutigen Tage.

Anhang

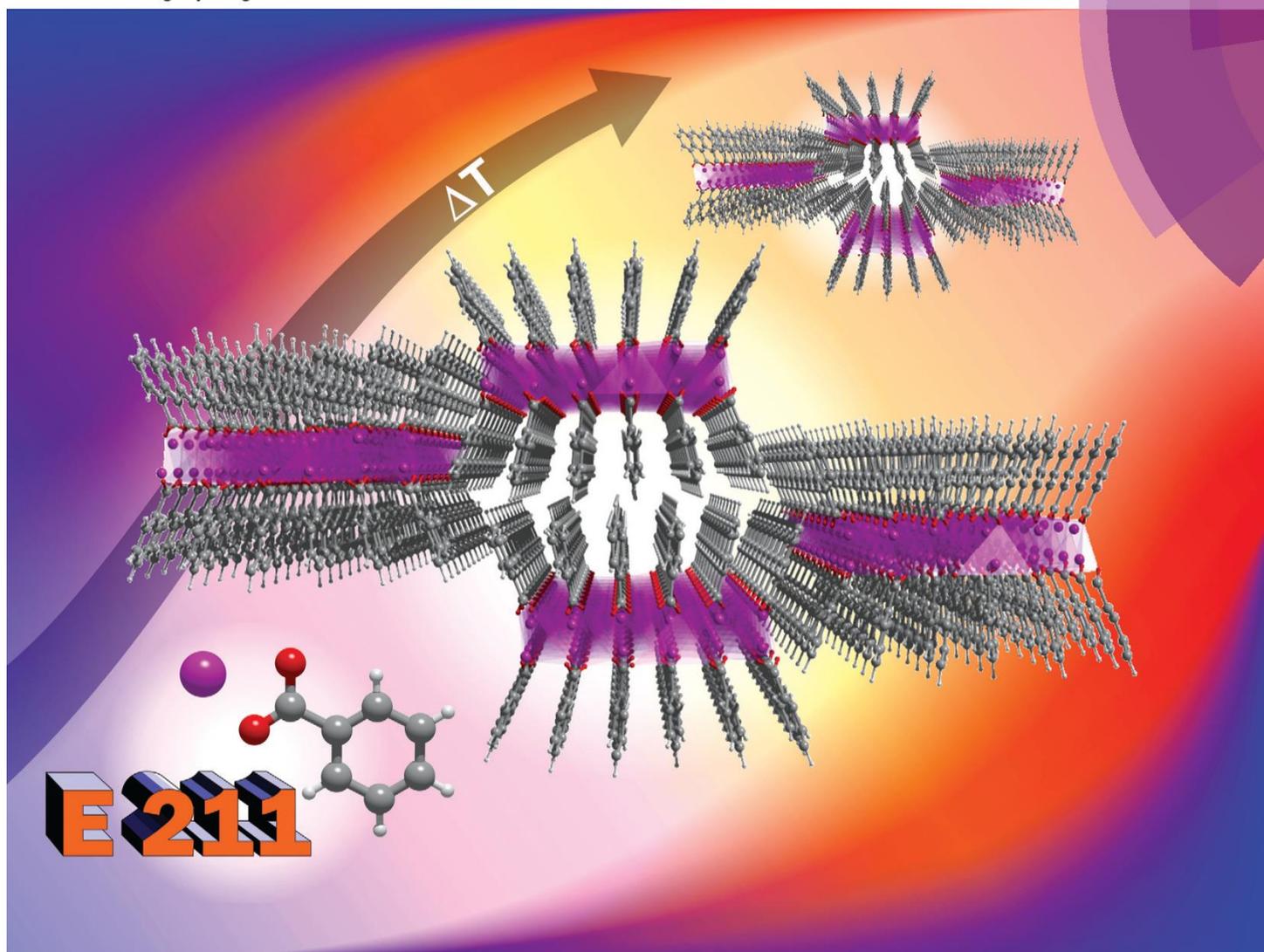
Anhang A.1

Microphase Separation upon Crystallization of Small Amphiphilic Molecules: 'Low' Temperature Form II of Sodium Benzoate (E 211)

Reproduced from T. Martin, T. Gorelik, D. Greim, C. Butterhof, U. Kolb, J. Senker, und J. Breu, *CrystEngComm*, **2016**, *18*, 5811-5817 with permission from The Royal Society of Chemistry.

CrystEngComm

www.rsc.org/crystengcomm



PAPER

T. E. Gorelik, J. Senker, J. Breu *et al.*

Microphase separation upon crystallization of small amphiphilic molecules: 'low' temperature form II of sodium benzoate (E 211)

175 YEARS



Cite this: *CrystEngComm*, 2016, 18, 5811

Microphase separation upon crystallization of small amphiphilic molecules: ‘low’ temperature form II of sodium benzoate (E 211)[†]

T. W. Martin,^a T. E. Gorelik,^{*b} D. Greim,^c C. Butterhof,^a U. Kolb,^b J. Senker^{*c} and J. Breu^{*a}

A so far unknown low temperature polymorph (form II crystallized at 350 °C) of the common food preservative sodium benzoate (NaBz; E 211) could be crystallized by annealing (7 days) of the poorly crystalline technical material. Its crystal structure was solved by indexing a tiny single crystal by electron diffraction followed by structure solution and refinement applying powder X-ray diffraction (PXRD). The new polymorph shows many structural similarities to form I (crystallized at 420 °C). Both form I and II are the result of a microphase separation: the structures consist of pseudo-hexagonal packings of rod-shaped micelles where the core consists of sodium cations being coordinated by the carboxylic groups, while the phenyl moieties of benzoate point outwards rendering the micelle surface hydrophobic. The structures differ by the degree of elliptical distortion of the rods which is more pronounced for the new form II due to incorporation of an additional Na-benzoate moiety into the circumference of the rods.

Received 3rd June 2016,
Accepted 21st June 2016

DOI: 10.1039/c6ce01281g

www.rsc.org/crystengcomm

Introduction

Besides pharmaceutical applications^{1–3} NaBz is widely used as preservative E 211 in the food industry.⁴ With an estimated worldwide production capacity of 100 kt per year,⁵ sodium benzoate is a technically wide-spread compound. Only recently structural information of NaBz became available because structure solution was impeded by massive disorder present in solution-grown materials.⁶ While the free acid of NaBz, benzoic acid, crystallizes well and its crystal structure could be determined as early as 1955,⁷ the PXRD pattern of commercial NaBz is characterized by broad peaks with line shapes typical for low-dimensional motifs being packed with frequently encountered defects (Fig. 1). The poor crystallinity most likely is related to a coordination dilemma.⁸ A molecular anion coordinating a much smaller inorganic cation (Na) will

necessarily have trouble to satisfy the coordination needs of the cation. Arranging enough ligands in 1 : 1 stoichiometry requires highly condensed coordination polyhedra. Sharing edges or even faces is, however, not easy given the steric demands of the molecular anion.⁹ Another interesting and unusual phenomenon for a small molecule is the formation of a liquid crystal phase of NaBz upon heating above 430 °C.¹⁰

Fortunately, NaBz is thermally remarkably stable. Previously, it was shown that long term annealing at 420 °C allows for sufficient mobility to overcome the coordination dilemma by a kind of microphase separation. Annealing over 5 months

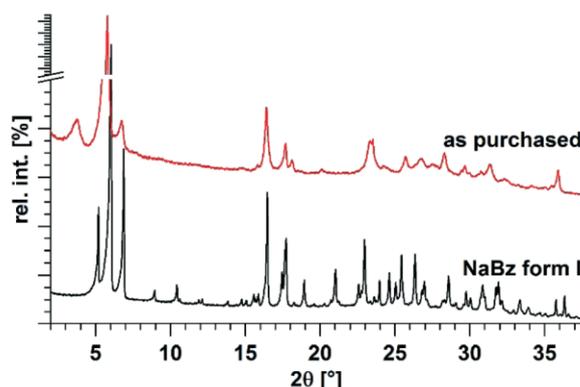


Fig. 1 PXRD patterns of NaBz. The upper pattern corresponds to the compound as purchased, the lower to the recrystallized material (form I).

^a Department of Inorganic Chemistry I, University of Bayreuth, Universitaetsstrasse 30, Bayreuth, 95440, Germany. E-mail: josef.breu@uni-bayreuth.de

^b Institute of Physical Chemistry, University of Mainz, Jakob Welder Weg 11, Mainz, 55128, Germany. E-mail: gorelik@uni-mainz.de

^c Department of Inorganic Chemistry III, University of Bayreuth, Universitaetsstrasse 30, Bayreuth, 95440, Germany. E-mail: juergen.senker@uni-bayreuth.de

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: STEM image of NaBz Form II needle. Comparison of measured and simulated electron diffraction patterns. Na–O distances for crystal structure of NaBz form II. Rigid body in TOPAS macro language for crystal structure solution. CCDC NaBz form II at 173 K – 1483378. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6ce01281g

even made single crystals of form I available that allowed for solution of a rather complex structure.⁸ As benzoate represents an amphiphilic molecule with a polar carboxylic head group and a non-polar phenyl moiety, a pseudo-hexagonal close packing of elliptical rods is realized with the phenyl moieties pointing outwards and the sodium cations being coordinated by the carboxylic groups in the core (Fig. 2). Consequently, an exceptionally high number of symmetry independent molecules ($Z' = 5$) is needed in the asymmetric unit.³

Upon annealing solution-grown, disordered, technical NaBz more and sharper reflections appear (Fig. 1). At the same time for some 2θ ranges the patterns show similar features suggesting that similar substructures may already be present in the poorly crystalline compound. Surprisingly, when examining the recrystallization process of NaBz by PXRD in an XRK chamber we observed an intermediate pattern that turned out to be a distinct polymorphic form (subsequently called form II). Combining electron diffraction to determine the unit cell dimensions and Laue symmetry^{11,12} and powder X-ray diffraction for solution and refinement yielded the crystal structure of this new polymorph of NaBz.

Experimental

Materials

NaBz (purity $\geq 99.0\%$) was purchased from Fluka and used without further purification.

Crystallization

A microcrystalline powder of NaBz form II was obtained by annealing. NaBz (*ca.* 0.5 g) was heated in a furnace with an accurate temperature control (accuracy 0.5 °C) [Carbolite LHT 6/30 with two temperature control units (unit 1: Eurotherm E3216P1 (PID (Proportional Integral Derivative) regulator); unit 2: Eurotherm E2132] for 1 week at 350 °C.

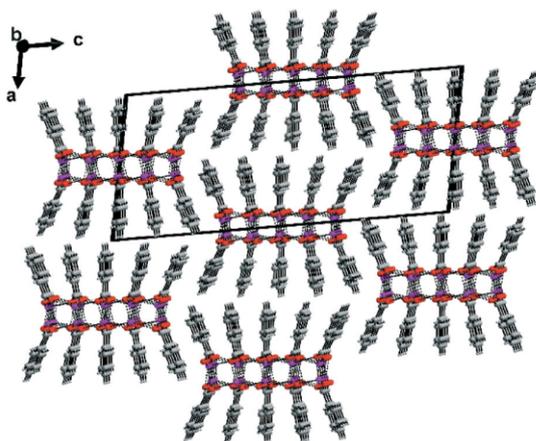


Fig. 2 Molecular packing of NaBz form I.⁸ Approximately hexagonal packing of lamellas running along the *b* axis.

Electron diffraction experiments

Measurements were performed with a TECNAI F30 TEM equipped with field emission gun operated at 300 kV. 3D electron diffraction data were collected using an automated electron diffraction tomography (ADT) module described elsewhere.¹¹ The data was collected at ambient temperature using an electron beam diameter of 100 nm, electron dose rate of 0.1 e \AA^{-2} s, and the exposure time of 4 seconds per frame. The electron beam was stepwise shifted during the acquisition, so that electron patterns were always collected from fresh unexposed areas. Three tilt series were collected within the tilt ranges of 50°, 40°, and 50°, respectively. The data was processed and reconstructed using the ADT3D software (Nanomegas, Belgium).

PXRD

PXRD patterns of NaBz form II were obtained at -100 °C using a STOE STADI P (Cu-K α_1 radiation, transmission geometry) diffractometer equipped with a curved Ge (111) primary monochromator, a fast, high resolution silicon strip detector (DECTRIS Mythen1K) and an Oxford Cryostream 700 Series temperature control unit.

Thermally induced recrystallization was followed with a PANalytical X'Pert Pro (Cu-K α_1 radiation, reflection geometry) diffractometer equipped with a real-time multi strip X'Celerator detector and an XRK 900 Reactor Chamber. PXRD patterns at every temperature step were recorded after allowing the sample to equilibrate for 1 h.

TG-DSC

Measurements were performed using technical NaBz with a Netzsch STA 499 C and synthetic air as purging gas. The heating rate was 10 °C min^{-1} in a range from RT to 700 °C.

Crystal structure determination

TOPAS Academic¹³ was used for structure solution, applying the unit cell data and Laue group as determined by electron diffraction, and for Rietveld refinement. The Pawley fit included 1102 reflections in the range of 1.5–59.97° 2θ .

Structure solution was accomplished by a simulated annealing method in TOPAS Academic¹³ applying a substructure of form I as supramolecular rigid body that contained six sodium atoms and six benzoate rigid bodies in a configuration as found in NaBz form I.⁸ The geometry of benzoate molecules of this supramolecular rigid body were, however, optimized by DFT (DMol3, generalised-gradient approximation with the Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) functional¹⁴ as implemented in the Materials Studio software¹⁵). Three positional and three angular parameters of the rigid body were globally optimized in the simulated annealing run. For successful structure solution, intermolecular distances as well as torsions in the benzoate molecules were restrained allowing for moderate relaxation of the supramolecular rigid body (for further details, please see ESI†).

For Rietveld refinement the fundamental parameters approach¹⁶ was applied. Positional and angular parameters were refined for each sodium atom and each benzoate rigid body, respectively. To avoid unrealistic interatomic distances (Na–Na, Na–carboxylic group, phenyl–phenyl) the *AI_Anti_Bump* macro as implemented in TOPAS Academic¹³ was applied. One common isotropic displacement factor was applied for all sodium atoms. Similarly, a common displacement factor was applied for all heavy atoms (C, O) of each symmetry independent benzoate moiety. Displacement factors for hydrogens were fixed to $U_{\text{iso}} = 3.8 \text{ \AA}^2$. The *PO_Spherical_Harmonics* macro¹⁷ of 4th order as implemented in TOPAS Academic¹³ was used to account for slight preferred orientation. The *LeBailJouanneaux* macro as implemented in TOPAS Academic¹³ was used to account for anisotropic line broadening.

Diamond¹⁸ was used for the graphical representation of the results. PLATON¹⁹ was used to calculate geometrical information.

Lattice energy calculations

The DFT-D calculations were carried out using the CASTEP code.²⁰ The GGA with the PBE functional was used.¹⁴ A plane-wave basis set with an energy cutoff of 800 eV was applied and the core electrons were represented by ultra-soft pseudopotentials. K-points were distributed using a Monkhorst–Pack-grid²¹ with a spacing of 0.03 \AA^{-1} . The semi-empirical dispersion correction was introduced using the scheme of Grimme.²² For the geometry optimization the convergence tolerances of energy, maximum force, and maximum displacement were 2.0×10^{-5} eV per atom, 5.0×10^{-2} eV \AA^{-1} and 1.0×10^{-3} \AA^{-1} , respectively. The allowed stress tolerance was 0.1 GPa.

Results and discussion

Thermal induced recrystallization

While all attempts to crystallize NaBz from various solvents yielded only poorly crystalline material comparable to the technical grades, annealing provides enough mobility to the benzoate moieties to remedy disorder and promote crystallization²³ by rearranging into a 3-dimensionally ordered structure.

Investigation of the crystallization process with *in situ* PXRD in an XRK chamber revealed a more complex crystallization process pointing towards NaBz being a polymorphic system (Fig. 3).

