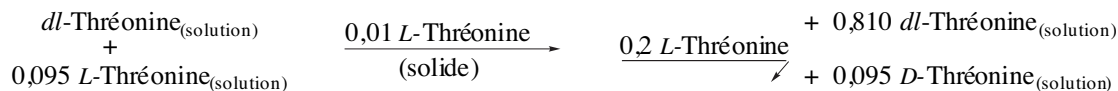


**MANIPULATION 104**

TYPE : Res

**D- et L- Thréonines (acides (2R,3S)-  
et (2S,3R)- 2-amino-3-hydroxybutanoïques)****Mots-clés** : conglomerat,  
cristallisation préférentielle,  
excès énantiomérique**Réaction** :  
dédoublément  
par entraînement**Réactifs** :  
D- et L- thréonines**Durée** : 1,5 à 2 h  
par cristallisation  
**Exigence** : R 1 / O 3

Réactifs	M. M.	R. à S.	d	$n_D^{20}$	$\Theta_f$ (°C)	$\Theta_{éb}$ (°C)	Sécurité
DL-threonine	119,12	1	-	0	244 (déc.)	-	-
D-threonine	119,12	0,095	-	+ 27	274 (!) (déc.)	-	-
L-threonine	119,12	0,01	-	- 27,4	256 (!) (déc.)	-	-

**Considérations générales sur le dédoublément par entraînement**

Cette technique repose sur la possibilité de cristalliser sélectivement un seul énantiomère d'un composé se présentant à l'état solide sous la forme d'un conglomerat, soit spontanément, à partir d'une solution sursaturée présentant un léger excès de cet énantiomère, soit après ensemencement de la solution sursaturée avec des cristaux de cet énantiomère<sup>1</sup>. *Le bon succès d'une cristallisation préférentielle reposant sur la non apparition de germes de l'autre énantiomère durant la cristallisation de l'énantiomère initialement excédentaire, il est primordial d'avoir présent à l'esprit l'importance de chaque paramètre expérimental sur la pérennité de cette condition.*

On appelle germe un état d'agrégation des molécules, qui, selon le mode d'évaluation, correspondrait à l'association de  $10^{13}$ , voire de seulement quelques centaines de molécules. En deçà de ce niveau, la taille de l'agrégat diminue réversiblement, au-delà, elle augmente irréversiblement, provoquant l'apparition de cristaux. Il est donc essentiel, dans la phase de sursaturation de la solution, de détruire la totalité des germes qui s'y trouvent, et comme la petitesse des germes les rend tout à fait invisibles à l'oeil nu, la limpidité de la solution n'est pas un critère de jugement. *La technique la plus fiable pour s'assurer de la destruction des germes consiste donc à préparer la solution par chauffage prolongé dans une zone de température où elle n'est plus saturée, c'est-à-dire plusieurs dizaines de degrés au-dessus de la température à laquelle sera conduite la cristallisation.*

La destruction de la totalité des germes étant supposée assurée lors de la mise en solution, la cristallisation du seul énantiomère excédentaire repose sur la réapparition dans le milieu des germes de cette seule espèce, ce qui en principe peut être réalisé en se plaçant à une température où lui seul se trouve en état de sursaturation. Une fois ces germes formés, la cristallisation s'amorce et il suffit ensuite d'abaisser encore la température pour précipiter la quantité désirée de cet énantiomère. En pratique, il est préférable d'ensemencer la solution avec l'énantiomère excédentaire pur.

