

MA-540-105-1

la République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB -Blida



Faculté des Science
Département de Chimie

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Option : Physico-Chimie des milieux dispersés et des formulations

Thème

Séparation des isomères d'isoxazolidines par chromatographie

Présenté par :

AHMED MESSAOUD FATIMA

Soutenu publiquement le 23 /11/2015 devant le jury composé de:

Mme N.SALHI.	professeur	USDB Présidente de jury
Mr A.BOULAHOUCHE	MAA	USDB Examineur
Mme K.HAMZA AIT YAHIA	MAA	USDB Directrice de mémoire
Mme A.BESSI	MAA	USDB Co- promotrice

Promotion 2014/2015

MA-540-105-1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Allah de m'avoir aidée à réaliser ce mémoire.

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de recherche de l'école normale supérieure de vieux Kouba, et au laboratoire de chimie, département de Chimie
Faculté des Sciences.*

Je veux tout d'abord remercier Mme HAMZA Kahina pour sa disponibilité, ses conseils, son sourire Permanent, son aide précieuse.

Je souhaiterai également remercier Mme Bessi Assia. merci pour son aide. Merci beaucoup.

*Un grand merci aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail
Mme N. Salhi et Mr A. Boulahouche, Merci beaucoup.*

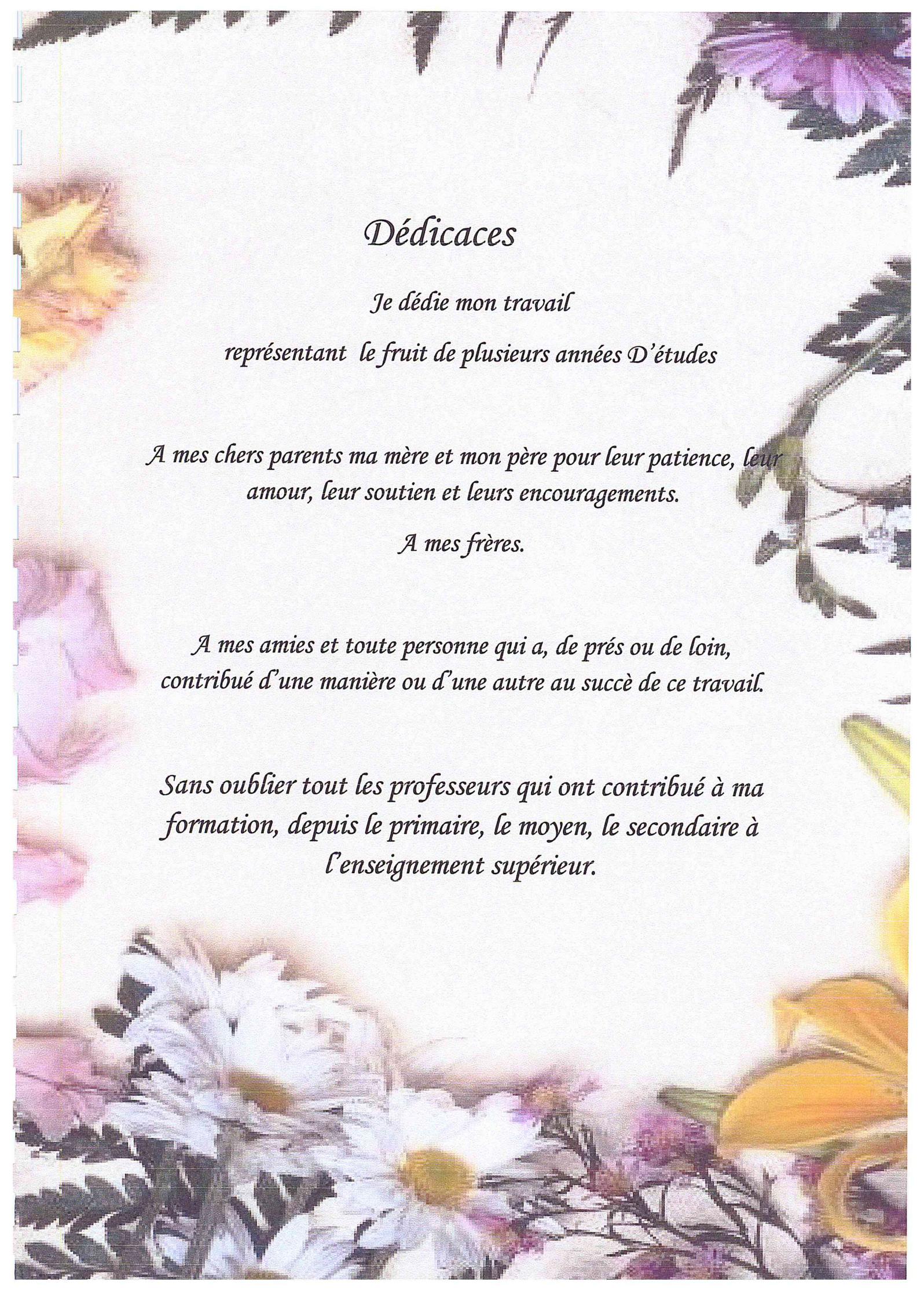
Je ne veux surtout pas oublier Mr AIT YAHIA. Ahmed qui a toujours été là pour rendre service, merci pour ses conseils.

J'adresse un merci au professeur TOUATI. Abdelkader directeur de laboratoire de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a témoigné.

J'adresse aussi mes remerciements à mes parents pour leur soutien matériel, financier, moral et psychologique. Mais particulièrement pour l'amour qu'ils me portent.

soutien moral et psychologique

Je tiens à remercier finalement Monsieur le professeur y. Bal responsable de notre master, mes chers professeurs, et toute l'équipe du laboratoire, qui m'a été d'un grand soutien moral et psychologique



Dédicaces

*Je dédie mon travail
représentant le fruit de plusieurs années D'études*

*A mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, leur
amour, leur soutien et leurs encouragements.*

A mes frères.

*A mes amies et toute personne qui a, de près ou de loin,
contribué d'une manière ou d'une autre au succès de ce travail.*

*Sans oublier tout les professeurs qui ont contribué à ma
formation, depuis le primaire, le moyen, le secondaire à
l'enseignement supérieur.*

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste d' abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Chapitre I : Généralité sur l'isoxazolidines	
I.1 Définition d'isoxazolidines	03
I.2 Préparation d'isoxazolidines	04
I.3 Stéréosélectivité de la réaction 1, 3-dipolaire	05
I.3.1. Régiosélectivité	05
I.3.2. Stéréosélectivité	06
I.4 préparation d'isoxazolidines optiquement actives.....	06
Chapitre II : chromatographie	
II.1 Introduction	08
II.2 La chromatographie sur couche mince.....	09
II.2.1 Définition et appareillage	09
II.2.2 Principe de la technique	10
II.2.3 Applications de la CCM	10
II.2.4 Adsorbants et plaques chromatographiques.....	11
II.2.5 Choix de l'éluant.....	11
II.3 La chromatographie sur colonne ouverte.....	11
II.3.1 Principe de base	11
II.4 La chromatographie flash	12
II.4.1 Définition	12
II.4.2 Principe	12

Sommaire

II.4.3 Avantages de la flash chromatographie	13
II.5 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	14
II.5.1 Les organes	14
II.5.1.1 Réservoir de solvant.....	15
II.5.1.2 Pompe.....	15
II.5.1.3 Vanne d'injection	16
II.5.1.4 Colonne.....	16
II.5.1.5 Phase stationnaire.....	16
II.5.1.6 Phase mobile	17
II.5.1.7 Détecteurs.....	18
II.5.1.8 Réfractomètre	18
II.5.2 Choix du procédé chromatographique	18
II.5.3 Application de la chromatographie à l'analyse	20

Chapitre III: Partie expérimentale

III.1 Appareillages et produits	21
III.1.1 Produits	21
III.1.2 Appareils	21
III.2 Synthèse d'isoxazolidines	22
III.3 Séparation du mélange d'isoxazolidine	22
III.3.1 CCM préparative	22
III.3.2 Chromatographie sur colonne ouverte	23
III.3.3 Séparation des isomères d'isoxazolidine par chromatographie flash.....	24
III.3.4 Séparation du mélange d'isoxazolidine par HPLC	25

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Préparation de l'isoxazolidine	27
IV.2 Analyse spectroscopique des isoxazolidines synthétisées.....	29

Sommaire

IV.2.1 Spectroscopie de masse	29
IV.2.2 Spectrophotométrie UV-Visible	30
IV.2.3 Spectrophotométrie infrarouge	31
IV.3 Séparation du mélange d'isoxazolidines	32
IV.3.1 CCM préparative.....	33
IV.3.2 Chromatographie sur colonne ouverte	34
IV.3.3 Chromatographie flash	37
IV.3.4 Séparation par HPLC.....	40
IV.3.4.1 Séparation du mélange Brute	40
IV.3.4.2 Etalonnage externe	43
Conclusion générale.....	46
Références bibliographiques

الهدف من هذا العمل هو فصل خليط من الايزوكسازوليدينات. هذا الخليط ناتج عن تفاعل الضم الحلقي 1.3 ثنائي القطب بين ثنائي الفينيل نيترون والأكريلونيتريل. هذا النوع من التفاعل, يتم تحت تردد مستمر للتولوين لمدة اثنتا عشرة ساعة يعطي مردود بنسبة 46% لخليط من أربعة ايزومرات. هذه الايزومرات هي عبارة عن زوج من الماكبات الموضعية وزوج من الدياستيريوزوميرات

الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة, كروماتوغرافيا العمود المفتوح و كروماتوغرافيا فلاش لهذه الأيزومرات يسمح لنا باسترجاع كمية قليلة من كل واحد. و يتم استخدام هذه الاخيرة كمعيار خارجي خلال الفصل باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة العالية الجودة.

افضل فصل للخليط عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة العالية الجودة, يتم الحصول عليه باستخدام الطور السائل 40% ماء, و 60% الأسيتونتريل. و النتائج المتحصل عليها تظهر ثلاث قمم التي تم نسبتها لمختلف الازوميرات.

الكلمات المفتاحية : ايزوكسازوليدين, تفاعل الضم الحلقي 1.3 ثنائي القطب, الكروماتوغرافيا, الكروماتوغرافيا السائلة العالية الجودة.

Résumé

Le but de ce travail est la séparation d'un mélange d'isoxazolidines. Ce mélange est le fruit de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre la C,N-diphényl nitroène et l'acrylonitrile. Cette réaction, réalisée sous reflux du toluène pendant douze heures donne un rendement de 46% d'un mélange de quatre isomères. Ces isomères sont deux couples de régéoisomères et deux couples de diastéréoisomères.

La séparation par chromatographie sur couche mince, CCM préparative, chromatographie sur colonne ouverte et par chromatographie flashe de ces isomères a permis la récupération d'une petite quantité de chacun. Ces derniers seront ensuite utilisés comme étalons externe lors de la séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La meilleure séparation du mélange par HPLC est obtenue en utilisant la phase mobile 40% eau, 60% acétonitrile. Le chromatogramme obtenue montre trois pics qui ont été attribué aux différents isomères.

Mots clé: isoxazolidines, cycloaddition 1,3-dipolaire, C,N-diphényl nitroène, chromatographie, HPLC.

Abstract

The target of this work is the separation of a mixture of isoxazolidines. This mixture is the result of a reaction of 1.3 dipolar cycloaddition between the C,N diphenyl nitrene and acrylonitrile. This reaction is achieved under an ebb of toluene when twelve hours give returns of 46% of a mixture of four isomers. Those isomers are two couples of regioisomers and two couples of diastereoisomers.

The separation with chromatographic on a thin coat, preparative TLC, chromatography an open column and with a chromatographic flash of those isomers that allowed a recuperation of a small quantity of each. these latter will after used as an internal etalones of a separation with chromatographic liquid at a high performance (HPLC).

The best separation of a mixture with (HPLC) is obtain using a mobile phase of 40% water, 60% acetonitrile. The chromatographic obtained shows there pics that are complement of different isomers.

Keywords : isoxazolidines, 1.3 dipolar cycloaddition, C,N-diphényl nitrene, chromatographic, HPLC.

Liste des abréviations

ACN : acrylonitrile.

C : carbone.

°C : degré Celsius .

CCM : chromatographie sur couche mince.

Cm : centimètre

DPN : C, N-diphényle nitroène

E : Trans

Eq. : équation

h: heure

HPLC: Chromatographie liquide à haute Pression

IR : Spectrométrie infrarouge.

IE : l'impact électronique

mn: minute.

ml : millilitre.

nm : Nanomètre

R_f : rapports frontaux

Rdt : rendement

SM : spectrométrie de masse

T : température.

TLC : chromatographie on a thin coat

UV : spectrophotométrie UV.

V/V : rapport volumique

Z : Cis.

μl : microlitre

λ: longueur d'onde

%: Pourcentage

Φ Stat : phase stationnaire.

Φ Mob : phase mobile.

Liste des figures

Figure 01 : Structure chimique d'isoxazolidine.....	3
Figure 02 : l'expérience de base en chromatographie.....	12
Figure 03 : Différents organes de l'HPLC.....	15
Figure 04 : Appareil HPLC de Marque Agilent.....	25
Figure 05 : Séparation des quatre isomères d'isoxazolidines.....	28
Figure06 : Spectres de masse en impact électronique de l'isoxazolidines synthétisée.....	29
Figure 07 : Spectres UV de la C,N-diphényl nitroène et de l'isoxazolidine synthétisée dans le méthanol (10^{-4} moles/l), à 25°C.....	30
Figure 08 : Spectres IR en pastille de KBr de l'isoxazolidine synthétisée.....	31
Figure 9 : Séparation des isomères d'isoxazolidines par CCM préparative sur plaque de gel silice, en utilisant la phase mobile (25% Diéthyl éther - 75%éther de pétrole).....	33
Figure 10 : Analyse des isomères séparées par CCM analytique , en utilisant la phase mobile (25% Diéthyl éther - 75%éther de pétrole).....	34
Figure 11 : Séparation d'isoxazolidine synthétisé e par chromatographie sur colonne ouverte.....	35
Figure 12 : Résultats de la séparation du mélange d'isoxazolidine par chromatographie flas.....	40
Figure 13 : chromatogramme des isomères de 1 en (a) et 2 en (b)obtenus. En utilisant la Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile).....	44
Figure 14 : chromatogramme des isomères de 3 en (a) et 4 en (b)obtenus et du mélange en (c). En utilisant la Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile).....	45
Figure 15 : chromatogramme du superposition des isomères 3 et 4. Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile).....	45

Liste des tableaux

Tableau 01 : pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC	17
Tableau 02 : produits utilisés ainsi que leurs origines et degré de pureté	22
Tableau 03 : Rendement (Rdt), point de fusion (P _f), rapports frontaux (R _f) en CCM	28
Tableau 04 : Pic moléculaire et pic de base par spectroscopie de masse en impact électronique de l'isoxazolidines synthétisée	29
Tableau 05 : Caractérisations spectrales en UV-Visible de la C,N-diphényl nitrones et de l'isoxazolidine synthétisées	30
Tableau 06 : Caractérisations spectrales en infrarouge de l'isoxazolidine	31
Tableau 07 : Résultats de séparation du mélange d'isoxazolidine par chromatographie sur colonne ouverte	36
Tableau 08 : R _f des isomères du mélange d'isoxazolidine par CCM analytique sur plaque de Gel de silice, en utilisant différente phases mobile a base de (éther de pétrole/ acétate diéthyle)	38
Tableau 09 : R _f des isomères du mélange d'isoxazolidine par CCM analytique sur plaque de Gel de silice, en utilisant différente phases mobile a base de (éther de pétrole/diéthyle-éther)	39
Tableau 10 : Chromatogrammes de l'analyse du mélange des quatre isomères d'isoxazolidines par HPLC en utilisant une colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (eau-acétonitrile)	41
Tableau 11 : Chromatogrammes de l'analyse du mélange des quatre isomères d'isoxazolidines par HPLC à des longueur d'onde 245 nm, 300 nm et 350 nm en utilisant une colonne C18, débit 1 ml/min, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile)	42

Etude théorique

Introduction générale

Introduction générale

On ne saurait trop souligner l'importance de la chimie hétérocyclique. Elle occupe en effet, une place prédominante dans l'industrie des produits pharmaceutiques et des colorants. Son rôle s'accroît constamment dans le domaine des plastiques, des produits chimiques agricoles Et dans divers autres secteurs.