Up to 300 °C, PXRD patterns of technical, solution-grown NaBz showed only few and broad reflections (Fig. 3, black diffraction traces). At 320 °C the number and shape of reflections improves significantly suggesting that a disorder–order transition yielded a crystalline phase, which is distinct of the unknown new form II, which is the stable phase at 340–360 °C (Fig. 3, blue diffraction traces). The previously published pure form I (Fig. 3, green diffraction trace) is observed at

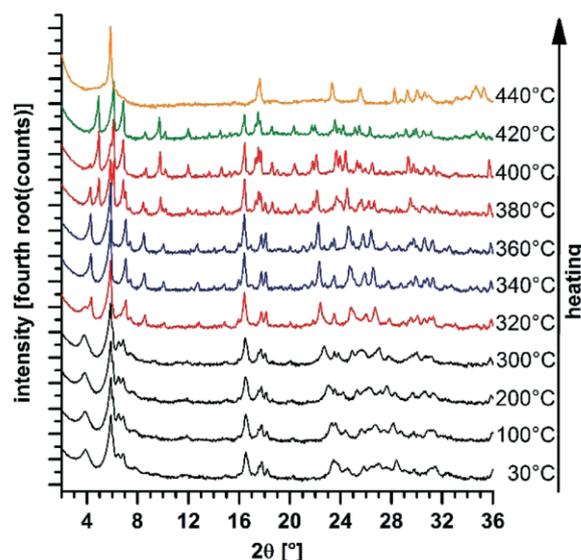


Fig. 3 PXRD traces of the XRK experiment. Black traces: technical, poorly crystalline material. Blue traces: new NaBz form II. Green trace: known NaBz form I.³ Yellow trace: smectic A mesophase.¹³ Red diffraction traces indicate mixed phases due to incomplete transitions.

420 °C and is molten into the already known smectic A mesophase¹⁰ above 440 °C (Fig. 3, yellow diffraction trace). Red diffraction traces indicate mixed phases due to incomplete transitions.

Both, the disorder–order transition of the technical product to form II and the transformation of form II into form I yield endothermic signals in TG-DSC at 380 °C and 439 °C. The weak signal at 380 °C was apparently overlooked in previous investigations.¹⁰ The exothermic signal at 459 °C is related to the partial melting into the mesophase and is followed by thermal degradation as indicated by a rapid mass loss (Fig. 4).

Crystal structure solution of sodium benzoate form II

Polycrystalline samples of NaBz form II can be quenched. Powders of sufficient quality for structure determination could be obtained by annealing at 350 °C for one week. Even excessive extension of annealing times did, however, not produce crystals large enough for single crystal structure solution. Moreover, due to massive peak overlap, attempts to index PXRD patterns failed. Unit cell parameters were finally obtained by electron diffraction measurements using ADT.^{11,12}

Electron diffraction. Form II crystallized in needles with a width of 100–1000 nm and a length of a few microns (Fig. S1†). The crystals are sufficiently thin along the electron beam direction. From three different electron diffraction tilt series, the same unit cell metric could be derived: $a = 6.26 \text{ \AA}$, $b = 19.35 \text{ \AA}$, $c = 15.02 \text{ \AA}$, $\alpha = 93.8^\circ$, $\beta = 98.8^\circ$, $\gamma = 92.5^\circ$. Unit cell parameters as determined from electron diffraction data

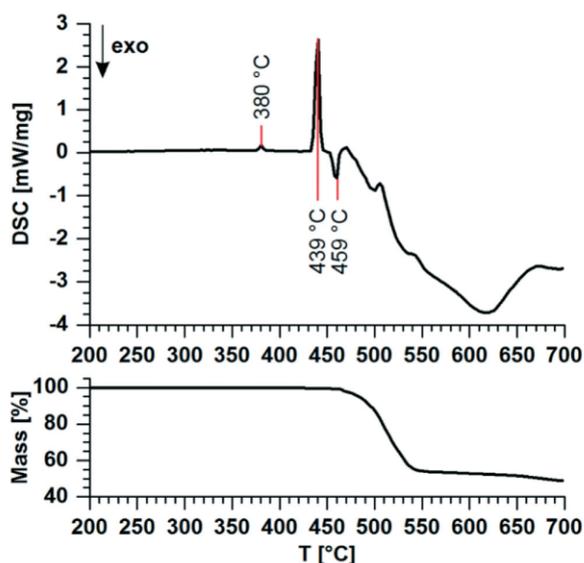


Fig. 4 TG-DSC measurement of NaBz.

suffer from relatively high errors. Nevertheless, α and γ deviated significantly from 90° clearly indicating a triclinic unit cell. Evaluation of the Laue symmetry of the data confirmed a low symmetry triclinic structure (Fig. 5).

Electron diffraction patterns showed sharp reflections indicating good long-range order. Additionally, large diffuse features were observed in the diffraction data associated with a lack of short-range order (Fig. S2†). No satisfying model for the diffuse scattering observed was elaborated so far.

PXRD. On the basis of the triclinic cell metric, indexing of the PXRD pattern of NaBz form II was feasible. A Pawley-Fit gave R values of $R_p = 0.0125$ and $R_{wp} = 0.0189$ ($R_{exp} = 0.0078$) in space group $P\bar{1}$ with cell parameters $a = 15.3066(5)$ Å, $b = 6.4364(4)$ Å, $c = 19.5134(5)$ Å, $\alpha = 87.281(4)^\circ$, $\beta = 95.578(3)^\circ$, $\gamma = 98.729(6)^\circ$ and a volume of $1890.1(1)$ Å³. This non-standard setting was chosen to aid a comparison of the structure of form II to the previously published form I.⁸

The symmetry and the cell volume suggest six symmetry independent NaBz moieties in the unit cell ($Z' = 6$). Needless

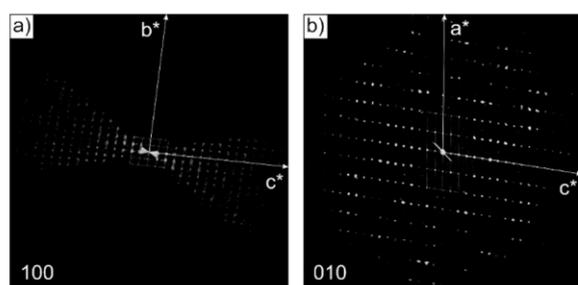


Fig. 5 Projections of the reconstructed reciprocal volume along the main crystallographic directions (1 0 0) (a) and (0 1 0) (b).

to say, solving such a complex low-symmetry structure *ab initio* with PXRD data is very challenging. Not surprisingly, attempts to solve the structure by simulating annealing applying six independent NaBz moieties failed. An admittedly fresh and purely intuitive hypothesis finally paved the way to a successful structure solution: the metric along a and b of form II were similar, while the c axis was roughly halved as compared to form I. The value of $c/2$ of form I was, however, 2.3 Å shorter than c of form II.⁸ The rod-shaped micelles in form I run along b . The small principle axis of the elliptical rods corresponds to the a axis. In summary, rod-shaped micelles were assumed similar to the ones found in form I. The longer principal axis, however, would have to be extended, for instance by incorporating additional NaBz moieties. In form I ten NaBz make up the circumference of the rods (Fig. 1). Consequently, we applied six NaBz moieties in a configuration as found in form I as supramolecular rigid body in the simulating annealing (please see ESI†) which yielded a solution with promising figures of merit. The subsequent Rietveld refinement (Fig. 6), however, no longer applied the supramolecular rigid bodies but rather Na^+ and Bz^- as rigid moieties. For Bz^- the torsion of the carboxylate group was allowed to vary. Table 1 shows the crystallographic data for NaBz form II in comparison to NaBz form I.⁸ Fig. 7 shows the asymmetric unit of the crystal structure of NaBz form II as ORTEP plot. The molecular packing is shown in Fig. 8.

Similar to NaBz form I the structure of form II is represented by a pseudo-hexagonal packing of elliptical rods running along the b axis (Fig. 8a) resembling the hexagonal microphase of surfactants or block-copolymers. The surface of the rods is hydrophobic due to phenyl moieties of the benzoate ligands pointing away from the core. (Fig. 8a and b). Hence, van-der-Waals forces and π - π -interactions are the main forces governing the stacking of the rods along the a axis [$5.80(9)$ Å between adjacent phenyl rings C(3x) and C(4x)]. The hydrophilic parts of NaBz, carboxylate groups and Na^+ ions, segregate to the core of the rods (Fig. 8b). Na^+ at the end of the longer principal axis are coordinated in a distorted quadratic prism (Na[5]) whereas the coordination spheres of the inner sodium cations are octahedral (Na[6]) (Fig. 8c). Along the longer principal axis adjacent Na-centred polyhedra are aligned in rows (Na[5], Na[6], Na[6], Na[6], Na[6], Na[5]) which are connected by shared edges and are tilted by *ca.* 33° and 9° with respect to the b and a axis, respectively. Adjacent rows at different heights are connected by shared edges as well (Fig. 8c). Please see Table S1† for Na–O distances. Neighbouring phenyl groups within the rows exhibit a shifted π - π -stacking [interaction distance between adjacent phenyl groups of C(1x) and C(2x) is $3.94(5)$ Å, C(2x) and C(3x) is $3.89(5)$ Å, C(3x) and C(4x) is $3.88(5)$ Å, C(4x) and C(5x) is $3.95(5)$ Å, C(5x) and C(6x) is $3.94(5)$ Å, respectively].

Therefore, form I and II of NaBz share similar building motifs with respect to the coordination of Na^+ as well as the structure and the orientation of the tapes. The main difference between both forms is the number of Na^+ and Bz^- in the circumvent of the rods. In form I it is 10 while in form II

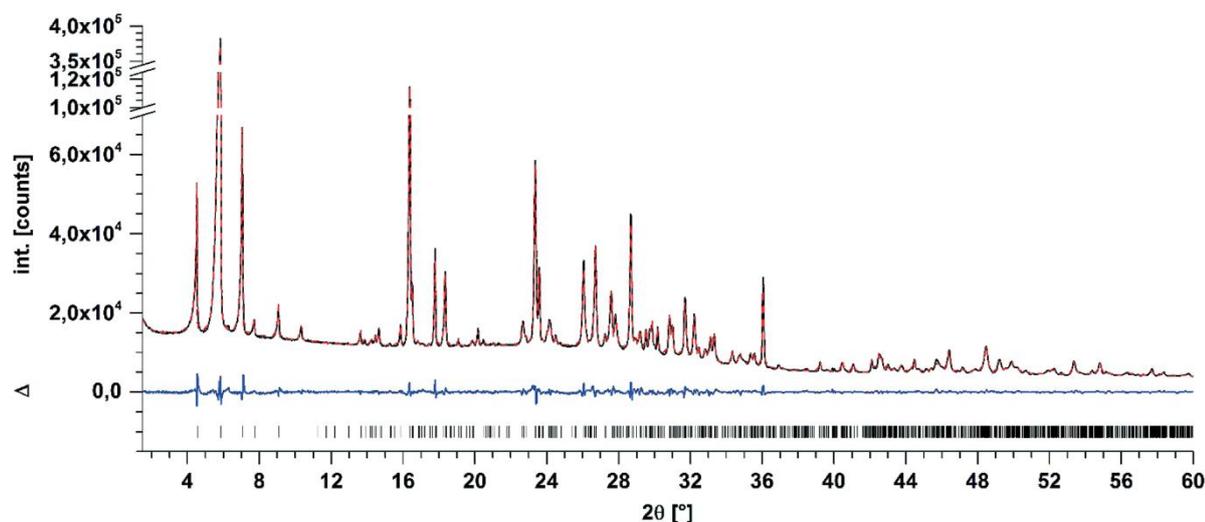


Fig. 6 Rietveld refinement of the crystal structure of NaBz form II. The refinement shows a good agreement between observed and calculated pattern. (—) marks the observed pattern, (---) marks the profile of the Rietveld-fit. The position of Bragg reflections of the unit cell are indicated by ticks (|). Δ marks the difference between observed and calculated pattern.

the number is increased to 12 extending the longer principal axis of the elliptical rods.

Thermodynamic stability

The crystal structures of NaBz as determined from single crystal data (form I) and by Rietveld refinement (form II) were relaxed by geometry optimization including the symmetry constraints of the respective space groups and the variation of unit cell parameters by applying density functional

theory with a semi-empirical dispersion correction (DFT-D) in order to compare thermodynamic stability of both forms at 0 K. The calculations clearly prove that both structures represent local minima and optimized parameters differ little from experimental ones (Table 2). As expected for experimental structures, optimization shrinks the volume, by approximately 9% and 6% for form I and form II, respectively. The relative energies suggest that at 0 K form I is metastable by

Table 1 Crystal data and details of PXRD measurements and refinement for NaBz form II; form I⁸ is reported for comparison

Form	II (LT)	I ⁸
Formula	C ₇ H ₅ O ₂ Na	C ₇ H ₅ O ₂ Na
M_r	144.10	144.10
Crystal system	Triclinic	Monoclinic
Space group	$P\bar{1}$	$P2_1/n$
a [Å]	15.3053(2)	15.113(3)
b [Å]	6.43668(9)	6.4048(13)
c [Å]	19.5164(3)	34.476(7)
α [°]	87.279(1)	90
β [°]	95.598(2)	100.18(3)
γ [°]	98.725(2)	90
Volume [Å ³]	1890.31(5)	3284.5(11)
Z/Z'	12/6	20/5
ρ [g cm ⁻³]	1.51905(4)	1.457
$F(000)$	888	1480
T [K]	173(2)	295(2)
Data range [°2 θ]	1.5–59.97	
Rfins used	1102	
Refined param.	129	
R_p	0.0181	
R_{wp}	0.0266	
R_{exp}	0.0092	
R_{Bragg}	0.0060	

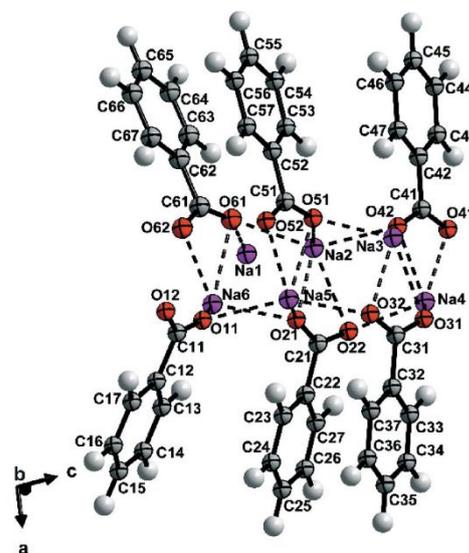


Fig. 7 ORTEP plot and crystallographic numbering scheme of the asymmetric unit of NaBz form II. Coordinate bonds are drawn as dashed lines. Displacement ellipsoids are drawn at 50% probability level.

