

Résonance magnétique nucléaire du deutérium en abondance naturelle dans les cristaux liquides chiraux

Franchir une nouvelle frontière dans l'analyse de la chiralité

La mesure de la pureté énantiomérique est devenue une priorité analytique associée au développement incontournable de la synthèse asymétrique. Pour répondre aux attentes et exigences croissantes des chimistes organiciens dans ce domaine, nous proposons une méthodologie originale fondée sur l'utilisation de la RMN. 1D ou 2D du deutérium en abondance naturelle dans les milieux orientés chiraux polypeptidiques. Le champ d'applications étendu et la flexibilité de cette approche en font un nouvel outil compétitif dans l'analyse de la chiralité, offrant une véritable alternative aux méthodes utilisées habituellement dans les laboratoires.

Un impératif analytique et humain !

La vente de molécules chirales énantiomériquement pures et médicalement actives représentent un chiffre d'affaire mondial d'environ 100 milliards d'euros. C'est pourquoi durant ces vingt dernières années, la synthèse organique asymétrique a connu un développement considérable. L'attribution du Prix Nobel de Chimie 2001 à trois chimistes ayant contribué à ces recherches est la preuve indéniable de cet enjeu. En corrolaire, et sous la contrainte des autorités sanitaires européennes et américaines, la détermination de la composition d'un mélange, c'est à dire la mesure des excès énantiomériques (e.e.) par chromatographie en phase liquide (HPLC), gazeuse (GC), ou par résonance magnétique nucléaire (RMN), est devenue un challenge tout aussi important. La raison principale de ces contrôles stricts est que la bioactivité de deux énantiomères peut être très différente, voire même radicalement opposée. Pour s'en convaincre, il suffit de rappeler la tragédie de la Thalidomide qui marqua l'histoire de la médecine à la fin des années 1950. En effet, ce médicament prescrit aux femmes enceintes pour traiter le stress et les nausées matinales s'est révélé être aussi un agent tératogène responsable de nombreuses malformations congénitales.

La raison en était simple : la présence simultanée dans le médicament des deux énantiomères de la molécule chirale utilisée comme principe actif.

RMN et chiralité

Deux énantiomères ont des propriétés magnétiques identiques, par conséquent la RMN est incapable de discriminer leurs signaux lorsqu'ils sont dissous dans un solvant achiral. En revanche les propriétés RMN de deux diastéréoisomères sont différentes quel que soit leur environnement, qu'il soit chiral ou achiral. Pour observer des énantiomères par RMN, il est donc nécessaire de les faire réagir ou interagir avec une entité chirale énantiomériquement pure, afin de former des diastéréoisomères, respectivement, stables ou temporaires, à l'origine de signaux RMN distincts. Trois méthodes analytiques sont actuellement très employées dans les laboratoires. Elles mettent en oeuvre des agents chiraux de dérivation, de complexation, ou de solvatation [2]. Cependant ces outils ne permettent pas toujours de répondre aux problèmes spécifiques des chimistes.

L'approche que nous proposons consiste à utiliser des agents chiraux d'orientation, c'est-à-dire des milieux organisés anisotropes chiraux tels que les cristaux liquides

chiraux (CLC), comme solvant de RMN [3]. L'intérêt est de bénéficier d'une matrice moléculaire présentant simultanément certaines propriétés du solide, telles que l'anisotropie, et la fluidité des liquides, condition *sine qua none* pour obtenir des spectres RMN haute résolution. Le principe de la reconnaissance chirale dans un CLC repose sur le fait que les interactions énantiosélectives entre les molécules orientées du solvant et des deux énantiomères sont différentes, et génèrent un effet d'orientation différentielle suffisamment grand pour séparer les signaux RMN de ces derniers.

Ce concept n'est pas nouveau puisqu'il fut introduit en 1968, dès le début du développement de la RMN [4]. Cependant le cristal liquide chiral utilisé à l'époque présentait beaucoup d'inconvénients (peu homogène, mauvais solvant organique, faible énantiosélectivité,...), et la méthode quoique très innovante, n'eut aucun succès auprès des chimistes organiciens.

Un cristal liquide chiral idéal ?