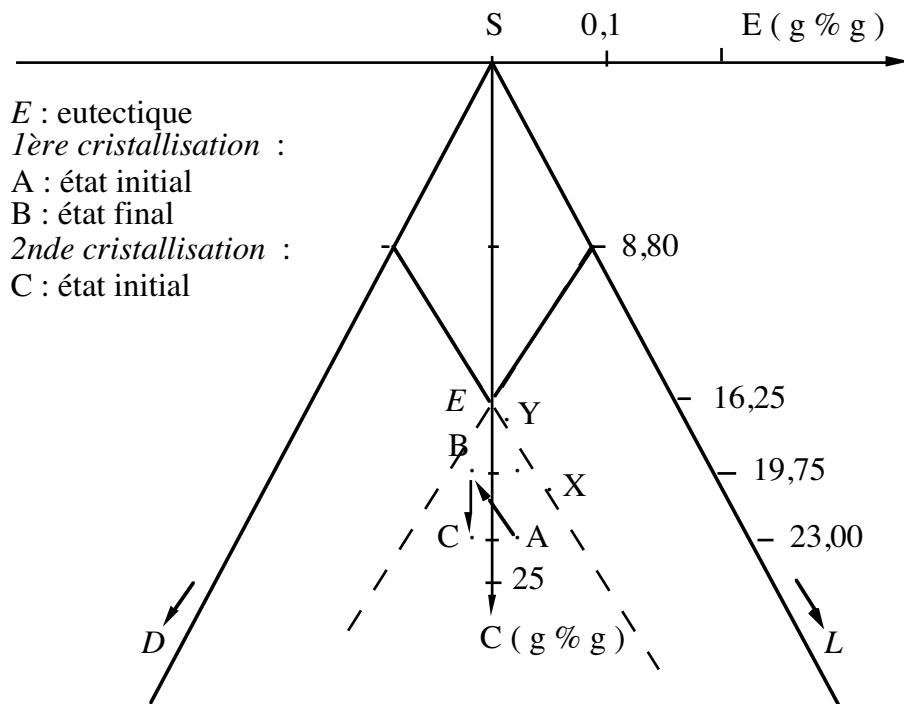
A ce point, un autre facteur doit être pris en compte : la durée de métastabilité des eaux-mères. Celle-ci doit être suffisante pour permettre la cristallisation de la quantité désirée de l'énantiomère initialement excédentaire, puis sa filtration, sans déclenchement de la précipitation de l'énantiomère resté en solution. Outre la nature du composé à dédoubler, trois autres paramètres ont une influence décisive sur ce facteur : la concentration initiale,  $c_0$ , de la solution, l'excès d'énantiomère,  $E$ , présent en solution et la vitesse d'agitation.

- la concentration initiale,  $c_0$ , de la solution : plus elle est élevée, plus l'instabilité de la solution est grande et plus la précipitation des deux énantiomères sera facile et rapide ;

- l'excès d'énantiomère présent en solution (défini par la relation  $E = (L-D) / (L+D+S)$  ou  $L$ ,  $D$  et  $S$  sont respectivement les masses d'énantiomère  $L$  ou  $D$  et de solvant engagées) : la tendance à la précipitation spontanée s'accroît avec la valeur absolue de  $E$  ;

Les valeurs possibles de  $c_0$  et de  $E_0$  dépendent de l'allure du diagramme de phase du mélange ternaire  $L+D+S$  figurant ci-après et qui a été construit à l'aide des solubilités dans l'eau à 20 °C des  $L$ - et  $D,L$ -thréonines : à tout moment, durant la cristallisation, les valeurs  $E_{(t)}$  et  $c_{(t)}$  doivent correspondre à des points inclus dans le triangle  $DEL$ , sans trop s'approcher des droites  $DE$  ou  $EL$ , au-delà desquelles la cristallisation est trop facile, ni trop s'éloigner de  $E$ , la sursaturation accroissant l'instabilité du système. La zone de travail optimale est le domaine du diagramme ternaire dans lequel il est possible d'obtenir d'une manière reproductible un énantiomère de bonne pureté optique avec la meilleure productivité. Elle doit être déterminée expérimentalement.