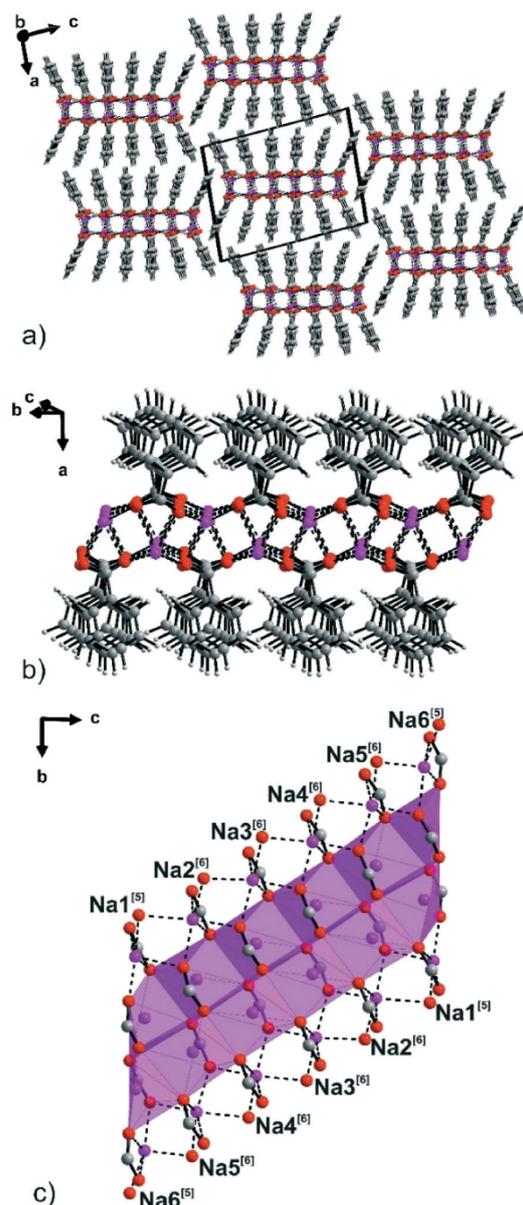


Fig. 8 Molecular packing of NaBz form II. a) Pseudo-hexagonal packing of rod-shaped micelles running along the *b* axis. b) Side view on a single rods. c) Coordination of the cations. The coordination polyhedra are interconnected by shared edges. The coordination number for the given atoms is noted in square brackets.

as little as 2.30 kJ mol^{-1} per molecule. Since entropy effects are neglected, the ranking of the two forms at more realistic, elevated temperature, can therefore not be determined reliably by the calculations. The ranking is, however, in line with the lower observed density for form I indicating its lower thermodynamic stability as compared to form II and the endothermic transformation of the form II to form I in the DSC experiment (Fig. 4) indicating that form I is the

Table 2 Results of the CASTEP²⁰ geometry optimization. The deviations (Δ) of the optimized cell parameters (0 K) as compared to the experimentally determined parameters are given in the third and fifth row

Lattice parameters	Form II DFT+D2	Δ [%]	Form I DFT+D2	Δ [%]
a [Å]	15.15	-1.320	14.87	-1.61
b [Å]	6.46	0.43	6.44	0.62
c [Å]	18.73	-5.42	31.87	-8.19
α [°]	86.96	-0.60	90	—
β [°]	96.50	1.35	100.61	0.43
γ [°]	98.88	0.18	90	—
Volume [Å ³]	1778.80	-6.54	2999.67	-9.5
ΔE [kJ mol ⁻¹]	0		+2.30	

high temperature and form II the low temperature form of NaBz.

Conclusions

NaBz, a commercially relevant food preservative (E211) turned out to be a polymorph system. Phase pure crystalline forms of NaBz can be addressed by a temperature controlled recrystallization process. Both forms of NaBz consist of very similar structural motifs that resemble hexagonal microphases of surfactants or block-copolymers. In both forms a pseudo-hexagonal packing of elliptical rods is realized. The extension of the rods along the longer principal axis turns out to be the main difference between both structures. In form II 12 NaBz moieties are incorporated in the circumvent while in form I it is only 10. The new NaBz form II crystallizes at a lower temperature (350 °C) as compared to the already known form I (420 °C). Thermal analysis suggests that the two forms can be enantiotropically converted into each other.

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1415) for financial support.

References

- J. Häberle, N. Boddart, A. Burlina, A. Chakrapani, M. Dixon, M. Huemer, D. Karall, D. Martinelli, P. Crespo, R. Santer, A. Servais, V. Valayannopoulos, M. Lindner, V. Rubio and C. Dionisi-Vici, *Orphanet J. Rare Dis.*, 2012, 7, 32.
- B. Wilcken, *Mol. Genet. Metab.*, 2004, 81, 86–91.
- H.-Y. Lane, C.-H. Lin, M. F. Green, G. Hellemann, C.-C. Huang, P.-W. Chen, R. Tun, Y.-C. Chang and G. E. Tsai, *JAMA Psychiatry*, 2013, 70, 1267.
- E. Lück, in *Chemische Lebensmittelkonservierung*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1986, pp. 166–173.
- Organization for Economic Cooperation and Development Screening Information Dataset, Benzoates, 2001.
- C. Butterhof, W. Milius and J. Brey, *CrystEngComm*, 2012, 14, 3945–3950.
- G. A. Sim, J. M. Robertson and T. H. Goodwin, *Acta Crystallogr.*, 1955, 8, 157–164.

- 8 C. Butterhof, T. Martin, W. Milius and J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2013, **639**, 2816–2821.
- 9 A. L. Rohl and D. M. P. Mingos, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1992, 3541–3552.
- 10 R. Van Deun, J. Ramaekers, P. Nockemann, K. Van Hecke, L. Van Meervelt and K. Binnemans, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2005, 563–571.
- 11 U. Kolb, T. Gorelik, C. Kübel, M. T. Otten and D. Hubert, *Ultramicroscopy*, 2007, **107**, 507–513.
- 12 U. Kolb, T. Gorelik and M. T. Otten, *Ultramicroscopy*, 2008, **108**, 763–772.
- 13 *TOPAS Academic v5*, Coelho Software, Brisbane, Australia, 2012.
- 14 J. P. Perdew, K. Burke and M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, **77**, 3865–3868.
- 15 *Materials Studio v5*, Accelrys Software Inc., San Diego (CA), USA, 2009.
- 16 R. W. Cheary and A. Coelho, *J. Appl. Crystallogr.*, 1992, **25**, 109–121.
- 17 M. Ahtee, M. Nurmela, P. Suortti and M. Järvinen, *J. Appl. Crystallogr.*, 1989, **22**, 261–268.
- 18 H. Putz and K. Brandenburg, *Diamond v4.1*, Crystal Impact GbR, Bonn, Germany, 2016.
- 19 A. L. Spek, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2009, **65**, 148–155.
- 20 S. J. Clark, M. D. Segall, C. J. Pickard, P. J. Hasnip, M. I. J. Probert, K. Refson and M. C. Payne, *Z. Kristallogr.*, 2005, **220**, 567–570.
- 21 H. J. Monkhorst and J. D. Pack, *Phys. Rev. B: Solid State*, 1976, **13**, 5188–5192.
- 22 B. G. Pfrommer, M. Côté, S. G. Louie and M. L. Cohen, *J. Comput. Phys.*, 1997, **131**, 233–240.
- 23 L. L. Kukkonen, I. M. Reaney, D. Furniss and A. B. Seddon, *Phys. Chem. Glasses*, 2001, **42**, 265–273.

Microphase Separation upon Crystallization of Small Amphiphilic Molecules: 'Low' Temperature Form II of Sodium Benzoate (E 211)

T. W. Martin,^a T. E. Gorelik,^{*b} D. Greim,^c C. Butterhof,^a U. Kolb,^b J. Senker,^{*c} and J. Breu^{*a}

^a Department of Inorganic Chemistry I, University of Bayreuth, Universitätsstraße 30, Bayreuth, 95440, Germany. E-mail: josef.breu@uni-bayreuth.de

^b Institute of Physical Chemistry, University of Mainz, Jakob Welder Weg 11, Mainz, 55128, Germany. E-mail: gorelik@uni-mainz.de

^c Department of Inorganic Chemistry III, University of Bayreuth, Universitätsstraße 30, Bayreuth, 95440, Germany. E-mail: juergen.senker@uni-bayreuth.de

Supporting information

Figures

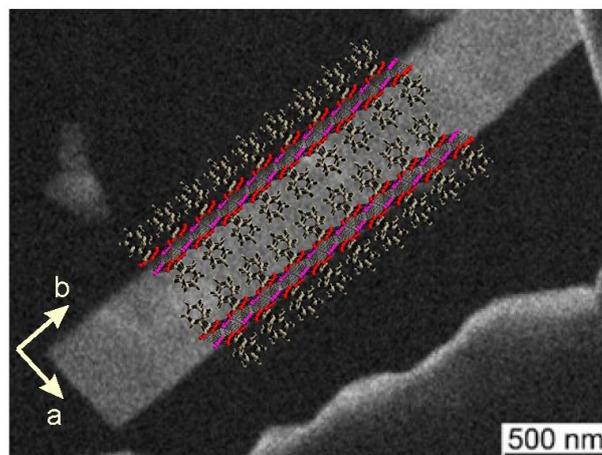


Fig. S1 STEM image of a NaBz form II crystal. All crystals had well-defined faceted form. Unit cell vectors determined from the electron diffraction data allowed to correlate the crystallographic directions and the crystal facets: the rod-like micelles are running along the long direction of the crystals.

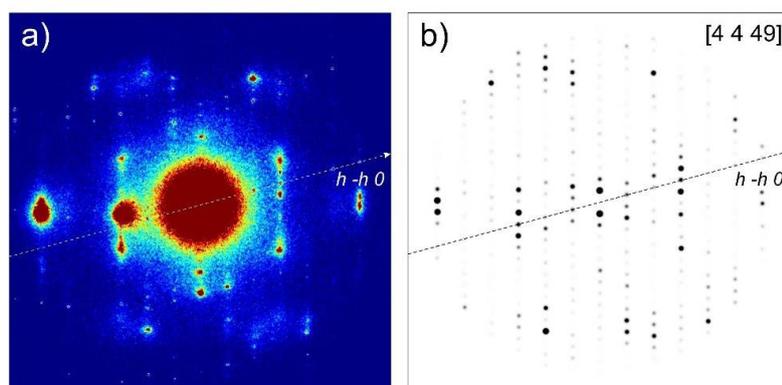


Fig. S2 a) experimental electron diffraction pattern of NaBz form II viewed along the [4 4 49] crystallographic direction, the contrast is enhanced in order to express the diffuse scattering features; b) simulated electron diffraction pattern (eMap, Analitex, Stockholm) of the obtained structure model viewed along the [4 4 49] direction.

Tables

Table S1. Na-O distances in the polyhedra. Corresponding symmetry operations other than (x, y, z) are given in brackets.

	Na1	Na2	Na3	Na4	Na5	Na6
Coordination number	5	6	6	6	6	5
O11 [Å]	2.50(3) (x, 1+y, z)				2.59(3)	2.21(3)
O12 [Å]	2.42(3) (x, 1+y, z)					2.17(2) (x, 1+y, z)
O21 [Å]		2.34(3)			2.34(3)	2.47(3)
O22 [Å]		2.73(3)		2.39(3)	2.33(3) (x, -1+y, z)	
O31 [Å]			2.58(3); 2.43(3) (1-x, 1-y, 1-z)	2.35(3)		
O32 [Å]			2.57(3)	2.35(3) (x, 1+y, z)	2.42(3)	
O41 [Å]			2.37(3) (x, -1+y, z)	2.46(3); 2.45(3) (1-x, 2-y, 1-z)		
O42 [Å]		2.51(3)	2.19(3)	2.42(3)		
O51 [Å]		2.28(3)	2.40(3)		2.68(3)	
O52 [Å]	2.30(3) (x, 1+y, z)	2.31(3) (x, 1+y, z)			2.48(3)	
O61 [Å]	2.38(2)	2.54(3)				2.74(3)
O62 [Å]	2.37(2) (x, 1+y, z)					2.47(2)

Rigid body for crystal structure solution

```
rigid
load z_matrix {
Na1
Na6 Na1 @ 3.8 min 3.25 max 4
Na2 Na6 @ 3.8 min 3.25 max 4 Na1 @ 55 min 50 max 60
Na5 Na2 @ 3.8 min 3.25 max 4 Na6 @ 55 min 50 max 60 Na1 @ -180 min -190 max -170
Na3 Na5 @ 3.8 min 3.25 max 4 Na2 @ 55 min 50 max 60 Na6 @ -180 min -190 max -170
Na4 Na3 @ 3.8 min 3.25 max 4 Na5 @ 55 min 50 max 60 Na2 @ -180 min -190 max -170

C11 Na1 @ 0 min 2.6 max 2.9 Na6 @ 0 min 55 max 75 Na2 @ 0 min 105 max 125
O11 C11 1.265 Na1 @ 0 min 55 max 75 Na6 @ 0 min 10 max 50
C12 C11 1.550 O11 115.316 Na1 @ 0 min -220 max -140
O12 C11 1.265 C12 115.397 O11 -179.979
C13 C12 1.403 C11 120.820 O11 -0.064
C14 C13 1.398 C12 121.110 C11 179.988
C15 C14 1.400 C13 120.096 C12 -0.014
C16 C15 1.401 C14 119.356 C13 0.004
C17 C16 1.398 C15 120.127 C14 -0.015
H131 C13 1.092 C12 116.747 C11 -0.059
H141 C14 1.094 C13 120.178 C12 -179.961
H151 C15 1.093 C14 120.317 C13 179.938
H161 C16 1.094 C15 119.744 C14 -179.916
H171 C17 1.092 C16 122.070 C15 -179.997

C21 Na2 @ 0 min 2.6 max 2.9 Na4 @ 0 min 55 max 75 Na3 @ 0 min 105 max 125
O21 C21 1.265 Na2 @ 0 min 55 max 75 Na4 @ 0 min 10 max 50
C22 C21 1.550 O21 115.316 Na2 @ 0 min -220 max -140
O22 C21 1.265 C22 115.397 O21 -179.979
C23 C22 1.403 C21 120.820 O21 -0.064
C24 C23 1.398 C22 121.110 C21 179.988
C25 C24 1.400 C23 120.096 C22 -0.014
C26 C25 1.401 C24 119.356 C23 0.004
C27 C26 1.398 C25 120.127 C24 -0.015
H231 C23 1.092 C22 116.747 C21 -0.059
H241 C24 1.094 C23 120.178 C22 -179.961
H251 C25 1.093 C24 120.317 C23 179.938
H261 C26 1.094 C25 119.744 C24 -179.916
H271 C27 1.092 C26 122.070 C25 -179.997

C31 Na3 @ 0 min 2.6 max 2.9 Na5 @ 0 min 55 max 75 Na2 @ 0 min -125 max -105
O31 C31 1.265 Na3 @ 0 min 55 max 75 Na5 @ 0 min 135 max 150
C32 C31 1.550 O31 115.316 Na3 @ 0 min -220 max -140
O32 C31 1.265 C32 115.397 O31 -179.979
C33 C32 1.403 C31 120.820 O31 -0.064
C34 C33 1.398 C32 121.110 C31 179.988
C35 C34 1.400 C33 120.096 C32 -0.014
C36 C35 1.401 C34 119.356 C33 0.004
C37 C36 1.398 C35 120.127 C34 -0.015
H331 C33 1.092 C32 116.747 C31 -0.059
H341 C34 1.094 C33 120.178 C32 -179.961
H351 C35 1.093 C34 120.317 C33 179.938
H361 C36 1.094 C35 119.744 C34 -179.916
H371 C37 1.092 C36 122.070 C35 -179.997
```