Il est toujours difficile de convaincre la communauté des chimistes de la pertinence d'un nouvel outil analytique. Cela devient impossible si la méthode proposée n'est pas performante, simple à mettre en œuvre

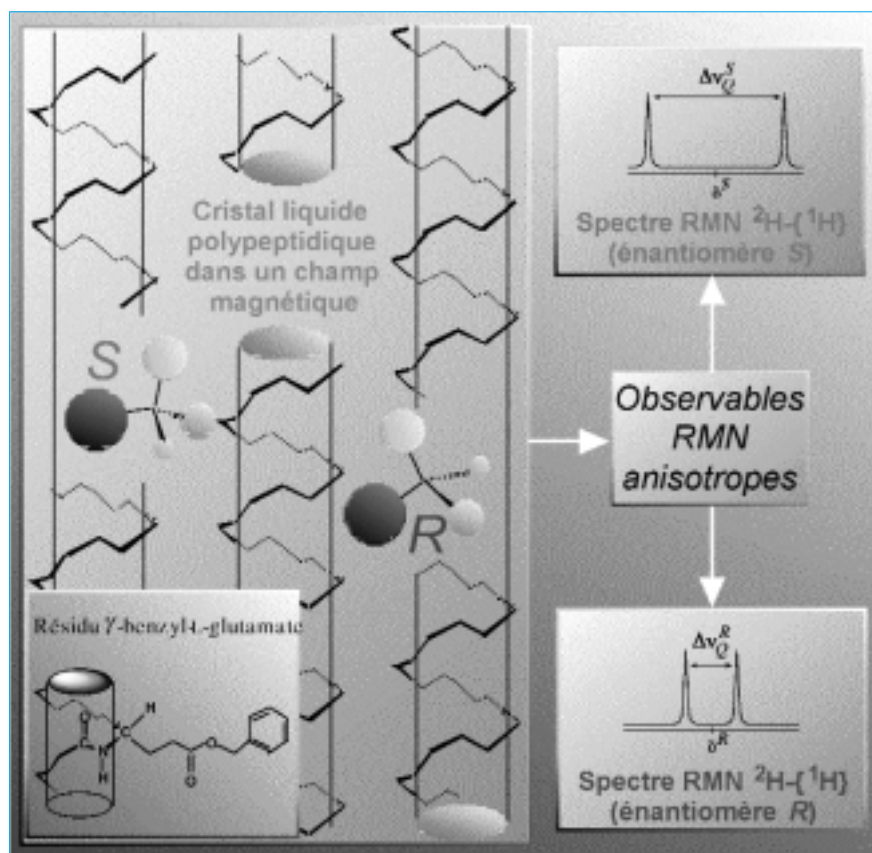


Fig. 1. Principe de la différenciation chirale par RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle dans les CLC polypeptidiques.

et capable de répondre aux multiples exigences des utilisateurs. Dans notre cas, le problème était de trouver un CLC capable de dissoudre une très large gamme de molécules organiques, et suffisamment énantio-sélectif pour discriminer des énantiomères quelle que soit leur nature chimique ou leur structure. Après divers essais, nous avons montré que des solutions organiques de poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG) ou de poly- ϵ -carbobenzyloxy-L-lysine (PCBL), deux homopolypeptides de synthèse (commercialisés par Sigma), pouvaient répondre à ces deux critères prioritaires (fig. 1).

Un avantage indéniable associé à ces polymères chiraux réside dans leur capacité à former une phase cristal-liquide (sur une large plage de température) avec la plupart des solvants organiques usuels tels que le chloroforme, le dichlorométhane, le DMF... ce qui offre une très grande flexibilité à cette technique [3]. Par ailleurs, la mésophase ainsi formée supporte une grande quantité de soluté (10-200 mg) avant de perdre ses propriétés anisotropes, ce qui est un atout essentiel pour analyser des composés de haut poids moléculaire ou détecter des noyaux magnétiquement actifs de faible abondance isotopique (^{13}C , ^2H), comme nous le verrons par la suite.