La série hétérocyclique constitue un vaste domaine de la chimie organique, approximativement deux tiers des publications en chimie concernent de près ou de loin ces composés.

Les hétéroatomes les plus courants sont l'oxygène, l'azote et le soufre. Les cycles les plus stables sont, comme dans le cas des hydrocarbures, ceux qui comportent cinq ou six chaînons.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux composés hétérocycliques à la fois oxygénés et azotés, en l'occurrence les 1,2-oxazolidines ou isoxazolidines. En effet, ces produits sont connus pour leur activité antibactérienne et anti-inflammatoire. En ce qui concerne leur synthèse, notre choix s'est porté sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire qui est une méthode extrêmement efficace pour la création des structures hétérocycliques complexes. Ce type de réaction qui met en jeu les nitrones et les alcènes, aboutit aux isoxazolidines sous forme d'un mélange de quatre régio et stéréo-isomères. Le but de notre travail est d'élaborer une méthode de séparation de ces isomères par différentes méthodes de chromatographie.

Le travail présenté dans ce mémoire comprend les deux parties suivantes :

Une partie théorique comportant deux chapitres:

- Un premier chapitre , nous donnerons l'essentiel concernant les isoxazolidines.
- Un deuxième chapitre dans lequel on donne un bref aperçu sur les méthodes chromatographiques utilisées pour la séparation d'isoxazolidines.

Introduction générale

Une partie expérimentale où on donnera l'ensemble des produits et des matériels utilisés ainsi que les protocoles suivis.

Une partie résultats et discussions. Dans laquelle nous exposerons les résultats de la séparation des isomères du mélange d'isoxazolidine.

On terminera par une conclusion générale.

Chapitre I

I.1- Définition d'isoxazolidines

Les molécules contenant des structures hétérocycliques présentent souvent des propriétés biologiques intéressantes. De ce fait elle restent toujours des cibles importantes de la synthèse chimique appliquée [1,2]. Les isoxazolidines font partie de ces molécules. Ce sont des hétérocycles à cinq chaînons avec deux hétéroatomes : l'azote et l'oxygène en position méta. Ils présentent d'intéressantes propriétés fongicide, herbicide, insecticide, des activités antibactériennes, anticorrosion, anti-inflammatoire...etc. [3,4]

Le principe intérêt du cycle d'isoxazolidines est lié à la diversité de composés accessibles à partir de ce motif. A cause de la relative fragilité de la liaison N-O. Sous conditions réductrices, les isoxazolidines ont été largement utilisées comme équivalent des 1,3-amino-alcools, précurseurs d'une grande variété de produits naturels et dérivés, principalement d'alcaloïde, d'acides aminés et d'aminosucres [5].

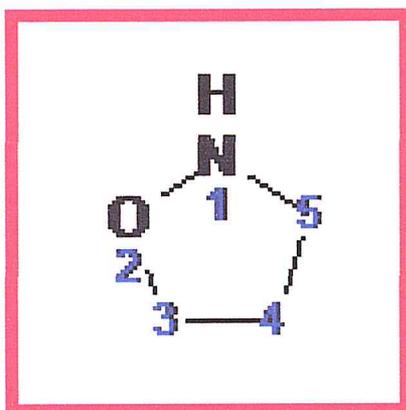


Figure n°1: Structure chimique d'isoxazolidine

I.2- Préparation d'isoxazolidines

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire est l'une des principales méthodes de synthèse organique utilisée pour obtenir les cycles et les hétérocycles à 5 chaînons [6]. Ces réactions sont également utilisées pour la synthèse des produits naturels comme les dérivés du sucre, les β -lactames, les acides aminés, les alcaloïdes et des produits d'intérêt

pharmacologique comme les pyrazolines ayant plusieurs activités biologiques (anti-inflammatoire, analgésique, herbicides,...) [7,8].

Les réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires consiste en l'addition d'un dipôle-1,3 sur un système insaturé appelé dipolarophile conduisant à la formation des hétérocycles à cinq chaînons (cycloadduit) (Schéma n°1). Cette réaction est réversible.

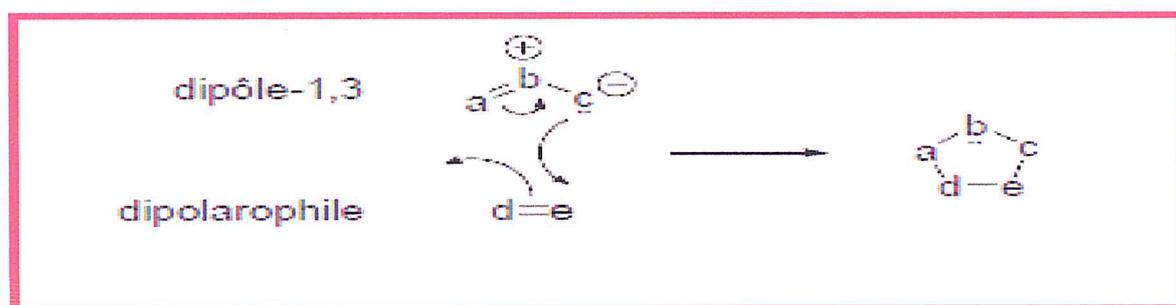


Schéma n°1: Principe général de la réaction de cycloadditions 1,3-dipolaires.

Plusieurs travaux ont été effectués notamment par Huisgen qui a fait une étude exhaustive des réactions possibles entre dipôles et dipolarophiles ce qui a permis de mieux comprendre ces réactions [9]. La possibilité de faire réagir une multitude de dipôles différents sur le même diénophile confère une diversité intéressante à ce type de réactions. Par exemple, l'utilisation des nitrones pour la cycloaddition a contribué à l'essor de cette stratégie. Leur isolation rend la synthèse des isoxazolidines par réaction avec les alcènes aisément accessibles [10].

Les cycloadditions 1,3-dipolaires font partie de la grande famille des réactions péricycliques. Elles s'effectuent par recouvrement d'orbitales de deux espèces comportant, dans un cas, quatre électrons π réactifs (qui correspond au dipôle) et dans l'autre cas, deux électrons π réactifs (pour le dipolarophile). En concordance avec les règles de Woodward-Hoffman, les réactions péricycliques faisant interagir des espèces ayant un couple $[4\pi + 2\pi]$ peuvent s'effectuer de manière concertée (schéma n°2) [11,12].

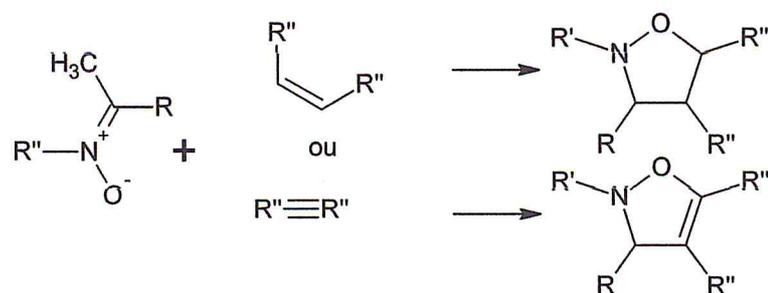


Schéma n°2 : cyclisations 1,3-dipolaires des nitrones avec les dipolarophiles

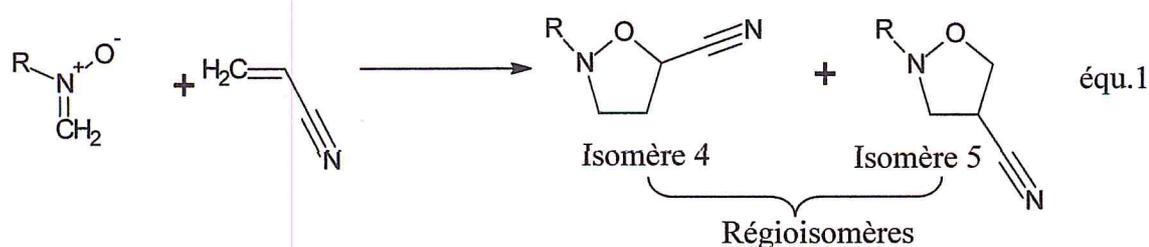
I.3- Stéréosélectivité de la réaction 1, 3-dipolaire

Trois problèmes de sélectivité sont associés à la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire nitronne-alcène :

I.3-1- Régiosélectivité

On peut définir la régiosélectivité comme étant la sélectivité des positions de substituant.

En effet, une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire dissymétrique peut conduire à la formation de deux régioisomères comme le montre l'équation (1). Quand l'oléfine porte un substituant, l'atome de carbone auquel celui-ci est lié peut se lier soit avec l'atome d'oxygène en formant l'isoxazolidine substituée en position 5, soit avec le carbone en α de la nitronne avec formation de l'isoxazolidine substituée en position 4 [13].



Pour la cycloaddition des alcènes monosubstitués riche en électrons (éthers/esters vinyliques) ou neutres (alcènes simples), la formation des adduits 5-substitués est favorisée à la fois par les effets stériques et électroniques. Pour la cycloaddition des alcènes monosubstitués pauvres en électrons, la situation est plus compliquée car les effets stériques et électroniques sont contraires bien que l'effet stérique joue un rôle déterminant [14].

I.3.2- Stéréosélectivité

Une réaction est dite stéréosélective si elle conduit majoritairement à l'un des stéréoisomères. Aussi, dans le cas d'une nitroène C-substituée et d'une oléfine portant au moins un substituant, chaque régioisomère peut être obtenu sous la forme d'un mélange d'isomères cis et trans par une attaque endo et exo (schéma n°3) [15].

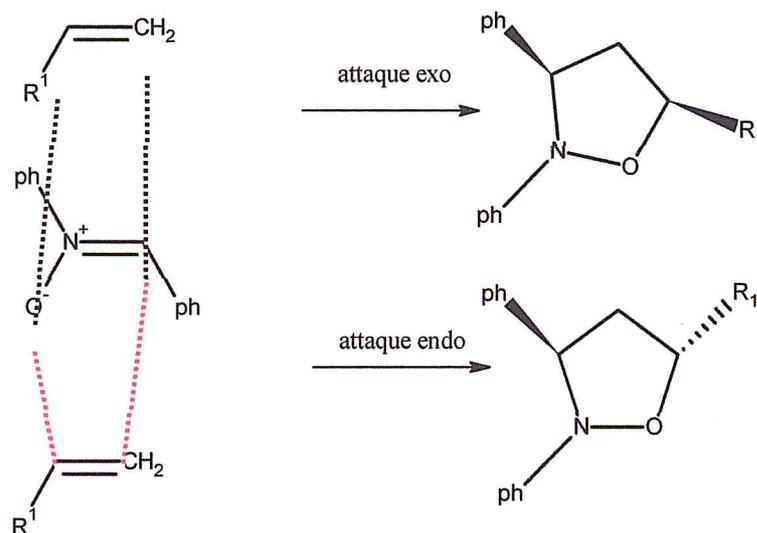


Schéma n°3 : la sélectivité endo/exo dans la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

I.4- préparation d'isoxazolidines optiquement actives

Le développement de méthodes de préparation d'isoxazolidines optiquement actives est le sujet d'un effort de recherche continu. Cet effort a été couronné de succès, tant dans le domaine de la synthèse de produits naturels et de molécules biologiquement actives que dans le domaine de la catalyse asymétrique où de nouvelles méthodologies sont apparues ces dernières années.

De très nombreuses publications décrivent la préparation d'isoxazolidines optiquement actives par l'utilisation de nitroènes ou d'alcènes chiraux ou via des cycloadditions intramoléculaires de précurseurs optiquement actifs. Mais parmi les nombreuses méthodes d'obtention de composés énantiomériquement enrichis, la catalyse asymétrique utilisant des complexes organométalliques chiraux possède de loin le plus fort potentiel. En fournissant un moyen

puissant et économique de multiplication de la chiralité, elle permet en effet de s'affranchir de l'utilisation de ces substrats chiraux. Contrairement à la très large implication de catalyseurs chiraux dans la réaction de Diels-Alder par exemple, la catalyse asymétrique de la réaction de cycloaddition (3+2) est restée un domaine inexploré jusqu'à très récemment. Ce n'est qu'en 1994 que sont apparus les deux premiers exemples de catalyse asymétrique de la réaction de cycloaddition (3+2) nitroène-alcène [16].

Chapitre II

II.1- Introduction

La chromatographie est une méthode analytique qui a pour but la séparation des différents constituants (solutés) d'un mélange, contenus soit dans une phase homogène liquide (chromatographie en phase liquide), soit dans une phase homogène gazeuse (chromatographie en phase gazeuse).

