

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention d'un Diplôme de

Mastère

Option : Chimie Appliquée

Séparation des isomères d'isoxazolidines par chromatographie liquide

par :

M^{elle} DJELLAL Nesrine et M^{elle} ACHOUR Selma

Soutenue publiquement le 30/09/2019 devant le jury compose de :

M ^r S.HAMANI	MCA	USDB Président
M ^r A. OURADI	MCB	USDB Examineur
M ^r A. AIT YAHIA	MAA	USDB Invité
M ^{me} K. HAMZA	MAA	USDB Promotrice

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Nous remercions en premier « Allah le plus puissant » qui nous a donné du courage et de la volonté afin d'accomplir et parvenir à élaborer ce mémoire.

*Nous tenons à remercier notre promotrice M^{me} **Hamza Kahina** pour avoir dirigé ce travail, et pour son aide très précieuse, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses conseils qui ont fait progresser ce travail. Un agréable devoir de lui adresser un grand merci pour la confiance et liberté d'action dont nous avons bénéficié tout au long de ce mémoire.*

*Un grand merci aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail Mr **S.HAMANI** et Mr **A.OURADI**, Merci beaucoup.*

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

*Des remerciements très particuliers sont présentés aux ingénieurs du laboratoire de Département de Chimie d'université **BLIDA 1**. M^{me} **HADAD**, Mr **CHWAKI** et M^{me} **OUIAZRI** pour leurs soutiens et leurs encouragements.*

*Un grand merci à tous les membres du laboratoire de contrôle de qualité de **SAIDAL Zmirli EL-HARACH** qui nous ont aidés à surmonter nos aléas de notre travail pratique à leur tête M^{me} **BOUHENNI** directrice de laboratoire qui nous a poussés à progresser*

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidées de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Selma et Nesrine

DEDICACE

Je dédie cet événement marquant de ma vie à :

♥ A mon très cher père **Djamel**, le premier et le dernier homme de ma vie, source d'amour, d'affection, de générosité et de sacrifices. Tu étais toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec tes précieux conseils. Que ce travail soit le témoignage des sacrifices que tu n'as jamais cessé de déployer pour mon éducation et mon instruction. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'admiration que je porte au grand homme que tu es. Puisse Dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

♥ A ma très chère mère **Rachida**, source de ma vie, d'amour et de tendresse qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tu m'as toujours aidé par tes conseils et tes sacrifices. Puisse Dieu le tout puissant t'accorder meilleure santé et longue vie.

♥ A mes frères **Abdou, Ayoub et Zakaria** pour leurs patiences, soutien et leurs sentiments d'amour aux moments les plus difficiles. Je vous souhaite plein de succès, de joie et de bonheur. Que dieu vous garde et illumine vos chemins.

♥ A ma grande mère **Fatiha**, merci pour tous les sacrifices et les efforts que vous avez fait pour nous.

♥ A mon oncle **Ali**, c'est ma sincère gratitude pour l'éternité, ce rapport est le plus beau cadeau que je puisse vous offrir.

♥ A ma cousine **Samia** et son mari **Rabeh** et ses fils **Hanan, Hossam, Yasmin** et **Abdo**.

♥ A mes cousines **Amina, Yousra, Fatimazohra**.

♥ A toute la famille **ACHOUR** et **ZERROUK**.

♥ A ma chère sœur et binôme **Nesrine** merci de donner naissance à ce projet.

♥ A mes meilleures amies **Sarah, Amira, Dallal, Khawla** et **Maissa**.

♥ A l'équipe de SAIDAL Mme **Wassila, Selma** et Mr **Hani** merci pour tous vos efforts. Vous avez tout mon respect et mon appréciation.

SELMA



Dédicace

A la personne la plus chère, la plus proche à mon cœur,
Ma mère khadidja qui a été toujours présente à mes côtés,
par son amour, sa tendresse et sa tolérance.

A mon très cher père khaled qui m'a tout appris,
pour toutes les peines et les sacrifices
qu'il s'est donné pour me voir réussir dans la vie.

A mon cher grand-père Rabeh.

A ma sœur : Wassila et son mari Djamel et mes neveux Rida, Meriem et Malek.

A mon frère Cherif et sa femme Naçira et mes neveux Houria et Lokmen Idris.

A mon frère Mohamed et sa femme Fatima et mon neveu Youcef Kosay.

A ma chère tante Fatima Zohera et mes cousins Houari, Nesrdine, Ibrahime, et
Riead.

A toute la famille :

Djellal et Ahmed Hadjela

A mon âme sœur et binôme : Selma, avec la quelle j'ai partagé des moments
inoubliables.

Mes cousines : Sara, Ayoub, Fathia, soumia et Ilhem.

A mes milleures amis : Chahira, Amira, Khaoula, Dalal, Saida.

A toute la promotion de chimie applique et produit naturel 2019.

Nesrine

Remerciement
ملخص
Abstract
Liste des figures
Liste des schémas
Dédicaces
Résumé
Liste d'abréviations
Liste des tableaux

Introduction générale..... 01

Partie théorique

Chapitre I : Isoxazolidine

I.1-Introduction..... 02

I.1.1- Généralités..... 02

I.1.2- Principe..... 02

I.1.3- Les dipôles-1.3..... 02

I.1.4- Les nitrones..... 03

I.1.5-Définition des isoxazolidines..... 04

I.1.5.1- La régiosélectivité..... 04

I.1.5.2- Stéréosélectivité..... 05

Chapitre II : Chromatographie

I.2.1-Définition de la chromatographie..... 06

I.2.2- Historique..... 06

I.2.3-Classification des méthodes chromatographiques..... 06

I.2.3.1- Classification selon la nature des phases..... 06

I.2.3.2-Classification selon nature des phénomènes..... 06

I.2.4-La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	07
I.2.4.a- Définition.....	07
I.2.4.b-Principe.....	07
I.2.4.c-Appareillage.....	07
I.2.4.d- Le réservoir de la phase mobile.....	08
I.2.4.e- La pompe.....	10
I.2.4.f-L'injecteur.....	10
I.2.4.j-La colonne.....	10
I.2.4.h-Le détecteur.....	11
I.4.2.i- L'enregistreur.....	12

Partie expérimentale

II.1- Appareillages et produits.....	13
II.1.1-Appareils.....	13
II.1.2-Produits.....	13
II.2-Synthèse d'isoxazolidines.....	14
II.3. Analyse des mélanges d'isoxazolidines par CCM.....	15
II.5-Séparation du mélange d'isoxazolidine.....	15
II.5.1 -Chromatographie sur colonne ouverte.....	15
a) Préparation de la colonne.....	15
b) Dépôt des produits à analyser.....	16
c) Développement de la colonne (élution).....	16
d) Analyse des fractions.....	16
II.5.2- CCM préparative.....	17

Sommaire

II.5.3-Séparation par HPLC	18
III.1-Préparation de l'isoxazolidine	19
III.2-Analyse des mélanges d'isoxazolidines	21
III.2.1 Spectrophotométrie infrarouge	21
III.2.2- Spectrophotométrie UV-Visible	24
III.3-Séparation du mélange d'isoxazolidines	26
III.3-Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative	27
III.3.1-Chromatographie sur colonne ouverte	28
III.3.2- Caractérisation par spectroscopie infrarouge des isomères séparés	30
III.4-Séparation par HPLC	31
III.5-Etalonnage externe	34
Conclusion générale	37
Annexe A	
Annexe B	
Annexe C	

في هذا العمل المقدم في هذا المخطط، قمنا بفصل الازوميرات الموجودة في سلسلة من الايزوكسازوليدينات. هذه الأخيرة ناتجة عن تفاعل الضم الحلقي 1،3 ثنائي القطب و الاكريلونتريل. يتم تمييز الايزوكسازوليدينات المحصل عليها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية و الأشعة تحت الحمراء.

و أظهرت هذه التحاليل ان المنتجات التي تم الحصول عليها هي في شكل خليط من أربعة ايزوميرات وقد فصل الأخير بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و كروماتوغرافيا العمود المفتوح. فيما بعد

الخطوة الأخيرة تتعلق بفصل هذه الازوميرات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة العالية الجودة. وفي جميع الأعمال التي وردت في الكتابات. يمكن ملاحظة أن التقييم الكمي لهذا التفاعل يعتمد دائما على مرحلة الفصل بين نواتج التفاعل و تطهيرها التي تتطلب قدرا كبيرا من الوقت و الموارد. في هذا العمل. جزانا تطوير طريقة لتحديد عدد الازوميرات المختلفة، الذي يعتمد على تحليل بواسطة HPLC.

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

Résumé

Dans le travail présenté dans ce manuscrit, nous nous avons consacrés à séparer des isomères d'une série d'isoxazolidines. Ces dernières sont issues de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire des C-aryle N-phénylnitrones sur l'acrylonitrile. Les isoxazolidines ainsi obtenues sont caractérisées par CCM, spectroscopies UV-Visible et Infra-rouge. Les résultats de ces analyses ont montré que les produits obtenus sont sous forme de mélange de quatre isomères. Ces derniers ont été par la suite séparés par CCM préparative et par chromatographie sur colonne ouverte.

L'étape suivante a concerné la séparation de ces isomères par HPLC. Dans tous les travaux rapportés dans la littérature, on constate que l'évaluation quantitative de la réaction reste toujours tributaire de l'étape de séparation et purification des produits de la réaction qui nécessite beaucoup de temps et de moyens. Dans ce travail, nous avons essayé de mettre au point une méthode de quantification des différents isomères, basée sur l'analyse par HPLC.

Mots clés : nitrones, isoxazolidines, cycloaddition 1,3-dipolaire, chromatographie, HPLC.

In this work, we have devoted ourselves to the separation of isomers from a series of isoxazolidines. This results from the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of C-aryl N-phenyl nitrones on acrylonitrile. The isoxazolidines thus obtained are characterized by TLC, UV-Visible and Infra-red spectroscopies. The results of these analyzes showed that the products obtained are in the form of a mixture of four isomers. The latter were subsequently separated by preparative, TLC and by open column chromatography.

The next step concern the separation of these isomers by HPLC. In all the works reported in the literature, it is found that the quantitative evaluation of the reaction always depends on the step of separation and purification of the products of the reaction which requires a lot of time and means. In this work, we have tried to develop a method for quantifying different isomers, based on HPLC analysis.

Keywords : nitrones, isoxazolidines, 1,3-dipolar cycloaddition, chromatography, HPLC.

Liste des abréviations

ACN	Acrylonitrile
Alk :	Alkyle
Ar	Aryle
C	Carbone
°C	Degré Celsius
CA	Cycloaddition
CD-1,3	Cycloaddition dipolaire-1,3
CCM	Chromatographie sur couche mince
cm	Centimètre
DAD	Détecteurs à barrette de diodes
E	Trans
GEA	Groupement électro-accepteur
GED	Groupement électro-donneur
H	Heure
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IR	Spectrométrie infra Rouge
mn	minute
ml	millilitre
R _{dt}	Rendement
R _f	Rapport frontal
T _R	Temps de rétention
T	Température
UV	spectrophotométrie UV
Z	Cis
μl	Microlitre
λ	Longueur d'onde
%	Pourcentage

Liste des figures

Figure I.1 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.....	02
Figure I.2 : 1,3-DC entre une nitronne et un alcène.....	03
Figure I.3 : Isomérisation des nitrones.....	03
Figure I.4: Structure chimique d'isoxazolidine.....	04
Figure I.5 : Influence de l'effet électronique sur la régiosélectivité des réactions de 1,3-DC.....	05
Figure I.6: Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.....	07
Figure I.7: Les organes d'une chaîne HPLC.....	08
Figure I.8 : Graphe de miscibilité.....	09
Figure I.9: Injecteur à boucle.....	10
Figure I.10: Colonne CLHP.....	11
Figure II.1 : Les étapes de préparation des isoxazolidines.....	14
Figure II.2 : L'élution de la phase mobile lors de l'analyse des isoxazolidines synthétisées par CCM.....	15
Figure II.3 : Les étapes de séparation des isomères par CCM préparative.....	17
Figure II.4: appareil HPLC de marque Agilent 1200.....	18
Figure III.1 : Schématisation de la plaque CCM obtenue lors de l'analyse du mélange d'isoxazolidine synthétisée.....	20
Figure III.2 : Spectre IR en (A) la nitronne nitrée et en (B) le mélange d'isoxazolidines I1.....	21
Figure III.3 : Spectre IR en (A) la nitronne Chlorée et en (B) le mélange d'isoxazolidines I2.....	22
Figure III.4 : Spectre IR en (A) la C, N-diphenyl nitronne et en (B) le mélange d'isoxazolidines I3.....	22
Figure VI.5: Spectre IR en (A) la nitronne méthoxylée et en (B) le mélange d'isoxazolidines I4.....	23
Figure III.6 : Spectre IR en (A) la nitronne(I) hydroxylé et en (B) le mélange d'isoxazolidine I5.....	23
Figure (III.7): Spectres UV-visibles des nitrones et des isoxazolidines synthétisées dans le méthanol (10 moles/l), à 25°C.....	26

Liste des figures

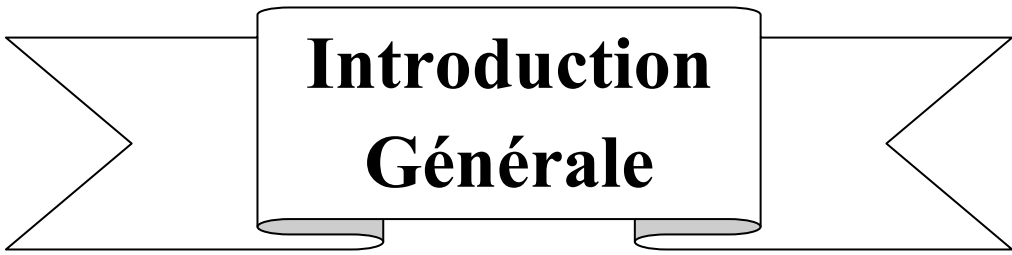
Figure III.8 : Séparation des isomères de 5-cyano-2,3-diphenyl isoxazolidine par CCM préparative.....	27
Figure III.9 : Analyse des isomères d'isoxazolidines séparés par CCM analytique.....	28
Figure III.10: Technique de séparation d'isoxazolidines synthétisées par chromatographie sur colonne ouvert.....	28
Figure A1 : chromatogrammes des mélanges d'isomères nitré obtenu dans les conditions C1, C2, C3 et C4.....	33
Figure A 1 : Chromatogramme des isomères de 1, 2, 3 et 4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines I1 en utilisant la colonne C18, débit 0.6 ml/min, longueur d'onde 254nm, condition 4.....	35

Liste de Schéma

Schéma II.1 : Chromatographie sur colonne.....	17
Schéma III.1: La réaction de cycloaddition entre la C, N-diphenyl nitroène et l'acrylonitrile.....	20
Schéma III.2 : Mécanisme concerté de la réaction de cycloaddition des nitrones sur l'acrylonitrile.....	20
Schéma III.3: Relation d'isomérisation entre les quatre isomères d'isoxazolidines.....	29
Schéma III.4 :	35

Liste des tableaux

Tableau I.1: pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC.....	10
Tableau II.1: Origine et pureté des produits utilisés.....	14
Tableau (III.1) : Nomenclature, rendement (Rdt), rapports frontaux (R_f) en CCM des isoxazolidines synthétisées.....	21
Tableau (III.2) : Caractérisations spectrales en infrarouge des l'isoxazolidines et des nitrones.....	26
Tableau (III.3) : Les longueurs d'ondes d'absorption en UV-visible correspondante à la nitrones et isoxazolidines.....	28
Tableau (III.4) : résultats de séparation du mélange d'isoxazolidines par chromatographie sur colonne ouvert.....	31
Tableau (III.5): résume les nombres d'onde σ (cm-1) des bandes d'absorption reliées aux différentes liaisons mise en jeux dans les différents isomères séparés.....	32
Tableau (III.6) : Conditions de séparation des isoxazolidines par HPLC.....	34
Tableau (III.7) : Les Meilleures condition de séparation par HPLC.....	34



**Introduction
Générale**

Introduction générale

La chimie des composés hétérocycliques occupe une place prépondérante dans notre société. Elle est à la base de nombreux produits utilisés en pharmacie, biologie et l'industrie. L'origine de ces composés peut être naturelle, semi synthétique ou totalement synthétique.

Les isoxazolidines sont des hétérocycles à cinq chaînons avec deux hétéroatomes : l'azote et l'oxygène en position méta. Ils présentent d'intéressantes propriétés fongicides, herbicide, insecticide, des activités antibactériennes, anticorrosion, anti-inflammatoire.

L'isoxazolidines sont synthétisés par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones avec les alcènes. Dans le cas des nitrones aryles, cette réaction conduit à la formation d'un mélange de quatre isomères. Le développement de nouvelles techniques de synthèse plus régio et stéréosélectives passe par la détermination de la proportion de chaque isomère. La chromatographie liquide à haute performance (LCHP) est la technique la plus utilisée pour ces études. Seulement sont utilisation passe par la détermination des conditions chromatographiques.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail vise à déterminer les conditions chromatographiques de la séparation des isomères d'une série d'isoxazolidines. Pour atteindre cet objectif, on sera amené à synthétiser les isoxazolidines, puis à faire la séparation par différentes méthodes chromatographiques (CCM préparative et chromatographie sur colonne). Les isomères obtenus seront utilisés comme étalons externes pour l'identification des différents pics obtenus.