C41	Na4 @ 0 min 2.6 max 2.9	Na3 @ 0 min 55 max 75	Na5 @ 0 min -125 max -105
O41	C41 1.265	Na4 @ 0 min 55 max 75	Na3 @ 0 min -40 max -5
C42	C41 1.550	O41 115.316	Na4 @ 0 min 140 max 220
O42	C41 1.265	C42 115.397	O41 -179.979
C43	C42 1.403	C41 120.820	O41 -0.064
C44	C43 1.398	C42 121.110	C41 179.988
C45	C44 1.400	C43 120.096	C42 -0.014
C46	C45 1.401	C44 119.356	C43 0.004
C47	C46 1.398	C45 120.127	C44 -0.015
H431	C43 1.092	C42 116.747	C41 -0.059
H441	C44 1.094	C43 120.178	C42 -179.961
H451	C45 1.093	C44 120.317	C43 179.938
H461	C46 1.094	C45 119.744	C44 -179.916
H471	C47 1.092	C46 122.070	C45 -179.997
C51	Na5 @ 0 min 2.6 max 2.9	Na3 @ 0 min 55 max 75	Na4 @ 0 min 105 max 125
O51	C51 1.265	Na5 @ 0 min 55 max 75	Na3 @ 0 min 10 max 50
C52	C51 1.550	O51 115.316	Na5 @ 0 min -220 max -140
O52	C51 1.265	C52 115.397	O51 -179.979
C53	C52 1.403	C51 120.820	O51 -0.064
C54	C53 1.398	C52 121.110	C51 179.988
C55	C54 1.400	C53 120.096	C52 -0.014
C56	C55 1.401	C54 119.356	C53 0.004
C57	C56 1.398	C55 120.127	C54 -0.015
H531	C53 1.092	C52 116.747	C51 -0.059
H541	C54 1.094	C53 120.178	C52 -179.961
H551	C55 1.093	C54 120.317	C53 179.938
H561	C56 1.094	C55 119.744	C54 -179.916
H571	C57 1.092	C56 122.070	C55 -179.997
C61	Na6 @ 0 min 2.6 max 2.9	Na2 @ 0 min 55 max 75	Na3 @ 0 min 105 max 125
O61	C61 1.265	Na6 @ 0 min 55 max 75	Na2 @ 0 min 10 max 50
C62	C61 1.550	O61 115.316	Na6 @ 0 min -220 max -140
O62	C61 1.265	C62 115.397	O61 -179.979
C63	C62 1.403	C61 120.820	O61 -0.064
C64	C63 1.398	C62 121.110	C61 179.988
C65	C64 1.400	C63 120.096	C62 -0.014
C66	C65 1.401	C64 119.356	C63 0.004
C67	C66 1.398	C65 120.127	C64 -0.015
H631	C63 1.092	C62 116.747	C61 -0.059
H641	C64 1.094	C63 120.178	C62 -179.961
H651	C65 1.093	C64 120.317	C63 179.938
H661	C66 1.094	C65 119.744	C64 -179.916
H671	C67 1.092	C66 122.070	C65 -179.997

```

}

Rotate_about_points( @ 0, C11, C12, "C13 H131 C14 H141 C151 H151 C16 H161 C17 H171")
Rotate_about_points( @ 0, C21, C22, "C23 H231 C24 H241 C251 H251 C26 H261 C27 H271")
Rotate_about_points( @ 0, C31, C32, "C33 H331 C34 H341 C351 H351 C36 H361 C37 H371")
Rotate_about_points( @ 0, C41, C42, "C43 H431 C44 H441 C451 H451 C46 H461 C47 H471")
Rotate_about_points( @ 0, C51, C52, "C53 H531 C54 H541 C551 H551 C56 H561 C57 H571")
Rotate_about_points( @ 0, C61, C62, "C63 H631 C64 H641 C651 H651 C66 H661 C67 H671")

```

```
Rotate_about_points( @ 0, C12, C11, "O11 O12")
Rotate_about_points( @ 0, C22, C21, "O21 O22")
Rotate_about_points( @ 0, C32, C31, "O31 O32")
Rotate_about_points( @ 0, C42, C41, "O41 O42")
Rotate_about_points( @ 0, C52, C51, "O51 O52")
Rotate_about_points( @ 0, C62, C61, "O61 O62")
```

```
Rotate_about_axies (
@ 0,
@ 0,
@ 0
)
```

```
Translate(
@ 0 min -1 max 2,
@ 0 min -1 max 2,
@ 0 min -1 max 2
)
```

Anhang A.2

Behind Crime Scenes: The Crystal Structure of Commercial Luminol

Reprinted with permission from T. Martin, J. Fleissner, W. Milius, und J. Breu, *Cryst. Growth Des.*, **2016**, *16* (5), 3014-3018. Copyright 2016 American Chemical Society.

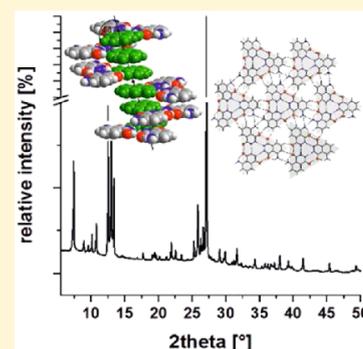
Behind Crime Scenes: The Crystal Structure of Commercial Luminol

Thomas Martin, Juliane Fleissner, Wolfgang Milius, and Josef Breu*

Department for Inorganic Chemistry I, University of Bayreuth, Universitaetsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

5 Supporting Information

ABSTRACT: The structure of the commercial polymorph (form II) of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) used for ages by crime scene investigators to secure blood evidence was determined by powder X-ray diffraction and Rietveld refinement. The “new” form II is a polytype¹ of form I.² The two polymorphs only differ in distinct π -stacking motifs. Slurry experiments prove that the commercial material is indeed the metastable polymorph.



INTRODUCTION

To this very day, crime scene investigators have applied 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) to detect traces of blood, even if someone has tried hard to clean or remove it.^{3,4} The intense luminescence upon oxidation catalyzed by the iron in hemoglobin renders luminol a sensitive sensor. Aside from its forensic use, numerous other applications ranging from environmental to medical have been established since the first report on the synthesis of luminol appeared.⁵ For instance, luminol is used for heavy metal detection or biosensing in bioanalytical chemistry.^{6–10} Crystal structures of five alkaline salts of luminol exhibiting a different structure each have been characterized only recently¹¹ since the sodium salt of luminol has regained interest for its pharmaceutical activity. Na-luminolate shows great potential in immunomodulating treatment of inflammatory and autoimmune diseases.^{12–14} Moreover, Na-luminolate shows a rich polymorphism with three crystal structures characterized so far.^{15,16}

Despite its long history, the first crystal structure of neutral luminol was reported as late as in 1992 by Paradies.² Suitable crystals for single crystal X-ray diffraction at low temperature (173 K; LT) could be obtained by controlled sublimation and were grown at 180 °C and at 5 Torr vacuum pressure in a closed environment on a cooling finger kept at 20 °C.² The crystal structure revealed that luminol in the bulk structure is present not as the commonly reported amide–amide form (Figure 1a), but as amide–hydroxyimine tautomeric form (Figure 1b).

Interestingly the simulated powder X-ray diffraction (PXRD) pattern of the published crystal structure does not match the experimental patterns recorded for commercial luminol as supplied by Merck and AppliChem, clearly indicating an overlooked polymorphism. Moreover, commercial luminol powders suffer from mediocre crystallinity as indicated by

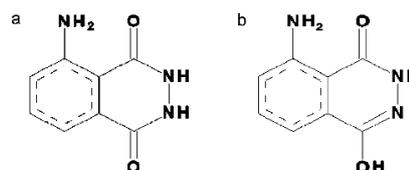


Figure 1. Amide–amide (a) and amide–hydroxyimine (b) tautomeric forms of luminol.

ranges with rather broad and heavily overlapping reflections (Figure S1). The limited resolution might have been the reason the structure of this commercial polymorph has not been solved.

By neutralization of Na-luminolate we now succeeded in improving the quality of the diffraction pattern to the limit that allowed for successful structure solution of the hitherto unknown form (subsequently called form II) from PXRD data. Moreover, to serve comparison the structure of the already published form (subsequently called form I) was redetermined from room temperature (RT) PXRD. Finally, the thermodynamic relationship between both forms was established.

EXPERIMENTAL SECTION

Luminol was purchased from AppliChem and Merck KGaA. Anhydrous sodium luminolate was supplied by MetrioPharm Deutschland GmbH and was used without further purification.

Crystallization of Form I. To obtain a phase-pure powder of form I luminol (1 g) was dissolved in 80 mL of a refluxing (80 °C) ethanol–water mixture (3:1, vol %:vol %). After complete dissolution the mixture was allowed to cool slowly to RT within a period of 2 h. The

Received: March 16, 2016

Revised: March 29, 2016

Published: March 30, 2016

microcrystalline powder was recovered by suction filtering and was allowed to dry at room atmosphere for 12 h.

Crystallization of Form II. A powder of good crystallinity could be obtained by neutralization of Na-luminolate. Slow addition of 5 mL hydrochloric acid (17%) to a stirred solution of 2 g Na-luminolate in 500 mL demineralized water yielded a microcrystalline powder. The precipitate was filtered and then washed three times with demineralized water before allowing it to dry at room temperature for 12 h.

Slurry Experiments. Slurry experiments were carried out by suspending 50 mg of a 1:1 mixture of forms I and II in 5 mL of ethanol or water. The mixture was stirred in closed vessels at RT for 2 days.

PXRD. Measurements were performed in transmission geometry using a STOE STADI P diffractometer with Cu $K_{\alpha 1}$ radiation equipped with a fast, high resolution silicon strip detector (DECTRIS Mythen1K). The samples were prepared in glass capillaries (diameter 0.5 mm). Instrumental parameters for Rietveld refinements were determined applying a Si standard.

Crystal Structure Determination. TOPAS Academic¹⁷ was used for indexing, determination of the Laue group, structure solution, and Rietveld refinement.

Structure solution was accomplished by a simulated annealing method in TOPAS Academic¹⁷ applying a rigid body model of a luminol molecule of the amide–hydroxyimine tautomeric form. The molecular structure of the rigid body was obtained by DFT geometry optimization with the DMol3 module applying the generalized-gradient approximation (GGA) with the Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) functional¹⁸ as implemented in the Materials Studio software.¹⁹

For structure solution six parameters were globally optimized in the simulated annealing run: three positional and three angular parameters for the luminol.

Rietveld refinements of the resulting structure models were performed using a fundamental parameters approach^{20,21} for describing the peak profiles. A conjoint isotropic temperature factor for all heteroatoms was refined. Temperature factors for hydrogens were fixed to $U_{\text{iso}} = 3.80 \text{ \AA}^2$ and 5.07 \AA^2 for form I and form II, respectively.

Form I. The Pawley fit in space group $P\bar{1}$ in the range of $3\text{--}59.970^\circ 2\theta$ including 653 reflections gave R values of $R_p = 0.0114$ and $R_{\text{wp}} = 0.0136$ ($R_{\text{exp}} = 0.0062$) with cell parameters $a = 12.7816(2) \text{ \AA}$, $b = 14.0693(3) \text{ \AA}$, $c = 7.16777(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 103.7155(9)^\circ$, $\beta = 95.4339(7)^\circ$, $\gamma = 114.1345(8)^\circ$, and a volume of $1115.74(4) \text{ \AA}^3$.

Form II. The Pawley fit in space group $P\bar{1}$ in the range of $3\text{--}59.970^\circ 2\theta$ including 653 reflections gave R values of $R_p = 0.0187$ and $R_{\text{wp}} = 0.0317$ ($R_{\text{exp}} = 0.0045$) with cell parameters $a = 9.3929(6) \text{ \AA}$, $b = 10.1273(6) \text{ \AA}$, $c = 12.426(1) \text{ \AA}$, $\alpha = 103.524(4)^\circ$, $\beta = 101.531(4)^\circ$, $\gamma = 92.283(3)^\circ$, and a volume of $1121.4(2) \text{ \AA}^3$. Sodium chloride was applied as distinct phase and the scaling factor and parameters for crystallite size and strain were refined. Sodium chloride was included as a second phase in the Rietveld refinement and the scaling factor and parameters for crystallite size and strain were refined. The calculated phase amount of sodium chloride was $1.17(4) \text{ wt \%}$. The Bragg R value for sodium chloride was $R_{\text{Bragg}} = 0.0052$.

Diamond²² was used for the graphical representation of the results. PLATON²³ was used to calculate hydrogen-bond distances.

TGA-DSC. Measurements were performed using a Netzsch STA 499 C applying synthetic air as purging gas. The heating rate was 10 K/min in a range from RT to 400°C .

RESULTS AND DISCUSSION

A phase pure crystalline powder of luminol form I could be obtained by slow cooling of an ethanol–water solution of luminol (3:1, vol %:vol %) from 80°C to RT. As already mentioned, Paradies was able to solve and refine the single crystal structure of form I determined at LT.² Starting with his coordinates, the crystal structure was refined with RT PXRD data to assist comparison of crystal structures of form I and II. For this purpose the RT PXRD data was reindexed giving cell

parameters that were in line with the published data. To be consistent with the structure solution of form II described below, the atomic positions were refined by treating luminol as rigid body in the Rietveld refinement. The molecular structure of the rigid body was optimized by first principles. Phase purity is confirmed by the high quality of the Rietveld fit shown in Figure 2. Details of the structure refinement of the RT PXRD

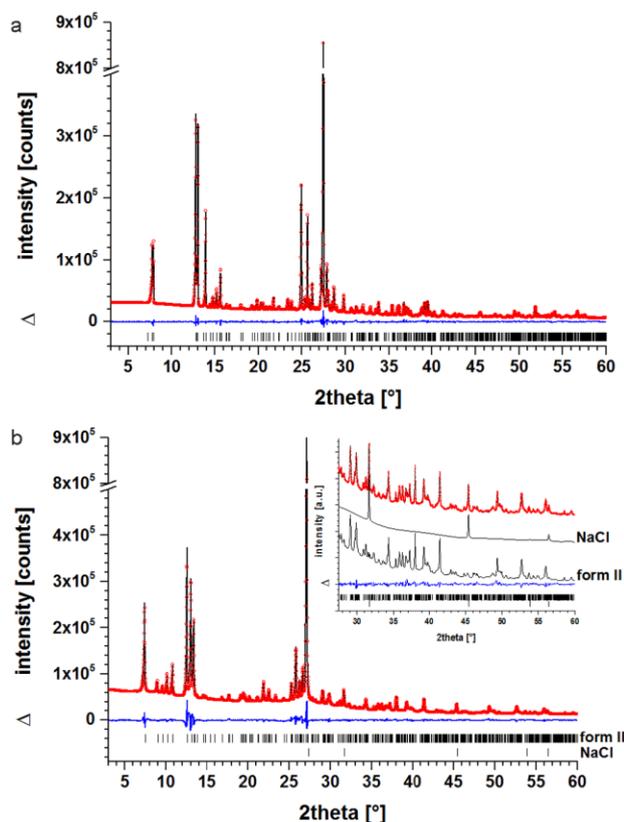


Figure 2. Rietveld refinements (applying TOPAS Academic¹⁷) of the crystal structures of form I (a) and form II (b) of luminol. Both refinements show good agreement between observed and calculated patterns. (O) marks the observed pattern, (–) marks the profile of the Rietveld-fit. The position of Bragg reflections of the unit cells are indicated by ticks (|). Δ marks the difference between observed and calculated patterns. The inset in (b) shows the deconvolution with the calculated patterns for form II of luminol and NaCl.

data are compared with values published by Paradies in Table 1. While the cell axes of the RT structure deviate little from the ones of the LT structure, the cell angles show deviations of up to 2.5° (α -angle). The unit cell volume of the RT structure increases by about 18 \AA^3 with respect to the volume of LT cell. Figure 3 shows the asymmetric unit of form I as ORTEP plot including the numbering scheme. Paradies assigned the amide–hydroxyimine tautomer based on the favorable hydrogen bonding motif available within the trimer which is only feasible for this tautomer. The molecular packing is shown in Figure 4a–c and is compared to form II in detail in the next section.