La chromatographie, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entrainement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

Il existe différents types de chromatographie suivant la nature physique de la phase stationnaire, le phénomène de séparation et la technique utilisée. Ces types sont résumés dans le schéma n°4:

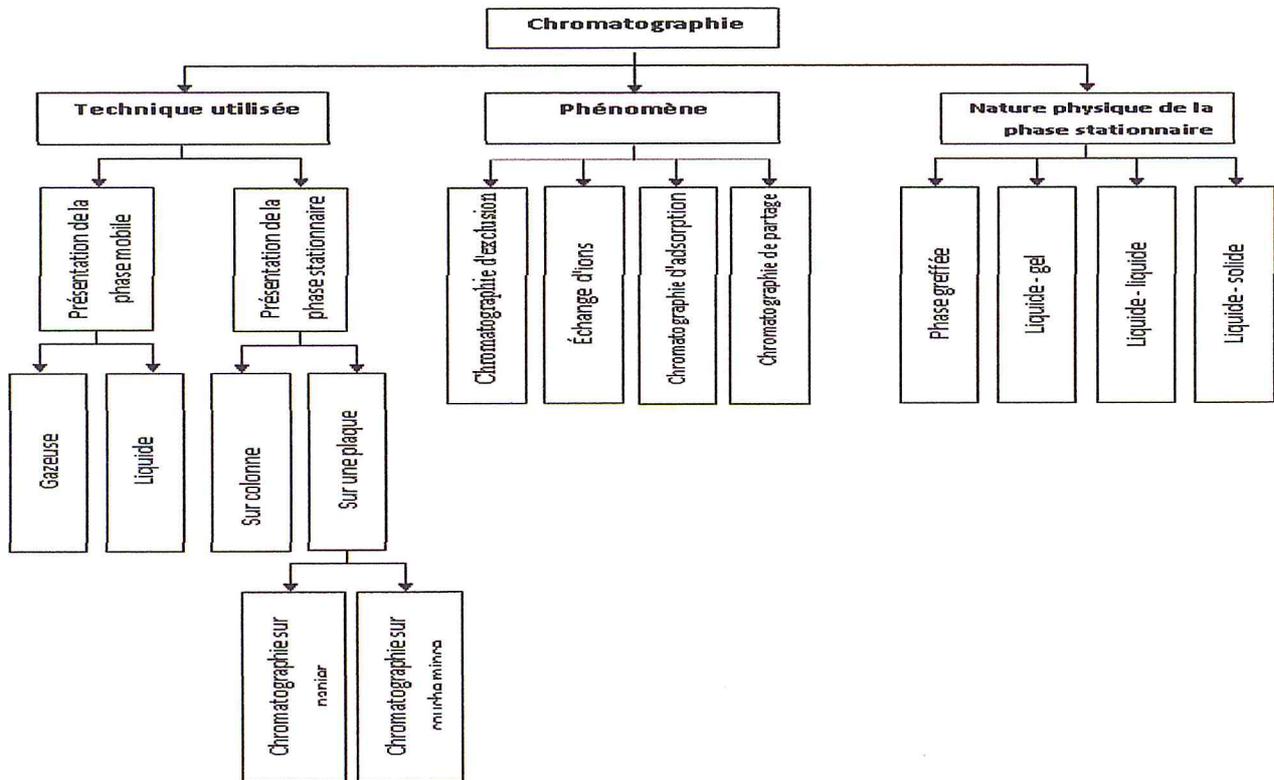


Schéma n°4: types de chromatographie.

Les différentes types regroupées ci-dessus sont très différents sur le plan technologique mais ont de nombreux points communs sur le principe de fonctionnement. Elles sont différentes quant au matériel utilisé. Une CCM nécessite une plaque d'aluminium, un solvant et une cuve en verre. la chromatographie sur colonne nécessite une colonne. La HPLC nécessite des appareils de technologies poussées de coût élevé [17]. Le terme de chromatographie recouvre donc plusieurs technologies basées sur un principe commun : l'identification par la séparation.

La chromatographie peut être utilisée de façon **quantitative** en de caractéristiques cinétiques (évolution temporelle de réaction) ou thermodynamiques (énergies et constantes de réaction).

II.2- La chromatographie sur couche mince

Cette méthode très facile à mettre en œuvre est une des principales méthodes utilisées dans les laboratoires. Elle présente l'avantage de ne nécessiter que peu de matériels et donner des résultats facilement interprétables mais pas toujours très reproductibles [18].

II.2.1- Définition et appareillage

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

– la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

II.2.2- Principe de la technique

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

II.2.3- Applications de la CCM

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

II.2.4- Adsorbants et plaques chromatographiques

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose.

II.2.5- Choix de l'éluant

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire ; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

II.3- La chromatographie sur colonne

La technique de chromatographie sur colonne repose sur le même principe que la chromatographie sur couche mince sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque : les espèces chimiques à séparer sont plus ou moins entraînées par un éluant sur une phase fixe. [19]

.II.3.1- Principe de base

Les solutés migrent au travers de la colonne sous des effets antagonistes :

- Effet d'entraînement des solutés par la phase mobile qui s'écoule au travers de la phase stationnaire.
- Effet de rétention des solutés par la phase stationnaire (adsorption réversible, interactions moléculaires, polaires, ioniques, diffusion).

En fonction de l'affinité de chacun des solutés vis-à-vis des phases mobiles et stationnaires, chaque soluté aura une vitesse de migration différente lors de son passage au travers de la colonne. De ce fait, les solutés du mélange sont donc progressivement séparés comme le montre la figure n°2. [20]

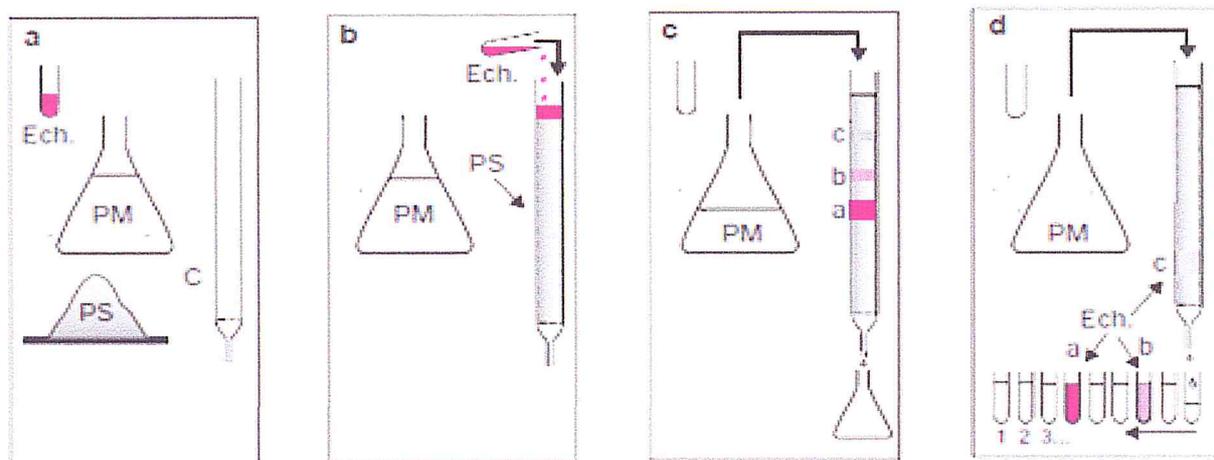


Figure n° 2: l'expérience de base en chromatographie.

a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, Ps. Phase stationnaire, PM. Phase mobile et E. échantillon; b) le dépôt de l'échantillon; c) le début de l'élution; d) la récupération des produits après séparation.

II.4- La chromatographie flash

C'est en 1978, aux Etats-Unis à l'université Columbia que née le terme « Flash column Chromatography » grâce à W. Clark Still et son équipe. Ils décrivent que lorsque le solvant est conduit dans la colonne par l'application d'une pression positive, cela accélère la phase mobile et la séparation devient plus rapide et davantage qualitative [21].

II.4.1- Définition

La Flash chromatographie est une technique utilisée pour purifier un échantillon brut. C'est une technique de séparation qui est très appréciée car elle est simple, rapide et peu coûteuse (notamment en comparaison avec l' HPLC).

II.4.2- Principe

La particularité de la Flash chromatographie est qu'elle est basée sur l'interaction entre les composés que l'on souhaite séparer, la phase stationnaire et la phase mobile. La pression

nécessaire est faible (moins de 320 psi) comparé à l'HPLC où elle est supérieure à 1000 psi. Il s'agit du même procédé décrit précédemment pour la chromatographie: la séparation des composés d'un échantillon brut se base sur les différentes affinités qu'ont les espèces contenues dans l'échantillon avec la phase mobile et la phase stationnaire. Ces différentes affinités et interactions vont engendrer des migrations qui vont différer selon les espèces en présence. La séparation n'est possible que si tous les composés ont des propriétés d'adsorption et désorption différentes avec la phase mobile et la phase stationnaire.

Au delà de ces interactions, d'autres facteurs sont déterminants pour obtenir des purifications de qualité. Ainsi, la qualité de vos purifications dépendra de votre choix de solvant, de la phase stationnaire, la technique d'injection de votre échantillon sur colonne flash (injection liquide ou dépôt solide) ainsi que des conditions obtenues sur plaque CCM.

Les résultats obtenus en CCM (chromatographie sur couche mince) permettent de prédire l'élution des composés en Flash chromatographie, la corrélation est similaire entre ces deux méthodes. Raison pour laquelle, il est important de prendre en compte les résultats obtenus en CCM pour obtenir le meilleur R_f (rapport frontal) pour la purification et permettre une bonne transposition sur colonne Flash [22].

Ii.4.3- les avantages de la flash chromatographie

Cette technique de séparation et purification est très populaire dans les laboratoires car ses avantages sont nombreux.

- Grande rapidité de la purification.
- Volume de collecte plus faible
- Temps d'évaporation réduit
- Coût de l'instrumentation très abordable
- Coût des consommables très attractifs, colonne économique
- Grande capacité de charge des colonnes
- Colonne réutilisable de très nombreuses fois pour des silices greffées

- Grande diversité de phase stationnaire (Silice vierge, silice greffée (NH₂, diol, Cn, ...), Alumine, Echange d'ion...)
- Large gamme (détecteurs, passeur d'échantillons ...)
- Développement de méthode aisé (transposition CCM- Flash et HPLC - Flash/Prep)

II.5- Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance est mise au point vers 1967 par Huker et Huslman. Alors que la chromatographie en phase gazeuse ne s'applique qu'aux composés volatiles, l'HPLC n'est pas limité par cette contrainte et peut séparer pratiquement tout les mélanges, quoi que ce soit leur volatilité. La phase mobile peut être un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne.

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

II.5.1- Les organes

HPLC utilise une pression élevée, plutôt que simplement par gravité, pour la propulsion d'un échantillon d'un mélange à travers une colonne. Un échantillon est injecté, puis une pompe contenant des quantités élevées de pression permet de déplacer l'échantillon le long d'une colonne garnie, où il est séparé en composants individuels. Cette séparation est ensuite analysée par un détecteur pour produire des résultats. Ces différents organes sont représentés sur la figure n°3 est décrit dans ce qui suit:

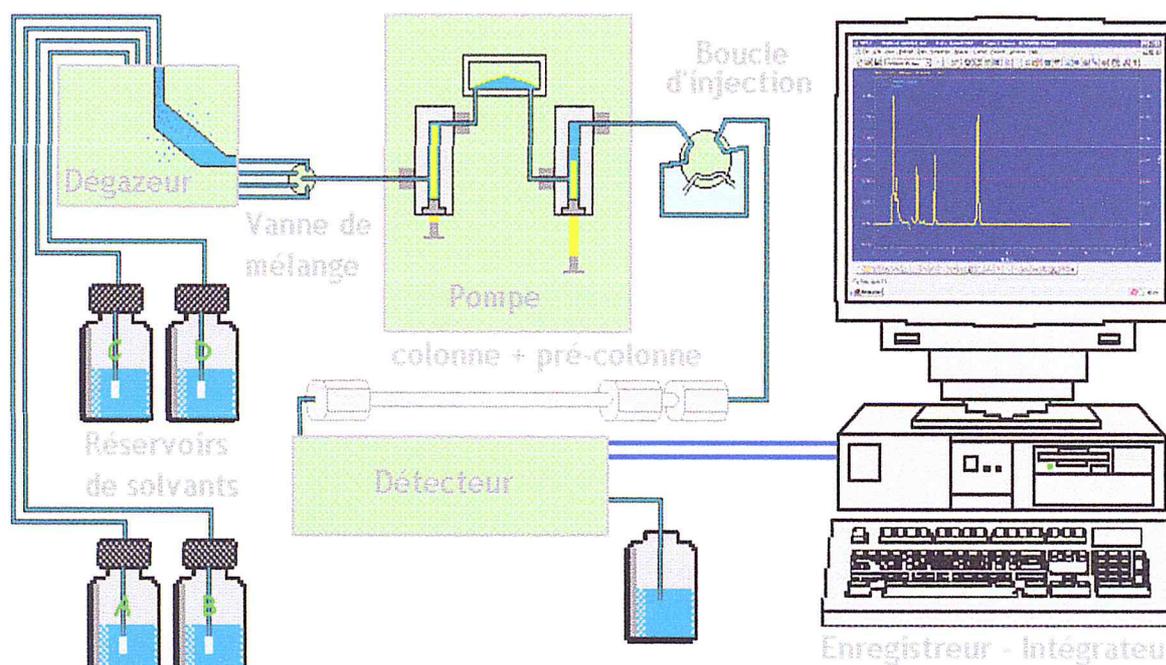


Figure n°3 : Différents organes de l'HPLC

II.5.1.1-Un réservoir de solvant (éluant) : qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

II.5.1.2-La pompe : elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- *en mode isocratique*, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- *en mode gradient*, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

II.5.1.3-Vanne d'injection :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la Colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

II.5.1.4-La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

II.5.1.5-La phase stationnaire

- La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

II.5.1.6-La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.

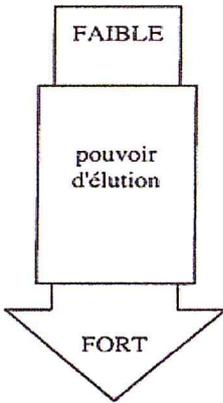
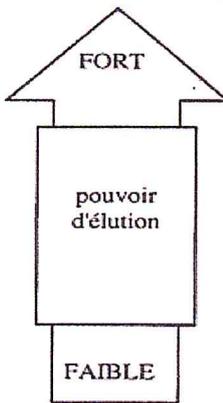
La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe:

Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;

Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec la phase normale. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase Mobile selon le classement de polarité donné dans le tableau n°1.

Tableau n°1: pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC :

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

II.5.1.7-Détecteurs

Détecteur UV-visible: il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

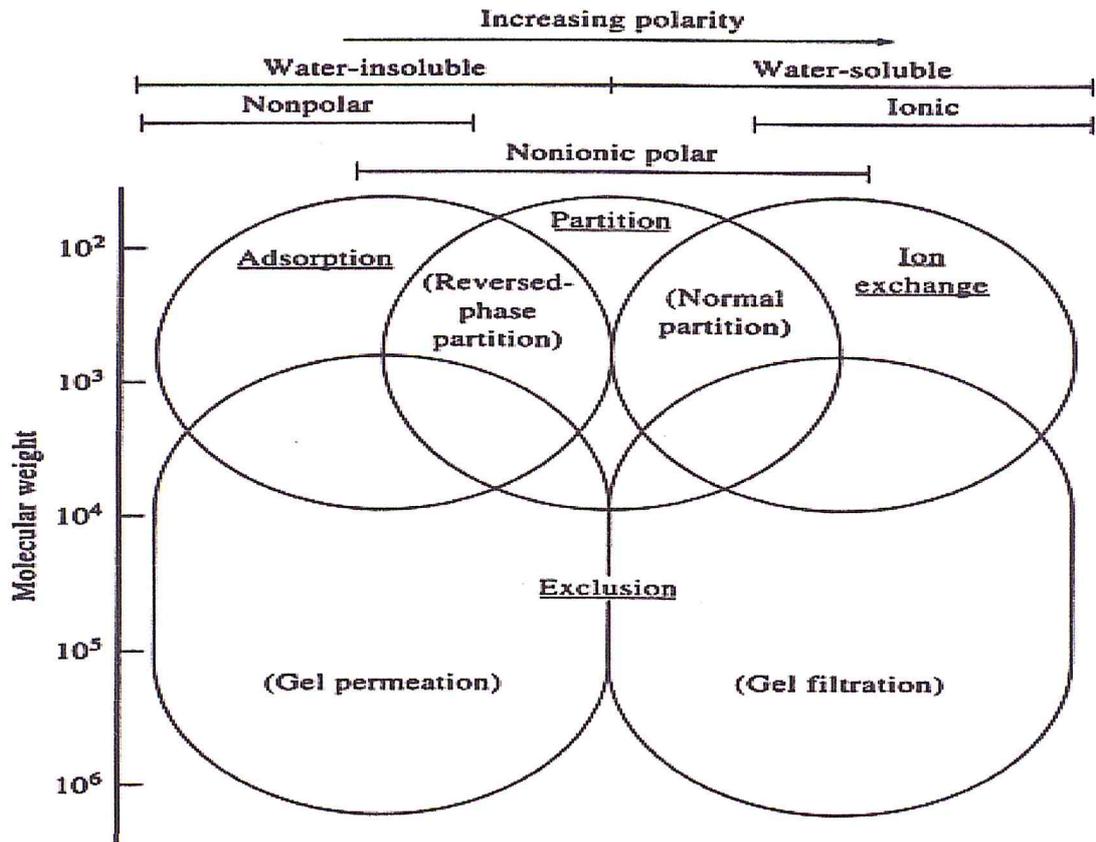
- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption ϵ soit suffisamment grand .
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur [23].