Le manuscrit de ce travail est divisé en trois parties indépendantes :

Une partie théorique comportant deux chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous présenterons l'essentielle sur les isoxazolidines et leurs synthèses.

- Le deuxième chapitre, on présentera les différentes techniques de chromatographie.

- Une deuxième partie qui comportera les différents matériels et méthodes utilisés.

- Une partie résultats et discussions où on exposera tout les résultats obtenus avec leurs discussions.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion générale



**Partie
théorique.**



Chapitre I

I.1-Introduction

Les réactions de cycloaddition (CA) possèdent une importance particulière en chimie organique, elles offrent une méthode utile pour la synthèse des structures cycliques, et hétérocycliques très complexes, en plus ces réactions sont caractérisées par un rendement élevé, diverses fonctionnalités et un bon contrôle de la stéréochimie. Ces réactions de cycloaddition sont couramment utilisées notamment les réactions 1,3-dipolaires (1,3-DC) [1].

I.1.1- Généralités

La cycloaddition 1,3-dipolaire est une réaction classique qui a lieu entre des composés dipolaire-1,3 et des dipolarophiles, cette réaction représente une des diverses voies d'accès aux hétérocycles à cinq chaînons [2]. Les réactions de cycloadditions concertées sont également parmi les outils les plus puissants pour la création stéréospécifique de nouveaux centres chiraux dans les molécules organiques [3].

I.1.2- Principe

Les cycloadditions 1,3-dipolaires est la réaction de cyclisation d'un dipôle-1,3 avec un dipolarophile (le plus souvent un alcène) sont des réactions pericycliques conduisant à cinq chaînons avec hétéroatomes possédant ou non des doubles liaisons selon le type du diénophile utilisé. La plupart de ces réactions procèdent par un mécanisme concerté en une seule étape, impliquant la formation de deux nouvelles liaisons σ . Cette réaction est souvent nommée réaction de cycloaddition [3+2] de manière concertée car il y a trois atomes du dipôle et deux atomes de l'alcène qui sont engagés dans le mécanisme de cette réaction [4]. Voir la (Figure I.1).

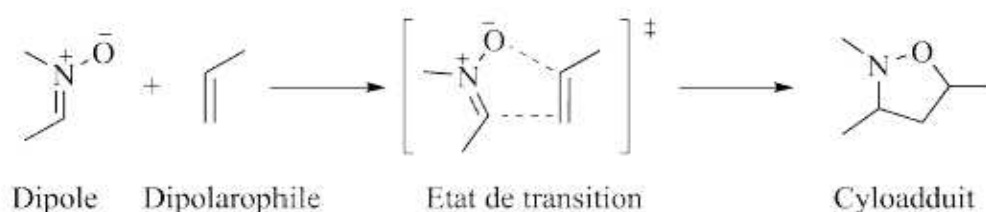


Figure I.1 : Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

I.1.3- Les dipôles-1,3

Les dipôles possèdent quatre électrons π répartis sur 3 atomes voisins. Chaque dipôle présente au moins une structure de résonance où les charges opposées sont dans une relation 1,3 (figure I.2). C'est cette caractéristique structurale qui a conduit à l'appellation réaction de cycloaddition dipolaire 1,3. La figure I.2 présente la structure d'un dipôle 1,3 définie comme a-b-c qui subit une réaction de cycloaddition avec des systèmes à liaisons multiples "les dipolarophiles"[5].

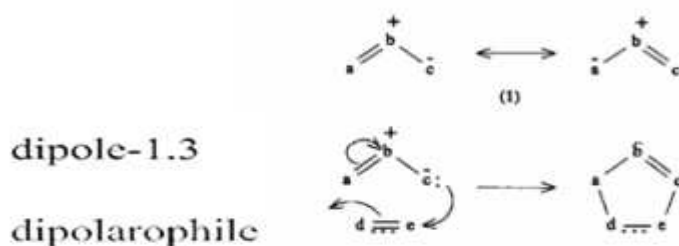


Figure I.2 : 1,3-DC entre une nitrene et un alcène.

I.1.4- Les nitrones

L'historique des nitrones revient à Beckmann qui les a découvert en 1890, et nommées par Pfeifer à partir de la contraction (nitrogène-cétone) pour souligner leur similitude aux cétones, ces nitrones existent en deux formes (E) et (Z) qui peuvent inter-convertir entre eux à haute température. L'analogie se résume à l'effet mésomère ou ils sont prédominés dans les deux classes de ces groupes faisant le groupe nitrone ou azométhine-N -oxide, et considérer comme une extension de la fonction carbonyle (Figure I.3). Elles sont utilisées comme des intermédiaires synthétiques importants qui ont servi d'une manière extensive en chimie organique [6].

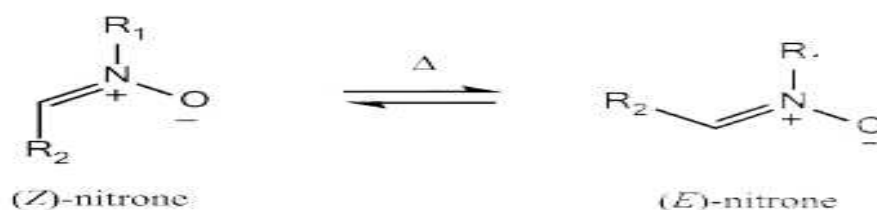


Figure I.3 : Isomérisation des nitrones.

On note que plusieurs nitrones cycliques ont été développées pour éviter les problèmes d'isomérisation (E/Z) et permettre ainsi une seule géométrie autour de la double liaison C=N et ce qui réduit le nombre de cycloadduits possibles [7].

Les molécules contenant des structures hétérocycliques présentent souvent des propriétés biologiques intéressantes. De ce fait elles restent toujours des cibles importantes de la synthèse chimique appliquée [8,9].

I.1.5-Définition des isoxazolidines

Les isoxazolidines sont des hétérocycles à cinq chaînons saturés contenant des atomes d'azote et d'oxygène adjacents [10] (Figure I.4). Par conséquent de la nature labile de la liaison N-O dans des conditions légèrement réductrices, les isoxazolidines sont des intermédiaires de synthèse importants et ont été largement utilisés comme alcool 1,3-amino [11]. D'autre part, les isoxazolidines peuvent contenir jusqu'à trois centres chiraux [12].

Précurseurs d'une grande variété de produits naturels comme les dérivés du sucre [13], les β -lactames, les aminoacides [14], les alcaloïdes [15]. Et des produits d'intérêt pharmacologique [16]. Aussi, elles possèdent une activité antibactérienne [17], anti-inflammatoire, antifongique [18] et antivirale [19].

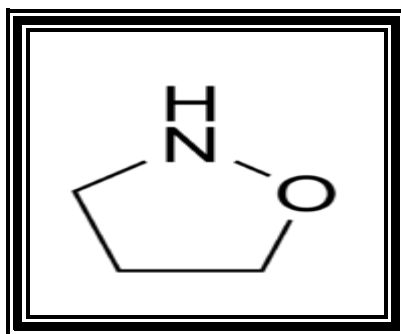


Figure I.4: Structure chimique d'isoxazolidine.

I.1.5.1- La régiosélectivité

Une réaction est dite régiosélective, si elle peut donner deux (ou plusieurs) isomères de constitution, elle en donne un (ou certains) majoritairement [20].

Dans le cas du dipôle et le dipolarophile asymétriques, il y a deux orientations possibles pour l'addition. Les facteurs effet stérique et électroniques jouent un rôle déterminant dans la régiosélectivité d'addition. En générale l'interprétation satisfaisante de la régiosélectivité de la CD-1,3 est basée sur le concept des orbitales frontières [21].

Pour la cycloaddition des alcènes monosubstitués électro-donneur (GED) (alcènes simple), la formation des adduits 5-substitués est favorisée à la fois par les effets stériques et électroniques. Pour la cycloaddition des alcènes monosubstitués électro-attracteur (GEA), Ceci favorise la formation des adduit 4-substitués (Figure I.5). Dans le cas où l'alcène est disubstitué, la situation est très compliquée car les effets stériques et électroniques sont inversés, un mélange de régioisomères est souvent obtenu [22].



Figure I.5 : Influence de l'effet électronique sur la régiosélectivité des réactions de 1,3-DC.

I.1.5.2- Stéréosélectivité

Une réaction est dite stéréosélective si, pouvant donner plusieurs stéréoisomères de configuration, elle en donne certains majoritairement [23].

D'une manière générale, La cycloaddition entre une nitronium et un alcène substitués peut conduire aux quatre stéréo-isomères possibles par la création de deux centres chiraux. Ces entités peuvent se rapprocher selon deux modes stériques possibles à savoir, l'approche endo ou exo. Le nombre de situations stéréochimiques possibles est doublé si la nitronium existe dans un équilibre de deux isomères *Z* et *E* [24].



Chapitre II

I.2.1-Définition de la chromatographie

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange, les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile, ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur. L'origine du mot chromatographie vient de la séparation de composés colorés puisque chroma en grec [25].

I.2.2- Historique

La première description de la méthode de séparation chromatographique est donnée dans le cadre d'une communication présentée en 1903 et a été appliquée en 1906. En 1930-31, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. En quelques années, la chromatographie en phase liquide sur colonne devient une technique rendant possible de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines.

En 1938, Reichstein introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores.

Avant les années 1970, un petit nombre de méthode chromatographique est utilisé dans les laboratoires. Ultérieurement, des colonnes ouvertes sont utilisées pour initier l'introduction de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans la séparation des composées chimiques complexes.

I.2.3-Classification des méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon la nature des phases ou la nature des phénomènes.

I.2.3.1- Classification selon la nature des phases

Les différentes méthodes chromatographiques sont :

- ✓ La chromatographie en phase gazeuse CPG.
- ✓ La chromatographie sur couche mince CCM.
- ✓ La chromatographie en phase liquide CPL.
- ✓ La chromatographie liquide à haute performance HPLC.
- ✓ La chromatographie en phase supercritique CPS.

I.2.3.2-Classification selon nature des phénomènes

On distingue quatre types de phénomènes :

- Chromatographie d'adsorption.
- Chromatographie de partage.

- Chromatographie ionique.
- Chromatographie d'exclusion.

I.2.4-La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

I.2.4.a- Définition

La chromatographie en phase liquide à haute pression - fréquemment appelée chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou CLH) est la principale technique d'analyse utilisée en analyse pharmaceutique et est principalement utilisée dans l'industrie pharmaceutique [26].

I.2.4.b-Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, 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. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique [27]. Ce principe est traduit par la figure suivant :

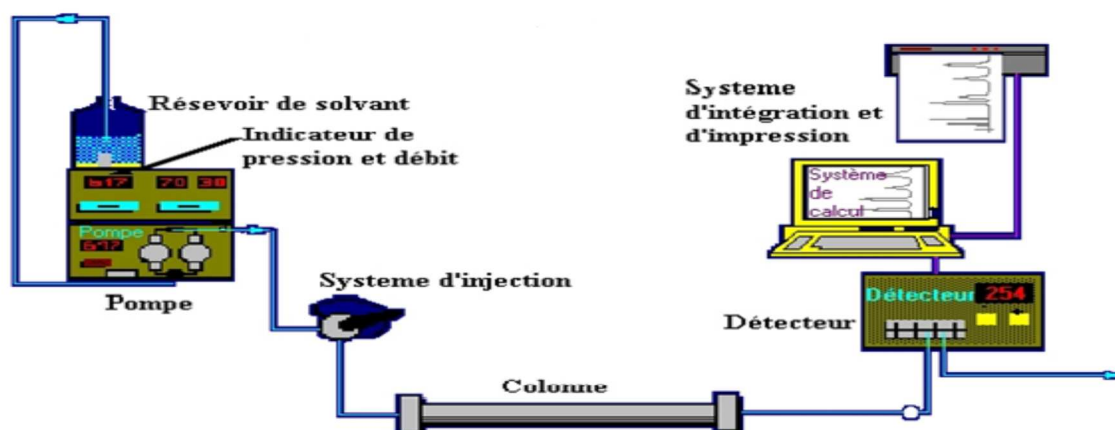


Figure I.6: Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.

I.2.4.c-Appareillage

Un appareil HPLC comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm) [28]. Voir (figure I.7) :

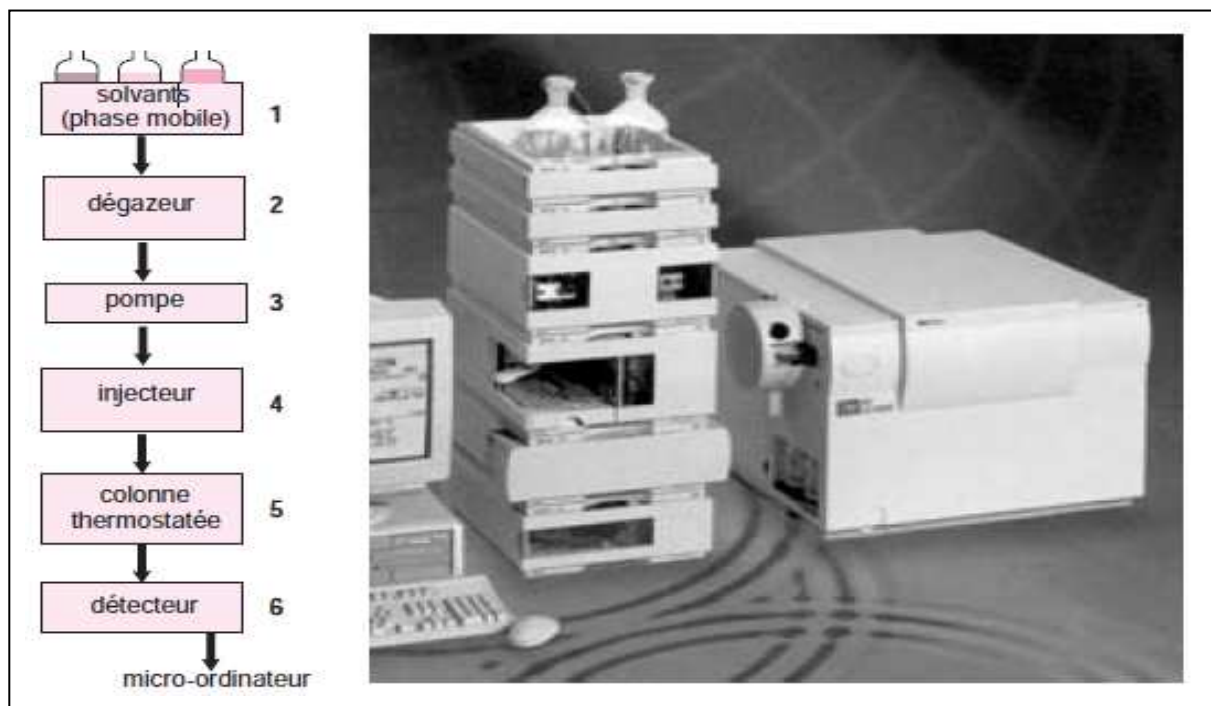


Figure I.7: Les organes d'une chaîne HPLC.

I.2.4.d- Le réservoir de la phase mobile

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant 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 qui réalise le mélange demandé.

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:

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite dans ce cas en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire, c'est la chromatographie en phase inverse.

Tableau I.1: pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC.

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
FAIBLE ↓ pouvoir d'éluion ↓ FORT	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	↑ FORT ↑ pouvoir d'éluion ↓ FAIBLE

En plus du pouvoir d'éluion le choix de la phase mobile dépend deux facteurs les plus importants : La miscibilité " l'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire" En d'autres termes, le solvant et la phase stationnaire doivent être en équilibre thermodynamique avant leur rencontre dans la colonne. On doit aussi tenir compte de la compatibilité des solvants avec les détecteurs utilisés. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés. [29]

TABLE DE MISCIBILITE DES SOLVANTS	
	<input type="checkbox"/> Miscible <input checked="" type="checkbox"/> Non-miscible
acide acétique	
acétone	
acétonitrile	
benzène	
n-butanol	
chloroforme	
cyclohexane	
dichlorométhane	
DMSO	
eau	
éthanol	
éthyle acétate	
éther éthylique	
hexane	
iso-octane	
méthanol	
2-propanol	
acide acétique	
acétone	
acétonitrile	
benzène	
n-butanol	
chloroforme	
cyclohexane	
dichlorométhane	
DMSO	
eau	
éthanol	
éther éthylique	
éthyle acétate	
hexane	
iso-octane	
méthanol	
2-propanol	

Figure I.8 : Graphe de miscibilité [30].

I.2.4.e- La pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile à un débit constant à une certaine pression dans la colonne. Elle permet de travailler soit :

- * 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 des constituants du mélange d'éluant.

I.2.4.f-L'injecteur

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- ❖ **Manuelle** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle, l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- ❖ **Automatique** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [31].



Figure I.9: Injecteur à boucle.

I.2.4.j-La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre.

Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- Type de la phase stationnaire, longueur, diamètre des particules (d_p), débit de la phase mobile supportable.



Figure I.10 : Colonne CLHP

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, on distingue deux types de phase stationnaire.