Figure 1 Diagramme ternaire thréonines / eau



- la vitesse d'agitation : la croissance d'un cristal fait appel à au moins trois processus distincts :

- (a) la diffusion des molécules de la solution vers l'interface liquide-cristal,
- (b) l'adsorption des molécules à la surface du cristal,
- (c) l'incorporation des molécules adsorbées au réseau cristallin.

Sans agitation, l'étape (a) est généralement limitante, tandis qu'au-delà d'une certaine vitesse d'agitation ce sont les étapes (b) et (c) qui déterminent un palier de la vitesse de cristallisation. Comme l'agitation est source de vibrations et de chocs susceptibles d'induire la nucléation de l'énantiomère en situation de plus forte sursaturation, il y a lieu d'en régler la vitesse à un niveau tout au plus suffisant pour que la diffusion ne soit plus le processus limitant<sup>2</sup>. L'efficacité d'une agitation dépendant essentiellement de la géométrie de l'appareillage, la vitesse optimum d'agitation doit être déterminée expérimentalement.

Les conditions décrites par Amiard et Velluz<sup>3</sup> ( $c_0 = 25\%$ ,  $E_0 = 2,5\%$ , pas d'ensemencement, ni d'agitation) sont un peu trop pointues. Par une légère modification des conditions initiales ( $c_0 = 23\%$ ,  $E_0 = 2,0\%$ ), le mode opératoire ci-après privilégie la reproductibilité et la pureté du produit au détriment de la productivité par cycle ; par contre la durée des cycles a été réduite de 60 à 40 min en utilisant une agitation et en ensemençant les solutions.

## Mode opératoire

### 1. Cristallisation préférentielle de la L-thréonine

Tarer un bécher étroit de 100 mL et y placer 10,00 g de thréonine racémique, 0,95 g de L-thréonine, 37,50 g d'eau distillée et un barreau magnétique de 20-25 mm de long. Couvrir le bécher à l'aide d'un verre de montre, puis chauffer au bain-marie à 80-85 °C, en agitant jusqu'à dissolution (1), (2). Après dissolution, maintenir encore à cette température pendant 5 min (3), puis remplacer le bain-marie à 80 °C par un autre à 30 °C, que l'on maintient à cette température par ajout de glace durant le refroidissement du bécher. Retirer le barreau à l'aide d'une canne magnétique et peser le bécher ; si la perte de masse n'est pas supérieure à 0,75 g, la solution est prête pour la cristallisation ; sinon, ajuster la masse d'eau à 36,75 g.

Mesurer rapidement l'indice de réfraction (4) et le pouvoir rotatoire ( $\alpha_{546}$ ) (5) de la solution ; remettre le contenu de la cellule de polarimétrie dans le bécher, peser ce dernier et porter à nouveau son contenu à 80-85 °C pendant 5 min, après l'avoir couvert avec le verre de montre (6), puis refroidir jusqu'à 30 °C comme précédemment. Contrôler le poids du bécher et, si nécessaire, rétablir sa valeur par ajout d'eau.

Ensemencer la solution avec 0,100 g de L-thréonine *finement broyée* (7) et placer le bécher dans un bain-marie thermostaté à 20 °C (1). Mettre en route l'agitation mécanique *préalablement* réglée à 100 tours/min (8), (9). Au bout de 20 min, prélever à la pipette à pointe cotonnée deux gouttes de solution (10) ; retirer le coton et déposer une goutte de solution dans la zone de mesure du réfractomètre (4). Mesurer l'indice de réfraction de la solution, puis à l'aide de la courbe  $c = f(n_D^{30})$  (voir fig. 2), déterminer la masse de solide ayant précipité (11), (12) ; en déduire la durée minimale de cristallisation nécessaire à la précipitation de 1,90 g de thréonine, en supposant que la vitesse de cristallisation est indépendante du temps (13), (14).