II.5.1.8-Réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la Température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

II.5.2- Le choix du procédé chromatographique

Plusieurs paramètres influents le choix du procédé chromatographique en particulier, la taille de l'échantillon à purifier, sa polarité et sa nature ionique ou non ionique comme le montre le schéma ci-dessous ;



Substances de PM > 2 000

- Chrom. d'exclusion-diffusion

Substances de PM < 2 000

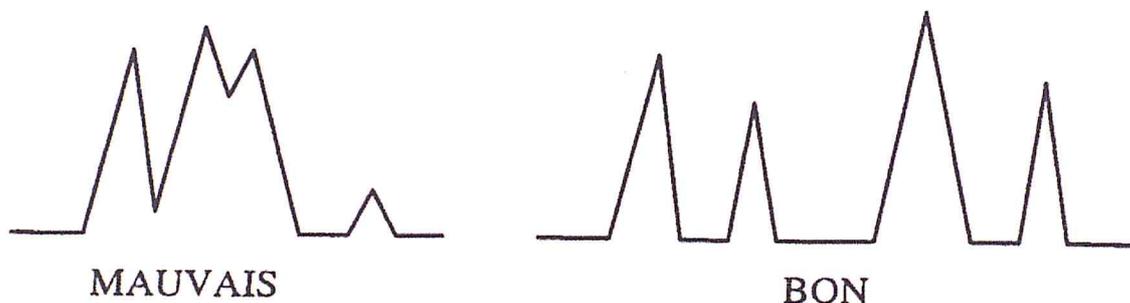
- | | | |
|-------------------------------------|--|---|
| a) Molécules non ionisées | { Polarité élevée :
Polarité faible :
ou moyenne | - Chrom. d'adsorption |
| | | - Chrom. de partage sur phase polaire |
| b) Molécules ionisées ou ionisables | { | - Chrom. de partage à polarité de phase inversée |
| | | - Chrom. par échange d'ions |
| | | - Chrom. de partage avec appariements d'ions sur phase inverse |
| | | - Chrom. de partage sur polarité de phase inversée après recul d'ionisation |

Schéma n°5 : Application de la chromatographie liquide (D.L.Saundres, in chromatography, 3rd, E.Heftmann, Ed., p.81.New York : Van Nostrand Reinhold, 1975. With permission).

A chacune de ces méthodes, il correspond un type de colonne qui est l'élément vital de la chaîne d'HPLC. Elle met en jeu des forces d'adsorption qui vont varier en fonction de la polarité des produits chimiques et selon des isothermes d'adsorption spécifiques. Le choix du solvant d'HPLC va dépendre de la colonne et des composés à éluer et principalement de leur polarité [24].

II.5.3- Application de la chromatographie à l'analyse

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection λ en nm.
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc....

Partie Expérimentale

Chapitre III : partie expérimentale

III.1- Appareillages et produits

III.1.1 – Appareils

- Les différentes pesées de précision ont été faites en utilisant une balance analytique de marque Scaltec, type OSI 9001.
- Le spectre de masse à été réalisé à l'aide d'un appareil de marque NERMAG R 10-10 dans les conditions d'impact électronique (IE).
- spectre UV- visible d'isoxazolidines à été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, de marque JASCO V-630 spectrophotomètre.
- spectre Infra Rouge d'isoxazolidines à été réalisé à l'aide d'un appareil de marque IR-FT JASCO-4100 sur des pastilles en KBr. Les nombres d'onde des bandes de vibration d'élongation (ν) sont donnés en cm^{-1} .
- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice sur aluminium, les CCM sont révélés en lumière ultraviolette à 254 nm.
- L'appareil HPLC utilisé est de marque Agilent-1200 séries (Quantité purifiable :1 à 5 mg ,Détecteur : UV-DAD ,Débit d'élution : 0,1 à 10 ml/minute et Pression : jusqu'à 600 bars)

III.1.2- Produits

Les germes tests qu'on a utilisés sont conservés au laboratoire de microbiologie de l'école normale supérieure. Les produits utilisés dans notre travail et leurs origines sont rassemblés dans le tableau n°2.

Chapitre III : partie expérimentale

Tableau (2) : produits utilisés ainsi que leurs origines et degré de pureté :

Produits	Origine	Pureté (%)
Ethanol	Fluka	95
Diéthyl éther	//	99,5
Dichlorométhane	Prolabo	99,5
Ether de pétrole (40-60 °C)	//	98
acétonirile	//	Grade HPLC
Toluène	Merck	99,5
C,N-diphénylnitrones	Elle est synthétisée et identifiée au laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba.	

III.2- Synthèse d'isoxazolidines

À une solution de 0,005 mole de nitronne dans 50 ml de toluène, on ajoute une solution de 0,1 mole d'acrylonitrile dans 50 ml de toluène. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h. Après évaporation du solvant, on obtient un liquide visqueux [25].

III.3- Séparation du mélange d'isoxazolidine

La séparation du mélange d'isoxazolidine préparées est réalisée par les méthodes chromatographiques suivantes :

III.3.1- CCM préparative

Pour la préparation des plaques, on prend 60g de gel de Silice (pour CCM) qu'on mélange à 120 ml d'eau distillé dans un erlenmeyer rodé. Une fois qu'on a obtenu une solution homogène sans granulées ni gaz, on verse le tout sur l'étaioire qu'on fait glisser sur cinq plaques préalablement étalé. On laisse les plaques sèches pendant 24h à 35°C et 30min avant l'utilisation à 120°C.

Pour l'analyse, On imbibe ces plaques avec la solution d'isoxazolidine préparée en forme d'un trait, on laisse migret en utilisant la phase mobile : diéthyl éther/éther de pétrole (25/75). Après la migration on entoure la zone des isomères séparés et on gratte chaque zone

Chapitre III : partie expérimentale

séparément puis on la récupère dans un bécher où elle sera lavée avec le dichlorométhane puis filtré. Une CCM analytique confirmera la bonne séparation des isomères.

III.3.2- Chromatographie sur colonne ouverte

Pour la séparation du mélange d'isoxazolides par chromatographie sur colonne ouverte se faire suite de trois étapes:

- **Remplissage de la colonne :** on prend 25g de gel de Silice qu'on mélange à 50 ml d'une phase mobile à utiliser pour l'élution dans un erlenmeyer, Le mélange est agité quelques minutes jusqu'à on obtient une solution homogène . à l'aide d'un entonnoir, faire tomber se mélange régulièrement et en ouvrant légèrement le robinet de la colonne pour que le liquide s'écoulant goutte à goutte entraîne la silice qui se répartie régulièrement.

Au cours de la manipulation, la silice doit être toujours imprégnée de solvant sinon il se produit des fissures dans la colonne sinon les zones d'adsorption se décalent et la séparation n'est plus aussi nette.

- **Déposition de l'échantillon :** L'échantillon est déposé en haut de la colonne après avoir solubiliser dans le dichlorométhane.
- **La séparation :** La séparation des isomères est obtenue par l'écoulement continu de la phase mobile à travers la colonne et en récupérant des fractions de 1 cm³ de cette phase mobile à la sortie de la colonne dans des tubes séparées.

Une CCM analytique déterminera l'isomère présent dans chaque tube. Les fractions qui présentent le même isomère seront regroupés (schéma n°6).

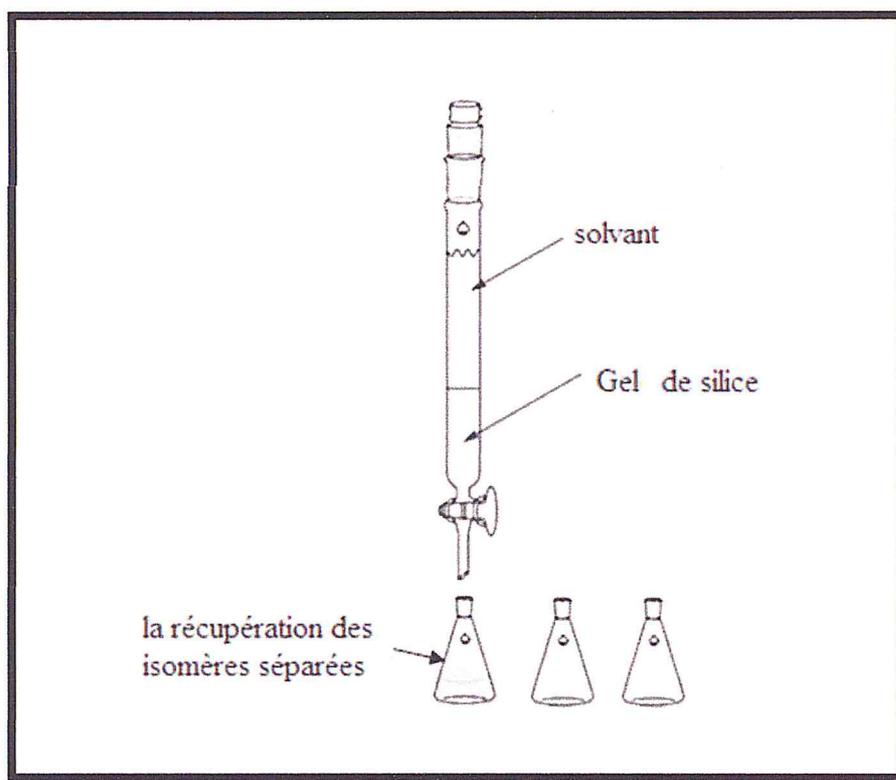


Schéma n°6: principe de séparation par chromatographie sur colonne ouverte

III.3.3- Séparation des isomères d'isoxazolidine par chromatographie flash

- Choix de la phase mobile : Pour s'assurer de la bonne séparation des isomères par cette méthode, on doit choisir une phase mobile qui donne des R_f compris entre 0.2 et 0.3.
- Le remplissage de la colonne, déposition de l'échantillon et la séparation des mélanges n'est pas très différente de celle de la chromatographie sur colonne ouverte. La différence principale entre ces deux méthodes est dans le choix du matériel. La colonne et la récupération des fractions doit se faire dans un système fermé pour permettre la montée de la pression comme le montre le schéma n°7:

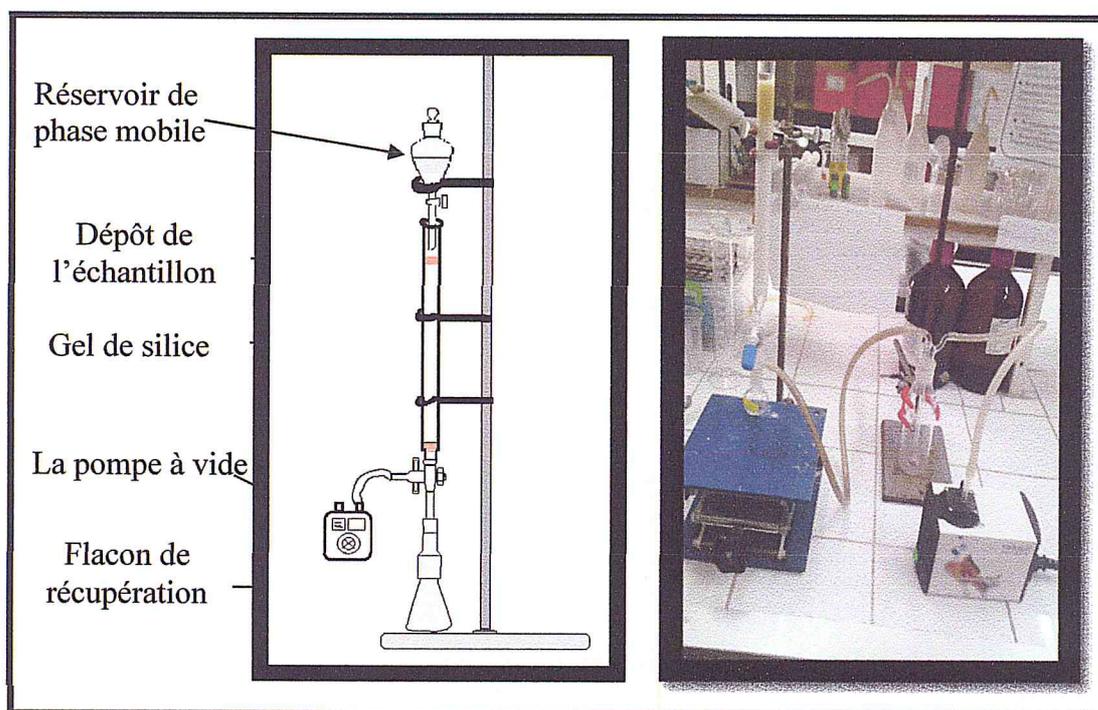


Schéma n°7: principe de la chromatographie flash en a) schématisation, en b) matériel utilisé

III.3.4- Séparation du mélange d'isoxazolidine par HPLC



Figure n°4: Appareil HPLC de Marque Agilent

Pour la séparation du mélange d'isoxazolidine par HPLC, notre choix a été porté sur :

- la colonne : C₁₈
- la phase mobile : acétonitrile – eau

Chapitre III : partie expérimentale

- la longueur d'onde : 245 nm
- le débit utilisé est : 1ml/min

Résultats et discussions

Le but de notre travail est la séparation des isomères d'isoxazolidine. Ces derniers sont obtenus par la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones correspondantes sur des alcènes sous reflux. Dans notre travail, nous avons choisi la C, N-diphénylnitronne pour sa stabilité et par ce qu'elle se présente sous une seule forme géométrique Z. cela, réduit le nombre d'isomères d'isoxazolidines à quatre au lieu de huit.

IV.1- Préparation de l'isoxazolidine

La préparation de l'isoxazolidine est réalisée par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre la C, N-diphénylnitronne et l'acrylonitrile. Comme le résume la réaction (1). Cette réaction est réalisée dans le toluène à reflux pendant douze heures avec un rapport molaire nitronne/ACN égale à 1/2 (schéma n°8) [26].

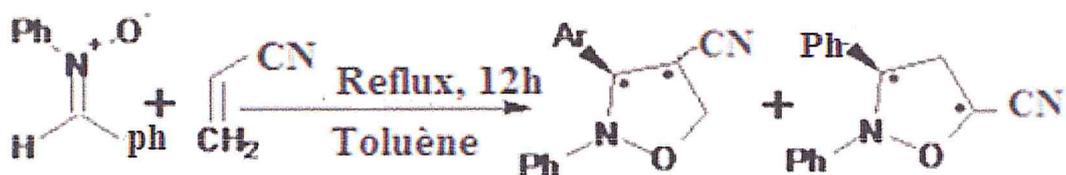


Schéma n°8: la réaction de cycloaddition entre la C, N- diphényl nitronne et l'acrylonitrile

Le mécanisme concerté de cette réaction est donné dans le schéma n°9.