✓ **La phase stationnaire 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 apolaires qui sortent en tête.

✓ **La phase stationnaire inversée**

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 tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. 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. [32].

I.2.4.h-Le détecteur

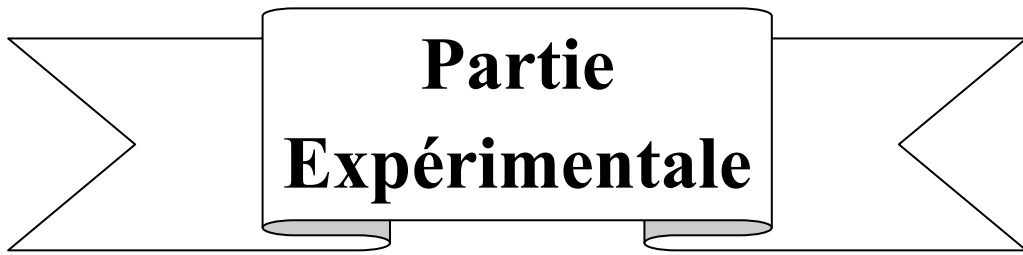
Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluant dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. Le détecteur suit l'apparition des analyses. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Il existe différents types de détecteurs :

- ✓ Détecteur UV-visible.
- ✓ Réfractomètre.
- ✓ Détecteur à fluorescence.
- ✓ Détecteur à barrette de diodes[33].

I.4.2.i- L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyse qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme[34].



**Partie
Expérimentale**

II.1- Appareillages et produits

II.1.1-Appareils

- Les différentes pesées de précision ont été faites en utilisant une balance analytique de marque OHAUS.
- Le suivi des réactions et l'analyse par CCM ont été réalisés sur des feuille d'aluminium recouvertes d'un gel de silice 60 F254 de 0,25mm d'épaisseur d'origine Merck. L'élution a été effectuée par un mélange de solvants dans une cuve en verre. Les produits sont révélés sous lampe UV à 254 nm.
- Les spectres Infra rouges des isoxazolidines et des nitrones ont été réalisé à l'aide d'un appareil de marque **IRAffinity-1S** à SAIDAL Zmirli El-Harrach .les nombres d'onde de bandes de vibration d'élongation (ν) sont donnés en cm^{-1} .
- Les spectres UV-Visible d'isoxazolidines et des nitrones ont été réalisé à l'aide d'un appareil de marque SHIMADZU à SAIDAL Zmirli El-Harrach.
- L'appareil HPLC utilisé est de marque Agilent technologies- 1200 série [quantité purifiable : 1 à 5mg, détecteur : UV-visible (DAD), la pression : jusqu'à 600 bars, débit d'élution : 0.1-10 ml/minute] au laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger.

II.1.2-Produits

Les produits utilisés dans notre travail et leurs origines sont rassemblés dans le tableau (II.1) :

Tableau II.1 : Origine et pureté des produits utilisés.

Produits	Origine	Pureté (%)
Méthanol	Sigma	99.5
Diéthyl éther	//	95
Dicloromethane	//	99.9
Ether de pétrole	//	99.5
Acétonitrile	//	99.9
Toluène	//	99.5
Acrylonitrile	Aldrich	98
nitrones	Elles ont été synthétisées et caractérisées au laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger.	

II.2-Synthèse d'isoxazolidines

À une solution de $0,75 \times 10^{-3}$ mol de nitroène dans 9 ml de toluène, on ajoute 1 ml d'acrylonitrile. Le mélange est chauffé à reflux pendant 3 h [34]. Après évaporation du solvant, on obtient les isoxazolidines sous forme de liquide visqueux (voir figure II.1).



Réaction de préparation d'isoxazolidine à reflux.



Evaporation de solvant



Les isoxazolidines obtenues.

Figure II.1 : Les étapes de préparation des isoxazolidines.

II.3. Analyse des mélanges d'isoxazolidines par CCM

L'analyse des mélanges d'isoxazolidines préparées et les nitrones par la chromatographie sur couche mince est réalisé dans le but de s'assurer de l'achèvement de la réaction. La phase stationnaire est le gel de silice sur plaque d'aluminium. On a préparé des plaques de (3 x 7cm).

On dépose à l'aide d'un capillaire, deux gouttes de solution de nitronne et d'isoxazolidine sur la phase stationnaire, on laisse l'échantillon migrer en utilisant l'éluant (voir la figure II.2). Après la migration, on laisse les plaques se sécher et on fait la révélation par la lampe UV à 254nm.

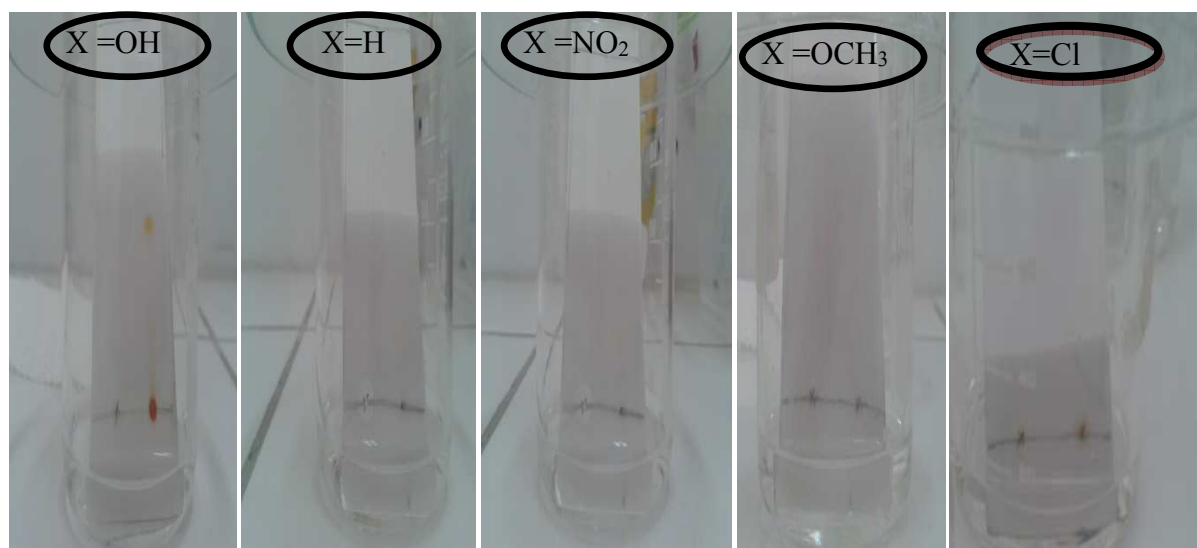


Figure II.2 : L'éluion de la phase mobile lors de l'analyse des isoxazolidines synthétisées par CCM.

II.5-Séparation du mélange d'isoxazolidine

La séparation des isomères d'isoxazolidines préparées est réalisée par les méthodes chromatographiques suivantes :

- Chromatographie sur colonne ouverte.
- CCM préparative.
- Chromatographie a haute performance (HPLC).

II.5.1 -Chromatographie sur colonne ouverte

Cette technique est appliquée en quatre étapes suivantes:

a) Préparation de la colonne

Tout d'abord, on place un morceau de coton au fond de la colonne que l'on recouvre d'éluant, on rajoute environ un demi-centimètre de sable au dessus du coton, afin que la phase stationnaire ne puisse pas s'échapper de la colonne.

D'autre part, on mélange 2.5 g de gel de silice avec 10 ml de l'éther de pétrole et agiter pendant quelque minute jusqu' à obtention d'une pate lisse. Ensuite, on verse doucement la solution dans la colonne de façon homogène à l'aide d'un entonnoir en ouvrant l'égerment le robinet de la colonne. Une fois la colonne remplie, on rajoute un demi-centimètre de sable en tête de colonne au dessus de la surface de silice (Voir le schéma II.1).

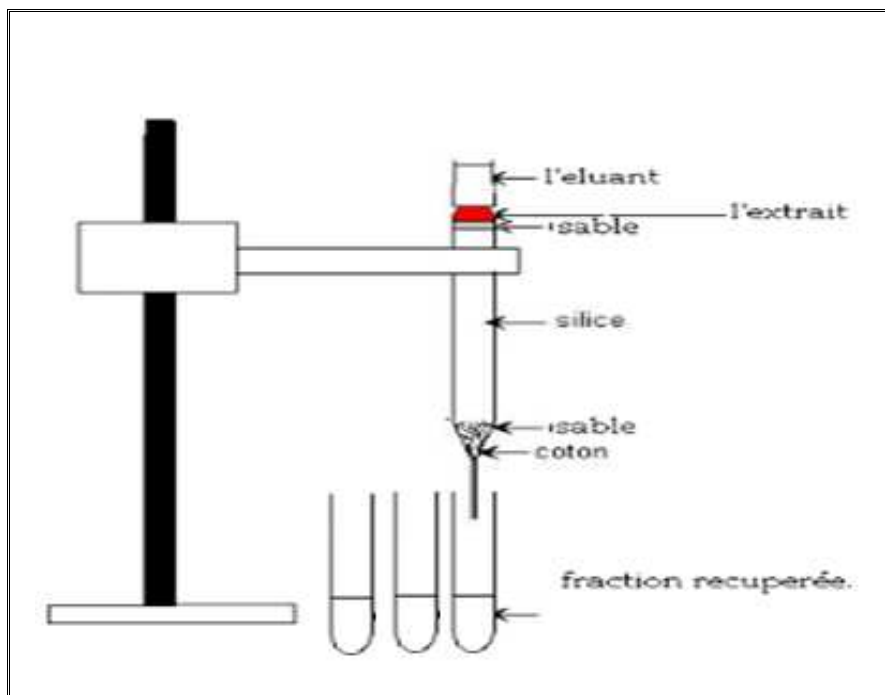


Schéma II.1 : Chromatographie sur colonne.

b) Dépôt des produits à analyser

On fait la dissolution d'isoxazolidines obtenu par 2ml de dichlorométhane. À l'aide d'une pipette pasteur, prélever un peu de la solution et la déposer doucement sur les bords de la colonne.

c) Développement de la colonne (élution)

On ajoute régulièrement l'éluant dans la colonne : le niveau d'éluant dans la colonne doit rester au dessus de celui de la silice jusqu'à la fin du développement et en récupérant des fractions dans des petits tubes à essais.

d) Analyse des fractions

Les fractions collectées sont soumises au contrôle chromatographique sur couche mince.

II.5.2- CCM préparative

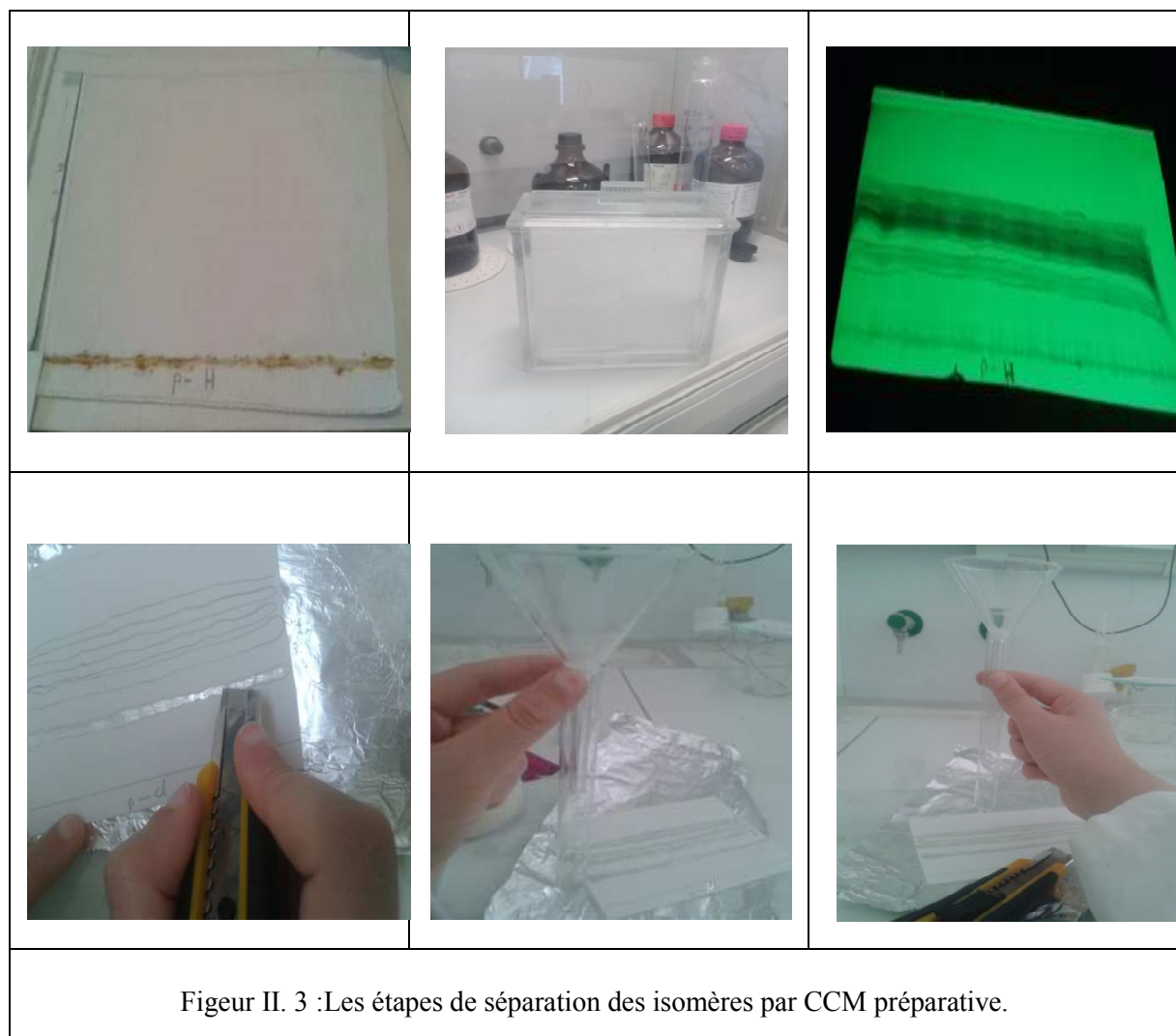
La chromatographie sur couche mince préparative (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, cette technique est très utile car la transposition à partir de CCM analytique est facile à réaliser.

❖ Protocole

Sur une plaque de gel de silice de dimension (20x20 cm), On a déposé le mélange d'isoxazolidine sous forme de bande fine. La plaque est ensuite placée dans une cuve, contenant la phase mobile : (diéthyl éther /éther de pétrole) (50% / 50%).

Après le développement et le séchage du chromatogramme, les isomères séparés sont marqués et délimités dans une chambre noire sous la lumière UV à 254 nm.

On gratte les bandes séparées et chacune est récupérée dans un bécher à part. Ces dernières seront lavées avec le dichlorométhane puis filtré. Une analyse par CCM analytique témoignera de la bonne séparation (voir la figure II.3).



II.5.3-Séparation par HPLC

La séparation des isomères d'isoxazolidines par HPLC est réalisée sur l'Appareil : Agilent technologies 1200 mené d'un détecteur UV-visible "DAD" (voir figure II.4). Les conditions HPLC utilisées pour la séparation du mélange d'isoxazolidine sont :

- **Colonne** : C18 2.1x10m- Size : 5 μ m ;
- **Volume d'injection** : 10 μ l ;
- **Elution: isocratique ou gradient** ;
- **Débit** : 0.6ml/min
- **Solvent A**: H₂O, B: C₂H₅NC.
- **la longueur d'onde** 254 nm



Figure II.4: appareil HPLC de marque Agilent 1200.

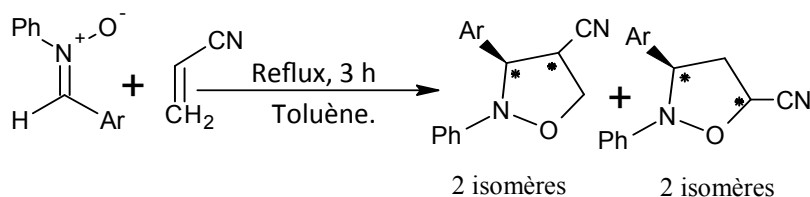


**Résultats et
discussions**

Le but de notre travail est la séparation des isomères d'une série d'isoxazolidines synthétisées. Ces derniers sont obtenues par la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire des nitrones correspondantes sur des alcènes sous reflux. Dans notre étude, nous avons choisi les C-aryle N-phénylnitrones pour leur stabilité et par ce qu'ils se présentent sous une seule forme géométrique Z.

III.1-Préparation de l'isoxazolidine

Les isoxazolidines sont synthétisées à partir de la réaction de cycloaddition 1, 3-dipolaire d'une série de nitrone avec l'alcène monosubstitué l'acrylonitrile. Cette réaction est réalisée dans le toluène à reflux pendant trois heures.



Ar : I1: *p*-NO₂ph, I2: *p*-Clph, I3: ph, I4: *p*OCH₃ph, I5: *p*OHPH

Schéma III.1: La réaction de cycloaddition entre la C, N-diphényl nitrone et l'acrylonitrile.