Quand la masse de thréonine précipitée atteint 1,90 g, arrêter l'agitation et filtrer la suspension sous pression réduite à l'aide d'un entonnoir de Buchner Ø 45 mm équipé de deux papiers filtres légèrement humectés d'eau et d'une fiole à vide *tarée au préalable*. Utiliser une spatule pour collecter les cristaux restés dans le bécher, compacter le solide sur les filtres et l'essorer pendant 1 min sous le vide de la trompe à eau *sans le rincer* (15). Mesurer sans délai le pouvoir rotatoire et l'indice de réfraction du filtrat (16), (17), puis remettre le contenu de la

cellule dans la fiole à vide et placer celle-ci en attente dans le bain-marie à 30 °C. Etaler le solide dans une boîte de Pétri tarée au préalable, peser et sécher à *poids constant* dans une étuve ventilée à 60-85 °C (environ 30 min) (18).

## II. Cristallisation préférentielle de la D-thréonine

Peser la fiole à vide pour déterminer la masse de la solution qui s'y trouve et, à l'aide du graphe de la fig. 2, déterminer sa concentration ; en déduire les masses respectives d'eau et de thréonines, puis calculer la masse d'eau  $m_e$  qu'il sera éventuellement nécessaire de rajouter pour rétablir la concentration initiale de la solution (23 %) après ajout des 1,90 g de ( $\pm$ )-thréonine destinés à remplacer la thréonine précipitée dans la première cristallisation.

Peser 1,90 g de ( $\pm$ )-thréonine dans un bécher étroit de 100 mL propre et sec *taré au préalable*. Y ajouter un barreau magnétique, puis la solution contenue dans la fiole à vide en prenant soin de ne pas éclabousser la paroi de l'erenmeyer. Rincer la fiole à vide avec  $m_e + 1$  à  $m_e + 2$  g d'eau, puis procéder exactement comme en I. pour la mise en solution et les mesures réfractométrique(s) et polarimétrique. Ensemencer la solution avec 0,100 g de D-thréonine *finement broyée* (7) et procéder comme en I. pour la cristallisation (19).

## Résultats

a) Masse de L-thréonine collectée comprise entre 1,6 et 2,1 g (correspondant à une masse de L-thréonine précipitée de 1,5 à 2,0 g) :  $[\alpha]_D = -26,9 / -28,0$ ,  $[\alpha]_{546} = -30,8 / -32,1$ , correspondant à une pureté optique de 95-99 % (20), (21), (22).

b) Masse de L-thréonine collectée comprise entre 2,1 et 2,4 g (correspondant à une masse de L-thréonine précipitée de 2,0 à 2,3 g) :  $[\alpha]_D = -22,4 / -27,7$ ,  $[\alpha]_{546} = -26,0 / -31,8$ , correspondant à une pureté optique de 80-98 % (20), (21), (22).

**Purification** Inutile.

## Notes expérimentales

- (1) Assujettir le bécher au statif à l'aide d'une pince et d'une noix.
- (2) Régler la vitesse d'agitation de manière à éviter les projections de solution sur la paroi du bécher : l'évaporation de l'eau y laisserait ensuite des cristaux des deux thréonines susceptibles d'induire ultérieurement leur cristallisation simultanée.
- (3) Cette phase de chauffage vise à la destruction des germes. Se reporter au principe pour des explications supplémentaires.
- (4) Le réfractomètre doit être muni d'une circulation d'eau thermostatée à 30 °C, température à laquelle la mesure de l'indice peut être réalisée *assez* facilement sans précipitation de la thréonine. La valeur de l'indice de réfraction à ce stade de la manipulation est de 1,3744 (voir fig. 2).
- (5) N'effectuer cette mesure qu'après obtention de la bonne valeur pour l'indice de réfraction, en prélevant en une fois, à l'aide d'une pipette graduée de 10 mL à *pointe bordée*, la quantité de solution nécessaire au remplissage de la cellule, afin de limiter les risques de cristallisation spontanée. Vider la cellule dans le bécher après la mesure. La valeur de  $\alpha_{546}$  est de  $-0,72^\circ$  correspondant à un excès de l'énantiomère L de 1,995 % (voir fig. 3).
- (6) Le contact de la solution avec des cellules de polarimétrie présentant des surfaces dépolies est fréquemment suffisant pour induire la cristallisation de la thréonine ; il est donc prudent de procéder systématiquement à un chauffage visant à la destruction des germes.