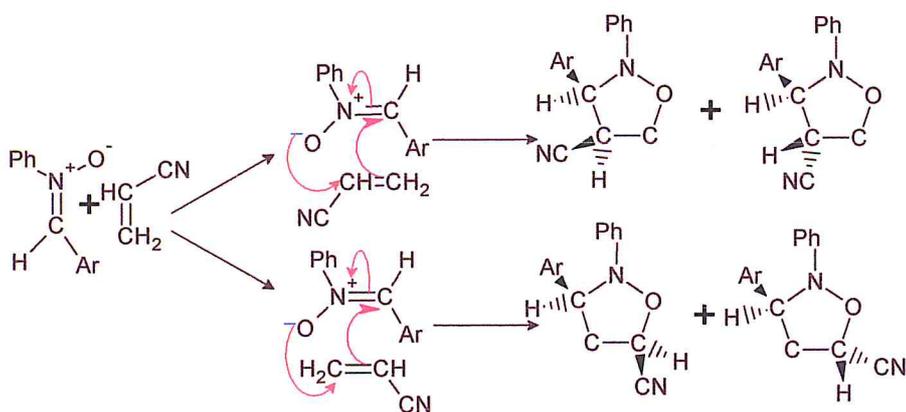


Schéma n°9 : Mécanisme de la réaction de cycloaddition des nitrones sur l'ACN.

Le tableau (3) regroupe les rendements en isoxazolidines ainsi que leurs points de fusion et leur rapport frontaux en CCM.

Tableau (3) : Rendement (Rdt), point de fusion (P_f), rapports frontaux (R_f) en CCM :

Propriété		Ph
Rdt %		46
R _f *	Isomère 1	0.3
	Isomère 2	0.4
	Isomère 3	0.5
	Isomère 4	0.7

* CCM sur plaque de Gel de silice; Phase mobile : diéthyléther- éther de pétrole (25/75)

Les résultats de l'analyse par CCM analytique a montré l'apparition de quatre spots bien séparés. Ces derniers ont été attribués aux quatre isomères d'isoxazolidines attendues (figure n°5).

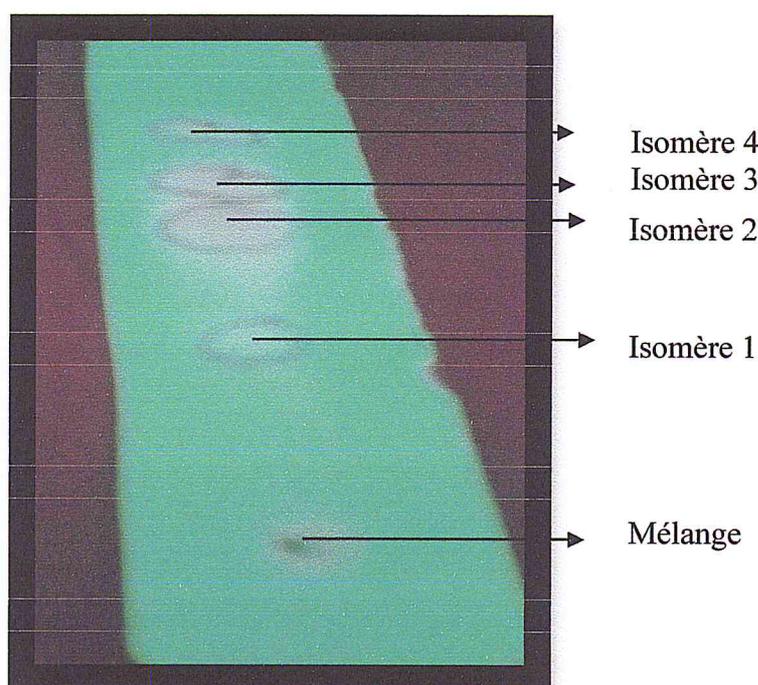


Figure n°5 : Séparation des quatre isomères d'isoxazolidines

IV.2-Analyse spectroscopique des isoxazolidines synthétisées

L'isoxazolidine obtenue est caractérisée par spectroscopie de masse, UV et IR.

IV.2.1- Spectroscopie de masse

Dans les spectres de masse en impact électronique de l'isoxazolidine aromatique synthétisée obtenu, on note l'apparition du pic moléculaire, et les pics de base. Ces derniers sont résumés dans le tableau (4), le spectre de masse est donné dans la (figure n°6).

Tableau (4) : Pic moléculaire et pic de base par spectroscopie de masse en impact électronique de l'isoxazolidines synthétisée

Ar	Masse molaire	Masse (m/z)	
		pic moléculaire	Pic de base
Ph	250,295	250	91

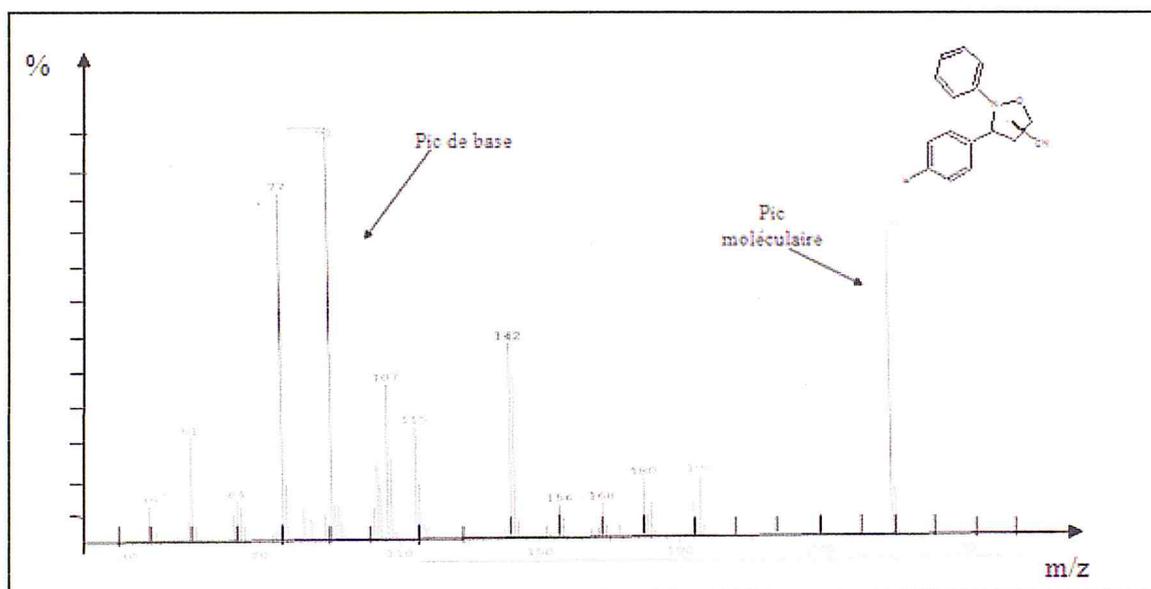


Figure n°6: Spectres de masse en impact électronique des isoxazolidines.

Le spectre de masse donne un pic moléculaire identique à la masse de l'isoxazolidine attendu.

IV.2.2- Spectrophotométrie UV-Visible

Dans le but de s'assurer du bon déroulement de la réaction de cycloaddition 1, 3 dipolaire, nous avons réalisé une analyse par spectroscopie UV-Visible de la nitroène et de l'isoxazolidine synthétisé. Ces analyses sont réalisées en solutions dans le méthanol à une concentration de 10^{-4} moles par litres. Les résultats sont regroupés dans le tableau (5).

Tableau (5) : Caractérisations spectrales en UV-Visible de la C,N-diphényl nitroènes et de l'isoxazolidine synthétisées

nitroène	Bande K		Bande E2		Bande E1	
	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}
nitroène	312,5	21890	230,5	10840	203,5	18410
isoxazolidine	/	/	238,5	179	203	688

La figure n°7 donne les spectres UV des isoxazolidines synthétisées. Chaque spectre correspond au mélange brut des quatre isomères.

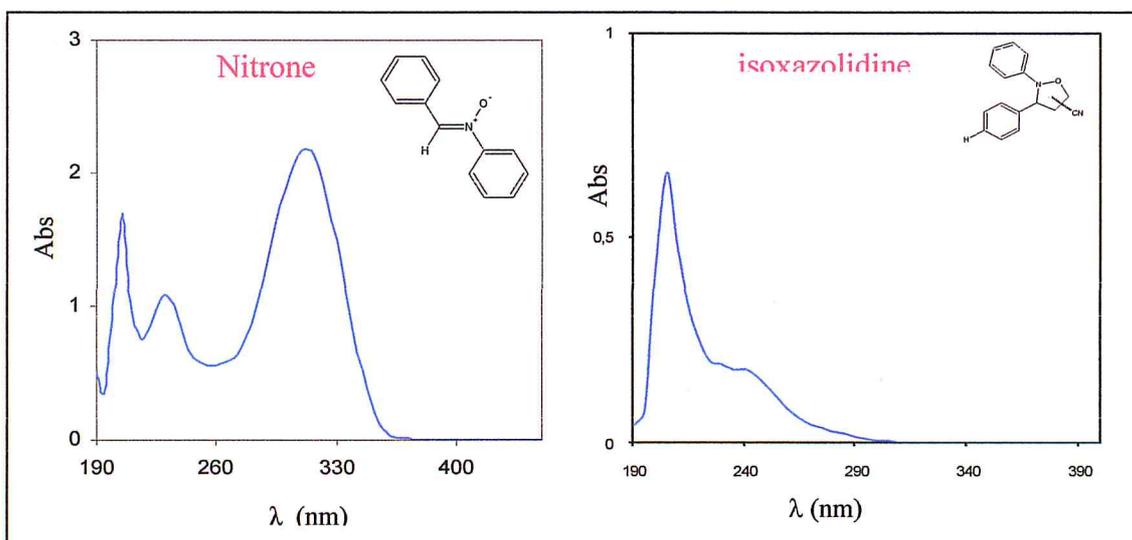


Figure n°7 : Spectres UV de la C,N-diphényl nitroène et de l'isoxazolidine synthétisée dans le méthanol (10^{-4} moles/l), à 25°C.

L'analyse de ces résultats nous a permis de vérifier l'absence de la bande K qui correspond aux transitions électroniques dans les molécules des nitroènes. Ceci montre que la réaction de cycloaddition a eu bien lieu.

IV.2.3- Spectrophotométrie infrarouge

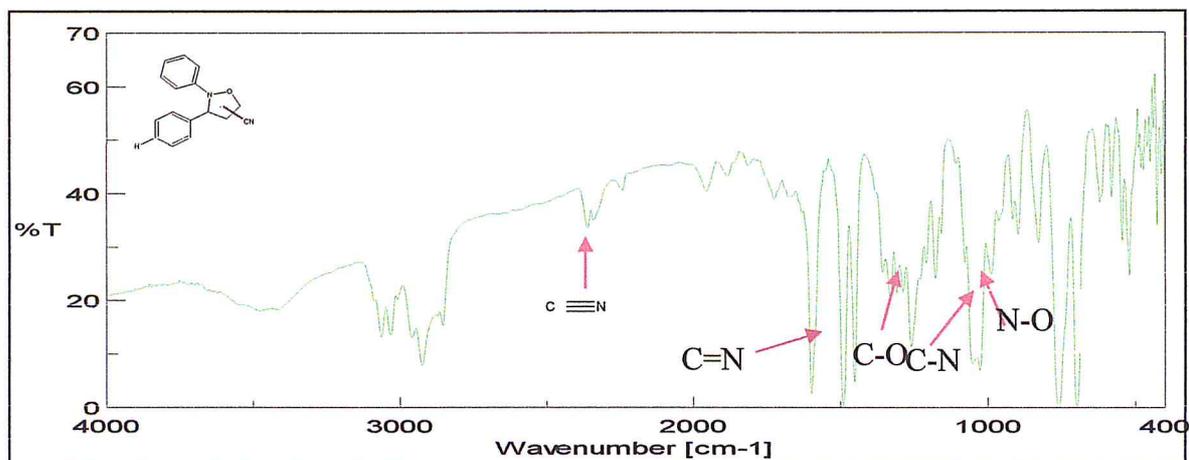


Figure n°8 : Spectres IR en pastille de KBr de l'isoxazolidine synthétisée.

L'étude des spectres IR de l'isoxazolidine et leur comparaison à celui de la nitroène nous a permis de détecter l'apparition de nouvelles bandes d'absorption et la disparition d'autres. C'est le cas des bandes qui apparaissent vers 1080, 1020, et 1200 cm^{-1} . Ces dernières ont été attribuées respectivement aux nouvelles liaisons C-N, N-O, et C-O qui sont formées lors de la cycloaddition des nitrones. L'absence de la bande d'absorption aux environs de 1540 à 1550 cm^{-1} témoigne de la disparition de la liaison C=N et affirme la disparition de toute la nitroène. Aussi, on remarque la présence de la bande caractéristique de la fonction $\text{C}\equiv\text{N}$ aux environs de 2240 cm^{-1} .

Le tableau (6) regroupe les fréquences des principales bandes d'absorption en infrarouge des isoxazolidines synthétisées. Les spectres IR des isoxazolidines sont donnés dans la figure n°4.

Tableau (6): Caractérisations spectrales en infrarouge de l'isoxazolidine synthétisée.

nitroène	Fréquence d'absorption (cm^{-1})			
	C-N	C-O	N-O	CN
isoxazolidine	1110,9	1257,5	1033,8	2445,6

IV.3- Séparation du mélange d'isoxazolidines

L'isoxazolidine synthétisée est obtenue sous forme d'un mélange de quatre isomères. Ces derniers sont deux couples de régioisomères et diastéréoisomères comme le montre le schéma n°8.