Le mécanisme concerté de cette réaction est donné dans le schéma suivant :

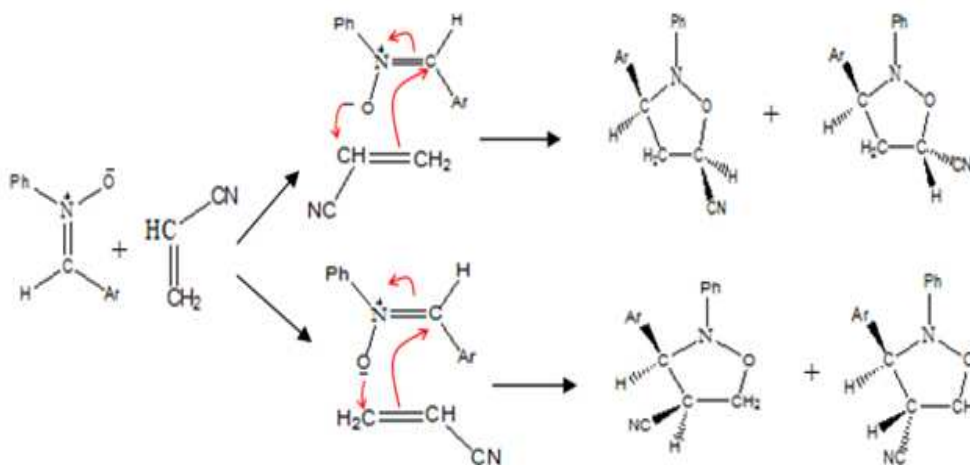


Schéma III.2: Mécanisme concerté de la réaction de cycloaddition des nitrones sur l'acrylonitrile.

Les résultats de l'analyse par CCM analytique montrent l'absence du spot correspondant à la nitrone dans le mélange réactionnel. Aussi on a remarqué l'apparition de quatre spots qu'on a attribués aux quatre isomères attendus. Les résultats obtenus sont schématisés dans la figure (III.1) et donnés dans le tableau III.1 :

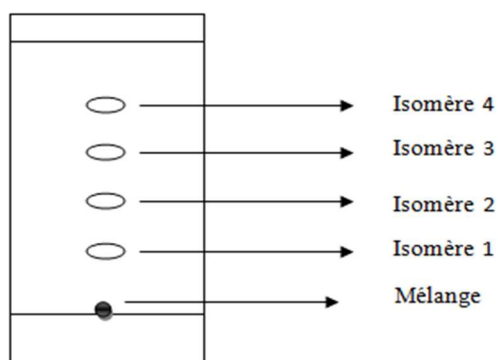
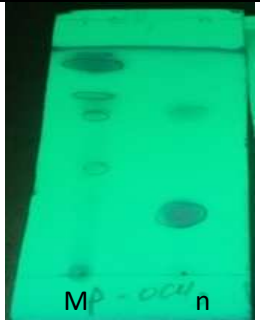



Figure (III.1) : Schématisation de la plaque CCM obtenue lors de l'analyse du mélange d'isoxazolidine synthétisée.

Tableau (III.1) : Nomenclature, rendement (Rdt), rapports frontaux (R_f) en CCM des isoxazolidines synthétisées.

Ar	Nomenclature	Rdt %	R_f		
			Isomères	R_f	
<i>p</i> -NO ₂ ph (I1)	5-cyano-3-(4-nitrophenyl)- 2-phenyl isoxazolidine	69.107	Isomères 1	0,28	
			Isomère 2	0,38	
			Isomère 3	0,46	
			Isomère 4	0,6	
			Nitrone	0,4	
Phase mobile : Diéthyléther-éther de pétrole (50/50)					
<i>p</i> -Cl ph (I2)	5-cyano-3-(4-chlorophenyl)- 2-phenyl isoxazolidine	84.967	Isomères 1	0,18	
			Isomère 2	0,3	
			Isomère 3	0,37	
			Isomère 4	0,47	
			Nitrone	0,2	
Phase mobile : Diéthyléther-éther de pétrole (25/75)					
Ph (I3)	5-cyano-2,3-diphenyl isoxazolidine	66,1887	Isomères 1	0,6	
			Isomère 2	0,7	
			Isomère 3	0,76	
			Isomère 4	0,8	
			Nitrone	0,4	
Phase mobile : Diéthyléther-éther de pétrole (50/50)					

<p><i>p</i>- OCH₃ ph (I4)</p>	<p>5-cyano-3-(4-methoxyphenyl)- 2-phenyl isoxazolidine</p>	<p>73.832</p>	Isomères 1	0,31	
			Isomère 2	0,52	
			Isomère 3	0,66	
			Isomère 4	0,72	
			Nitrone	0,17	
<p>Phase mobile : Diéthyléther-éther de pétrole (50/50)</p>					
<p><i>p</i>- OH ph (I5)</p>	<p>5-cyano -3-(4-hydroxyphenyl) -2-phenyl isoxazolidine</p>	<p>87.368</p>	Isomères 1	0,33	
			Isomère 2	0,5	
			Isomère 3	0,6	
			Isomère 4	0,74	
			Nitrone	0,07	
<p>Phase mobile : Diéthyléther-éther de pétrole (50/50)</p>					

III.2-Analyse des mélanges d'isoxazolidines

Les mélanges d'isoxazolidines ont été analysés par spectrophotométrie infrarouge (IR) et UV-visible

III.2.1 Spectrophotométrie infrarouge

Les isoxazolidines synthétisées ont été analysé par spectrophotomètre IR. Les spectres obtenus sont comparés à ceux des nitrones de départ. Ces spectres sont donnés dans les figures suivantes.

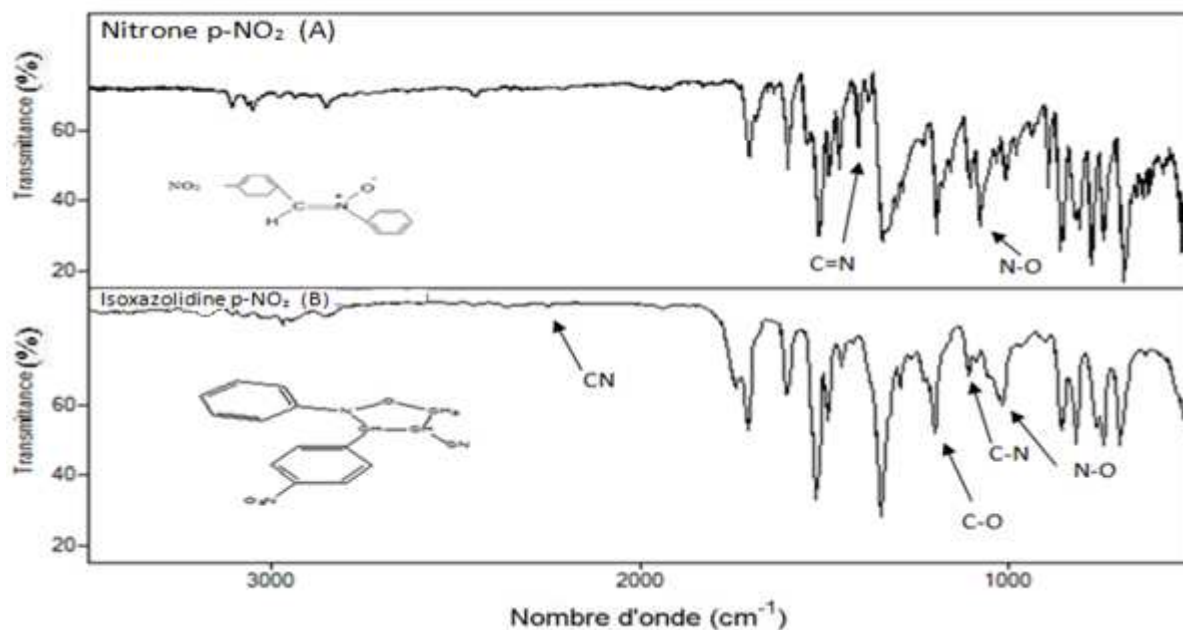


Figure III.2 : Spectre IR en (A) la nitrone nitrée et en (B) le mélange d'isoxazolidines II.

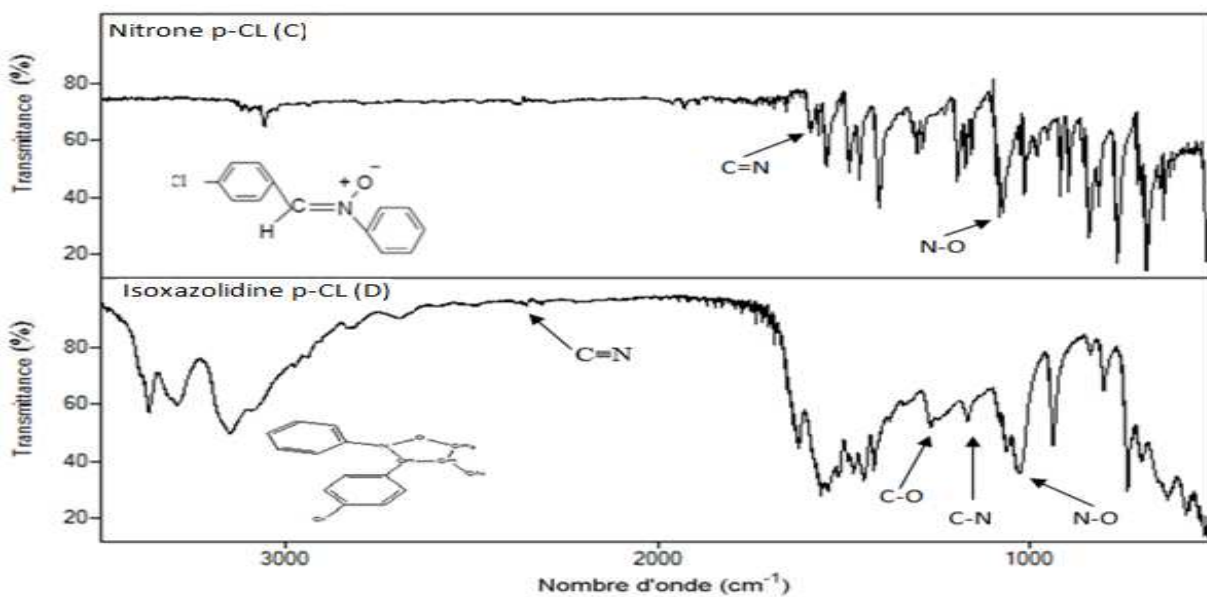


Figure III.3 : Spectre IR en (A) la nitrosonium Chlorée et en (B) le mélange d'isoxazolidines I2.

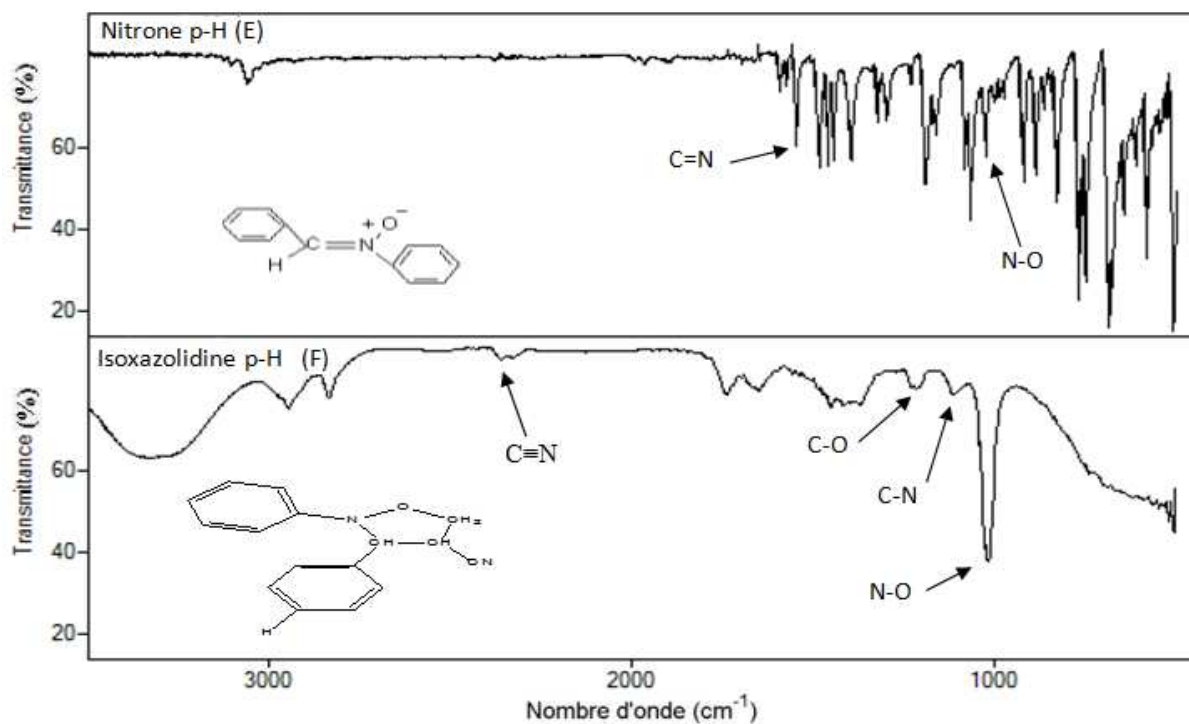


Figure III.4 : Spectre IR en (A) la C, N-diphenyl nitrosonium et en (B) le mélange d'isoxazolidines I3.

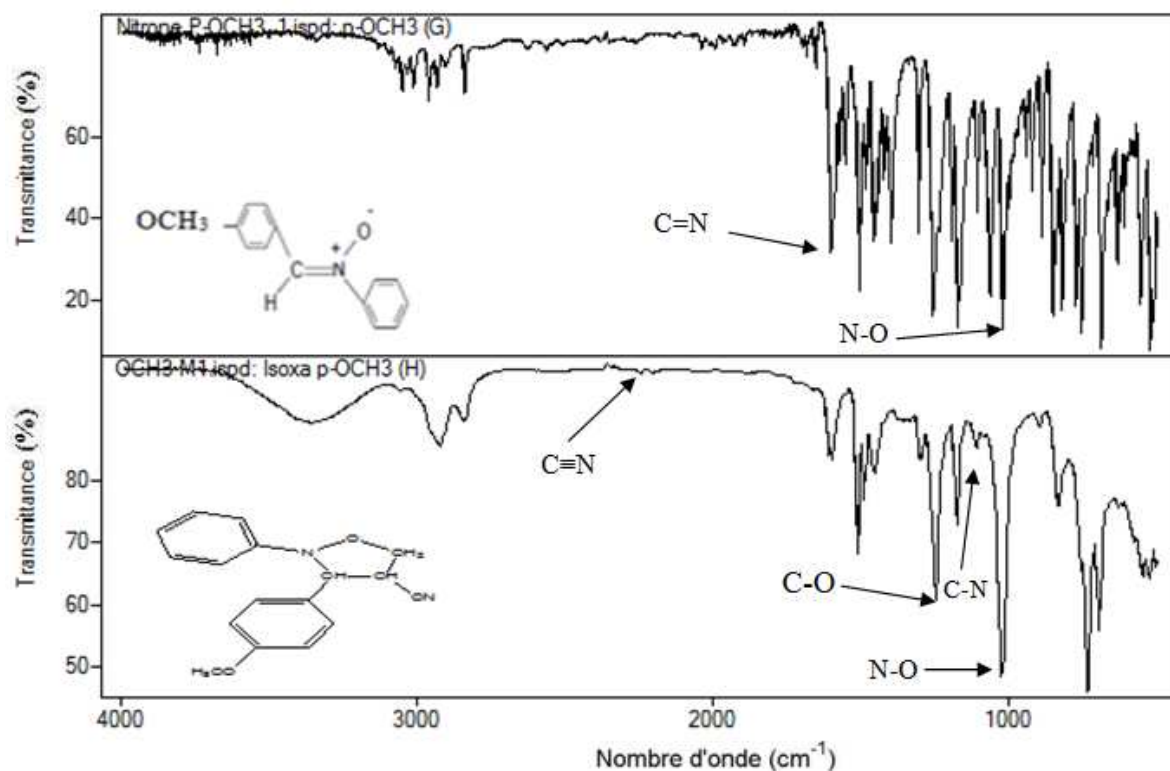


Figure III.5: Spectre IR en (A) la nitron méthoxylée et en (B) le mélange d'isoxazolidines I4.