RMN du deutérium

Les discriminations énantiomériques observées sur les spectres RMN enregistrés en milieu orienté chiral ont pour origine une différence dans les termes RMN dits « anisotropes » (termes nuls en moyenne en milieu isotrope !), notamment l'interac-

tion quadrupolaire (noyaux de spin $I > 1/2$), dipolaire ou l'anisotropie de déplacement chimique. En pratique, cette reconnaissance chirale se traduit par l'existence de deux spectres, un par énantiomère. Lorsque les séparations spectrales sont suffisantes, la détermination de la composition énantiomérique du mélange par simple intégration des signaux RMN devient possible.

A ce stade de la réflexion, une question cruciale se pose : quel noyau de la molécule doit on détecter pour visualiser les discriminations chirales recherchées ? En effet, la complexité de certains spectres de RMN en milieu orienté (*cas de l'hydrogène*) et/ou la sensibilité des interactions anisotropes vis-à-vis d'une différence d'ordre orientationnel n'est pas équivalente selon le noyau détecté. Du point de vue de la différenciation chirale, c'est l'interaction quadrupolaire qui est la plus sensible [4]. C'est pourquoi les premières expériences menées au laboratoire consistaient à enregistrer le spectre deutérium (spin $I = 1$) découplé des protons ($^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$) de molécules chirales monodeutérees. L'analyse de ces spectres est très simple puisque si les deux énantiomères sont orientés différemment dans le CLC, nous observons généralement deux doublets quadrupolaires distincts, ($\Delta\nu_Q^R \neq \Delta\nu_Q^S$), centrés approximativement sur le même déplacement chimique ($\delta^R \approx \delta^S$) (fig. 1).

Les résultats obtenus par cette première approche furent remarquables, puisque la discrimination chirale fut observée dans 90 % des cas, quelle que soit la classe de molécules chirales étudiées (polaire ou apolaire, rigide ou flexible, avec ou sans atome de carbone asymétrique), ce qui

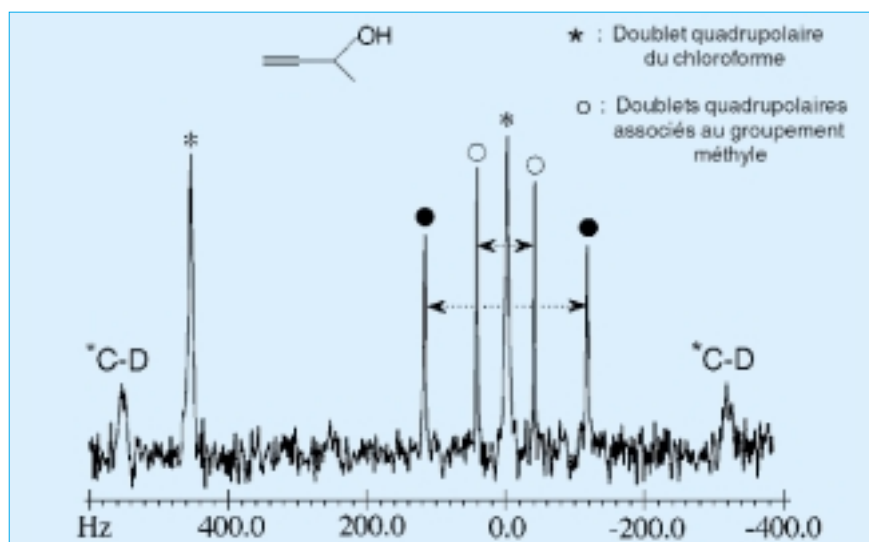


Fig. 2. Spectre 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle du (\pm)-but-3-yn-2-ol dissous dans une solution PBLG/ CHCl_3 (T = 301K).