Cela rend leur séparation par les méthodes chromatographie ordinaire possible, qui sont la CCM analytique , CCM préparative, la technique de la colonne ouverte, chromatographie flash et la Chromatographie liquide haute Performance (HPLC)

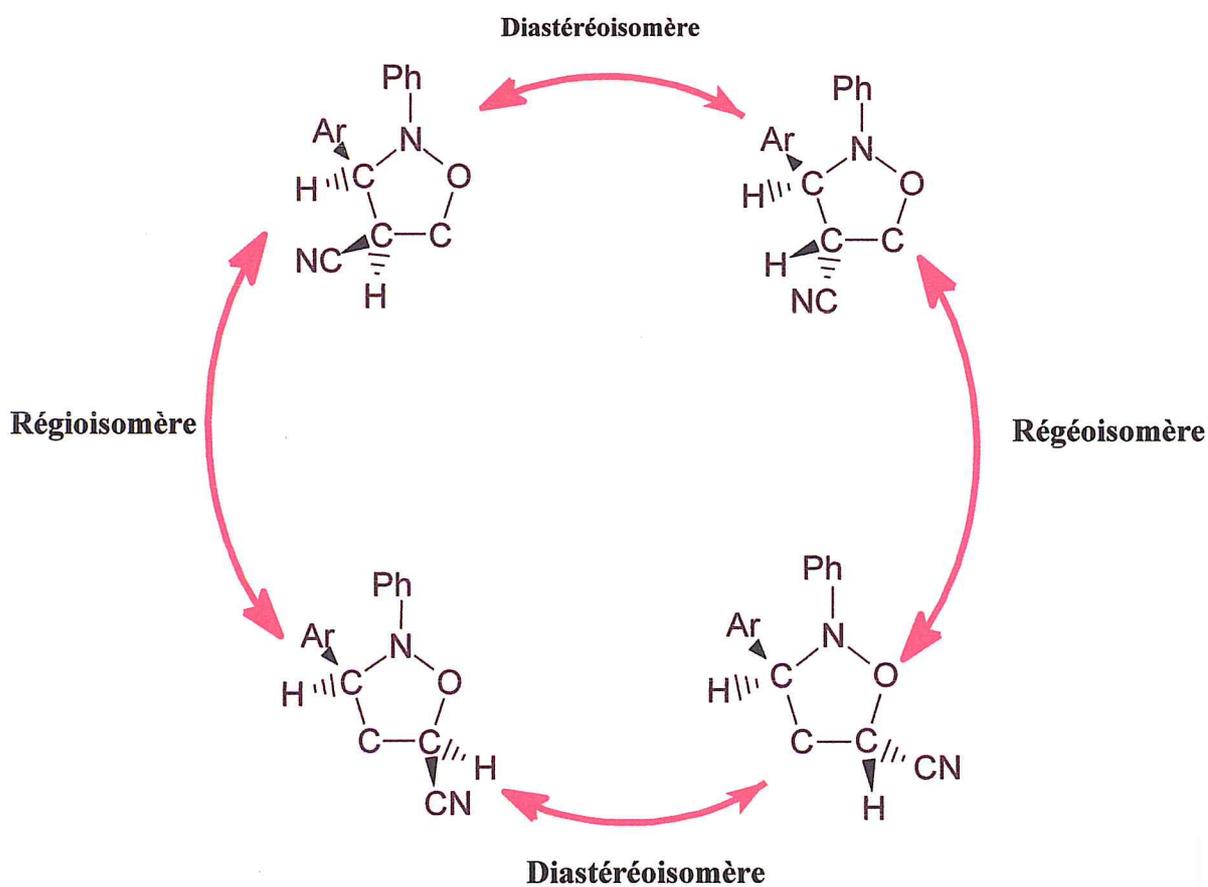


Schéma n°8: relation d'isomérisation entre les quatre isomères d'isoxazolidines

IV.3.1- CCM préparative

Dans le but d'avoir la plus grande quantité de chaque isomère, nous avons réalisé une séparation par CCM préparative. Plusieurs solvants ont été testés afin de trouver les meilleures conditions chromatographiques qui révèlent les quatre isomères.

Le mélange d'isoxazolidine a été posé sur la plaque de Gel de silice sous forme d'une ligne (figure n°9).

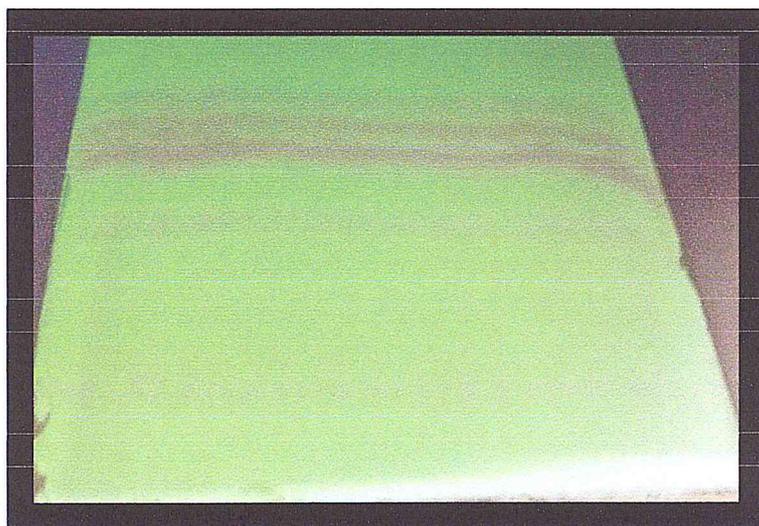


Figure n°9 : Séparation des isomères d'isoxazolidines par CCM préparative sur plaque de gel silice, en utilisant la phase mobile (25% Diéthyl éther - 75%éther de pétrole).

Après migration, on gratte chaque ligne et on le récupère avec le dichlorométhane pour avoir les isomères séparés. Ces derniers seront séchés. Une CCM analytique a été réalisée pour confirmer la bonne séparation des isomères d'isoxazolidines. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n°10.

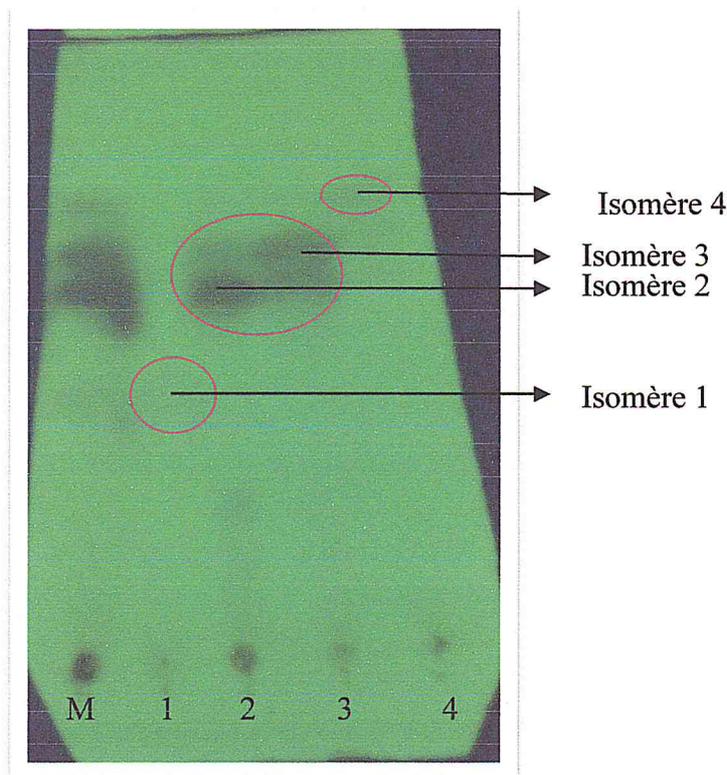


Figure n°10 : Analyse des isomères séparés par CCM analytique, en utilisant la phase mobile (25% Diéthyl éther - 75%éther de pétrole).

Les résultats de l'analyse par CCM analytique ont montré une bonne séparation de l'isomère 1 et 4 mais les isomères 2 et 3 restent attachés. Cette technique malgré sa simplicité reste fatigante et très coûteuse (solvant et Gel de silice).

IV.3.2- Chromatographie sur colonne ouverte

La séparation par chromatographie sur colonne est basée sur la différence de vitesse d'entraînement vers le bas de la colonne des isomères. Ces vitesses dépendent de la capacité d'adsorption du gel de silice des isomères d'isoxazolidine, et de la solubilité de ces derniers dans l'éluant et donc de leur polarité.

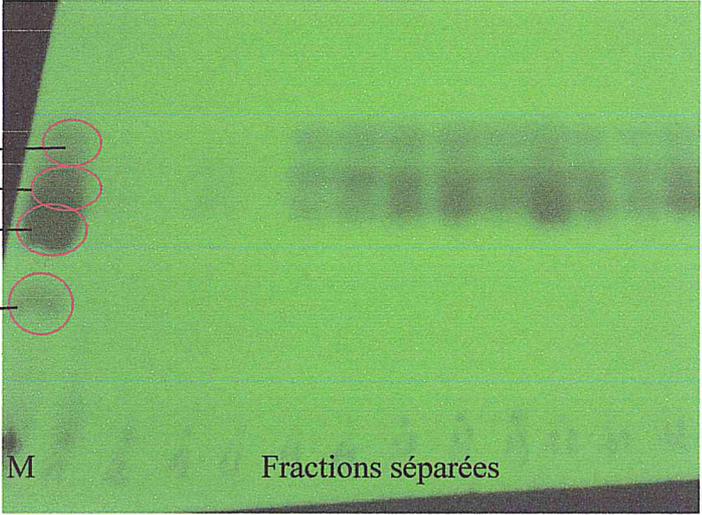
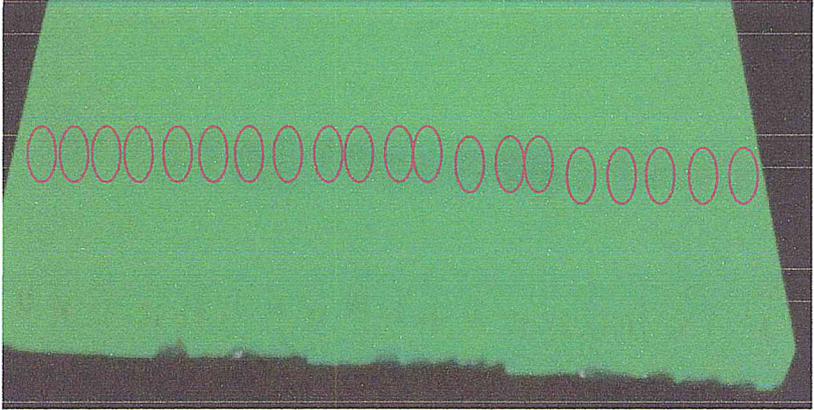
Nous avons préparé une colonne ouverte de gel de silice dilué dans la phase mobile (figure n°11). Le mélange d'isoxazolidine est placé en haut puis déplacé à travers la colonne par l'éluant. A la sortie de la colonne, les fractions sont récupérées et analysées par CCM analytique. Cette analyse nous permet de juger du bon choix de la phase mobile en se basant sur le taux de séparation de chaque isomère.

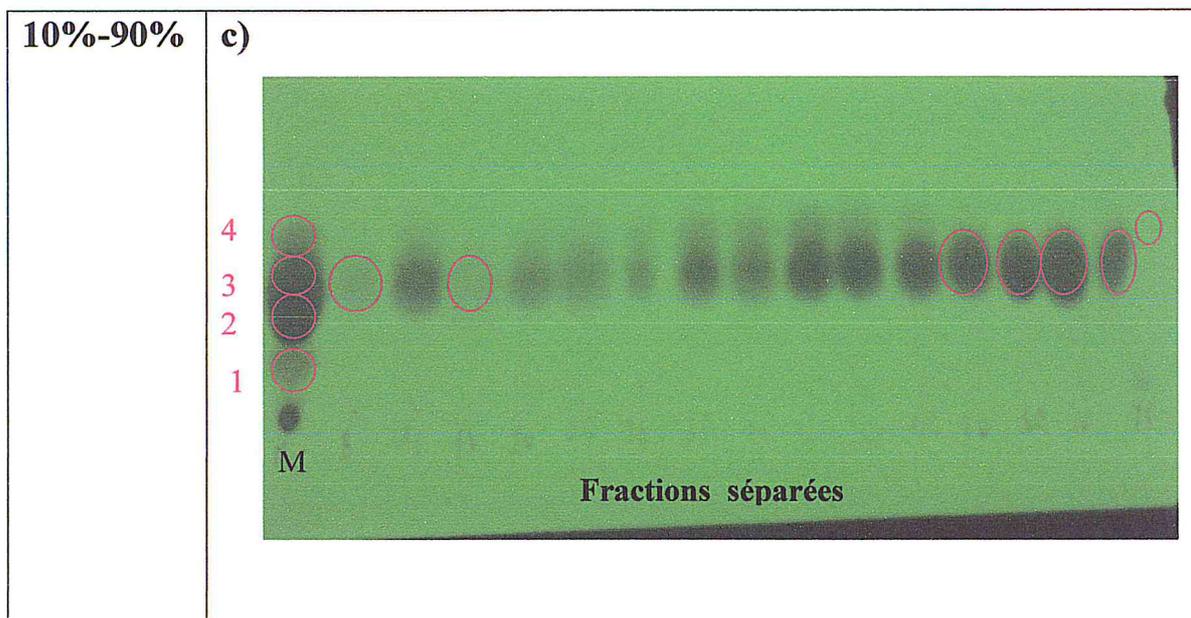


Figure n°11: Séparation d'isoxazolidine synthétisé e par chromatographie sur

Il faut signaler que l'utilisation d'autre phases mobiles décrites par la littérature tel que (l'hexane et l'acétate d'éthyle, chloroforme...) a conduit soit à l'entraînement totale du mélange d'isoxazolidine sans séparations soit au séchage de la colonne. Cela nous a mené à garder le système diéthyléter- éther de pétrole comme éluant de la chromatographie sur colonne et de la CCM. Seules les proportions des deux solvants qui seront variées. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (7)

Tableau (7) : Résultats de séparation du mélange d'isoxazolidine par chromatographie sur colonne ouverte

Diéthyléther-éther de pétrole	Plaque de gel de silice des fractions d'isoxazolidine séparées
40%-60%	<p>a)</p>  <p>Isomère 4 ←</p> <p>Isomère 3 ←</p> <p>Isomère 2 ←</p> <p>Isomère 1 ←</p> <p>M Fractions séparées</p>
20%-80%	<p>b)</p> 



La séparation avec une phase mobile 40%-60% (diéthyl éther- éther de pétrole) n'a pas permis la séparation des isomères. Cela a été attribué à la polarité élevée de la phase mobile. En diminuant la polarité de la phase mobile à (20%-80%), on arrive à isoler les isomères 2 comme le montre la (figure b du tableau 7). En diminuant encore la polarité 10%-90% (diéthyl éther- éther de pétrole) on a pu isoler l'isomère 3 et 4 (figure c du tableau 7).

L'analyse des plaques CCM établie après la séparation par colonne a montré que l'isomère 2 est le plus abondant dans tous les mélanges suivie de l'isomère 3. Selon la littérature, la majorité des cycloaddition nitroène-oléfine monosubstitué donne l'isoxazolidine 5-substitué comme isomère majeur [26]. On peut alors, par diduction, corespondres ces deux composé aux régéoisomères 5 substitués trans et cis respectivement.

Il faut signaler que cette méthode est plus efficace que la CCM préparative. Pour gagner en durée de manipulation et en quantité de solvant nous avons utilisé la chromatographie flash

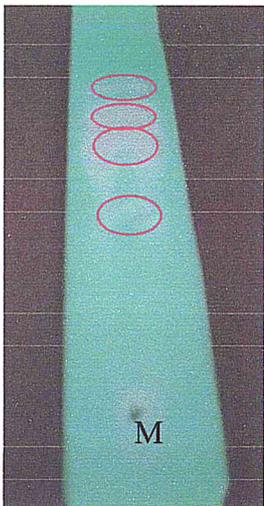
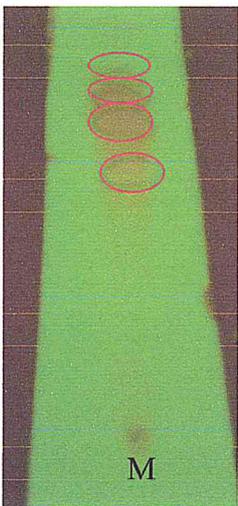
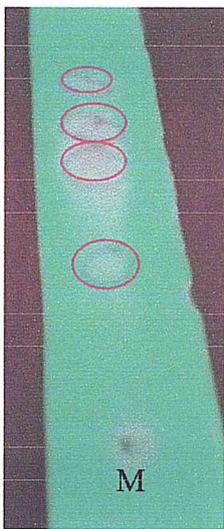
IV.3.2- Chromatographie flash

Dans le but de faciliter la séparation des isomères d'isoxazolidines préparées. Nous avons réalisé une séparation par chromatographie flash. Une meilleure séparation par chromatographie flash est obtenu quand le R_f par CCM analytique est compris entre

0.2 et 0.3. Plusieurs solvants ont été testé a fin de trouvés ces conditions. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux (8 et 9).