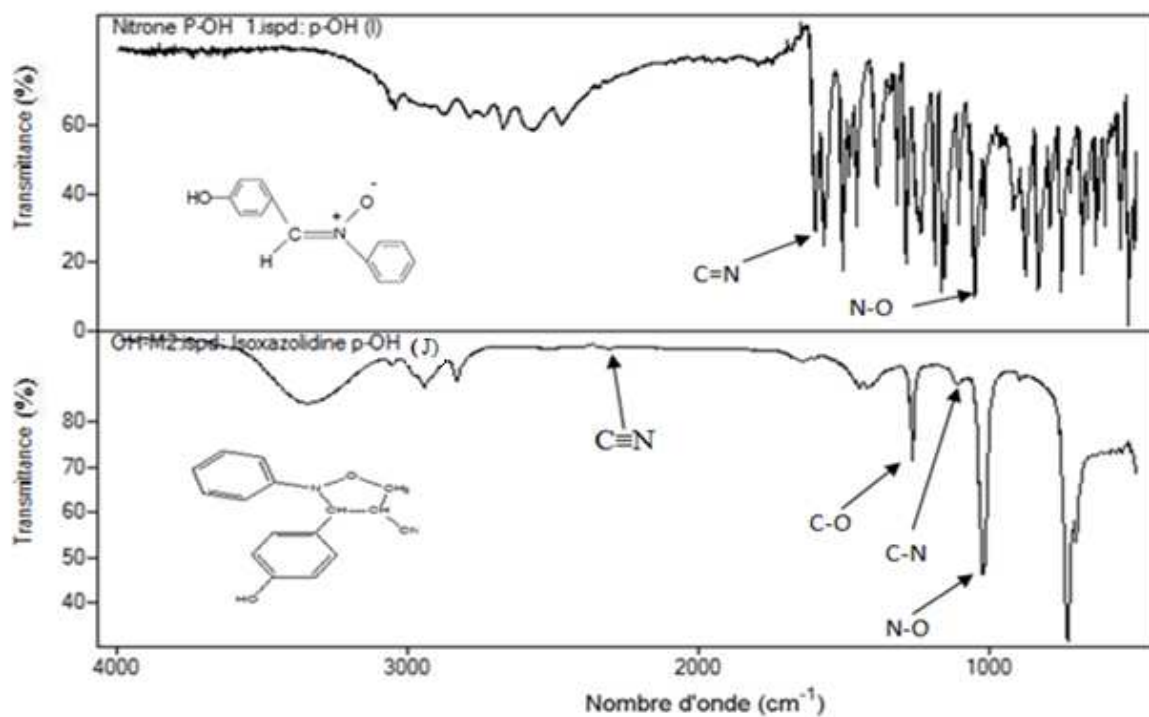


Figure III.6 : Spectre IR en (A) la nitron(I) hydroxylé et en (B) le mélange d'isoxazolidine I5.

L'analyse par spectroscopie IR de l'isoxazolidine et leur comparaison à celui de la nitroène correspondante, nous a permis de détecter l'apparition de nouvelles bandes d'absorption et la disparition d'autres. On note l'absence de la bande d'absorption vers $[1548-1636] \text{ cm}^{-1}$, due à l'élongation de la liaison $\text{C}=\text{N}$ de la fonction nitroène, et l'apparition des trois bandes d'absorption attribuées à la vibration d'élongation de liaison ($\text{N}-\text{O}$) vers $[1007-1026] \text{ cm}^{-1}$, ($\text{C}-\text{N}$) vers $[1107-1167] \text{ cm}^{-1}$, ($\text{C}-\text{O}$) vers $[1199-1266] \text{ cm}^{-1}$ qui sont formées lors de la cycloaddition des nitroènes. Ainsi qu'une bande d'absorption attribuée à la vibration d'élongation de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ aux environs $[2246-2361] \text{ cm}^{-1}$.

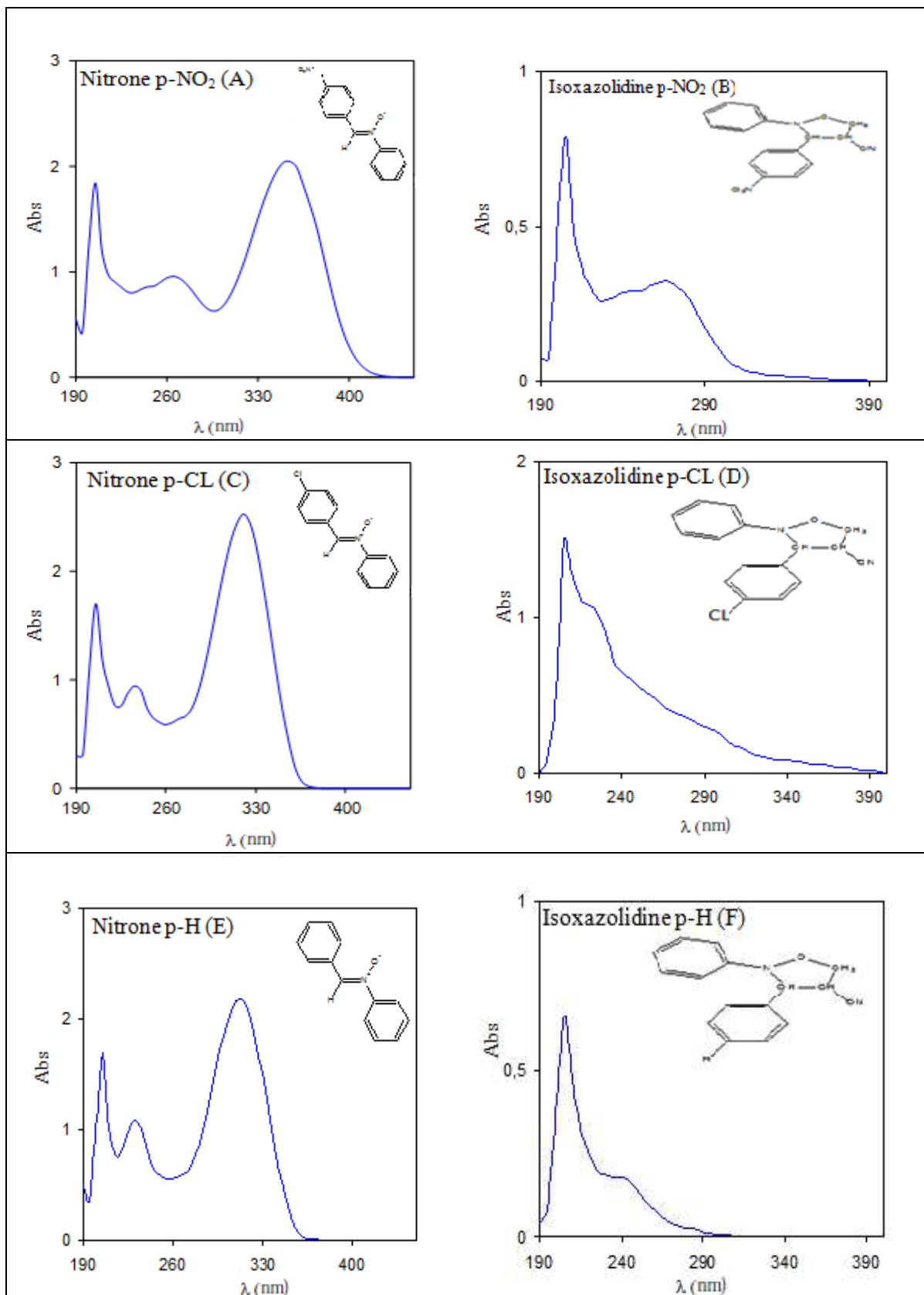
Le tableau (III.2) regroupe les fréquences des principales bandes d'absorption en IR des isoxazolidines et des nitroènes correspondantes.

Tableau (III.2) : caractérisations spectrales en infrarouge des l'isoxazolidines et des nitroènes.

composé		Fréquence d'absorption (cm^{-1})							
		N-O	C-N	C-O	C=N	C≡N	C-X	C=C aromatique	=C-H
P-NO₂	Isoxazolidine (I1)	1015	1107	1199	//	2361	//	1600	2855-2970
	Nitroène	1007	//	//	1636	//	//	1515	2839-2932
P-Cl	Isoxazolidine (I2)	1026	1167	1266	//	2351	736	1559	3151
	Nitroène	1013	//	//	1589	//	764	1545	3056
P-H	Isoxazolidine (I3)	1019	1112	1216	//	2358	//	1651	2835 -2946
	Nitroène	1024	//	//	1548	//	//	1592	3050
P-OCH₃	Isoxazolidine (I4)	1025	1112	1248	//	2246	//	1512	2924-2839
	Nitroène	1022	//	//	1603	//	//	1507	2961
P-OH	Isoxazolidine (I5)	1024	1111	1266	//	2360	1266 de c-o	1450	2832 -2874
	Nitroène	1021	//	//	1601	//	1288 de c-o	1571	2874-2832

III.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 des isoxazolidines synthétisées. Ces analyses sont réalisées en solutions dans le méthanol à une concentration de 10^{-4} moles par litres. Les spectres obtenus sont donnés dans la figure (III.7).



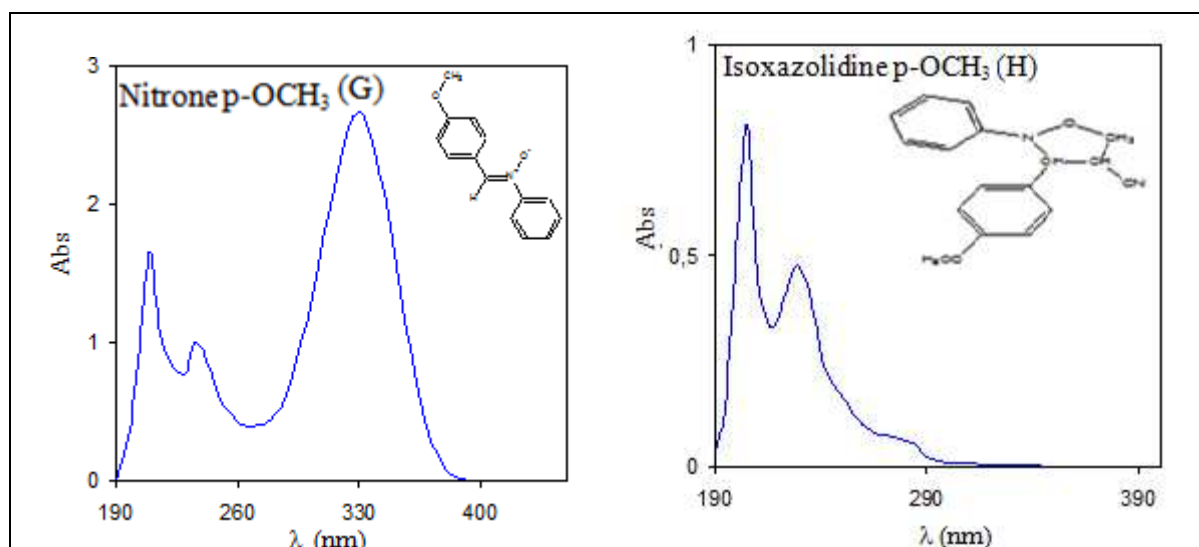


Figure (III.7): Spectres UV-visibles des nitrones et des isoxazolidines synthétisées dans le méthanol (10^{-4} moles/l), à 25°C.

L'analyse par spectroscopie UV de l'isoxazolidines et nitrones nous a permis de détecter la présence de trois bandes d'absorption E1, E2 et K sont observées, Les bandes E1 et E2 sont situées entre 202-204 nm et 230-265 nm, quant à la bande d'absorption K, elle est intense et située entre 312 et 352 nm, elle est caractéristique des nitrones. Cette dernière a disparue dans le cas d'isoxazolidine ou on obtient E 1 et E 2. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau (III.3) : Les longueurs d'ondes d'absorption en UV-Visible correspondante à la nitrones et isoxazolidines.

Ar		Bande K		Bande E ₂		Bande E ₁	
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}
p-NO ₂	nitrone	351,5	20660	265,0	9600	203,5	19620
	isoxazolidine	//	//	265	324	203	851
p-Cl	nitrone	319,0	26020	256,5	7160	204,0	18920
	isoxazolidine	//	//	225	345	204	1499
P-H	nitrone	312,5	21890	230,5	10840	203,5	18410
	isoxazolidine	//	//	238,5	179	203	688
P-OCH ₃	nitrone	330,0	26710	237,5	10050	203,0	18330
	isoxazolidine	//	//	230	475	202,5	967

III.3-Séparation du mélange d'isoxazolidines

L'isoxazolidines synthétisées sont obtenues sous forme d'un mélange de quatre isomères. Ces derniers sont deux couples de régioisomères et deux couples de stéréo-isomères (schéma III3). Cela rend leur séparation par les méthodes chromatographique ordinaire possible. Dans notre travail, nous avons utilisé la chromatographie d'adsorption en choisissant le gel de silice comme phase stationnaire en appliquant les techniques suivante :

- CCM préparative,
- la colonne ouverte et
- la Chromatographie à haute performance (HPLC).

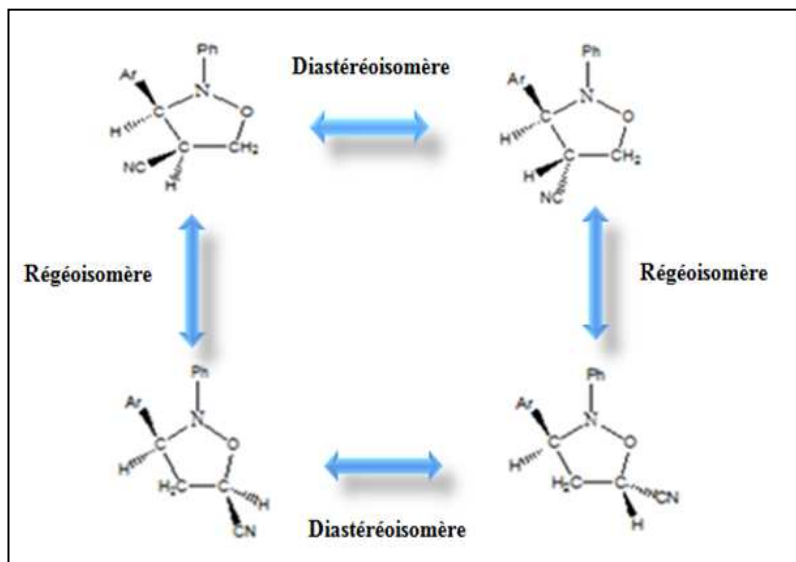


Schéma III.3: relation d'isomérisation entre les quatre isomères d'isoxazolidines.

III.3.1-Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative

Dans le but de récupérer les isomères d'isoxazolidines séparés, nous avons réalisé une séparation par CCM préparative sur plaque de gel de silice, en utilisant la phase mobile (diéther-éther de pétrole). Ce système de solvants est choisi après plusieurs essais (voir la figure III.8).

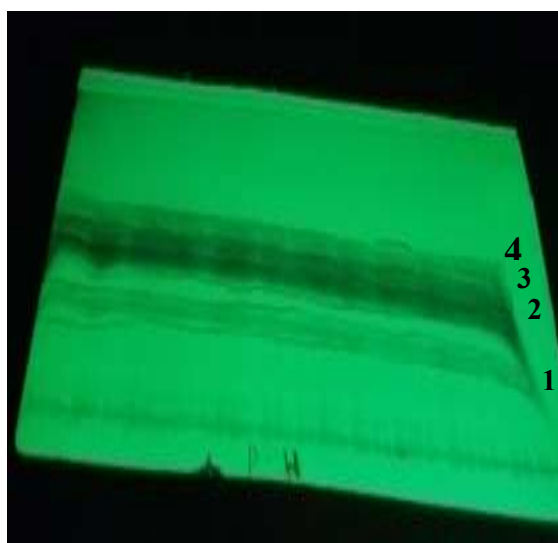


Figure III.8 : Séparation des isomères de 5-cyano-2,3-diphényl isoxazolidine par CCM préparative.

Pour confirmer la séparation des isomères d'isoxazolidines, une analyse par CCM analytique est réalisée, les résultats obtenus sont représentés dans la figure (III.9). Le résultat a montré une bonne séparation de quatre isomères de 5-cyano-2,3-diphényl isoxazolidine. Cette technique malgré sa simplicité reste fatigante et très couteuse (solvant et gel de silice) et nécessite beaucoup de temps.



Figure III.9 : Analyse des isomères d'isoxazolidines séparés par CCM analytique.

III.3.2-Chromatographie sur colonne ouverte

Cette technique repose sur le phénomène d'absorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits apolaires sont élués les premiers (figure III.10).