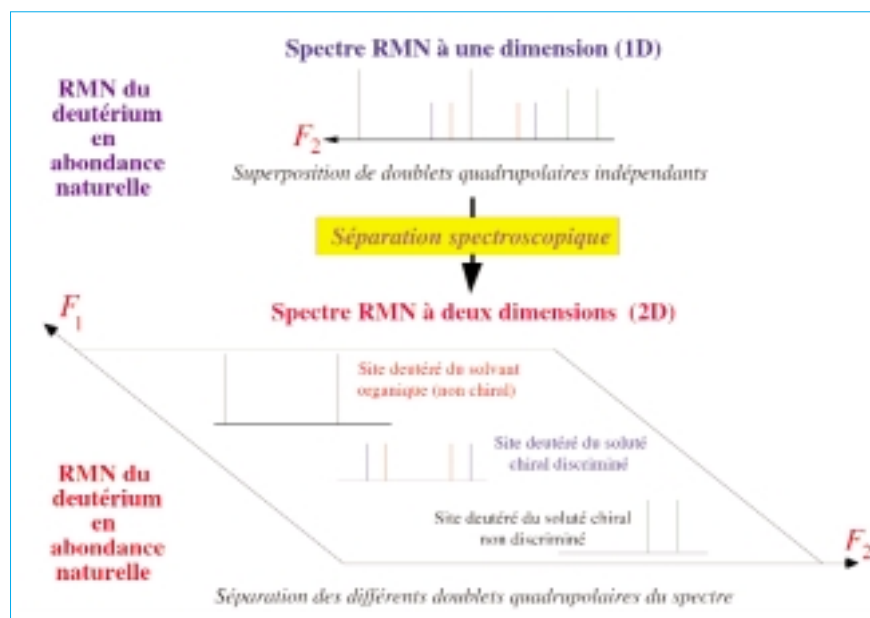


Fig. 3. Principe de la simplification de l'analyse des spectres 1D $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle.

confère à cette méthode un caractère très généraliste que ne possèdent pas les techniques RMN classiques [5].

Deutérium en abondance naturelle : une hérésie ?

La deutération sélective d'une molécule n'est intéressante que si cette étape n'est ni trop fastidieuse, ni trop coûteuse, et si elle ne risque pas de modifier la composition énantiomérique du mélange étudié. De plus, seul le site marqué de la molécule est observé, mais peut se révéler être un mauvais choix s'il ne montre pas d'énantiomère discrimination spectrale suffisante pour une mesure des e.e. Heureusement la nature est très généreuse car, en fait, le deutérium, premier isotope de l'hydrogène, est présent naturellement à hauteur de 0,015 % dans toutes molécules organiques. Même si cette proportion semble très faible, la sensibilité des spectromètres RMN de routine permet leur détection. Pour s'en convaincre, la figure 2 présente le premier spectre $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle d'une molécule chirale, le (\pm)-but-3-yn-1-ol, dissoute dans la phase PBLG/chloroforme [6]. Ce spectre (obtenu avec 200 mg de soluté !) a été enregistré en accumulant le signal pendant 18 heures sur un vieux spectromètre de 5,9 T (soit une fréquence de résonance de 250 MHz). Même si ce spectre affiche un rapport signal-sur-bruit (S/B) plutôt médiocre, il montre une parfaite discrimination des deux énantiomères (deux doublets visibles) au niveau des deutériums du groupement méthyle de la molécule.

Depuis ce premier spectre obtenu fin 1997, la qualité des résultats a nettement progressé en terme de rapport S/B, de quantité de soluté utilisée, (80 à 100 mg), et de temps d'acquisition (12-15 heures) grâce à l'utilisation d'un spectromètre moderne de 9,4 T (400 MHz) et au partenariat avec la société Bruker, premier constructeur mondial de spectromètres, qui a développé pour nos recherches une sonde de mesure RMN ^2H spécifique optimisée [7].

Une approche RMN bidimensionnelle

Contrairement aux molécules sélectivement marquées, nous observons simulta-

nément tous les deutériums d'une molécule en RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle. Cette situation accroît ainsi la possibilité de visualiser une discrimination chirale, mais complique considérablement les spectres. Pour y remédier, différentes expériences RMN bidimensionnelles (2D) de type QUOSY (« QUadropole Ordered spectroscopy »), telle que la séquence 2D Q-COSY, ont été mises au point afin d'éclater l'information spectrale sur deux domaines de fréquence et donc simplifier l'analyse des spectres 1D (fig. 3) [7,8]. Cette solution permet de corréler les deux composantes de chaque doublet quadrupolaire, puis d'attribuer les différents doublets sur la base de leur déplacement chimique. A cet égard le spectre 2D du (\pm)-pent-4-èn-2-ol présenté sur la figure 4 est significatif et illustre concrètement la simplification apportée par une présentation bidimensionnelle des informations quadrupolaires. Sur ce second exemple, tous les sites deutérés de la molécule montrent une différenciation chirale. Une telle situation est idéale car elle permet de choisir le meilleur site (*en terme de séparation spectrale et de rapport S/B*) pour mesurer la composition énantiomérique de l'échantillon avec une incertitude variant entre 3 et 10 % en fonction du site deutéré considéré. Même si cette précision peut sembler insuffisante, les mesures quantitatives obtenues apportent des informations essentielles aux chimistes.