Tableau (8) : R_f des isomères du mélange d'isoxazolidine par CCM analytique sur plaque de Gel de silice, en utilisant différente phases mobile a base de (éther de pétrole/ acétate diéthyle) :

Acétate diéthyle/éther de pétrole		20 /80 (a)	10/90 (b)	5/95 (c)
R _f *	Isomère 1	0.4	0.3	0.3
	Isomère2	0.5	0.5	0.5
	Isomère 3	0.6	0.6	0.6
	isomère 4	0.7	0.7	0.7

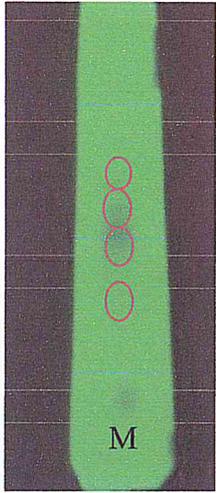
(a)	(b)	(c)
		

L'utilisation du mélange acétate d'éthyle- éther de pétrole à différents proportion n'a pas permit l'obtention des R_f entre 0.2 et 0.3, alors on est revenu à l'utilisation du mélange diéthyle éther- éther de pétrole. Les proportions utilisées ainsi que leurs résultats sont donnés dans le tableau (8).

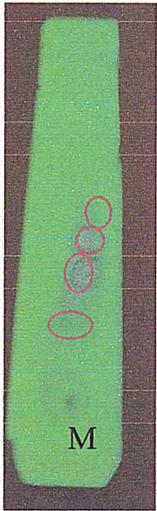
Tableau (9) : R_f des isomères du mélange d'isoxazolidine par CCM analytique sur plaque de Gel de silice, en utilisant différente phases mobile a base de (éther de pétrole/diéthyle-éther) :

Diéthyl éther/éther de pétrole		20 /80 (a)	10/90 (b)	5/95 (c)
R_f^*	Isomère 1	0.2	0.1	0.1
	Isomère2	0.3	0.2	0.2
	Isomère 3	0.4	0.3	0.3
	isomère 4	0.5	0.4	0.3

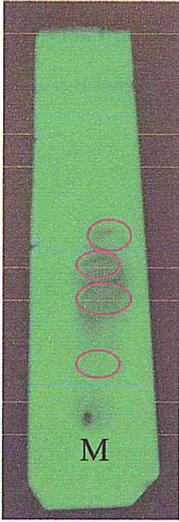
(a)



(b)



(c)



- Les résultats de ce tableau montre que l'utilisation de la phase mobile (diéthyle éther- éther de pétrole) donnera en principe de très bonne résultats .nous avons alors réalisé la séparation du mélange disoxazolidine par chromatographie flash en utilisant la phase mobile C du tableau (9).

Une CCM analytique a été réalisé pour confirmer la bonne séparation des isomères d'isoxazolidines, comme la montre la figure n°12.

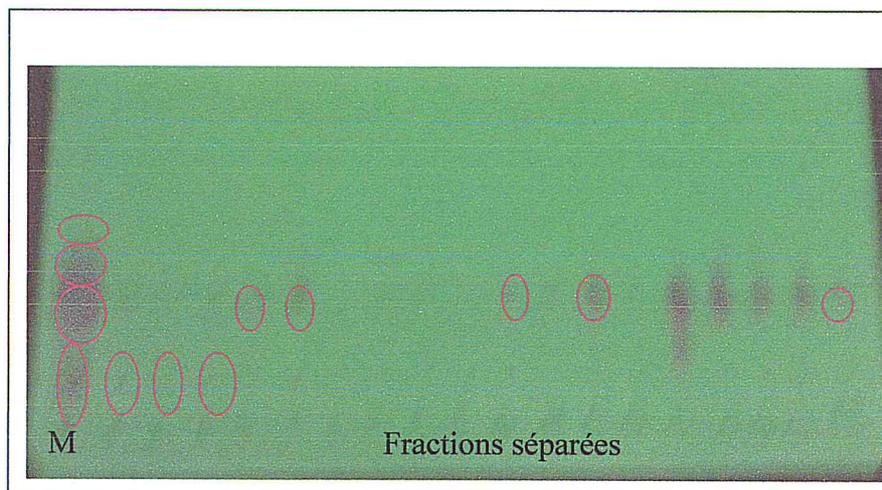


Figure n°12: Résultats de la séparation du mélange d'isoxazolidine par Chromatographie flash

- L'utilisation la phase mobile (5%-90%) diéthyl éther/éther de pétrole lors de la séparation des isomères d'isoxazolidines par chromatographie flash a permis la récupération des isomères 1 et 2 comme le montre la figure n°12.

IV.3.4- Séparation par HPLC

IV.3.4.1- Séparation du mélange Brut

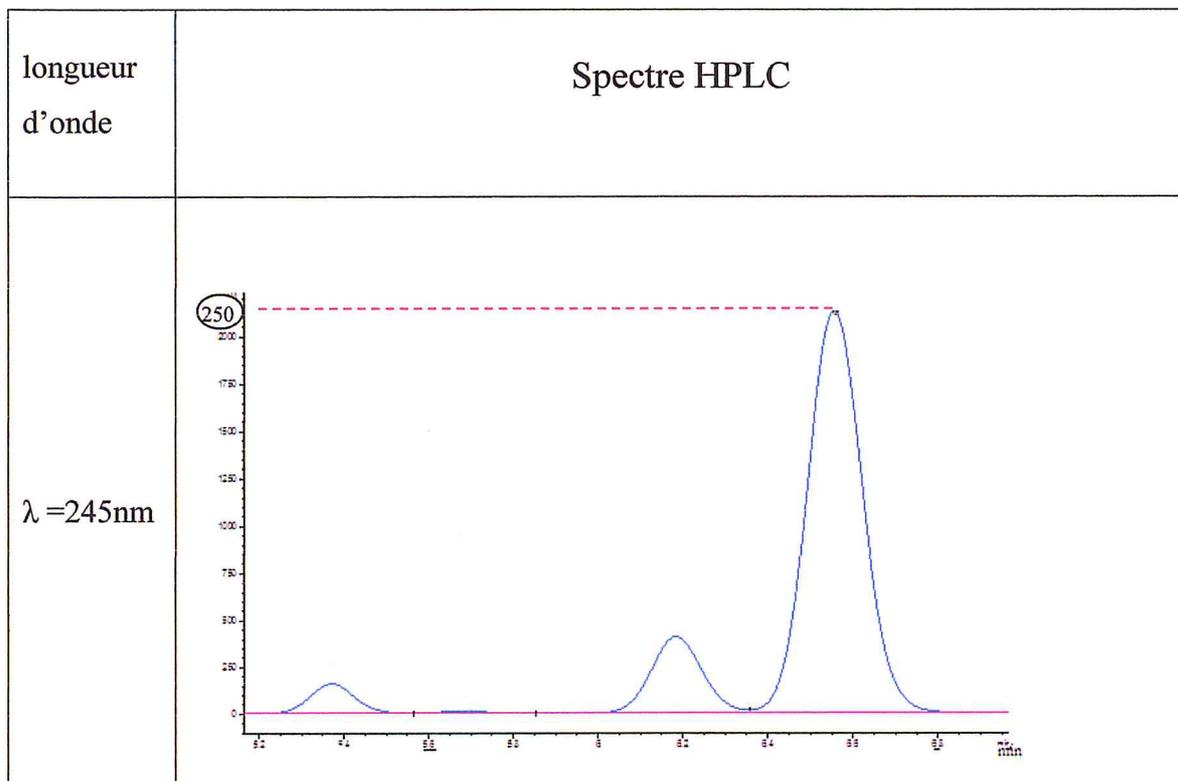
Dans le but d'avoir le pourcentage de chaque isomère dans le mélange, nous avons réalisé une séparation par HPLC. Dans ce travail, nous avons fixé tous les paramètres et nous n'avons varié que les pourcentages de la phase mobile. Notre choix a été porté sur le système acétonitrile-eau, la longueur d'onde a été fixée à 245 nm et le débit utilisé est de 1ml/min. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau (10).

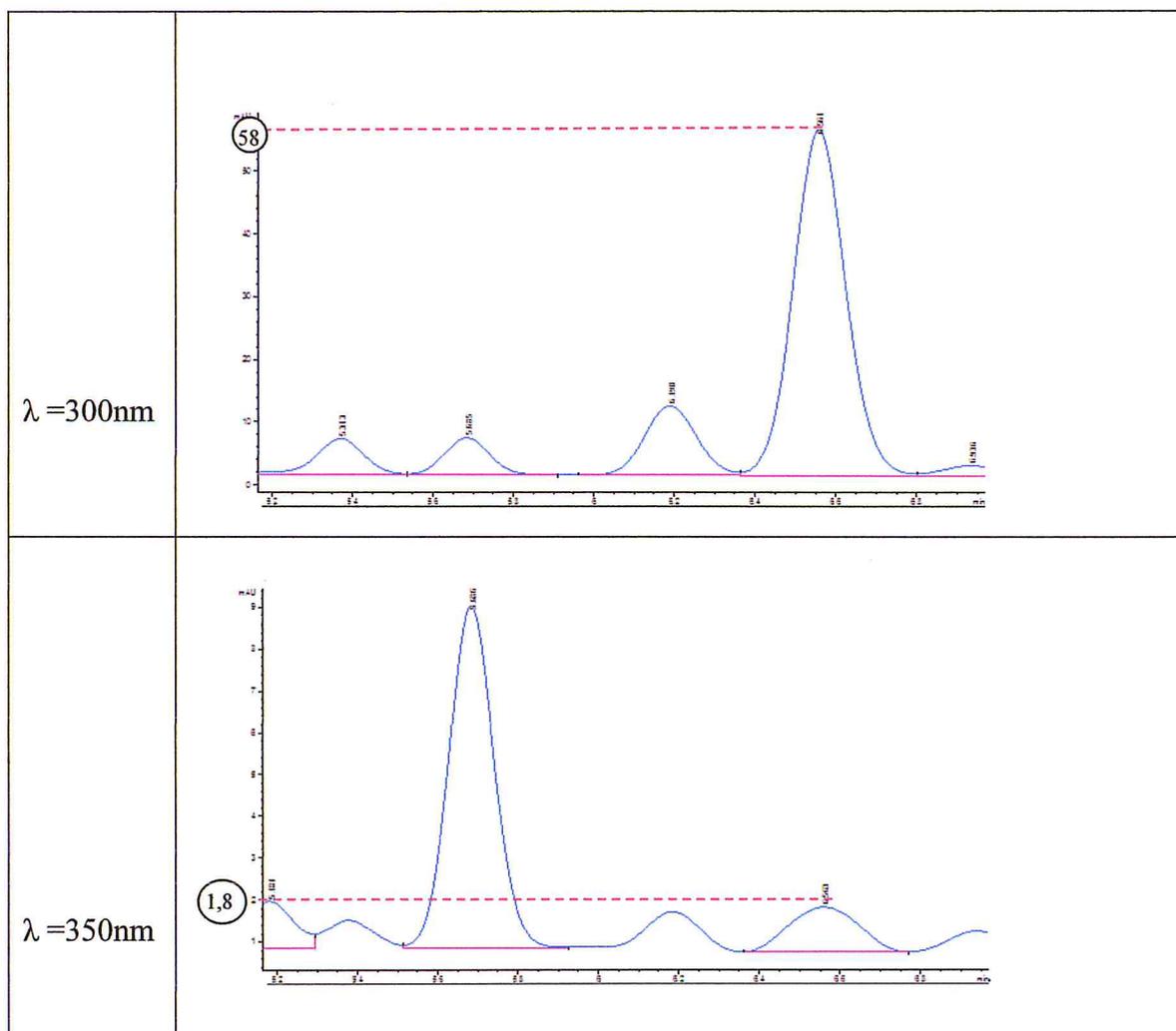
Tableau (10) : Chromatogrammes de l'analyse du mélange des quatre isomères d'isoxazolidines par HPLC en utilisant une colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (eau-acétonitrile)

<p>Phase mobile : Eau-acétonitrile</p>	<p>Spectre HPLC</p>
<p>25%-75%</p>	<p>a)</p> <p>DAD1 A, Sig=245,4 Ref=off (ISOCLASSIQUE000037.D)</p>
<p>30%-70%</p>	<p>b)</p> <p>DAD1 A, Sig=245,4 Ref=off (ISOCLASSIQUE000038.D)</p>
<p>40%-60%</p>	<p>c)</p> <p>DAD1 A, Sig=245,4 Ref=off (ISOCLASSIQUE000040.D)</p>

Dans notre résultats, l'utilisation d'une phase mobile riche en acétonitrile (figure a) et (figure b) a conduit à une mauvaise séparation. Avec une phase mobile de (40% eau- 60% acétonitrile), on obtient une meilleure séparation. Ce chromatogramme réalisé à 245nm montre quatre pics, seulement la lecture de la même analyse à 300 et 350nm montre la diminution de l'absorbance des pics qui sortent à 5.37 min, 6.18 min, 6.56 min et l'augmentation de l'absorbance du pic qui sort à 5.68 min comme le montre les figures du tableau n°11. Cela montre que ce dernier ne correspond pas à l'un des isomères d'isoxazolidine attendue.

Tableau (11) : Chromatogrammes de l'analyse du mélange des quatre isomères d'isoxazolidines par HPLC à des longueurs d'onde 245 nm, 300 nm et 350 nm en utilisant une colonne C18, débit 1 ml/min, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile).





D'après ces résultats on a choisi de travailler avec la phase mobile (60% eau- 40%) acétonitrile et identifier les pics obtenu par cette phase en utilisant l'étalonnage externe.

IV.3.4.2- Etalonnage externe

L'étalonnage externe est une méthode qui consiste à comparer sur deux chromatogrammes le temps de rétention du pic d'éluion de la substance de référence à celle du produit à doser. Dans notre cas, on utilisera les isomères séparé précédemment comme référence. On comparera ensuite le temps de rétention de chaque isomère au temps de rétention des pics du chromatogramme du mélange. Les résultats obtenus sont illustré dans la figure n°13.