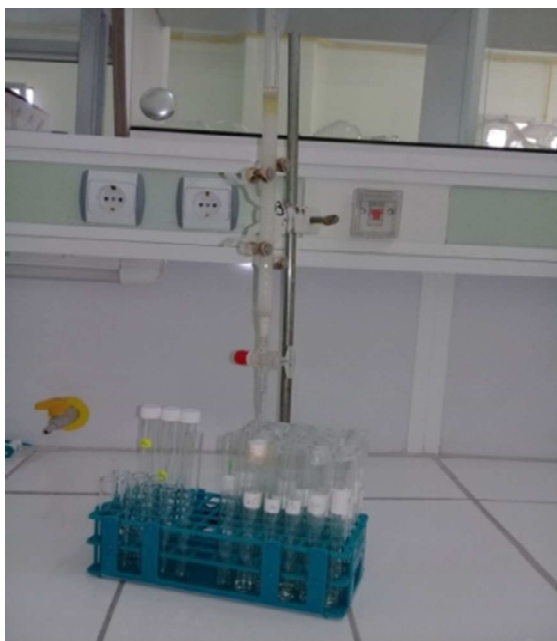
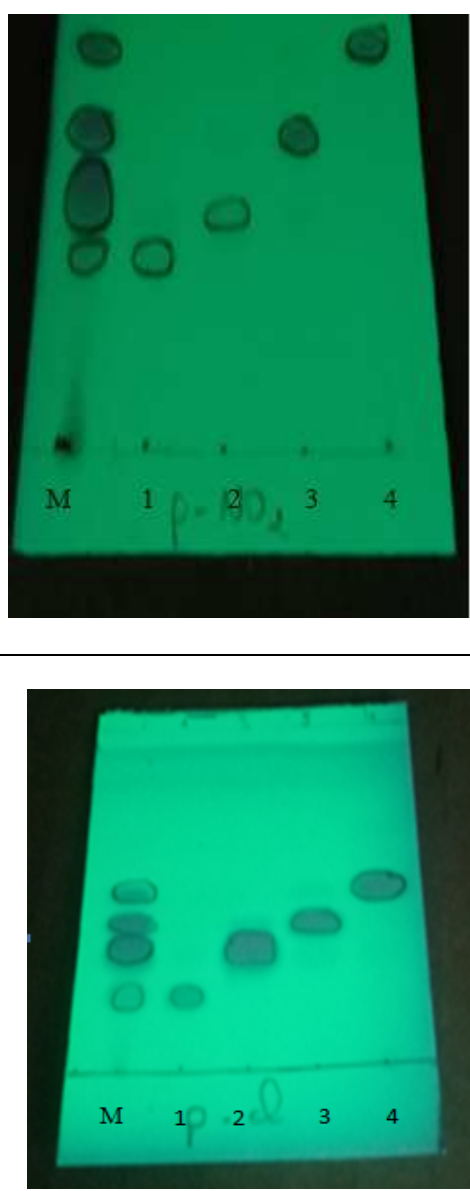
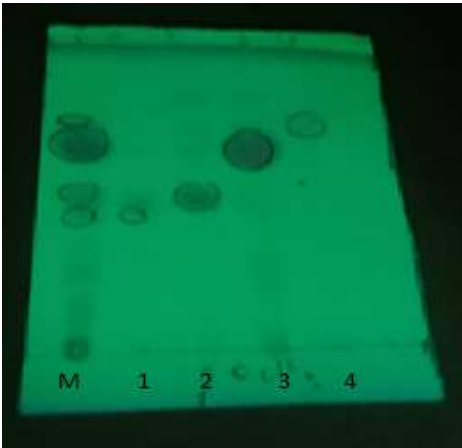
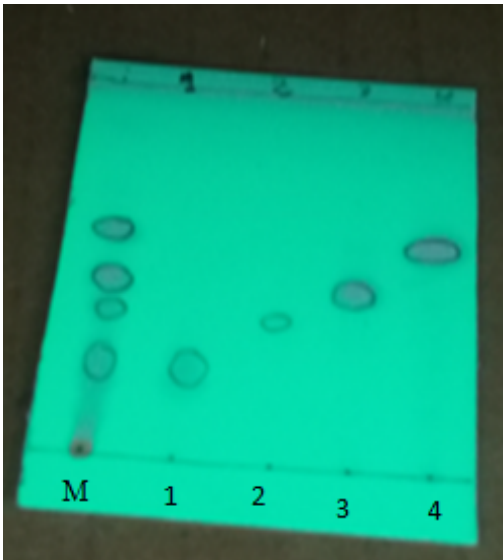


Figure III.10: Technique de séparation d'isoxazolidines synthétisées par chromatographie sur colonne ouverte.

Après plusieurs essais pour le choix de l'éluant qui nous permettra une bonne séparation des isomères d'isoxazolidines, nous avons adapté après optimisation le système (Diéthyl éther-éther de pétrole) avec différente proportion. Ce dernier a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographiques. Le tableau indique les conditions retenues pour chaque isoxazolidines et les figures montrent la bonne séparation de tous les isomères d'isoxazolidines synthétisées.

Tableau (III.4) : résultats de séparation du mélange d'isoxazolidines par chromatographie sur colonne ouvert.

Mélange	masse (g)	Diéthyl éther-éther de pétrole	Plaque de gel de silice des fractions d'isoxazolidines séparées
<i>p</i> -NO ₂ ph (I1)	0.1836	La colonne n° 1 pour séparer les isomères 4 et 3	5%-95%
			90%-10%
			80%-20%
			70%-30%
			60%-40%
			100%-0%
		La colonne n° 2 pour séparer les isomères 2 et 1	5%-95%
			10%-90%
			20%-80%
			30%-70%
			40%-60%
		La colonne n° 3 pour séparer les isomères 1 et 2.	10%-90%
			20%-80%
			25%-75%
			30%-70%
35%-65%			
		40%-60%	
		40%-60%	
<i>p</i> -CL ph (I2)	0.2593	La colonne n° 1 pour séparer les isomères 4 et 3	0%-100%
			10%-90%
			20%-80%
			30%-70%
			40%-60%
			100%-0%
		La colonne n° 2 pour séparer les isomères 4 et 3	0%-100%
			10%-90%
			20%-80%
			30%-70%
			40%-60%
			

<i>p</i> -OCH ₃ ph (I4)	0.1745	La colonne n°1 pour séparer les isomères 4, 3 et 2	0%-100%	
			10%-90%	
			20%-80%	
			30%-70%	
			40%-60%	
			100%-0%	
		La colonne n°2 pour séparer les isomères 1 et 2	15%-85%	
			20%-80%	
			25%-75%	
			30%-70%	
			35%-65%	
			40%-60%	
			100%-0%	
			100%-0%	
<i>p</i> -OH ph (I5)	0.2425	La colonne n° 1 pour sépare les isomère 2, 3 et 4	0%-100%	
			15%-85%	
			20%-80%	
			25%-75%	
			30%-70%	
			30%-70%	
			35%-65%	
			40%-60%	
		100%-0%		
		La colonne n°2 pour séparer les isomères 1 et 2	10%-90%	
			20%-80%	
			25%-75%	
			30%-70%	
			35%-65%	
40%-60%				
40%-40%				
100%-0%				

III.3.3- Caractérisation par spectroscopie infrarouge des isomères séparés

Afin de s'assurer que les isomères séparés correspondent aux isomères attendus, nous avons réalisé une analyse par spectroscopie IR pour chacun des isomères. Les spectres obtenus sont donnés dans les figures..... de l'annexe I. L'ensemble des résultats obtenus pour chaque isomère séparé sont résumés dans le tableau (III.5).

Tableau (III.5) : Nombres d'onde σ (cm-1) des bandes d'absorption reliées aux différentes liaisons mise en jeux dans les différents isomères séparés.

	σ (cm-1)	N-O	C-N	C-O	C=N	C-H	C-H	C=C	C-Cl	NO2	OH	Aryle
(I1)	isomère 1	1023	1111	1216	2359	2944	2970	1452		1367		
	isomère 2	1025	1111	1216	2361	2944	2970	1454		1367		
	isomère 3	1023	1111	1216	2358	2832	2970	1453		1372		
	isomère 4	1022	1112	1216	2360	2832	2944	1453		1373		
(I2)	isomère 1	1038	1167	1265	2351	3152			736			
	isomère 2	1036	1166	1265	2361	3152			736			
	isomère 3	1036	1166	1244	2351	3152			736			
	isomère 4	1031	1166	1265	2358	3152			735			
(I3)	isomère 1	1024	1111	1216	2361	2847	2916	1650				
	isomère 2	1023	1111	1216	2358	2832	2944	1650				
	isomère 3	1023	1111	1266	2360	2832	2944	1650				
	isomère 4	1024	1112	1216	2364	2832	2944	1650				
(I4)	isomère 1	1022	1113	1271	2361	2832	2944	1451				
	isomère 2	1023	1110	1267	2358	2832	2945	1451				
	isomère 3	1023	1112	1266	2360	2833	2944	1451				1177
	isomère 4	1023	1111	1216	2361	2833	2944	1452				1268
(I5)	isomère 1	1025	1111	1266	2360	2832	2944					
	isomère 2	1022	1112	1269	2358	2832	2944				3346	
	isomère 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	isomère 4	1023	1111	1268	2345	2832	2944				3340	

La lecture des résultats confirme l'obtention des quatre isomères isoxazolidine, on remarque la disparition du mode de vibration de la liaison C=N qui, caractérise les différentes nitrones étudiées et l'apparition des modes de vibration caractérisant les liaisons C-O et N-O du cycle isoxazolidine à cinq chaînons.

III.3.4-Séparation par HPLC

Dans tout les travaux rapportés dans la littératures, axés sur l'amélioration de la régio et stéréosélectives de la réaction 1, 3-dipolaire [35,37]. On constate que l'évaluation quantitative (régio et stéréosélectivité) de la réaction passe toujours par une étape de séparation et purification des isomères obtenus. L'achèvement de cette étape nécessite beaucoup de temps et de matériels.

Dans notre travail, nous avons essayé d'élaborer une méthode directe qui permet de déterminer le pourcentage des différents isomères à partir de l'analyse des mélanges bruts. Pour cela, une étude analytique en HPLC a été menée. Les tests préliminaires effectués ont permis de choisir La longueur d'onde du détecteurs UV à été fixée à 245nm. Le débit d'élution utilisé est de 0.6 mL/min, le système eau/acétonitrile comme phase mobile à différents pourcentages.

Afin d'obtenir de meilleures conditions de séparation, nous avons utilisé des gradients de phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile. Les différents gradients de phase utilisés (conditions) sont regroupés dans le tableau (III.6).

Tableau (III.6) : Gradient de phases mobiles C1, C2, C3 et C4 utilisées en HPLC pour la séparation des isomères d'isoxazolidines synthétisés.

condition	Temps (min)	Eau-ACN
C ₁	20	60%-40%
C ₂	0	75%-25%
	15	0%-100%
	20	75%-25%
C ₃	0	70%-30%
	15	20%-80%
	20	70%-30%
C ₄	0	60%-40%
	15	40%-60%
	20	60%-40%

Les chromatogrammes obtenus dans ces conditions sont donnés en annexes (A1). A titre d'exemples on donne dans la Figure A1, les chromatogrammes du mélange d'isoxazolidines nitrées. Les meilleures conditions qui donnent une bonne séparation pour chaque mélange sont données dans le tableau (III.7) :

Tableau (III.7) : Meilleures condition de séparation des mélanges d'isoxazolidines par HPLC.

Isoxazolidines	I1	I2	I3	I4	I5
Conditions	C4	C3	C4	C4	C4

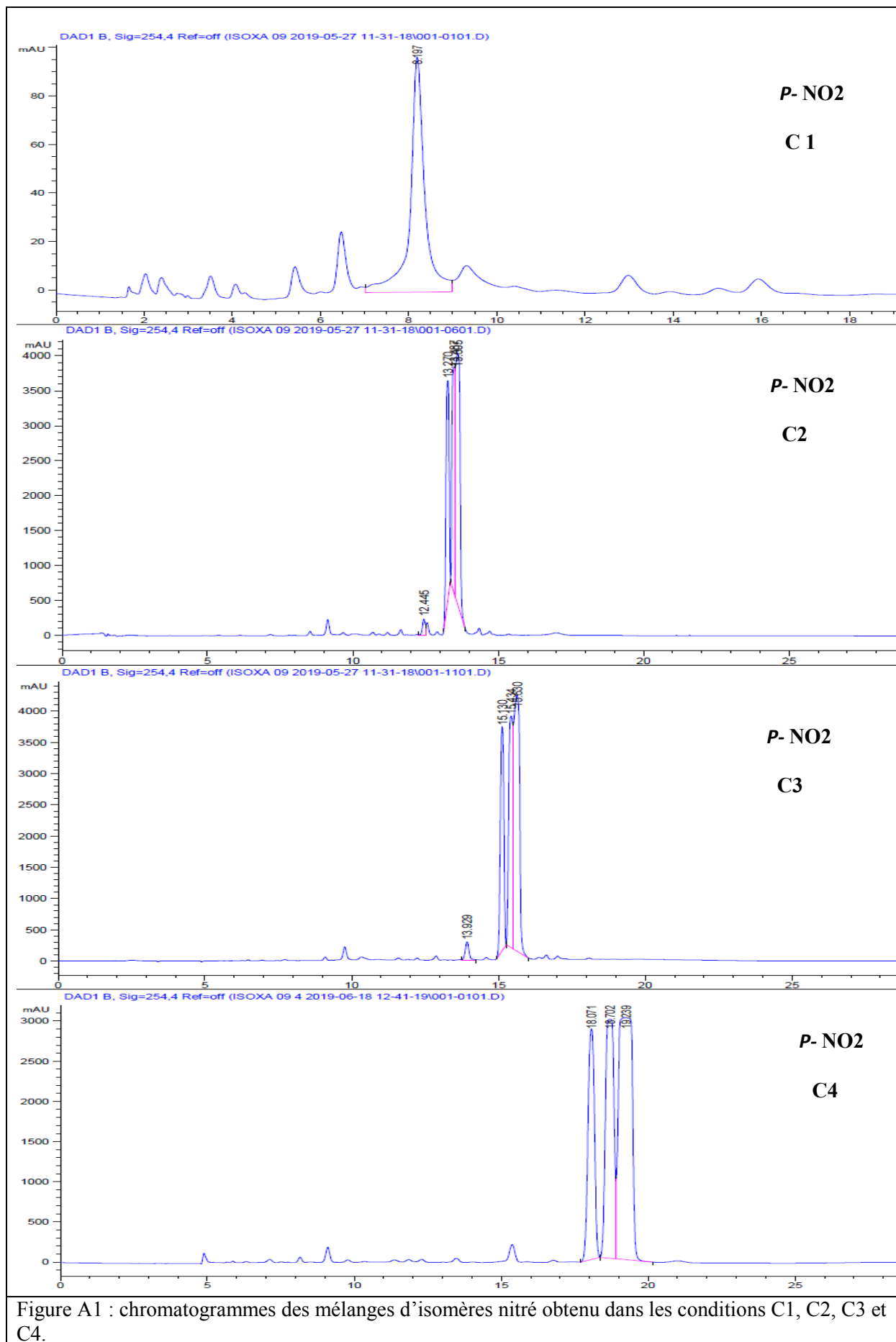


Figure A1 : chromatogrammes des mélanges d'isomères nitré obtenu dans les conditions C1, C2, C3 et C4.

III.4. 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 séparés précédemment comme référence. On comparera ensuite le temps de rétention de chaque isomère au temps de rétention des pics du chromatogramme du mélange. Le chromatogramme obtenu est donné dans l'annexe A2. A titre d'exemple on donnera les chromatogrammes des isoxazolidines nitrées (figure III.11).

Les temps de rétention et le pourcentage de chaque pic et de chaque chromatogramme dans les meilleures conditions sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau (III.8) : Temps de rétention et aire des différents pics obtenus lors de la séparation des isomères d'isoxazolidines avec les meilleures conditions de séparation obtenues.

Ar	Temps de rétention (proportion de pic) min (%)		
	Pic 1	Pic 2	Pic 3
<i>p</i> -NO ₂ ph (11)	18,071 (21,799) Isomère 4	18,702 (29,772) Isomère 1	19,239 (48,5083) Isomère 2 et 3
<i>p</i> -Clph (12)	/	/	/
ph (13)	17,36 (4,9863) Isomère 1	18,408 (12,5108) Isomère 3+4	19,189 (82,5029) Isomère 2
<i>p</i> -OCH ₃ ph (14)	17,235 (8,5504) Isomère 1	18,274 (18,733) Isomère 4	18,986 (71,7166) Isomère 2+3
<i>p</i> -OHph (15)	9.873 (40.6134) Isomère 4	10.899 (21.0925) Isomère 1	11.037(22.4427) Isomère 2 et 3

D'après ces résultats, la séparation par HPLC donne un chromatogramme de trois pics au lieu de quatre pics. (Voir annexe B). Ces études pour être améliorées en appliquant d'autres conditions.