Le défi des alcanes chiraux

Un avantage indéniable de la RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle est de pouvoir étudier l'énantioselectivité du polypeptide vis-à-vis d'une large gamme de molécules, et

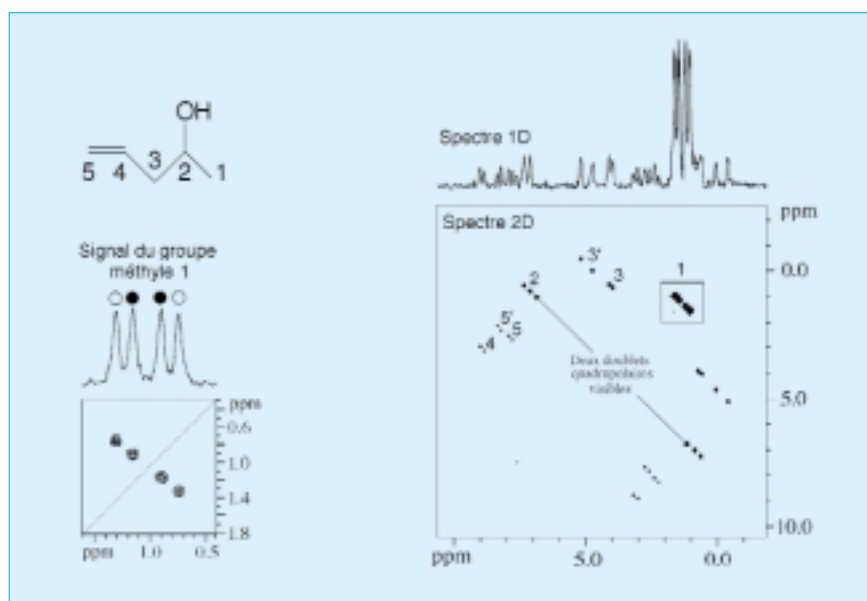


Fig. 4. Spectre 2D Q-COSY $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ en abondance naturelle du (\pm)-pent-4-èn-2-ol dissous dans une solution PBLG/ CHCl_3 ($T = 298\text{K}$).

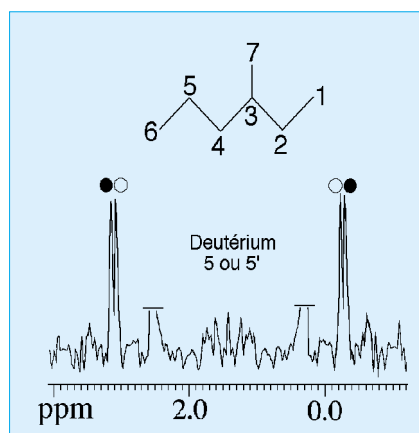


Fig. 5. Discrimination chirale du (±)-3-méthylhexane dans une solution PBLG/CHCl₃ (T = 298 K). Signaux deutérium extraits du spectre 2D Q-COSY ²H-¹H en abondance naturelle.

ceci à moindre coût puisque aucune modification chimique des molécules choisies n'est requise. Parmi les molécules intéressantes, le cas des hydrocarbures chiraux est très particulier car les méthodes RMN traditionnelles ne permettent pas de discriminer leurs énantiomères, et seules quelques techniques plutôt « exotiques » et très spécifiques sont décrites dans la littérature. C'est avec succès que ce défi fut relevé puisque la plupart des hydrocarbures chiraux testés ont été différenciés [7], y compris les alcanes flexibles ramifiés tels que le (±)-3-méthylhexane (fig. 5), qui est la plus simple des molécules chirales mais aussi la plus difficile à différencier par RMN [9].