(7) La vitesse de cristallisation est proportionnelle à la surface des cristaux exposée à la solution<sup>4</sup>.

(8) La vitesse de cristallisation croît avec la vitesse d'agitation, mais au-delà d'une certaine valeur, qui doit être déterminée expérimentalement, une agitation trop rapide induit une cristallisation de l'énantiomère resté en solution. Le système d'agitation doit être exempt de vibration<sup>5</sup>.

(9) La forme et la surface du système d'agitation influent considérablement sur son efficacité. La palette en Téflon utilisée a la forme d'un trapèze de 27 mm à la base, 15 au sommet, haut de 27 mm ; elle est immergée sur 25 mm.

(10) Ce prélèvement est effectué sans arrêter l'agitation.

(11) Soient  $M_t$  la masse de la solution à l'instant  $t$ ,  $L_t$  et  $D_t$  les masses de *L*- et de *D*-thréonines en solution à l'instant  $t$ ,  $T_t$  la somme de  $L_t + D_t$  et  $S$  la masse du solvant. La concentration de la solution à l'instant  $t$  est donnée par la relation :

$$c_t = (L_t + D_t) / (L_t + D_t + S) = T_t / (T_t + S) \text{ d'où } T_t = c_t \cdot S / (1 - c_t)$$

La masse de thréonine précipitée à l'instant  $t$ ,  $m_t$ , est égale à  $T_0 - T_t = c_0 M_0 - T_t$ , d'où :

$$m_t = [1 - c_t (1 - c_0)] / c_0 (1 - c_t)$$

(12) La mesure de l'indice de réfraction ne permettant pas de connaître la nature (*L* ou *D*) de la thréonine qui cristallise, *la bonne pratique consiste à suivre la cristallisation simultanément par réfractométrie et polarimétrie*, mais la nécessité de recycler l'importante fraction de la solution utilisée pour cette mesure impose l'emploi d'une cellule qui ne déstabilise pas la solution.

(13) Avec le système d'agitation décrit dans la note (9), la cristallisation de 1,90 g de thréonine prend environ 40 min. La vitesse de cristallisation décroissant sensiblement avec le temps, l'extrapolation de la durée de cristallisation à partir de la mesure à 20 min donne toujours une valeur par défaut. Au-delà d'une durée de cristallisation de 50 min, la pureté optique du solide, à masse précipitée identique, diminue fréquemment.

(14) A ce stade de la précipitation, l'excès d'énantiomère

$$E_t = (L_t - D_t) / (L_t + D_t + S)$$

est légèrement plus qu'inversé, ce qui permet théoriquement de créer un état symétrique de l'état initial par simple ajout de 1,90 g de thréonine racémique ; lorsque la masse de thréonine précipitée est comprise entre 2,10 et 2,30 g, sa pureté optique varie aléatoirement dans une plage beaucoup plus importante (80-95 % au lieu de 95-99 %).

(15) La thréonine est trop soluble dans l'eau - même glacée - pour envisager d'éliminer les eaux-mères imprégnant le solide par rinçage à l'eau. Il est donc primordial pour la qualité de l'excès énantiomérique que l'essorage soit très soigné. Typiquement, la perte de masse au séchage est de 2,5 à 5 %, ce qui correspond grossièrement à l'apport de 0,3 à 0,6 % de *D*-thréonine dans la phase solide et donc à une perte de pureté énantiomérique double de ces valeurs (*La perte de masse après une filtration sur verre fritté est sensiblement plus élevée*).