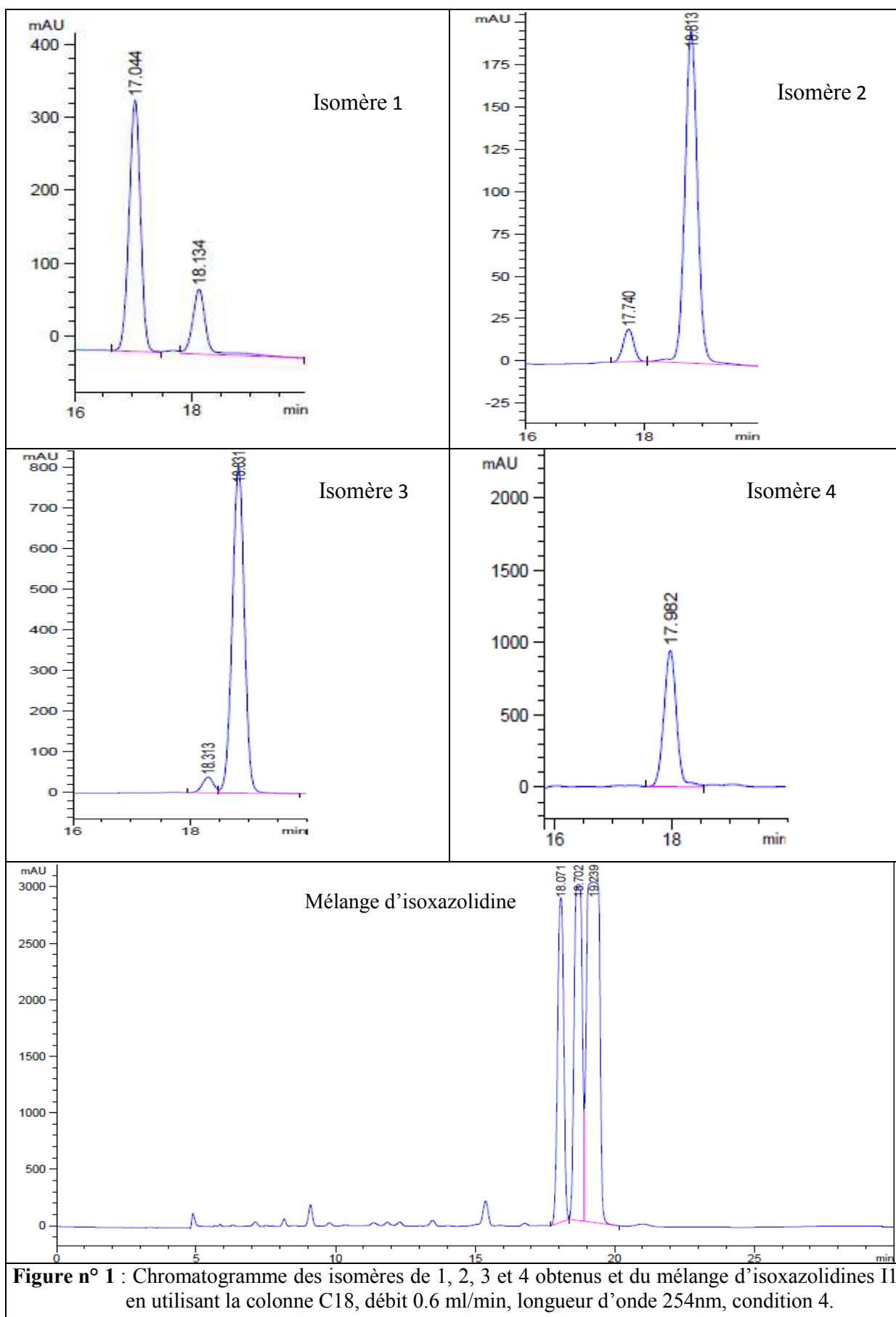


Figure n° 1 : Chromatogramme des isomères de 1, 2, 3 et 4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines II en utilisant la colonne C18, débit 0.6 ml/min, longueur d'onde 254nm, condition 4.

Les structures des isomères séparées sont données dans le schéma (III.5) [38]. A partir de ces structures et l'aire de chaque pic dans le chromatogramme du mélange, il est possible de quantifier les pourcentages des différents isomères d'isoxazolidines I1, I2 et I4. Cette quantification n'est pas possible pour l'I3 puisque les isomères 2 et 4 sont donnés dans même pic.

X	IX-1	IX-2	IX-3	IX-4
(I1): NO ₂ , (I2): Cl, (I3): H, (I4):, OCH ₃ (I5): OH.				
	Régéoisomères 1-4	Régéoisomères 1-5	Régéoisomères 1-5	Régéoisomères 1-4

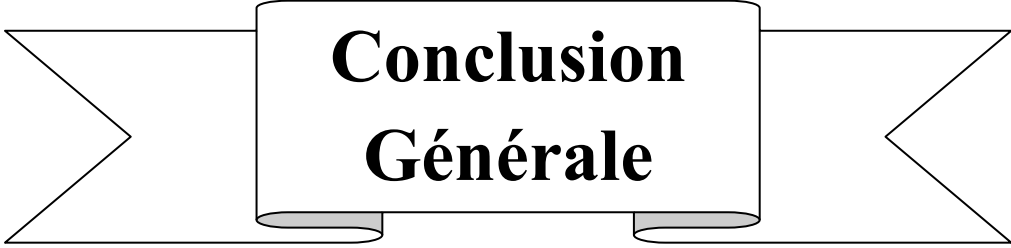
Schéma III.4 : Structure des différents isomères des isoxazolidines I1-I5.

Tableau (III.9) : Proportion des régéoisomeres 1-4 et 1-5 des isoxazolidines synthétisées obtenu par HPLC du mélange brut.

Isoxazolidines	Régéoisomères 1-4	Régéoisomères 1-5
(I1): NO ₂ ,	51.571	48.508
(I4):, OCH ₃	18.745	71.7166
(I5): OH.	61.7059	22.4427

Dans le cas d'isoxazolidine méthoxylée, les résultats montrent que les régéoisomères 5-substitués sont plus abondant que les 4-substitué. Ceci est en accord avec les résultats décrits dans la littérature [39], où il a été rapporté que pour la cycloaddition des alcènes mono-substitués électro-appauvris en électrons, les effets stériques et électroniques agissent d'une manière défavorisant la formation des adduits 4-substitués. Pour l'isoxazolidines hydroxylée et nitrée donne des proportions inverse. Cela est dû probablement à l'effet stérique.

La réaction de cycloaddition 1, 3-dipolaire de la C,N-diphenyl nitronne avec l'acrylonitrile à été déjà réalisé par Asrof et col.[38]. Selon ces auteurs la proportion entre les deux régéoisomere 5-substitués / 4-substitués est de 1/9 déterminé après séparation des isomères par chromatographie. Il serait intéressant de vérifier ces conditions par HPLC.



**Conclusion
Générale**

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de notre travail est principalement consacré à la séparation des isomères des isoxazolidines par HPLC.

La première étape de notre travail est la préparation de ces isoxazolidines. Nous avons alors, réalisé la réaction de cycloaddition 1.3-dipolaire entre une série de nitrones et l'acrylonitrile. Les produits sont obtenus avec des bons rendements, ces derniers ont été analysés par spectroscopie Infra Rouge qui a révélé la présence des pics des fonctions caractéristiques d'isoxazolidine et la disparition de ceux des nitrones. De même pour l'analyse par spectroscopie UV-visible. Les analyses par CCM ont montré l'apparition de quatre spots qui ont été attribué aux quatre isomères attendus. La séparation de ces isomères par CCM préparative, chromatographie sur colonne ouverte nous a permit de récupérer chaque isomère à part.

L'analyse des mélanges des isoxazolidines synthétisées par HPLC nous a donné un chromatogramme de trois pics. L'attribution de chaque pic aux différents isomères correspondants est réalisée grâce à l'étalonnage externe. Les résultats obtenus nous ont permis de faire une étude régéoselective de la réaction. Cette étude a montré que les régéoisomères 5 substitués sont préférentiellement obtenu dans le cas de l'isoxazolidine méthoxylée; cela est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature.

Comme perspective, on ce propose de développer une méthode chromatographique qui nous permettra de quantifier les quatre isomères à la fois.

Aussi, il serait très intéressant d'évaluer l'activité antimicrobienne de chaque isomère en vu de diriger la réaction de leur synthèse vers la préparation de l'isomère le plus actif.



**Références
Bibliographiques**

Références Bibliographiques

- [1] S. (Shu) Kobayashi , K. A. Jørgensen, "Cycloaddition reactions in organic synthesis". wiley-vch, 2002.
- [2] F. Casuscelli et al., "Ring-opening of isoxazolidine nucleus: Competitive formation of α,β -enones and tetrahydro-1,3-oxazines," *Tetrahedron*, vol. 51, no. 10, pp. 2979–2990, mar. 1995.
- [3] L. O. D. E. Nitrile, E. T. L. Azoture, C. Dipôles, and E. T. Des, "Cycloaddition 1,3-Dipolaire Intramoléculaire Impliquant Vinyloxazolines Dérivés De La Noréphédrine Marc-André Desjardins" thèse de magister ,2008. university de québec à montréal.
- [4] M. Freindorf , T. Sexton, "The mechanism of the cycloaddition reaction of 1,3-dipole molecules with acetylene : an investigation with the unified reaction valley approach," *Theoretical Chemistry Accounts*. 2014,university mainchen. DOI: 10.1007/s00214-013-1423-z.
- [5] Albert Padwa, William H. Pearson,"Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry",New york,2002.livre.
- [6] B.CHAKRABORTY and G. P. LUITEL, "Synthesis of some novel fluoro isoxazolidine and isoxazoline derivatives using N-benzyl fluoro nitrene via cycloaddition reaction in ionic liquid," *J. Chem. Sci.*, vol. 125, no. 5, pp. 1071–1077, Sep. 2013.
- [7] A. K. Nacereddine, "Etude Expérimentale et Théorique des Réactions de Cycloaddition," thésé de doctorat, Universite Badji Mokhtar (Annaba), 2011.
- [8] K. N. Houk, J. GonzAlez, and Y. Li, "Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios, 1935-1995," *Acc. Chem. Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 81–90, Feb. 1995.
- [9] BELLOULA, Nacera, "préparation des isoxazoles et isoxazolines quinoléiques par des réactions de cycloddition 1,3-dipolaires". thésé de magister ,2006, université mentouri (constantine),
- [10] EZ-Zoubi Amine., "Synthèse et caractérisation d'amino-isoxazolines et de tétrazoles.," thésé de master, 2017.université de Sidi Mohammed Ben Abdellah (Maroc).
- [11] M. Frederickson, "Optically Active Isoxazolidines via Asymmetric Cycloaddition Reactions of Nib-ones with Alkenes: Applications in Organic Synthesis," *Tetrahedron* vol. 53, no. 2, p. 1996, 1997.
- [12] I. Blanáriková, L. Fišera, and P. Salanski, "Synthesis of chiral amino acid - derived nitrenes and 1,3-dipolar cycloadditions with acrylic acid methyl ester," vol. 2001, no. v, pp. 51–59, 2001, *Arkivoc*.
- [13] V. Jäger and I. Müller, "Synthesis of amino sugars via isoxazolines," *Tetrahedron*, vol. 41, no. 17, pp. 3519–3528, Jan. 1985.

Références Bibliographiques

- [14] F. boutaleb ait mehdi a. zeghdaoui a. zitouni h. bouziane," synthese, caracterisation et evaluation de l'activite antimicrobienne d'une serie d'isoxazolidines",sciences et technologie.pp.65-72,(2008).
- [15] H. Merouani, A. Ounissi, and N. Ouddai, "DFT study of nitrogenated heterocycles of six and seven links" vol. 49, no. 3, pp. 690–696, Journal of the American Chemical Societ, 2017.
- [16] M. Berthet, T. Cheviet, G. Dujardin, I. Parrot, and J. Martinez, "Isoxazolidine: A Privileged Scaffold for Organic and Medicinal Chemistry," Chem. Rev., vol. 116, no. 24, pp. 15235–15283, Dec. 2016.
- [17] Palmer GC, Ordy MJ, Simmons RD, Strand JC, Radov LA, Mullen GB, Kinsolving CR, St Georgiev V, Mitchell JT, Allen SD. "Selection of orally active antifungal agents from 3,5-substituted isoxazolidine derivatives based on acute efficacy-safety profiles" ,Antimicrob. Agents Chemother., vol. 33, no. 6, pp. 895–905, Jun. 1989. doi: 10.1128/aac.33.6.895.
- [18] K. R. Ravi Kumar, H. Mallesha, Basappa, and K. S. Rangappa, "Synthesis of novel isoxazolidine derivatives and studies for their antifungal properties" Eur. J. Med. Chem., vol. 38, no. 6, pp. 613–619, Jun. 2003.
- [19] U. Chiacchio et al, "Enantioselective synthesis of isoxazolidinyl nucleosides containing uracil , 5-fluorouracil , thymine and cytosine as new potential anti- HIV drugs" Arkivoc, vol. 2002, no. xi, 2002.
- [20] Nicolas Rabasso," Chimie organique", Paris, 2018.p:124.livre.
- [21] Baki Samira,"Etude théorique des réactions de Diels-Alder des diènes 1,4-symétriquement disubstitués: Influence de la configuration des doubles liaisons sur la régio- et endosélectivité," thèse de doctorat,2012, Universite d'oran.
- [22] LAYEB Hatem, "Etude théorique et synthèse d'isoxazolidines optiquement actives par réaction 1,3-dipolaire (1,3-DC)", thèse de doctorat, 2016,Universite badji mokhtar-(annaba).
- [23] Jonathan Clayden, Nick Greeves, Stuart Warren," Chimie organique : une approche orbitalaire", septembre 2013, livre.
- [24] B. ACHOURI, "Synthèse et étude théorique d'une série d'isoxazolidines par réaction de cycloaddition.," thèse de magister, 2011,Université Badji Mokhtar (Annaba).
- [25] B. A. Bidlingmeyer, "Practical HPLC methodology and applications".p:200.Wiley, 1992.livre.
- [26] Satinder ahuja michael.W.dong "Hndbook of pharmaceutical analysis by HPLC",vol.6, 2005.p: 350. livre.
- [27] W. L.B.GODON, "chromatographie liquide a haute performance", p. 2, 20. livre.
- [28] Joel swadesh,"HPLC : partical and industrial applications",1996 .p:480. livre.

Références Bibliographiques

- [29] S. California State University, "Solvent miscibility table" 2011.
<http://www.scharlab.com/tabla-reactivos-mezclabilidad.php>
- [30] Thierry BRIERE-Professeur, "cours de chromatographie liquide",p45-46,Université de La Réunion 2001.
<http://www2.univ-reunion.fr/~briere> COURS.
- [31] Douglas A Skoog,"Chimie analytique",2008.p:55.livre.
- [32] J. Mendham, Analyse chimique quantitative de Vogel. 2005.p:36. livre.
- [33] LATIFA.BEN SAAD,"Etude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma ", thèse de master 2013,Université Tunis El Manar.
- [34] K. HAMZA, A. TOUATI, A. AIT YAHIA, and A. MEKLAT, "Mise En Evidence De L'Activite Antimicrobienne De Deux Series De Nitrones Et D'Isoxazolidines Synthetisees," Sci. Technol. C, vol. N°28 Decem, pp. 65–72, 2008.
- [35] R.A. Floyd, R.D. Kopke, C. Choi, S.B. Foster, S. Doblas, R.A. Towner, Free Radical Biology & Medicine Nitrones as therapeutics, Free Radic. Biol. Med. 45 (2008) 1361–1374. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.017.
- [36] K. R. Maples, A. R. Green, and R. A. Floyd, "Nitronerelated therapeutics;," CNS Drugs, vol. 18, no. 15, pp. 1071–84, 2004.doi: 10.2165/00023210-200418150-00003.
- [37] Y. Sun, G. Zhang, Z. Zhang, P. Yu, H. Zhong, J. Du, Y. Wang, Novel multifunctional nitrones for treatment of ischemic stroke, in: Bioorganic Med. Chem., Elsevier Ltd, 2012: pp. 3939–3945. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.016.
- [38] S. Asrof Ali, P.A. Senaratne, C.R. Illig, H. Meckler, J.J. Tufariello," Nitroner cycloadditions. regiochemistry" Tetrahedron Lett. 20 (1979) 4167–4170.
doi:10.1016/S0040-4039(01)86534-5.
- [39] P. Merino, T. Tejero, U. Chiacchio, G. Romeo, A. Rescifina, "A DFT study on the 1, 3-dipolar cycloaddition reactions of C-(hetaryl) nitrones with methyl acrylate and vinyl acetate", Tetrahedron. 63 (2007) 1448–1458,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.11.073>.