L'énantiosélectivité du polypeptide vis-à-vis des alcanes chiraux nous a apporté des éléments nouveaux pour mieux comprendre les mécanismes de discrimination chirale mis en jeu. A terme, cet axe de recherche, beaucoup plus théorique, devrait nous permettre de prévoir *a priori* la configuration absolue (*R* ou *S*) des molécules chirales étudiées à partir de leur spectre de RMN.

Les premières applications analytiques

La synthèse totale de molécules bioactives passent irrémédiablement par la préparation de précurseurs chiraux de faible poids moléculaire, mais dont le contrôle de la pureté énantiomérique est souvent crucial pour la suite de la synthèse asymétrique. C'est à ce stade que notre approche peut intervenir le plus efficacement, compte tenu de la sensibilité accessible avec le plus moderne des spectromètres de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (un 400 MHz !). C'est une équipe de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, basée à Gif-sur-Yvette et dirigée par le Dr. J.-M. Campagne, qui nous a pro-

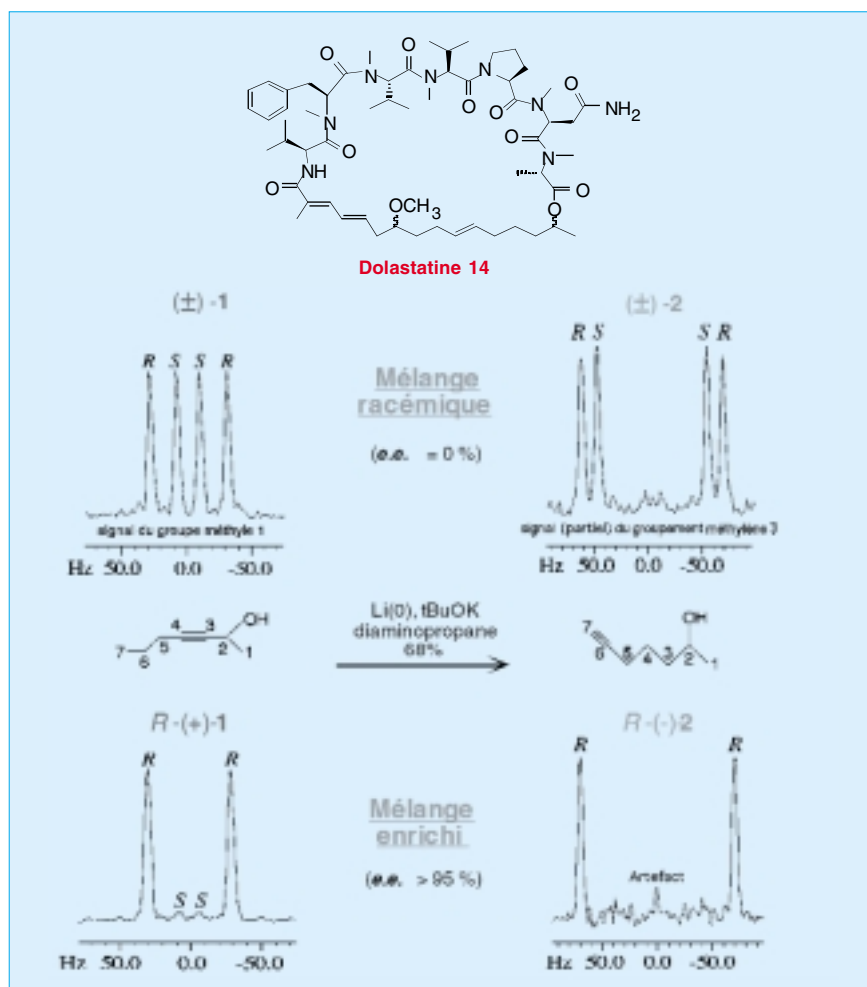


Fig. 6. Exemple de contrôle de la pureté énantiomérique d'un mélange. Signaux deutérium extraits des spectres 2D Q-COSY ²H-¹H en abondance naturelle des composés **1** et **2** dans une solution PBLG/CHCl₃ (T = 300K).