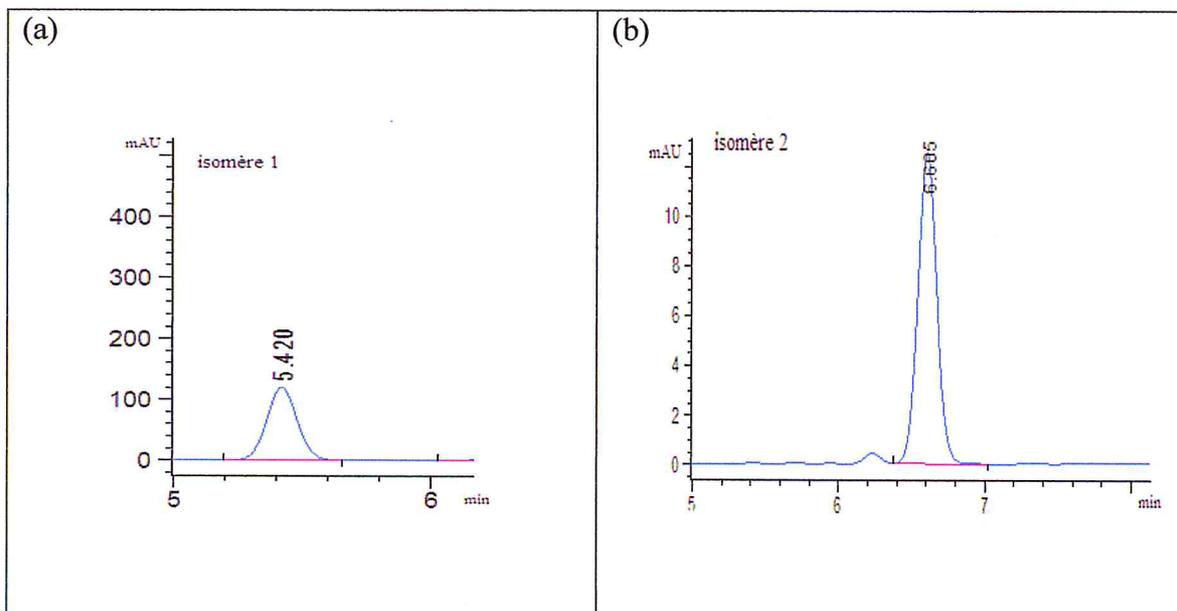
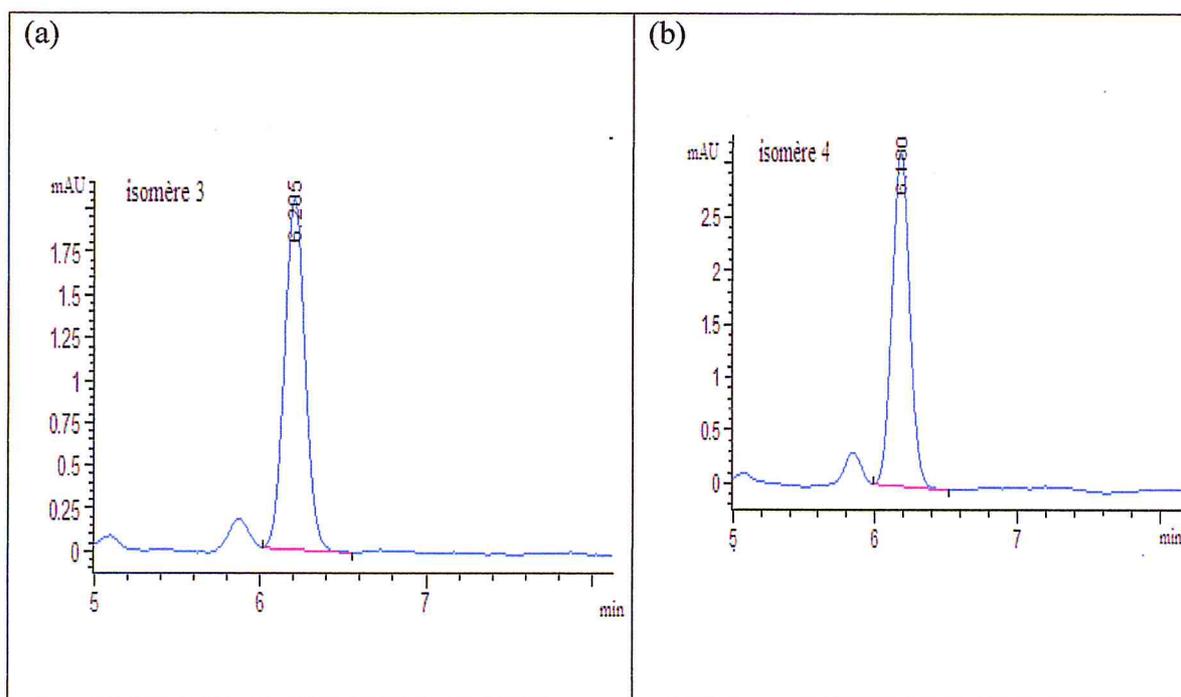


Figure n°13 : chromatogramme des isomères de 1 en (a) et 2 en (b) obtenus. En utilisant la Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile)



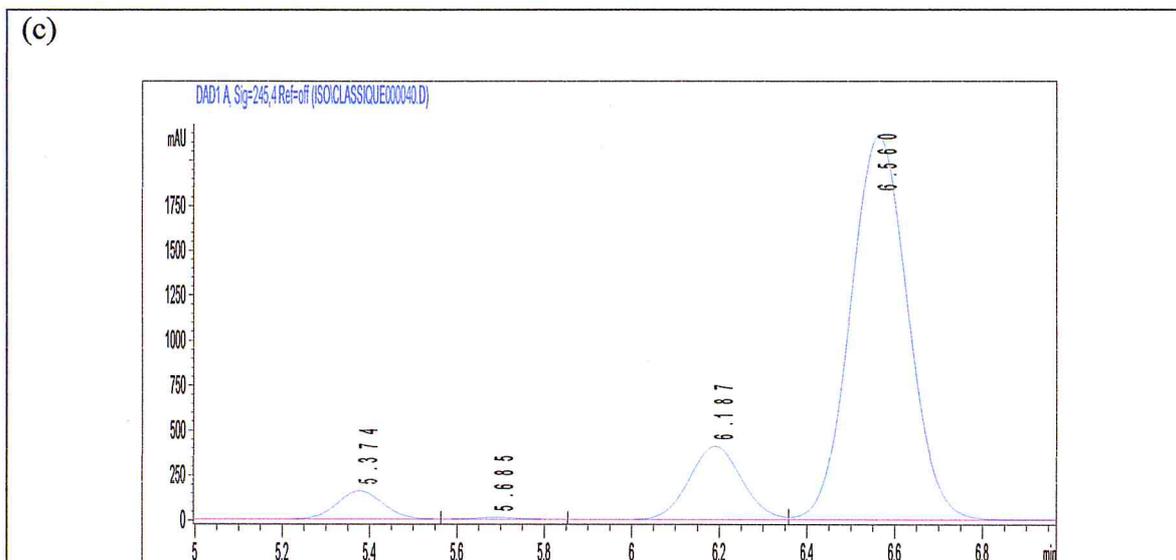


Figure n°14 : chromatogramme des isomères de 3 en (a) et 4 en (b) obtenus et du mélange en (c). En utilisant la Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile)

La séparation par HPLC donne un chromatogramme avec trois pics au lieu de quatre. L'étalonnage externe a permis de correspondre ces pics aux isomères d'isoxazolidines comme suis. Le pic qui sort à 5.37 min correspond à l'isomères 1, celui qui sort à 6.56 min Correspond à l'isomère 2, alors que les isomères 3 et 4 donnent le même pic 6.18 min Puisque ils présentent des temps de rétentions 6.20 min 6.18 min respectivement comme le montre la figure n°14.

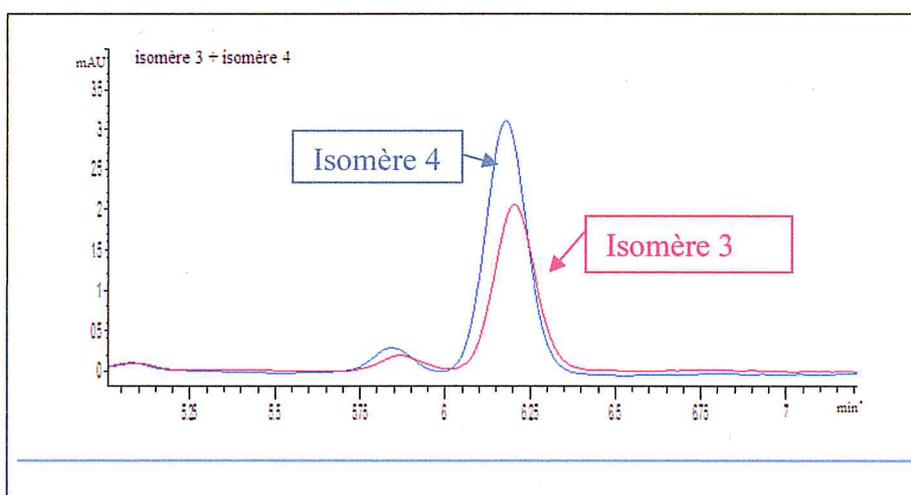


Figure n°15 : chromatogramme de la superposition des isomères 3 et 4. Colonne C18, débit 1 ml/min, longueur d'onde 245 nm, phase mobile (40% eau- 60% acétonitrile)

Conclusion Générale

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire a principalement été consacré à la séparation des isomères d'isoxazolidines par chromatographie .

La première étape de notre travail a été la synthèse de ces isoxazolidines. Nous avons alors réalisé la réaction de cycloaddition 1.3- dipolaire entre la C, N-diphénylnitronne et l'acrylonitrile. Le produit est obtenu avec un rendement de 46%. Ce dernier à été analysé par spectroscopie de masse (SM) qui a révélé la présence du pic moléculaire, par spectroscopie infra rouge (IR) où on a détecté la présence des pics des fonctions caractéristiques, et par spectroscopie UV-Visible. L'analyse par CCM a montré l'apparition de quatre spots qui ont été attribués aux quatre isomères attendus.

La séparation de ces isomères par CCM préparative, chromatographie sur colonne ouverte et chromatographie flash nous a permis de récupérer chaque isomère à part. La séparation des isomères d'isoxazolidines par HPLC nous a donné un chromatogramme avec trois pics au lieu de quatre. L'attribution de chaque pic à l'isomère correspondant est réalisée grâce a l'étalonnage externe.

L'utilisation du mode gradient de solvant devrait améliorer la séparation par HPLC.

L'analyse par RMN ^1H et ^{13}C de chaque isomère séparé nous permettra de faire une étude de la régéo et la stéréosélectivité de la réaction.

Bibliographie

- [1] K. N. Hook, J. Gonzales, Y. Li, Acc, "Péricyclique Unis Transition: Passion et scrupules ", 1935-1995, *Res.*, Chem. Res. 1995, 28, 81. 26
- [2] K. N. Hook, "théorique et expérimentale sur cycloaddition Réactions," thème dans la chimie actuel, (*Progrès de la recherche chimique*).1979, 79, 1.
- [3] J.Hamer and A.Macaluso, " Nitrone". *Chem Rev* 64, 473 (1964).
- [4] S.R.Sandler and W.Karo," Synthèse de quelques nouveaux isoxazolidines par 1,3-dipolaire". *Chem .Vol* 3, PP.351-376 (1989).
- [5] H. Yamanmoto, S. Saito, " Designer acides de Lewis catalyseurs pour la synthèse organique sélective ". *Pure & Appl Chem.*, 71, 239, (1999).
- [6] B.ACHOURI, "Synthèse et étude théorique d'une série d'isoxazolidines par réaction de cycloaddition" : Thèse de l'Université de Borj Baji Mokhtar (Annaba), P14, (2011).
- [7] F. Pfrengle and H. Reissig Beilstein, "L'addition d'énol éthers de nitrones lithié et un acide de Lewis ultérieure induite cyclisations à énantiopurs 3,6-dihydro-2H pyranes - une approche de glucides mimétiques". *J. Org Chem*, 6 No. 75 (2010).
- [8] S. Saito, H. Yamanmoto, "Designer acides de Lewis catalyseurs - réactifs d'aluminium volumineux pour la synthèse organique sélective". *Chem. Commun.* 1585, (1997)
- [9] S. Chimichi, *Synthesis*, "détermination de la structure et de l'activité anti-proliférative de Photo-Nouveau 3-pyrazolyle ou -Isoxazolyl Remplacé 4-hydroxy-2 (1H) – quinolinones".*Tetrahedron*, 62, 90-96, (2006).
- [10] Nacera Belloula, "Préparation Des Isoxazoles Et Isoxazolines Quinoléiques Par Des Réactions De Cycloaddition 1,3- Dipolaires". (2006)
- [11] A. Banerji and P. Sengupta, *J. Indian Inst*, "Synthèse de quelques nouveaux isoxazolidines par 1,3-dipolaire".*Sci, J. Indian Inst.* 81, 313 (2010).
- [12] K. Maruoka, S. Saito, H. Yamamoto, *Synlett* 1994, 439.
- [13] S. Kanemasa, N. Ueno, M. Shirahase, "Les réactions de cycloaddition de la nitrone α -accepteurs carbonyle, β -insaturation catalysées par un catalyseur d'acide de Lewis. Accélération du rythme dramatique et de l'amélioration de la régiosélectivité et la diastéréosélectivité ".*Tetrahedron Lett.* 43, 657, (2002).

[14] K. N. Hook, "Réactions de cycloaddition en synthèse organique". Top.Cur Chem. 79, 1, (1979).

[15] K. V. Gothelf, R. G. Hazell, K. A. Jørgensen, " Contrôle de diastéréo-énantiosélective en réactions de cycloaddition 1, 3-dipolaires catalysée par un métal de nitriles avec des alcènes. Des études expérimentales et théoriques ". J. Org Chem. 61, 346 ,(1996).

[16] Florian VITON De Saint Marcellin (France), "Acides de Lewis chiraux Fe(II) et Ru(II) Développements, mécanismes et applications". Thèse de l'universite de geneve département de chimie organique, P131, (2002).

[17] Livre "Analyse chimique et caractérisation". Vol p1-4, istra, techniques de l'ingénieur, analyse et caractérisation 0245.9639

[18] G. Mahuzier et m. Hamon, "méthodes de séparation", 12ème édition, abrégés de chimie analytique, masson 2.225.81849, (1990).

[19] Francis Rouessac, Annick Rouessac, "Méthodes et techniques instrumentales modernes". Livre de : Analyse chimique - 6ème édition, (2004).

[20] B. Fried et J. Sherma " Chromatographie sur couche mince Pratique ". springer-verlag 0.8493.2660.5, (1996).

[21] Flash Purification, 2014. Article de l'institut de chimie et des matériaux paris

[22] V. JACOB. "La Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC)" Livre: de Génie Analytique n° 001. P 1-10, (2010).

[23] Livre : La chimie pour tous, chimie analytique, HPLC.2008.

[24] H. KAHINA, A. TOUATI, A.AIT YAHIA, A.MEKLAT, "Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de deux séries de nitrones et d'isoxazolidines synthétisées". Sciences & Technologie. pp.65-72, (2008).

[25] F. BOUTALEB, AIT MEHDIA. ZEGHDAOUI, A. ZITOUNI H. BOUZIANE, "synthese, caracterisation et evaluation de l'activité antimicrobienne d'une serie d'isoxazolidines".Sciences & Technologie, pp.82-86, (2011).

- [26] AKBAR MOBNIKHALDI, NASER FOROUGHIFAF, ZAHRA KALATE. Turk.J, " Synthèse de quelques nouveaux isoxazolidines par 1, 3-dipolaire Cycloaddition Réaction de Nitriles et OIens ".Chem, 147-152, 29 (2005).