Rapid crystallization by quenching hot solutions of luminol in ethanol–water mixtures (3:1, vol %:vol %) yielded powders that give X-ray patterns of comparable quality to the as purchased commercial products (Figure S2a). The rather

Table 1. Crystal Data and Details of Measurements and Refinements for Polymorph forms I and II of Luminol; Paradies² is Reported for Comparison

form	Paradies ^a	I	II
formula	C ₈ H ₇ N ₃ O ₂	C ₈ H ₇ N ₃ O ₂	C ₈ H ₇ N ₃ O ₂
M _r	177.16	177.16	177.16
crystal system	triclinic	triclinic	triclinic
space group	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$
a [Å]	12.714(2)	12.7818(2)	9.3932(3)
b [Å]	14.132(3)	14.0693(2)	10.1291(4)
c [Å]	7.1027(9)	7.16752(5)	12.4300(5)
α [°]	101.24(2)	103.7212(9)	103.534(2)
β [°]	94.84(1)	95.4372(6)	101.530(3)
γ [°]	116.60(1)	114.1324(7)	92.2919(16)
V [Å ³]	1097.2(4)	1115.67(2)	1121.92(8)
Z/Z'	6/3	6/3	6/3
ρ [g cm ⁻³]	1.607	1.58208(3)	1.5733(1)
F(000)	552	552	552
T [K]	173(1)	295(2)	295(2)
data range [°2θ]	-	3–59.970	3–59.970
rlfns used	-	653	648
refined param.	-	48	87
R _p	-	0.0199	0.0252 ^b
R _{wp}	-	0.0289	0.0382 ^b
R _{exp}	-	0.0067	0.0049 ^b
R _{Bragg}	-	0.0144	0.0082 ^b

^aRef 2. ^bValues obtained for two-phase (+ NaCl impurity) Rietveld refinement.

poorly resolved ranges at 12–14°2θ and 24.5–28°2θ hampered successful indexing.

By precipitation of a sodium luminolate solution with hydrochloric acid a significantly better crystalline powder was obtained (Figure S2b), showing significantly narrower reflections for which indexing was straightforward.

A good Pawley fit of this pattern in TOPAS Academic¹⁷ yielded cell parameters in accordance with a triclinic metric. The obtained volume of 1122 Å³ indicates six luminol molecules in the unit cell. In $P\bar{1}$ three independent luminol molecules reside in the unit cell. Four unindexed reflections at

higher 2θ angles could be traced back to a very small amount of sodium chloride produced by the neutralization of the Na-luminolate with HCl. The impurity could also be confirmed by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). With this residual amount of sodium chloride as a distinct phase taken into account, the crystal structure solution and Rietveld refinement in TOPAS Academic¹⁷ turned out to be straightforward. The high quality of the Rietveld fit shown in Figure 2 confirms the successful structure solution of luminol form II and indicates a residual content of sodium chloride of about 1 wt%. As for the refinement of form I, luminol was applied again as rigid body in its amide–hydroxyimine² tautomeric form during structure solution and refinement. This tautomer is assumed as for the same reasons claimed by Paradies. As discussed in detail below, form II contains the same trimer unit which can only realize a favorable hydrogen bonding pattern in this tautomeric form. Moreover, infrared spectra of form I and form II are in agreement indicating the same tautomer (Figure S3). Crystallographic data and details of the structure refinement are given in Table 1. Figure 3 shows the asymmetric unit of form II as ORTEP plot including the numbering scheme. The molecular packing is shown in Figure 4d–f.

Both form I and form II share similar building motifs. The structures are represented by lamellar phases with layers stacked parallel to the (1 0 $\bar{1}$) and ($\bar{1}$ $\bar{1}$ 1) lattice plane for form I and form II, respectively (Figure 4a and d). For both forms these layers are made up by the same trimers discussed above (Figure 4b and e). Strong hydrogen bonds (H-bonds) within this trimeric unit are the dominating intermolecular interactions (H-bonds labeled a–f in Figure 4b and e). While the deprotonated nitrogen of the hydrazide moiety of one luminol molecule serves as acceptor to a neighboring proton bearing nitrogen in the hydrazide moiety, a protonated carbonyl group acts as H-donor to a neighboring unprotonated carbonyl group.² Weaker H-bonds between adjacent luminol trimers lead to an “edge-to-side” interconnectedness between triangles formed by the luminol trimer within the layers (H-bonds labeled g–o in Figure 4b and e). Within the “edge-to-side” connectivities, amino groups act as H-donors to amino groups of adjacent molecules (H-bonds labeled g–i in Figure 4b and e). The aromatic rings serve as H-donors to unprotonated

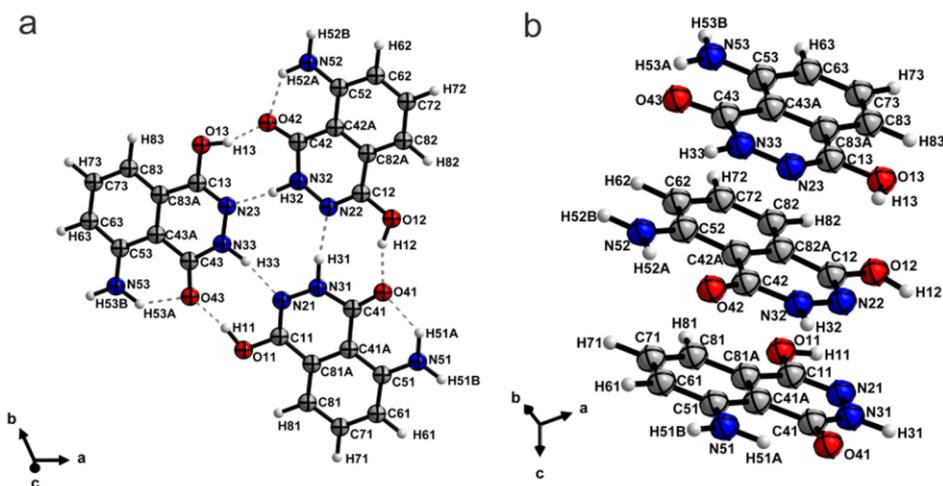


Figure 3. ORTEP plots and crystallographic numbering schemes of the asymmetric units of forms I (a) and II (b) of luminol. Displacements ellipsoids are drawn at 50% probability level.

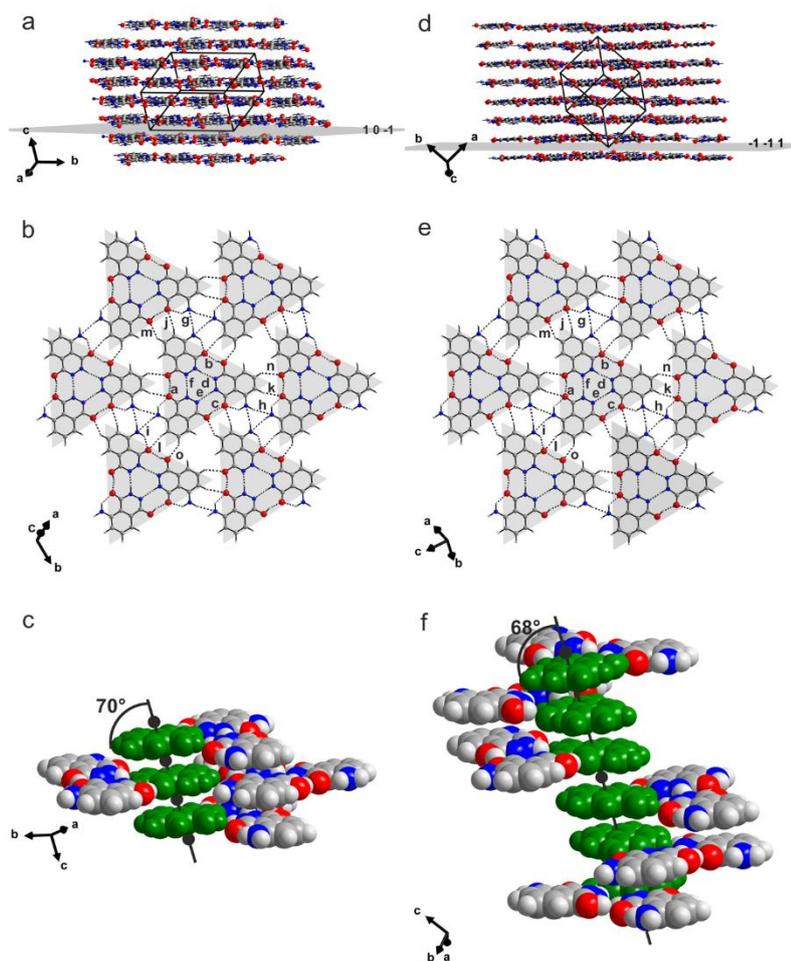


Figure 4. Molecular packing of luminal form I (left column) and form II (right column). Hydrogen bonds are dashed in black. Layer stacking (a,d). Top view onto one layer perpendicular to $(10\bar{1})$ and $(\bar{1}\bar{1}1)$ lattice plane for form I and form II, respectively, showing packing of H-bonded luminal trimers (gray triangles), alphabetic labels of H-bonds refer to values in Table S1 (b,e). Shifted stacking of trimers in adjacent layers, molecules lying on the axis linking inversion centers (marked by ●) are shown in green (c,f).

carbonyl groups (H-bonds labeled j–l in Figure 4b and e) as well as for protonated carbonyl groups of adjacent molecules (H-bonds labeled m–o in Figure 4b and e). Details about the hydrogen bonding geometry are summarized in Table S1.

Since both forms share the same layer motif they may therefore be regarded as a rare example of polytypism¹ in pure organic compounds.^{24–26} The stacking of the layers (with an interlayer distances of 3.27 and 3.26 Å for form I and form II, respectively) is governed by distinct shifted π -stacks between adjacent layers. In form I the stacking vector of the shifted π -stack is inclined by 70° to the layers and adjacent rings have a center shift of 1.3 Å and are connected by the inversion centers displayed by nodes on the stacking vector (Figure 4c). The trimer units in adjacent layers are rotated by 180°.

In form II the stacking vector of the shifted π -stack is inclined by 68° to the layers and adjacent rings have a center shift of round about 1.4 Å. Here only in between every third layer is an inversion center located, displayed by nodes on the stacking vector (Figure 4f). The trimer units in adjacent layers are rotated by about 60°.

According to the Ostwald-Vollmer rule form I should be more stable (1.58 and 1.57 g/cm³ for form I and form II, respectively, at 295 K). The density difference of 0.01 g/cm³ is

a first indicator to assert that form I is the thermodynamically more stable polymorph. However, in light of the many exceptions to this rule known the difference appears insignificant.²⁷ Thermal analysis also failed to establish the thermodynamic ranking since both compounds decomposed (onset at 328 ± 1 °C and 320 ± 1 °C for form I and form II, respectively) without any signs of a signal related to a transformation (Figure S4). A reliable thermodynamic ranking of the two forms was finally and unequivocally established by solution mediated transformation experiments. Slurries of a 1:1 mixture of the two forms in ethanol or water were formed at RT. PXRD patterns (Figure 5) recorded after 2 days showed that in both solvents equilibration leads to a significant reduction of peaks related to form II.

The complete conversion takes typically 2 weeks. This suggests that form I is the thermodynamically more stable polymorph at RT. A spontaneous or tribochemically induced conversion between the forms was never observed during our experiments. Most likely, the conversion in suspension occurs due to a dissolution/reprecipitation mechanism.

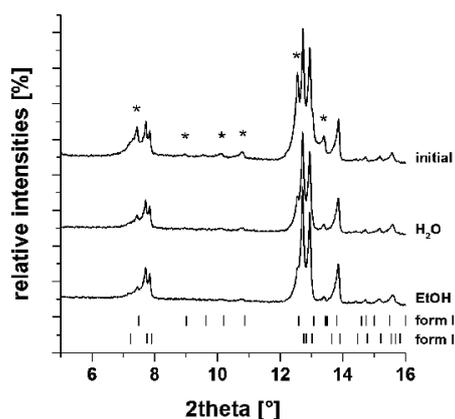


Figure 5. PXRD patterns of suspensions of 1:1 mixtures of forms I and II in EtOH and water after 2 days equilibration period. For comparison, a pattern of the initial 1:1 mixture is included. The significant decrease of characteristic intensities related to form II (marked by *) indicates a slow solution mediated transformation of form II into form I.

CONCLUSION

Luminol is marketed in the metastable form II. The structure of this newly characterized form II shares primary (amide-hydroxyimine tautomer), secondary (hydrogen bonded trimers), and tertiary (layers) building motifs with the already known form I of luminol. The two forms differ only in the stacking of the layers and may therefore be regarded as polytypes.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.cgd.6b00425.

Figures: comparison of PXRD patterns of commercial forms of luminol with published single crystal structure, PXRD patterns of crystallization products from different experiments, IR spectra of both forms of luminol, TG and DSC curves of both forms of luminol. Tables: Intermolecular H-bond geometry for both forms of luminol. (PDF)

Accession Codes

CCDC 1455729–1455730 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: josef.breu@uni-bayreuth.de. Phone: +49 921 552530. Fax: +49 921 552788.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1415) for financial support as well as MetrioPharm AG for financial

support, and Na-luminolate samples, and the contributors from MetrioPharm for the prolific cooperation.

REFERENCES

- (1) International Union of Crystallography. Online Dictionary of Crystallography: Polytypism, <http://reference.iucr.org/dictionary/Polytypism>.
- (2) Paradies, H. H. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 1027–1031.
- (3) Barni, F.; Lewis, S. W.; Berti, A.; Miskelly, G. M.; Lago, G. *Talanta* **2007**, *72*, 896–913.
- (4) Quickenden, T. I.; Ennis, C. P.; Creamer, J. I. *Luminescence* **2004**, *19*, 271–277.
- (5) Schmitz, A. J. *Ueber das Hydrazid der Trimesinsäure und der Hemimellitssäure (On the hydrazide of trimesic acid [1,3,5-benzenetricarboxylic acid] and of hemimellitric acid [1,2,3-benzenetricarboxylic acid])*; Universität Heidelberg, 1902.
- (6) Alwarthan, A. A.; Townshend, A. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *196*, 135–140.
- (7) Cui, H.; Wang, W.; Duan, C.-F.; Dong, Y.-P.; Guo, J.-Z. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 6975–6984.
- (8) Klopff, L. L.; Nieman, T. A. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1080–1083.
- (9) Marquette, C. A.; Leca, B. D.; Blum, L. J. *Luminescence* **2001**, *16*, 159–165.
- (10) Marquette, C. A.; Blum, L. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 546–554.
- (11) Guzei, I. a.; Kim, M.-H.; West, R. J. *Coord. Chem.* **2013**, *66*, 3722–3739.
- (12) Breu, J.; Brysch, W.; Kaiser, A.; Ludescher, B.; Maass, G.; Martin, T.; Milius, W.; Niedermaier, M. Crystalline forms for 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione sodium salt, pharmaceutical preparations containing the same and method for the production of said forms. European Patent No. EP 2542535 B1, 2014.
- (13) Breu, J.; Brysch, W.; Kaiser, A.; Ludescher, B.; Maass, G.; Martin, T.; Milius, W.; Niedermaier, M. Crystalline forms for 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione sodium salt, pharmaceutical preparations containing the same and method for the production of said forms. U. S. Patent No. US 8772294 B2, 2014.
- (14) Breu, J.; Brysch, W.; Kaiser, A.; Ludescher, B.; Maass, G.; Martin, T.; Milius, W.; Niedermaier, M. Crystalline forms for 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione sodium salt, pharmaceutical preparations containing the same and method for the production of said forms. International Patent No. WO 2011107295 A1, 2011.
- (15) Rybakov, V. B.; Chernyshev, V. V.; Paseshnichenko, K. A.; Sheludyakov, V. D.; Belyakov, N. G.; Bozhev, R. S.; Mochalov, V. N.; Storozhenko, P. A. *Crystallogr. Rep.* **2014**, *59*, 383–393.
- (16) Martin, T.; Greim, D.; Milius, W.; Niedermaier, M.; Ludescher, B.; von Wegerer, J.; Brysch, W.; Bärwinkel, K.; Senker, J.; Breu, J. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2015**, *641*, 332–338.
- (17) Coelho, A. A. Coelho Software; Brisbane, Australia 2012.
- (18) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.
- (19) *Accelrys*; Accelrys Software Inc.; San Diego, CA, USA, 2009.
- (20) Cheary, R. W.; Coelho, A. J. *Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 109–121.
- (21) Cheary, R. W.; Coelho, A. a.; Cline, J. P. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2004**, *109*, 1.
- (22) Putz, H.; Brandenburg, K. *CRYSTAL IMPACT*; Brandenburg GbR: Bonn, Germany, 2016.
- (23) Spek, A. L. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 148–155.
- (24) Mishra, M. K.; Desiraju, G. R.; Ramamurty, U.; Bond, A. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 13102–13105.
- (25) Bond, A. D.; Boese, R.; Desiraju, G. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 618–622.
- (26) Duggirala, N. K.; Kanniah, S. L.; Muppidi, V. K.; Thaimattam, R.; Devarakonda, S. *CrystEngComm* **2009**, *11*, 989.
- (27) Thun, J.; Seyfarth, L.; Senker, J.; Dinnebier, R. E.; Breu, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6729–6731.