(16) Si la cristallisation du filtrat est amorcée, chauffer la fiole à 80 °C, puis ramener à 30 °C avant d'effectuer la mesure.

(17) Typiquement, les valeurs du pouvoir rotatoire et de l'indice de réfraction du filtrat sont 0,72-0,75° ( $\alpha_{546}$ ) et 1,3684 ( $n_D^{30}$ ), correspondant respectivement à un excès d'énantiomère *D* de 2,00 à 2,07 % (voir fig. 3) et à une concentration de 19,75 %.

(18) Un séchage incomplet conduit bien évidemment à une valeur de la pureté optique erronée par défaut (15). (La masse de thréonine est égale à la masse de thréonine précipitée + 0,1 g)

(19) Après cette seconde cristallisation, un simple ajout de thréonine racémique permet théoriquement de reconstituer le système initial du paragraphe I. En pratique, les prélèvements et transvasements répétés ont fait perdre près d'un gramme à la solution.

(20) Les résultats sont identiques pour la *D*-thréonine, au signe du pouvoir rotatoire près.

(21) Valeurs retenues pour les pouvoirs rotatoires spécifiques des *D*- et *L*- thréonines énantiomériquement pures :  $[\alpha]_D^{26,0} = \pm 28,3$ ,  $[\alpha]_{546} = \pm 32,4$ . Conformément à la tendance actuelle les pouvoirs rotatoires sont donnés sans unité, bien que leur dimension soit  $\text{deg L}^2 \text{M}^{-1}$  (unité :  $\text{deg dag}^{-1} \text{cm}^2$ )<sup>6</sup>.

(22) On notera que la pureté optique de la thréonine précipitée paraît très souvent un peu supérieure à celle des cristaux ayant servi à l'ensemencement de la solution, dont la pureté chimique n'est que de 98 %.