posée une première application, dans le cadre de la synthèse de la dolastatine 14 (fig. 6), substance bioactive prometteuse dans le traitement de certains cancers. Ainsi, le *R*-(-)-hept-6-yn-2-ol (**2**) synthétisé à partir du *R*-(+)-hep-3-yn-2-ol (**1**), a été identifié comme un précurseur énantiopur intéressant. L'objectif de ce travail consistait donc à contrôler que la réaction de migration de la triple liaison n'était pas racémisante. Dans une première étape, nous avons donc vérifié par RMN 2D ²H-¹H en abondance naturelle que les composés (±)-**1** et (±)-**2** étaient effectivement énantiomères dans la phase PBLG/chloroforme. Nous avons ensuite enregistré le spectre Q-COSY ²H-¹H en abondance naturelle du composé *R*-(-)-**2** synthétisé à partir du *R*-(+)-**1** enrichi à plus de 95 %. L'obtention d'un doublet quadrupolaire unique pour *R*-(-)-**2** indique sans ambiguïté que l'e.e. de l'échantillon est supérieur à 95 %, et montre ainsi que la réaction est non racémisante [10].

Et demain ?

Les esprits chagrins affirmeront que cette stratégie analytique manque chroniquement de sensibilité, et que son domaine d'applications restera limité aux molécules de faible poids moléculaire. Cependant, cet argument est très discutable dans la mesure où la sensibilité d'un spectromètre RMN est proportionnelle à l'intensité de son champ magnétique élevée à la puissance 3/2. Actuellement, le champ magnétique des spectromètres commerciaux les plus puissants atteint 21,2 T (900 MHz), soit une sensibilité accrue d'un facteur proche de 3,4 comparée à notre spectromètre RMN [3]. Par ailleurs, l'utilisation de cryosondes (sondes RMN refroidies par de l'hélium gaz à la température de 22 K), récemment développées (et commercialisées) par la société Bruker afin de limiter le bruit électronique et améliorer la détection du signal RMN, conduit à un gain en sensibilité d'un facteur 4 pour un moindre coût financier. A titre de comparaison, un spec-

tromètre de 14.1 T (600 MHz) muni d'une crysonde possède la même sensibilité qu'un spectromètre de 35,2 T (1,5 GHz)... qui n'existe malheureusement pas encore ! Ne doutons donc pas que l'utilisation conjointe de spectromètres opérant à « haut champs » et d'une crysonde deutérium permettra de résoudre immédiatement les problèmes de sensibilité, rendant ainsi cet outil analytique incontournable.

Références bibliographiques :

- [1] A.L. Eliel, A.H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Ed. John Wiley and Sons, **1994**.
- [2] D. Parker, *Chem Rev.*, **1991**, 91, 1441.
- [3] M. Sarfati, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *Chem. Commun.*, **2000**, 2069. C. Aroulanda, M. Sarfati, J. Courtieu, P. Lesot, *Enantiomer*, **2001**, 6, 281.
- [4] E. Sackmann, S. Meiboom, L.C. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 2183.
- [5] I. Canet, J. Courtieu, A. Loewenstein, A. Meddour, J.M. Péchiné, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6520.
- [6] P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, *Tetrahedron : Asym.* **1998**, 9, 1871.
- [7] P. Lesot, M. Sarfati, D. Merlet, J. Courtieu, B. Ancian, C. Brevard, *Bruker Report*, **2001**, 149, 29.
- [8] D. Merlet, B. Ancian, J. Courtieu, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5249.
- [9] M. Sarfati, J. Courtieu, P. Lesot, *Chem. Commun.*, **2000**, 1113.
- [10] A. Parenty, J.-M. Campagne, C. Aroulanda, P. Lesot, *Org. Lett.*, **2002**, 4, 1663.

Philippe LESOT

Laboratoire de Chimie Structurale
Organique
CNRS UMR 8074
ICMMO, Bât. 410
Université de Paris-Sud (XI)
91405 Orsay
Tél. : 01 69 15 47 59
Fax : 01 69 15 47 70
Mél : philesot@icmo.u-psud.fr