Behind Crime Scenes: The Crystal Structure of Commercial Luminol

Thomas Martin, Juliane Fleissner, Wolfgang Milius, und Josef Breu*

*Department for Inorganic Chemistry I, University of Bayreuth, Universitaetsstrasse 30, 95440 Bayreuth, Germany

Supporting Information

Figures

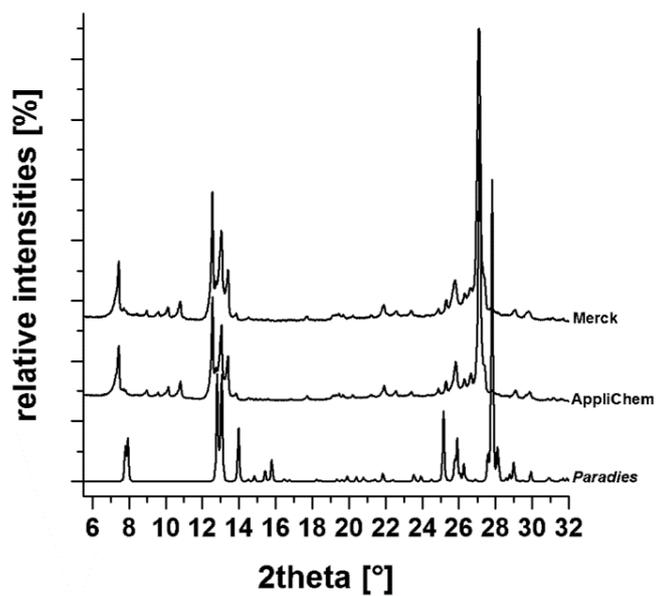


Figure S1. PXR D patterns of commercial forms of luminol in comparison to the simulated diffraction pattern from the published single crystal structure.

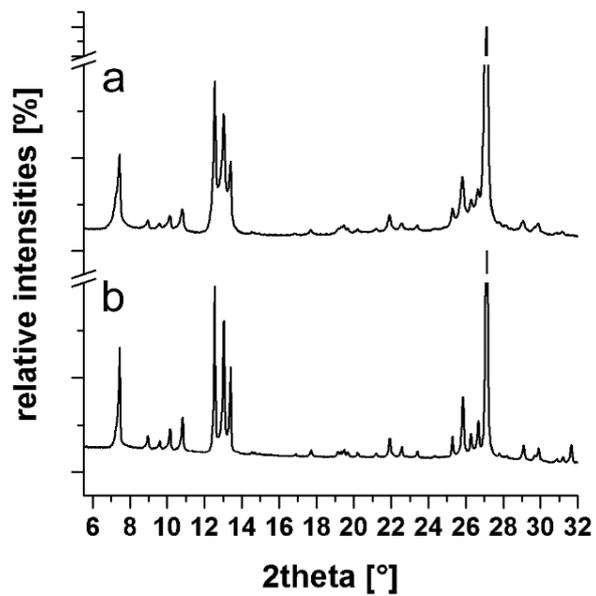


Figure S2. PXR D patterns of crystallization products from rapid cooling of a hot solution of luminol (a) and precipitation from a solution of sodium luminolate with hydrochloric acid (b).

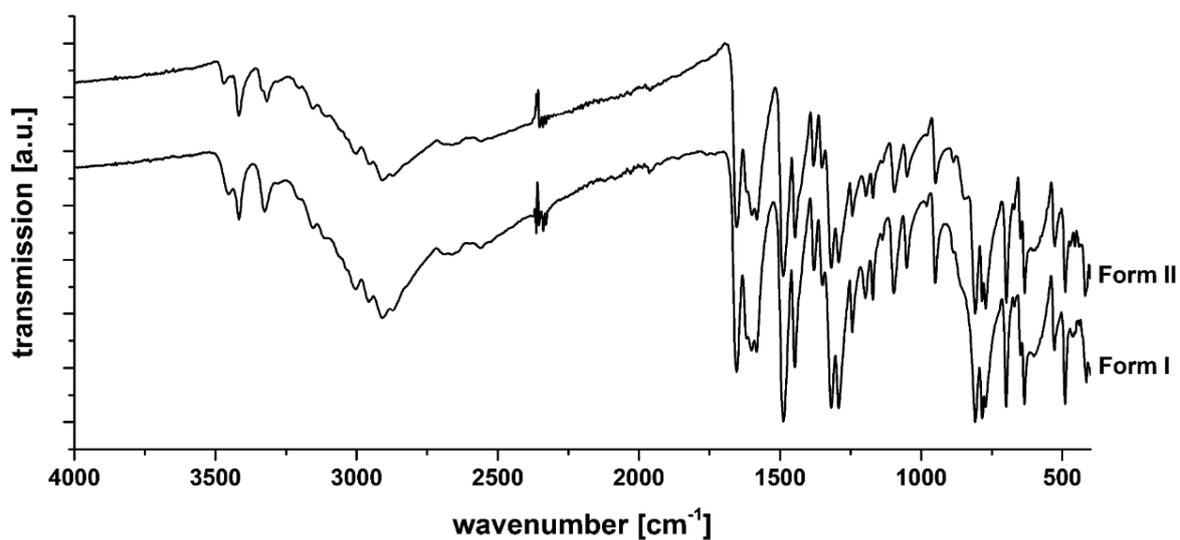


Figure S3. IR spectra of forms I and II of luminol.

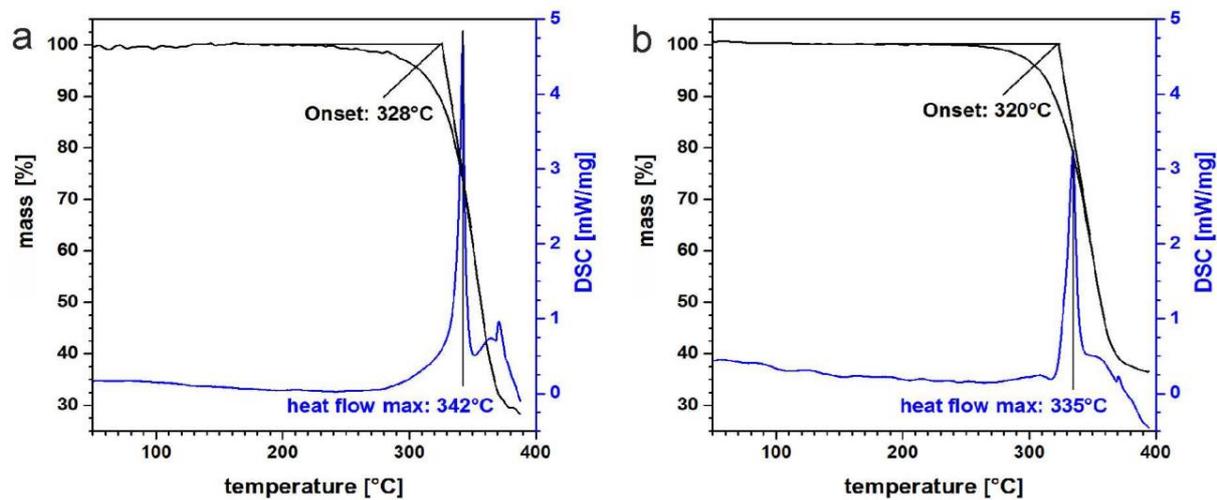


Figure S4. TG and DSC curves of forms I (a) and II (b) of luminol.

Tables

Table S1. Intermolecular H-bond geometry for polymorph forms I and II of luminol.

Label ^[a]	D—H...A	Form	D—H	H...A	D...A	D—H...A	symmetry code of A
a	O11—H11...O43	I	0.976(6)	1.857(7)	2.716(7)	145.2(3)	
		II	0.975(17)	1.73(2)	2.65(2)	157.0(12)	x,-1+y,z
b	O12—H12...O41	I	0.975(4)	1.731(7)	2.668(7)	159.8(5)	
		II	0.975(17)	1.75(2)	2.643(19)	150.1(13)	2-x,-y,1-z
c	O13—H13...O42	I	0.975(6)	1.761(7)	2.694(7)	159.2(5)	
		II	0.975(13)	1.901(19)	2.809(18)	153.7(13)	2-x,1-y,1-z
d	N31—H31...N22	I	1.016(6)	1.861(5)	2.869(5)	170.8(5)	
		II	1.01(2)	1.89(2)	2.861(17)	159.5(15)	2-x,-y,1-z
e	N32—H32...N23	I	1.016(6)	1.881(6)	2.888(5)	170.8(5)	
		II	1.016(17)	1.955(14)	2.948(14)	164.7(16)	2-x,1-y,1-z
f	N33—H33...N21	I	1.016(7)	1.918(6)	2.914(6)	165.7(5)	
		II	1.01(2)	1.83(2)	2.839(19)	174.5(14)	x,1+y,z
g	N51— H51B...N52	I	1.009(11)	2.428(10)	3.356(10)	152.7(7)	x,-1+y,z
		II	1.01(3)	2.47(3)	3.46(3)	167(3)	1-x,1-y,1-z
h	N52— H52B...N53	I	1.010(6)	2.431(7)	3.408(7)	162.4(6)	1+x,1+y,1+z
		II	1.01(3)	2.27(3)	3.24(2)	159.1(19)	1-x,1-y,-z
i	N53— H53B...N51	I	1.010(8)	2.559(8)	3.489(8)	153.1(6)	-1+x,y-1+z
		II	1.011(18)	2.48(2)	3.40(2)	151.1(19)	y,y,-1+z
j	C61—H61...O42	I	1.092(10)	2.523(10)	3.536(9)	154.0(7)	x,-1+y,z
		II	1.09(3)	2.50(3)	3.57(3)	165(2)	1-x,1-y,1-z
k	C62—H62...O43	I	1.092(5)	2.564(7)	3.611(6)	160.2(6)	1+x,1+y,1+z
		II	1.09(2)	2.46(3)	3.49(2)	156.4(16)	1-x,1-y,-z
l	C63—H63...O41	I	1.091(8)	2.549(8)	3.567(7)	154.9(7)	-1+x,y-1+z
		II	1.092(16)	2.565(17)	3.572(15)	152.9(17)	x,y,-1+z
m	C71—H71...O13	I	1.091(9)	2.382(7)	3.307(7)	141.6(6)	x,-1+y,z
		II	1.09(3)	2.51(3)	3.40(2)	138.2(18)	-1+x,y,z
n	C72—H72...O11	I	1.091(9)				1+x,1+y,1+z
		II	1.09(2)	2.571(19)	3.379(18)	130.7(17)	1-x,-y,-z
o	C73—H73...O12	I	1.091(9)	2.437(7)	3.318(6)	136.8(6)	-1+x,y-1+z
		II	1.09(3)	2.337(17)	3.271(17)	142.3(16)	2-x,-y,-z

[a] refers to labels in Figure 3b and e

Anhang A.3

The Same at a First Glance: The Diffractogram of a New Polymorph of Anhydrous Sodium Luminolate Almost Perfectly Resembles the Diffraction Trace of An Already Known Polymorph

Copyright 2016 Wiley. Used with permission from T. Martin, D. Greim, W. Milius, M. Niedermaier, B. Ludescher, J. von Wegerer, W. Brysch, K. Bärwinkel, J. Senker und J. Breu, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2015**, *641* (2), 332-338.

The Same at a First Glance: The Diffractogram of a New Polymorph of Anhydrous Sodium Luminolate Almost Perfectly Resembles the Diffraction Trace of an Already Known Polymorph

Thomas Martin,^[a] Dominik Greim,^[b] Wolfgang Milius,^[a] Michael Niedermaier,^[c]
Beate Ludescher,^[c] Jörg von Wegerer,^[c] Wolfgang Brysch,^[d] Kilian Bärwinkel,^[b]
Jürgen Senker,^{*[b]} and Josef Breu^{*[a]}

Dedicated to Professor Hans-Jörg Deiseroth on the Occasion of His 70th Birthday

Keywords: Crystal engineering; Polymorphism; X-ray diffraction; Structure elucidation; Thermodynamics

Abstract. A so far unknown third polymorph (form III) of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminolate) monosodium salt could be isolated phase pure and its structure was determined by powder X-ray diffraction and Rietveld refinement [cell parameters: $a = 8.0364(2) \text{ \AA}$, $b = 3.69765(5) \text{ \AA}$, $c = 26.4246(7) \text{ \AA}$, $\beta = 96.346(2)^\circ$, $V = 780.42(3) \text{ \AA}^3$, space group $P2_1/c$]. The new structure shows many similarities to the structure of the known form II and the consequently slim differences in the diffraction traces could have easily been over-

looked. Slurry experiments prove the new form to be more stable than form II. Both form II and form III crystallize in a lamellar structure. The layers are in turn built by shifted π -stacked strands of hydrogen bonded luminolate dimers. The strands are canted by $\pm 25^\circ$ in respect to the layers. While in form II the tilt direction alternates from strand to strand within a single layer, in form III all strands within a layer are tilted in the same direction and the orientation rather alternates between adjacent layers.