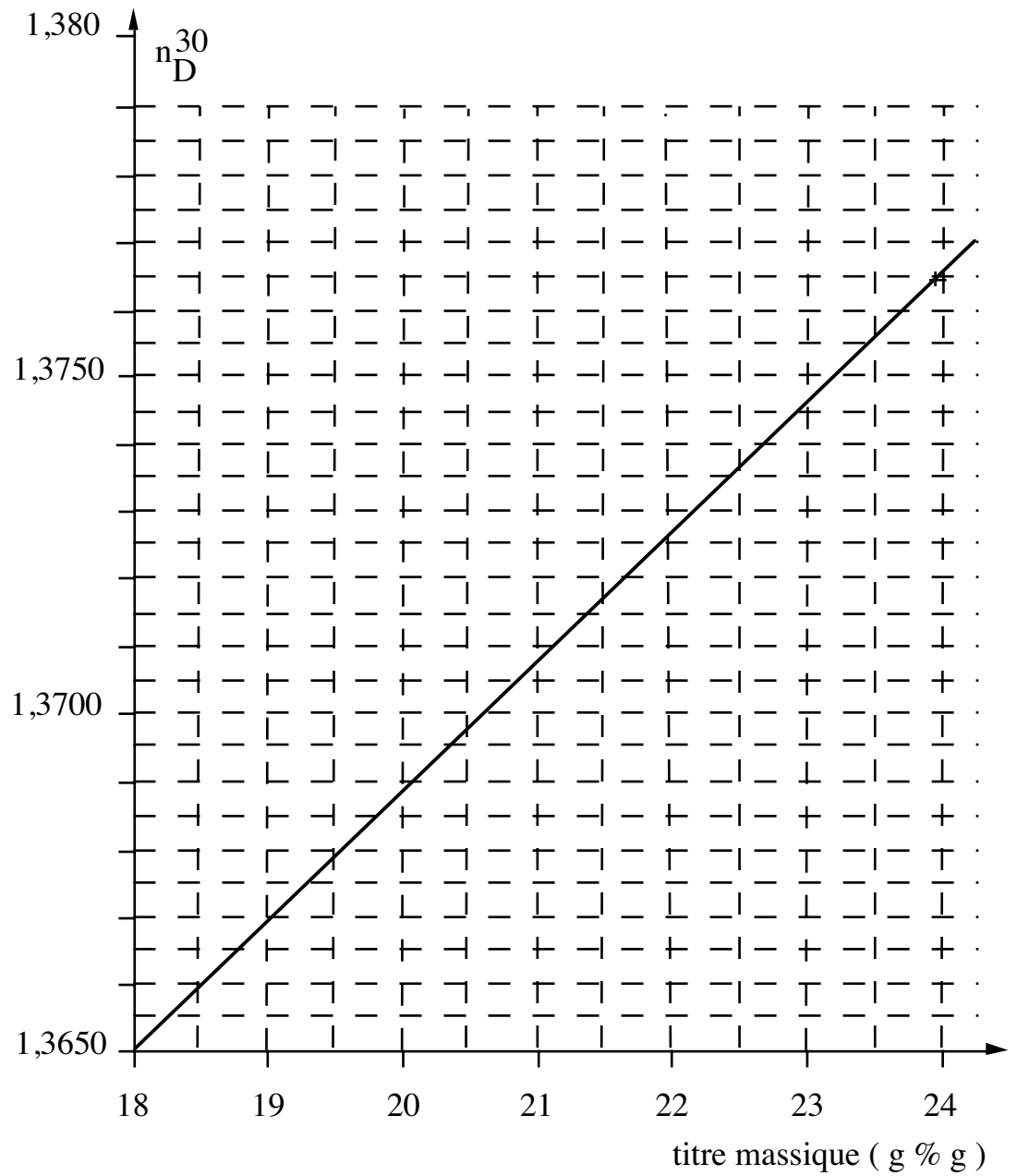
## Le produit

La *L*-thréonine est un  $\alpha$ -aminoacide dit essentiel, indispensable à la croissance et particulièrement abondant (4 à 5 %) dans la caséine, le lait écrémé et les oeufs entiers. La *dl*-thréonine est un solide présentant la particularité d'être un conglomerat<sup>2</sup>, c'est à dire un mélange de cristaux constitués par un assemblage de molécules homochirales, soit *D*, soit *L*. Cette particularité cristallographique est une condition nécessaire, mais non suffisante, pour pratiquer un dédoublement par entraînement, c'est-à-dire la cristallisation préférentielle d'un seul énantiomère dans une solution sursaturée présentant un faible excès de cet énantiomère. Le diagramme ternaire des thréonines et de l'eau est donné dans le préambule (fig. 1). Le rapport des solubilités de la *dl*-thréonine sur celle d'un énantiomère pur est de 1,85, une valeur favorable à la pratique de la cristallisation préférentielle, parce que la valeur de la sursaturation de l'énantiomère restant en solution décroît proportionnellement à BY/AX durant la cristallisation de l'autre énantiomère, ce qui limite les risques d'une cristallisation spontanée.

## Bibliographie et notes

1. E. L. Eliel, S. H. Wilen et L. N. Mander, *Stereochemistry of Organic Molecules*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, p. 304. J. Drouin, *Introduction à la chimie organique*, Librairie du CEDRE, Corbas, 2005, p. 89.
2. Ibid, p. 1196, 299.
3. L. Velluz et G. Amiard, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1953, 903.
4. J. Jacques, A. Collet et S. H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley & Sons, New York, 1981, p. 238.
5. Ibid, p. 240, fig. 15.
6. E. L. Eliel, S. H. Wilen et L. N. Mander, *Stereochemistry of Organic Molecules*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, p. 1207, 1073.

Figure 2 Indice de réfraction des solutions aqueuses de *dl*-thréonine en fonction de leur titre massique (g / 100 g de solution)



**Figure 3 Pouvoir rotatoire des solutions aqueuses de thréonine en fonction de l'excès d'énantiomère L**