Introduction

Over the last years phase purity and the knowledge about thermodynamic stability of polymorphs of APIs (active pharmaceutical ingredients) have become increasingly relevant issues in patent litigation. Many popular examples like Abbott's HIV protease inhibitor Norvir (Ritonavir)^[1] or the patent litigation between Glaxo Smithkline (GSK) and Novapharm Ltd over GSK's popular heartburn medication Zantac[®]^[2] illustrate the need for in depth polymorph screening for pharmaceutical products. Although numerous compounds of industrial and pharmaceutical relevance are marketed in crystalline forms their crystal structures often remain unknown.^[3] Most fre-

quently polymorphs in patents are documented by a list of d values of the most intense reflections. At best powder X-ray diffractograms are presented to assist identification by "fingerprint". As we will show herein, this state of the art approach of documentation bears the risk that polymorphs with similar diffractograms remain unnoticed with all kinds of legal implications. Probably due to the fact that primary building units are the same and that many times even secondary building motifs are similar, diffractograms of polymorphs of molecular crystals frequently show only very few unique features.^[4]

The first report of the synthesis of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione ("1-amido-2,3-phthalhydrazid", commonly "luminol") dates back to 1902.^[5] Since that time, numerous applications of this compound have been developed ranging from environmental to medical or to forensic. Probably most widely known luminol produces an intense chemiluminescence upon its oxidation catalyzed by heavy metal cations.^[6] As a consequence luminol may be used for heavy metal detection or biosensing in bioanalytical chemistry.^[7] Its most popular application certainly is the use as sensor for detecting traces of blood due to the iron in hemoglobin in forensic medicine.^[8] Additionally, the sodium salt of luminol is known to be pharmaceutically active. In the Russian Federation, the sodium luminolate dihydrate has been used for immunomodulating treatment of inflammatory and autoimmune diseases of several organs as well as for reducing or preventing infections after surgery.^[9] Recently, phase-pure forms of the anhydrous sodium luminolate have been patented as immunomodulating drugs.^[10]

* Prof. Dr. J. Senker
Fax: +49 921552788
E-Mail: juergen.senker@uni-bayreuth

* Prof. Dr. J. Breu
Fax: +49-921552788
E-Mail: josef.breu@uni-bayreuth

[a] Department of Inorganic Chemistry I
University of Bayreuth
Universitaetsstrasse 30
95447 Bayreuth, Germany

[b] Department of Inorganic Chemistry III
University of Bayreuth
Universitaetsstrasse 30
95447 Bayreuth, Germany

[c] MetrioPharm Deutschland GmbH
Neuendorfstrasse 20b
16761 Hennigsdorf, Germany

[d] MetrioPharm AG
Bleicherweg 45
8002 Zurich, Switzerland

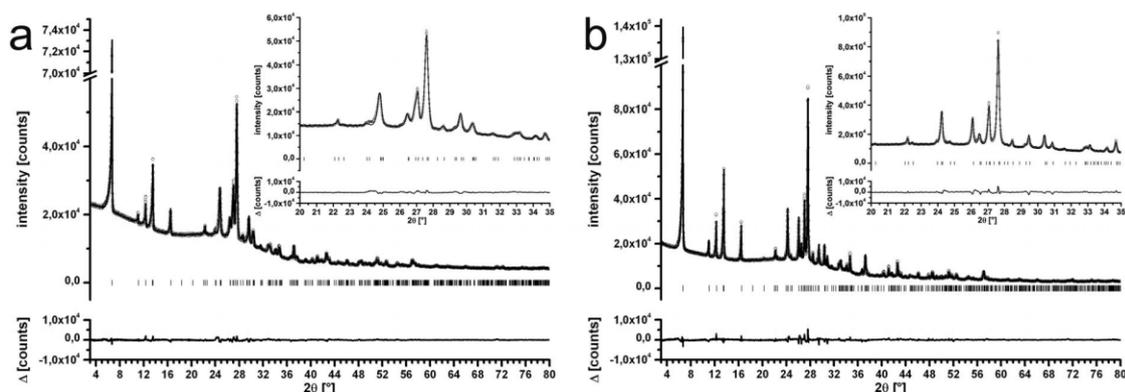


Figure 1. Rietveld refinements (applying TOPAS Academic^[15]) of the crystal structures of form **II** (a) and form **III** (b) of anhydrous Na-luminolate. Both refinements show good fits between the observed and calculated patterns. (O) marks the observed pattern, (–) marks the profile of the best Rietveld-fit. The positions of Bragg reflections of the unit cells are indicated with (|). Δ marks the difference between observed and calculated patterns.

Despite its long history, the crystal structure of luminol was reported as late as in 1992.^[11] The structures of various hydrated and non-hydrated alkali (Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, and Cs⁺) luminolates, have only been published recently in 2013.^[12] In 2014 *Rybakov* et al. published the crystal structures of two polymorphs of non-hydrated Na-luminolate [**B1**^[9d], CCDC no. CCDC-931683 in the Cambridge structural database (CSD),^[13] herein referred to as form **II**, and **B2**^[9d], CCDC no. CCDC-931684 in the CSD,^[13] herein referred to as form **I**]. They failed to identify a transition temperature in differential scanning calorimetry (DSC) and consequently it could not be determined which form would be the thermodynamic more stable one. According to the Ostwald-Vollmer rule, the authors speculated that the slightly denser form **I** might be more stable.

Herein we report synthesis conditions for anhydrous sodium luminolate that allow to avoid concomitant crystallization^[14] of any other form and yield “phase-pure” products of form **II**. With these samples of form **II** becoming available, a scrutinized check of the diffractogram revealed the presence of a yet unknown third polymorph, subsequently called form **III**. Further optimization of the crystallization finally allowed the synthesis of phase pure samples of both form **II** and form **III** and the crystal structure solution of the new polymorph, form **III**.

Results and Discussion

Crystal Structure of Form II

Dehydration of luminol sodium salt dihydrate^[9d] at a moderate temperature of 80 °C yields a phase pure powder of form **II**. Whereas *Rybakov* et al. were already able to solve and refine the crystal structure of form **II** from a two-phase material, we here cross-checked the crystal structure refinement with PXRD data of a phase pure sample. Following a Pawley fit applying published cell parameters, the crystal structure solution and Rietveld refinement in TOPAS Academic^[15] were straightforward. To be consistent with the structure solution of

form **III**, during structure solution and refinement luminolate was applied as rigid body. The molecular structure of this rigid body in turn was determined by a first principles optimization. The high quality of the Rietveld fit confirms phase purity. The Rietveld plot is shown in Figure 1a. Figure 2a shows the ORTEP plot of the asymmetric unit of form **II** including the numbering scheme. The molecular packing is shown in Figure 3a–e and is compared in detail to the packing of form **III** in the next section. In Table 1 details of the repeated structure refinement are compared with values published by *Rybakov* et al. While the unit cell parameters are the same within experimental errors, the residual values obtained for single phase refinement were significantly smaller. Amongst others the Na–O and Na–N distances (Table 2), however, deviate significantly.

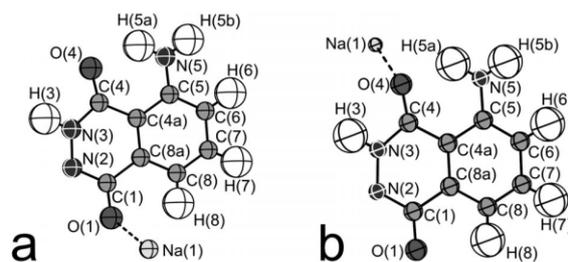


Figure 2. ORTEP plots and the crystallographic numbering schemes of the asymmetric units for form **II** (a) and form **III** (b) of anhydrous Na-luminolate. Displacement ellipsoids are drawn at 50% probability level.

Crystal Structure of Form III

A crystalline powder of form **III** was obtained by slow evaporation of a hot dimethyl sulfoxide (DMSO) solution of Na-luminolate.

On a first glance the diffraction traces of form **II** and form **III** (Figure 1) look very similar and the slim differences might easily escape attention in a fingerprint comparison. Also the *d* values of most of the intense reflections agree within experi-

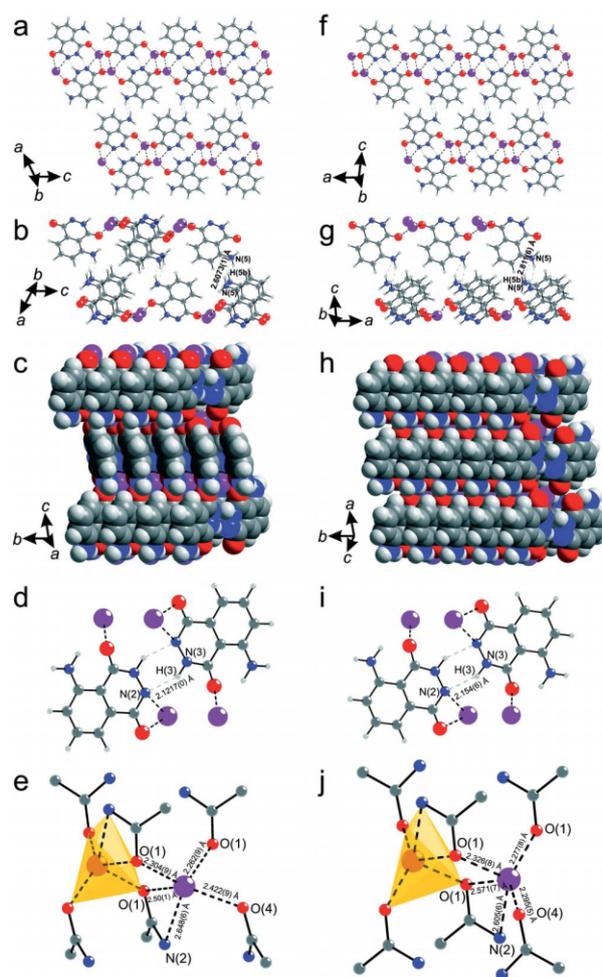


Figure 3. Molecular packing of the anhydrous Na-luminolate of form **II** (left column) and form **III** (right column). Intermolecular hydrogen bonds are dashed in grey. Dative bonds are dashed in black. Layer stacking (a, f). Interface between neighboring strands (b, g). Top view onto the layers showing the strands of dimers (c, h). Hydrogen bonded dimers (d, i). Coordination environment of Na^+ (e, j).

mental errors. Scrutiny reveals differences in the range between 24 and $32^\circ 2\theta$ (inset in Figure 1) which, however, might still be attributed to preferred orientation. Thorough structural characterization nevertheless unequivocally proves the distinct form **III**.

Following indexing, a Pawley fit of the diffraction trace, crystal structure solution and Rietveld refinement in TOPAS Academic^[15] turned out to be straightforward. The high quality of the Rietveld fit (Figure 1b) confirms phase purity. As for form **II**, during structure solution and refinement luminolate was applied as rigid body with a molecular structure determined by a first principles optimization. Crystallographic data and details of the structure refinement are shown in Table 1. Figure 2b shows the asymmetric unit of form **III** as ORTEP plot including the numbering scheme.

The packing motifs are shown in Figure 3f–j. Both, form **II** and form **III** represent lamellar phases with layers stacked

along the a^* and c^* axes, respectively (Figure 3a, c and f, h). The striking similarity of the lamellar motif certainly contributes to the similarity of the diffraction traces.

In both, form **II** and form **III**, aminophenyl moieties of the luminol ligands point towards the surface of the layers while the azindione moieties provide the coordination environment of sodium residing at the center of the layers. The stacking of the layers is promoted by weak van der Waals interactions as well as a weak hydrogen bond (Figure 3b and g) between the amino groups $[\text{N}(5)\text{--H}(5b)\cdots\text{N}(5)]$ of two opposing luminol anions in adjacent layers [$2.6073(1)$ Å, $153.3(6)^\circ$ and $2.811(6)$ Å, $152.4(4)^\circ$ for form **II** and form **III**, respectively].

Top views of the layers (Figure 3c and h), however, reveal significant differences in the motif of the two-dimensional substructures of form **II** and form **III**. The layers in both forms are comprised of strands of luminolate dimers in a parallel-displaced π -stack arrangement with interaction distances between adjacent aminophenyl moieties of $3.615(9)$ Å [$\text{C}(8)\text{--C}(8A)$] and $3.393(7)$ Å [$\text{C}(5)\text{--}(4A)$] for form **II** and $3.63(1)$ Å [$\text{C}(8)\text{--C}(8A)$] and $3.396(7)$ Å [$\text{C}(5)\text{--C}(4A)$] for form **III**. The dimers (Figure 3d and i) are held together by hydrogen bonding between $\text{N}(3)\text{--H}(3)$ and $\text{N}(2)$ [2.1217 Å, $147.5(5)^\circ$ and $2.154(6)$ Å, $147.1(4)^\circ$ for form **II** and form **III**, respectively]. The strands differ in the orientation of these dimers with respect to the layers. The planes of the dimers are canted by approximately $\pm 25^\circ$ with respect to the layer. In form **III** the direction of canting within each layer is the same (Figure 3h) and it alternates from layer to layer. Contrary to this, in form **II** neighboring strands of dimers within a single layer have alternating orientations (Figure 3c).

Within a given layer neighboring strands of dimers are connected by the coordination to the Na^+ sandwiched between the strands. Interestingly, despite the different orientations of the strands the coordination environment for Na^+ is again similar in both forms (Figure 3 e and j). The sodium cations reside at slightly different heights in the layers filling the gaps between the dimer stacks. In both forms the coordination number of Na^+ is 5 ($1 \times \text{N}$ and $4 \times \text{O}$) in an irregular polyhedron. The coordination polyhedra are interconnected by two shared edges and two shared vertices. The Na–O and Na–N distances are summarized in Table 2.

Vibrational Spectroscopy

FT-IR and Raman spectra of both polymorph forms are compared in Figure 4 (IR) and Figure 5 (Raman). Since the primary (luminolate), the secondary (hydrogen bonded dimers), the tertiary (shifted π -stacked strands of dimers) and the quaternary building (layers) motifs and even the Na environments are very similar, little difference is expected in the spectra. Indeed the differences observed are slim and are restricted to the phonon region. The two polymorphs exhibit differences in the IR spectra below 470 cm^{-1} and in the Raman spectra below 250 cm^{-1} . An assignment of the absorptions/resonances is not straightforward but these differences in the phonon regime can be regarded as another evidence for the presence of two different polymorphic forms of luminolate.

Table 1. Crystal data and details of measurements and refinements for polymorph forms **II** and **III** of anhydrous Na-luminolate; **B1**^[9d] is reported for comparison.

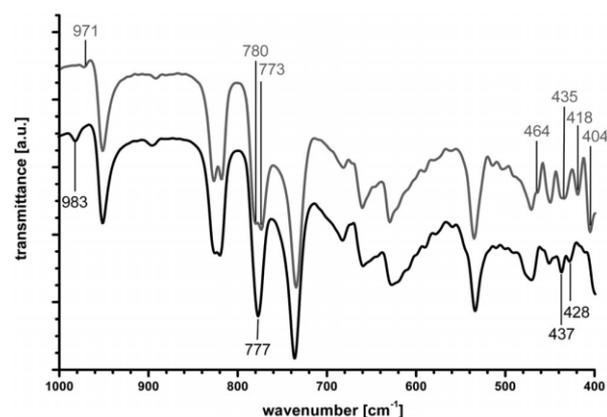
	B1 ^{a)}	II	III
Formula	C ₈ H ₆ N ₃ NaO ₂	C ₈ H ₆ N ₃ NaO ₂	C ₈ H ₆ N ₃ NaO ₂
M _r	199.15	199.15	199.15
Crystal system	monoclinic	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P2</i> ₁ / <i>c</i>	<i>P2</i> ₁ / <i>c</i>	<i>P2</i> ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> / Å	14.7157(18)	14.7172(7)	8.0364(2)
<i>b</i> / Å	3.7029(19)	3.7003(1)	3.69765(5)
<i>c</i> / Å	16.0233(15)	16.0055(8)	26.4246(7)
β / °	116.682(13)	116.715(3)	96.346(2)
<i>V</i> / Å ³	780.2(4)	778.59(6)	780.42(3)
<i>Z</i> / <i>Z'</i>	4 / 1	4 / 1	4 / 1
ρ / g·cm ⁻³	1.695	1.6989(1)	1.69491(7)
<i>F</i> (000)	408	408	408
Measured temperature / °C	295(2)	295(2)	295(2)
Data range / °2 θ	3.360–34.919	3–80.085	3–80.085
Reflections used	338	479	480
Refined parameters	102 ^{b)}	63	66
<i>R</i> _p	0.0435 ^{b)}	0.0155	0.0214
<i>R</i> _{wp}	0.0614 ^{b)}	0.0212	0.0296
<i>R</i> _{exp}	0.0352 ^{b)}	0.0099	0.0104
<i>R</i> _{Bragg}		0.0120	0.0148

a) Ref. [9d]. b) Number for two-phase Rietveld refinement.

Table 2. Coordination bonding Na–X [X = N, O] distances for polymorph forms **II** and **III** of anhydrous Na-luminolate; **B1**^[9d] is reported for comparison.

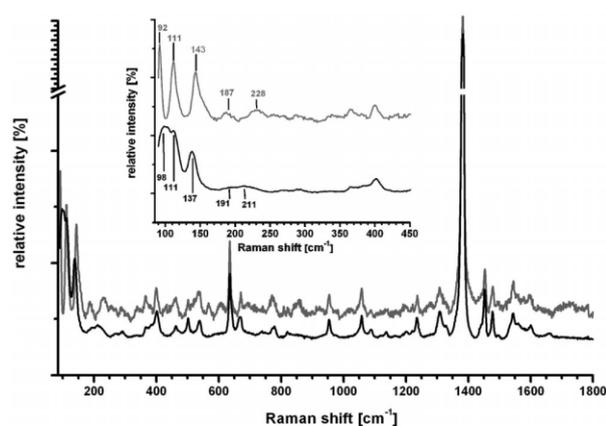
Coordination bond	B1 ^{a)}	Form II		Form III		
	Symmetry code	Na–X / Å	Symmetry code	Na–X / Å	Symmetry code	Na–X / Å
Na–O(1)	<i>x, y, z</i>	2.379(9)	<i>x, y, z</i>	2.304(9)	–1+ <i>x, y, z</i>	2.326(8)
Na–O(1)	<i>x, –1+y, z</i>	2.275(9)	<i>x, –1+y, z</i>	2.262(9)	–1+ <i>x, –1+y, z</i>	2.277(8)
Na–O(1)	1– <i>x, –0.5+y, z</i>	2.442(7)	1– <i>x, –0.5+y, z</i>	2.50(1)	1– <i>x, 1–y, –z</i>	2.571(7)
Na–N(2)	1– <i>x, –0.5+y, z</i>	2.726(7)	1– <i>x, –0.5+y, z</i>	2.648(6)	1– <i>x, 1–y, z</i>	2.605(6)
Na–O(4)	<i>x, 0.5–y, 0.5+z</i>	2.385(9)	<i>x, 0.5–y, 0.5+z</i>	2.422(9)	<i>x, y, z</i>	2.295(5)

a) Ref. [9d].

**Figure 4.** FT-IR spectra of form **II** (black) and form **III** (grey) of anhydrous Na-luminolate.

Thermodynamic Relation

Additional experiments and theoretical calculations were performed to clarify the thermodynamic relation between the two polymorphic forms. According to Ostwald-Vollmer rule

**Figure 5.** Raman spectra of form **II** (black) and form **III** (grey) of anhydrous Na-luminolate. Significant differences occur within the lattice phonon region below 250 cm⁻¹ (see inset).

form **II** should be more stable ($\rho = 1.699 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and $1.694 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ for form **II** and form **III**, respectively, at 295 K). The density difference is, however, too small

($0.004 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and too many exceptions to the rule are known as to indicate reliably the thermodynamic order of the two forms.^[4] Rather lattice energy calculations and solution mediated transformation experiments were consulted.

DFT Calculations

The crystal structures as determined by Rietveld refinement at room temperature were relaxed by geometry optimization including the symmetry constraints of the respective space groups and the variation of unit cell parameters by applying density functional theory with a semi-empirical dispersion correction (DFT-D) in order to determine the thermodynamically more stable form at 0 K. The calculations clearly prove that both structures represent local minima and optimized parameters differ little from experimental ones (Table 3). As expected for experimental structures refined at room temperature, optimization shrinks the volume, however, by as little as approximately 3% for both forms. The relative energies suggest that form II is metastable at 0 K by as little as $1.708 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Since entropy effects are neglected, the ranking of the two forms can therefore not be determined reliably by the calculations.

Table 3. Results of the CASTEP^[16] geometry optimization. The deviations of the optimized cell parameters (0 K) as compared to the experimentally determined parameters (room temp.) are given in the third row.

Form	Lattice parameter	Deviation /%	$\Delta E / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
II	$a / \text{Å}$	14.602	-0.79	+1.708
	$b / \text{Å}$	3.620	-2.22	
	$c / \text{Å}$	15.992	-0.08	
	$\beta / ^\circ$	116.478	-0.20	
	$V / \text{Å}^3$	756.69	-2.90	
III	$a / \text{Å}$	8.034	-0.03	0
	$b / \text{Å}$	3.623	-2.06	
	$c / \text{Å}$	26.195	-0.88	
	$\beta / ^\circ$	96.585	0.25	
	$V / \text{Å}^3$	757.43	-3.04	

Solution Mediated Transformation

To determine the relative stability of form II and form III unequivocally, slurries of a 1:1 mixture of the two forms in 2-propanol, methanol, and ethanol were equilibrated at room temperature. PXRD patterns (Figure 6) recorded after 24 h showed that in all three solvents equilibration leads to a significant reduction of reflections related to form II. This suggests that form III is the thermodynamically more stable polymorph at room temperature. The thermodynamic ranking retrieved by the slurry experiments, therefore, is in line with the relative energies retrieved in the DFT-D calculations. In neither of the equilibration experiments a conversion to form I was observed as reported by Rybakov et al.^[9d] A spontaneous or tribochemical induced conversion between forms II and III was never observed during our experiments. Most likely, the conversion in suspension occurred via a dissolution/precipitation mechanism.

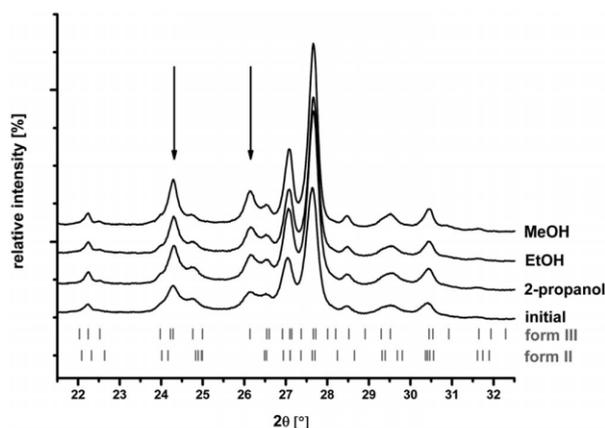


Figure 6. PXRD patterns of suspensions of 1:1 mixtures of forms II and III in 2-propanol, ethanol, and methanol after a 24 h equilibration period. For comparison a pattern of the initial 1:1-mixture is included. The significant increase of the most prominent reflections being singular to form III (marked by arrows) indicate a slow solution mediated transformation of form II into form III.

Conclusions

Primary (luminolate), secondary (hydrogen bonded dimers), tertiary (shifted π stacked strands of dimers) and the quaternary building (layers) motifs are very similar in the crystal structure of both, the newly detected form III and the known form II of anhydrous Na-luminolate. As a consequence, diffraction patterns appear very similar and vibrational spectra also show little differences. Form III of this promising API therefore could have easily escaped discovery without scrutiny.

Experimental Section

General: Anhydrous sodium luminolate was supplied by MetrioPharm Deutschland GmbH and was used without further purification.

To obtain a phase-pure powder of form II first the Na-luminolate (1 g) was dissolved in water (10 mL). Crystallization was induced by slowly adding 50 mL of the anti-solvent 2-propanol over a period of 3 h to obtain the known dihydrate form.^[9d] Slow dehydration over a period of 8 h at 80°C in a drying furnace yields a microcrystalline powder of fine needles (typically 500 nm in diameter, 20 μm in length) of form II.

Form III was obtained by slow evaporation of a saturated solution of anhydrous Na-luminolate in DMSO at 90°C . The material was obtained as yellowish microcrystalline powder of fine needles (typically 100 nm in diameter, 5 μm in length). Crystallization can be speeded up by applying a vacuum of 8×10^{-3} mbar.

Slurry experiments were carried out by suspending 50 mg of a 1:1 mixture of forms II and III in 5 mL of 2-propanol, methanol, or ethanol. The mixture was stirred in a closed vessel at room temperature for 24 h.

PXRD: Measurements were performed in transmission geometry with a STOE STADI P diffractometer with $\text{Cu-K}\alpha_1$ radiation equipped with a fast, high resolution silicon strip detector (DECTRIS Mythen1K).

The samples were prepared in glass capillaries (diameter 0.5 mm). Instrument parameters for Rietveld refinements were determined applying Si.

Crystal Structure Determination: TOPAS Academic^[15] was used for indexing, determination of the Laue group, structure solution, and Rietveld refinement.

Structure solution was accomplished by a simulated annealing method in TOPAS Academic^[15] applying a rigid body model of a luminolate molecule. The molecular structure of the rigid body was obtained by DFT geometry optimization with the DMol3 module applying the generalized-gradient approximation (GGA) with the Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) functional^[17] as implemented in the Materials Studio software^[18].

For structure solution nine parameters were globally optimized in the simulated annealing run: three positional and three angular parameters for the luminolate and three positional parameters for the sodium cation.

Rietveld refinements of the resulting structure models were performed using a fundamental parameters approach^[19] for describing the peak profiles. The profoundly needle-shape of the crystals of both polymorphs triggers a good degree of preferred orientation even with capillary samples. Although refinement is stable also without taking the preferred orientation into account, the *R*-value turned out to be significantly smaller when applying the PO_Spherical_Harmonics macro^[20]. Displacement parameters were refined atom-type-wise with the B-factors for hydrogen atoms being fixed to $B_{\text{iso}} = 5 \text{ \AA}^2$.

Form III: The Pawley fit in space group $P2_1/c$ in the range of $3\text{--}80.085^\circ 2\theta$ including 480 reflections gave *R* values of $R_p = 0.0158$ and $R_{\text{wp}} = 0.0213$ ($R_{\text{exp}} = 0.0100$) with cell parameters $a = 8.0362(2) \text{ \AA}$, $b = 3.69703(6) \text{ \AA}$, $c = 26.4224(8) \text{ \AA}$, $\beta = 96.346(2)^\circ$, and a volume of $780.20(3) \text{ \AA}^3$. For Rietveld refinement preferred orientation was described with a spherical harmonics function of 4th order.

Form II: Starting cell parameters and symmetry ($P2_1/c$) were taken from data deposited as CCDC no. CCDC-931683^[9d]. The Pawley fit of our data in space group $P2_1/c$ over a range of $3\text{--}80.085^\circ 2\theta$ including 479 reflections gave *R* values of $R_p = 0.0121$ and $R_{\text{wp}} = 0.0166$ ($R_{\text{exp}} = 0.0095$) with cell parameters $a = 14.718(1) \text{ \AA}$, $b = 3.7042(2) \text{ \AA}$, $c = 16.0057(10) \text{ \AA}$, $\beta = 116.721(3)^\circ$, and a volume of $779.38(10) \text{ \AA}^3$. The structure of form II was solved and refined against the diffraction data obtained for the phase pure sample. For Rietveld refinement preferred orientation was described with a spherical harmonics function of 2nd order.

Diamond^[21] was used for the graphical representation of the results. PLATON^[22] was used to calculate hydrogen bond lengths.

Crystallographic data (excluding structure factors) for the structures in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. Copies of the data can be obtained free of charge on quoting the depository numbers CCDC-1040228 and CCDC-1040229 for form II and form III, respectively (Fax: +44-1223-336-033; E-Mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>).

Vibrational Spectroscopy: IR spectra were recorded with a JASCO FT/IR 6100 FT-IR spectrometer equipped with a DLATGS detector. Raman spectra were recorded on a LabRam spectrometer (with a resolution of 2 cm^{-1}), with a He-Ne laser (632.8 nm) (power of 15 mW for

excitation), and a $100\times$ objective. Due to high background fluorescence the spectra were background corrected.

Lattice Energy Calculations: The DFT-D calculations were carried out using the CASTEP code.^[16] The GGA with the PBE functional was used.^[17] A plane-wave basis set with an energy cutoff of 800 eV was applied and the core electrons were represented by ultra-soft pseudopotentials. K-points were distributed using a Monkhorst-Pack grid^[23] with a size of $2 \times 6 \times 2$ for form II and $4 \times 6 \times 1$ for form III. The semi-empirical dispersion correction was introduced using the Scheme of Tkatchenko and Scheffler.^[24] For the geometry optimization the convergence tolerances of energy, maximum force, and maximum displacement were $2.0 \times 10^{-5} \text{ eV per atom}$, $5.0 \times 10^{-2} \text{ eV \AA}^{-1}$ and $1.0 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, respectively. The allowed stress tolerance was 0.1 GPa .

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SPP 1415) for financial support as well as MetrioPharm AG for financial support, and Naluminolate samples, and the contributors from MetrioPharm for the prolific cooperation. We also thank Patrick Feicht for measurement of Raman spectra.

References

- [1] a) J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, J. Morris, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 859–866; b) S. L. Morissette, S. Soukasene, D. Levinson, M. J. Cima, O. Almarsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2180–2184.
- [2] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Clarendon Press, Oxford, **2002**.
- [3] C. Butterhof, T. Martin, W. Milius, J. Brey, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2013**, *639*, 2816–2821.
- [4] J. Thun, L. Seyfarth, J. Senker, R. E. Dinnebier, J. Brey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6729–6731.
- [5] A. J. Schmitz, *Ueber das Hydrazid der Trimesinsäure und der Hemimellithsäure (On the hydrazide of trimesic acid [1,3,5-benzenetricarboxylic acid] and of hemimellitic acid [1,2,3-benzenetricarboxylic acid])*, Heidelberg, **1902**.
- [6] H. O. Albrecht, *Z. Phys. Chem.* **1928**, *136*, 321–330.
- [7] L. L. Klopff, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1080–1083.
- [8] F. Bami, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, G. Lago, *Talanta* **2007**, *72*, 896–913.
- [9] a) J. R. Gionfriddo, K. S. Freeman, A. Groth, V. L. Scofield, K. Alyahya, J. E. Madl, *Vet. Ophthalmol.* **2009**, *12*, 325–332; b) G. Lungu, X. Kuang, G. Stoica, P. K. Wong, *Acta Virol. (Engl. Ed.)* **2010**, *54*, 27–32; c) V. L. Scofield, M. Yan, X. Kuang, S. J. Kim, P. K. Wong, *Immunol. Lett.* **2009**, *122*, 150–158; d) V. B. Rybakov, V. V. Chernyshev, K. A. Paseshnikchenko, V. D. Shelud'yakov, N. G. Belyakov, R. S. Bozviev, V. N. Mochalov, P. A. Storzhenko, *Crystallogr. Rep.* **2014**, *59*, 383–393.
- [10] a) J. Brey, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *World Intellectual Property Organization (WIPO)*, WO2011/107295A1, **2011**, pp. 1–55; b) J. Brey, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *European Patent Office (EPO)*, EP2542535B1, **2014**, pp. 1–30; c) J. Brey, W. Brysch, A. Kaiser, B. Ludescher, G. Maass, T. Martin, W. Milius, M. Niedermaier, *United States Patent Office (USTPO)*, US8772294B2, **2014**, pp. 1–18.
- [11] H. H. Paradies, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 1027–1031.
- [12] I. A. Guzei, M.-H. Kim, R. West, *J. Coord. Chem.* **2013**, *66*, 3722–3739.
- [13] F. H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B* **2002**, *58*, 380–388.

- [14] J. Bernstein, R. J. Davey, J. O. Henck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3441–3461.
- [15] A. A. Coelho, *TOPAS-Academic*, v5.0, Coelho Software, Brisbane, Australia, **2007**.
- [16] a) S. J. Clark, M. D. Segall, C. J. Pickard, P. J. Hasnip, M. J. Probert, K. Refson, M. C. Payne, *Z. Kristallogr. New Cryst. Struct.* **2005**, *220*, 567–570; b) E. R. McNellis, J. Meyer, K. Reuter, *Phys. Rev. B* **2009**, *80*.
- [17] J. P. Perdew, K. Burke, M. Enzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 79, 3865.
- [18] *Materials Studio*, v5.0.0.0, Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA, **2009**.
- [19] R. W. Cheary, A. Coelho, *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 109–121.
- [20] M. Ahtee, M. Nurmela, P. Suortti, M. Järvinen, *J. Appl. Crystallogr.* **1989**, *22*, 261–268.
- [21] *Diamond*, Crystal and Molecular Structure Visualization, v3, Crystal Impact - Dr. H. Putz & Dr. K. Brandenburg GbR, Bonn, Germany.
- [22] A. L. Spek, *Acta Crystallogr., Sect. D* **2009**, *65*, 148–155.
- [23] H. J. Monkhorst, J. D. Pack, *Phys. Rev. B* **1976**, *13*, 5188–5192.
- [24] A. Tkatchenko, M. Scheffler, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*.

Received: December 18, 2014
Published Online: January 28, 2015

Erklärung des Verfassers

Hiermit erkläre ich mich einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, 4. Mai 2016

Thomas Martin