Annexes

Annexe A

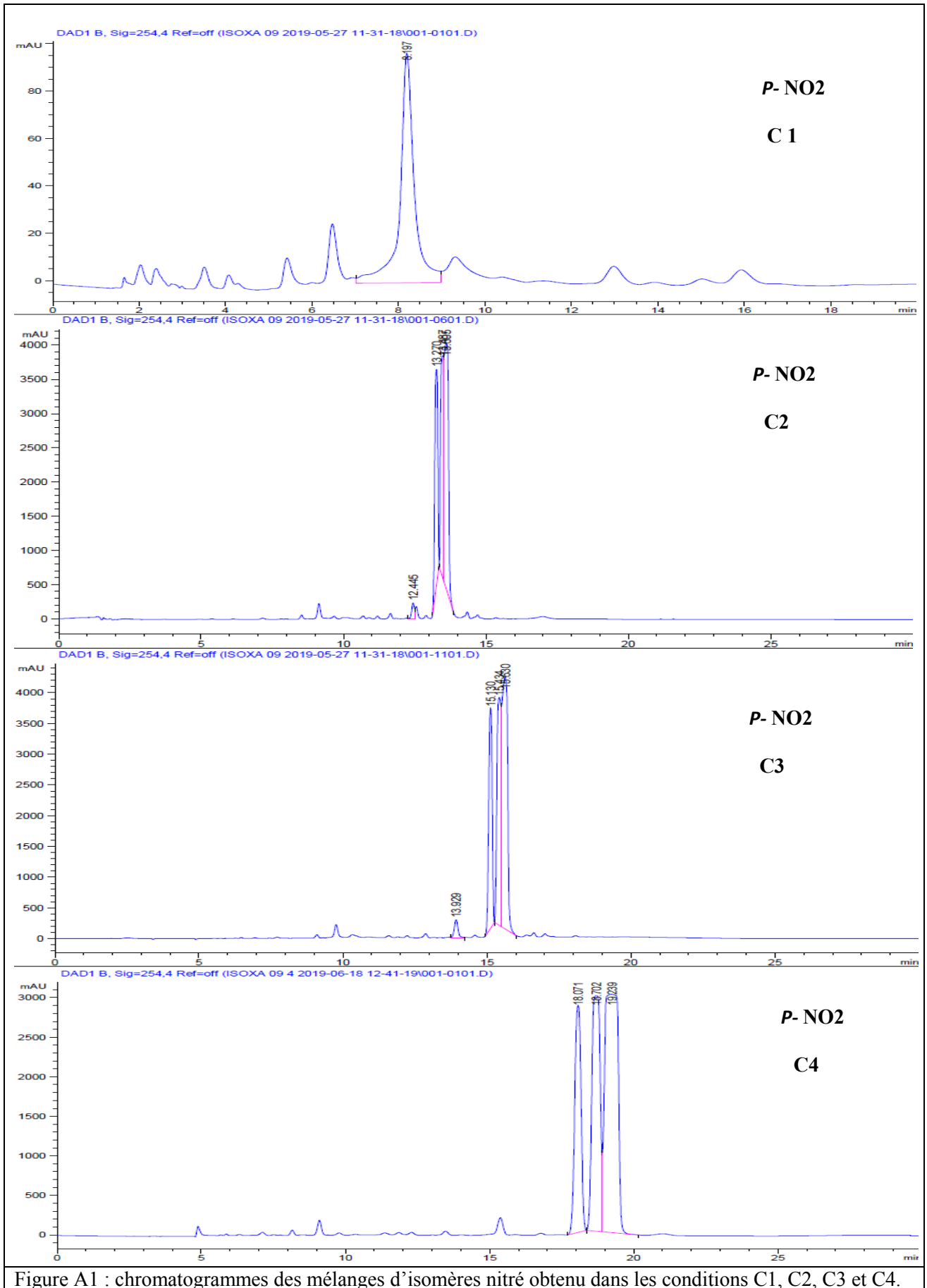
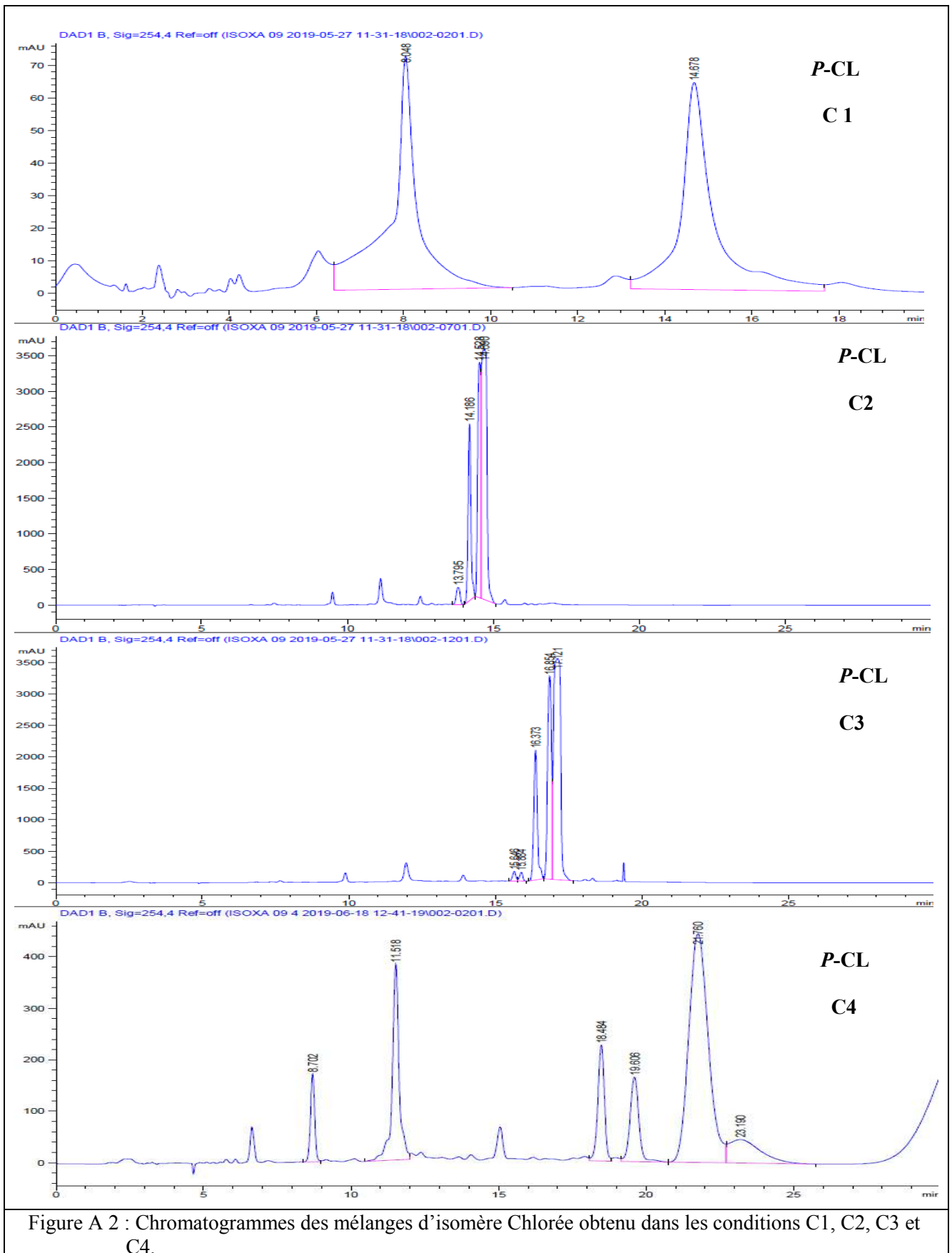


Figure A1 : chromatogrammes des mélanges d'isomères nitré obtenu dans les conditions C1, C2, C3 et C4.

Annexe A



Annexe A

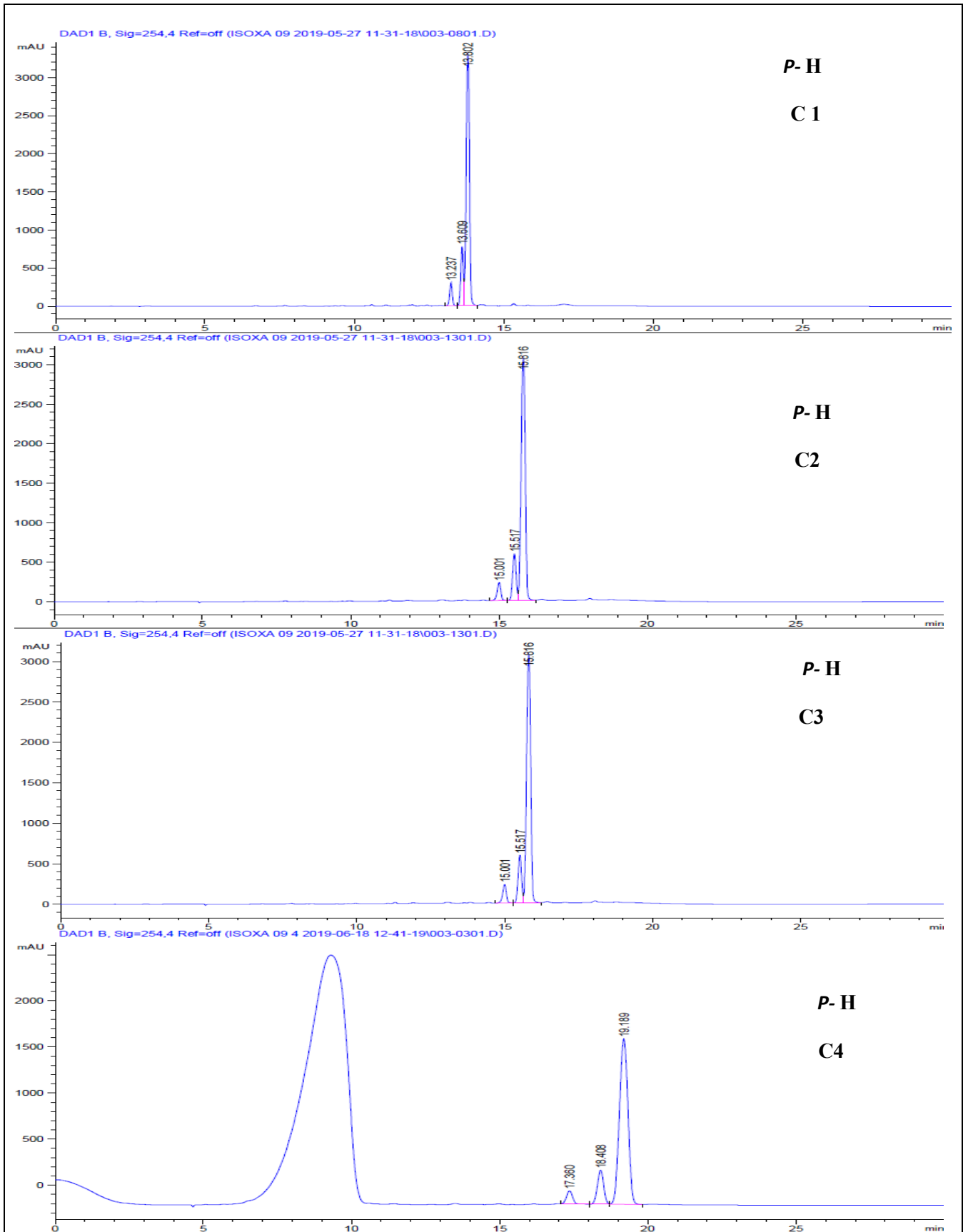


Figure A 3 : Chromatogrammes des mélanges d'isomère C,N-diphényl obtenu dans les condition C1,C2,C3 et C4.

Annexe A

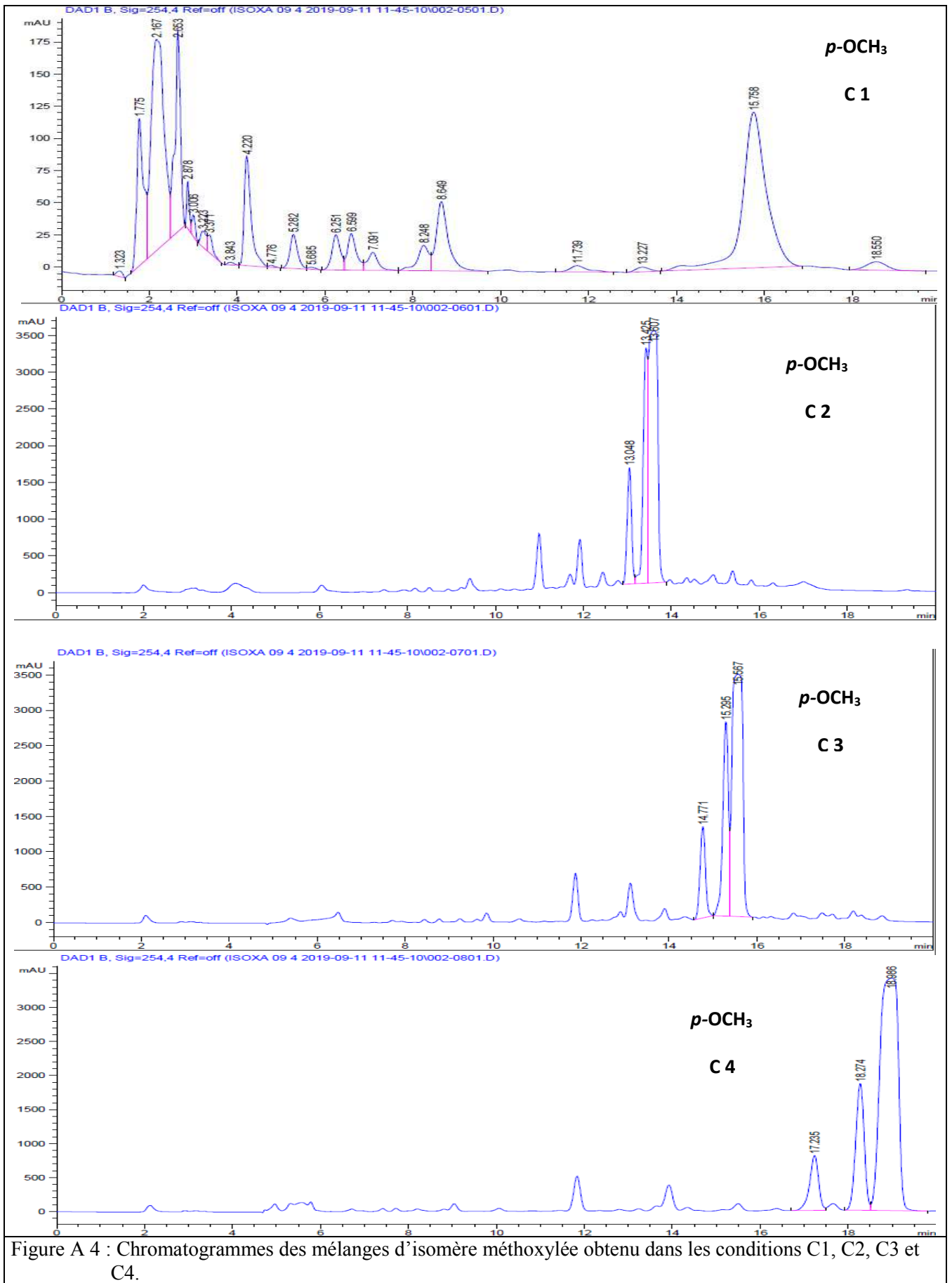


Figure A 4 : Chromatogrammes des mélanges d'isomère méthoxylée obtenu dans les conditions C1, C2, C3 et C4.

Annexe A

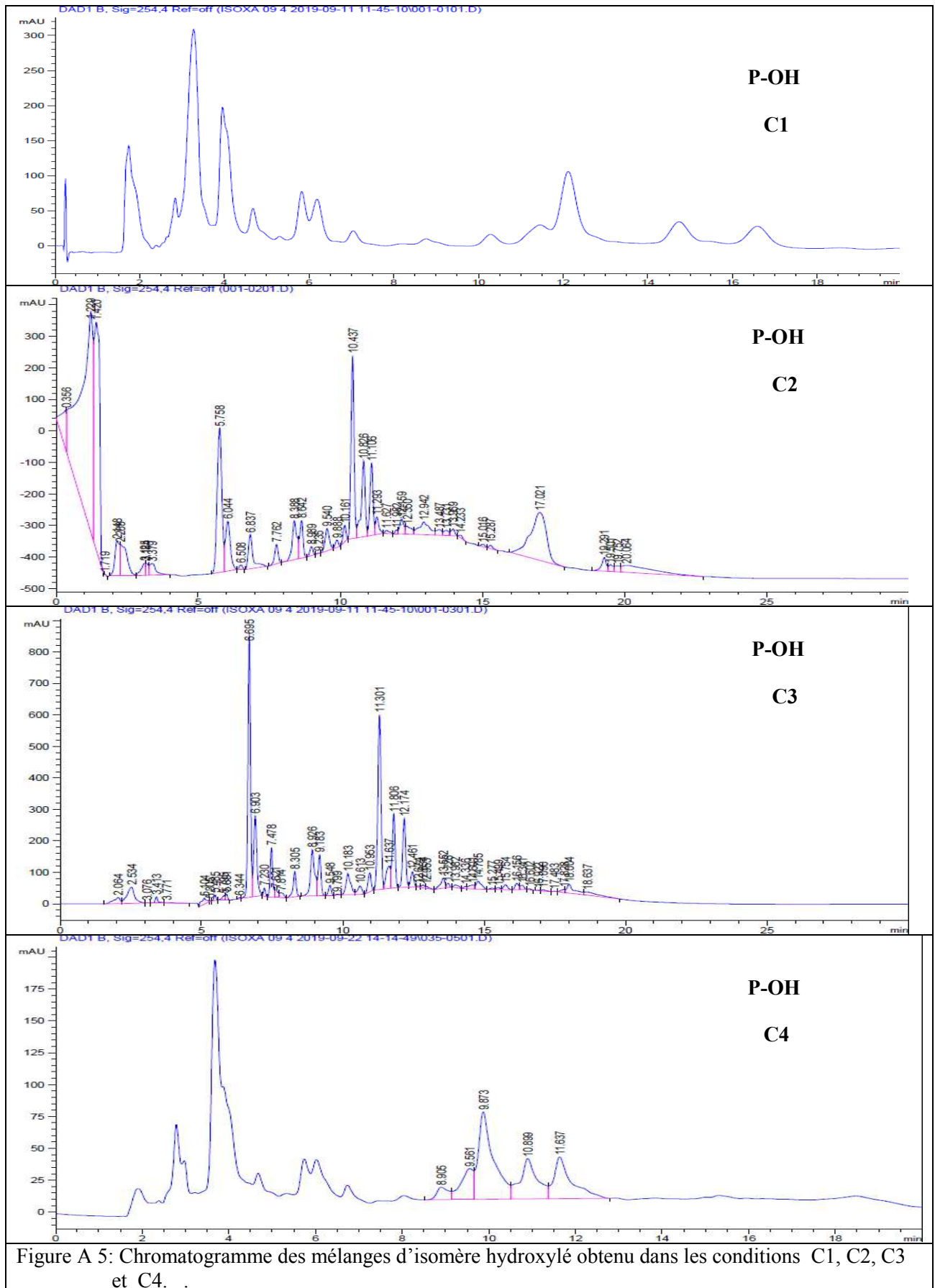


Figure A 5: Chromatogramme des mélanges d'isomère hydroxylé obtenu dans les conditions C1, C2, C3 et C4.

Annexe B

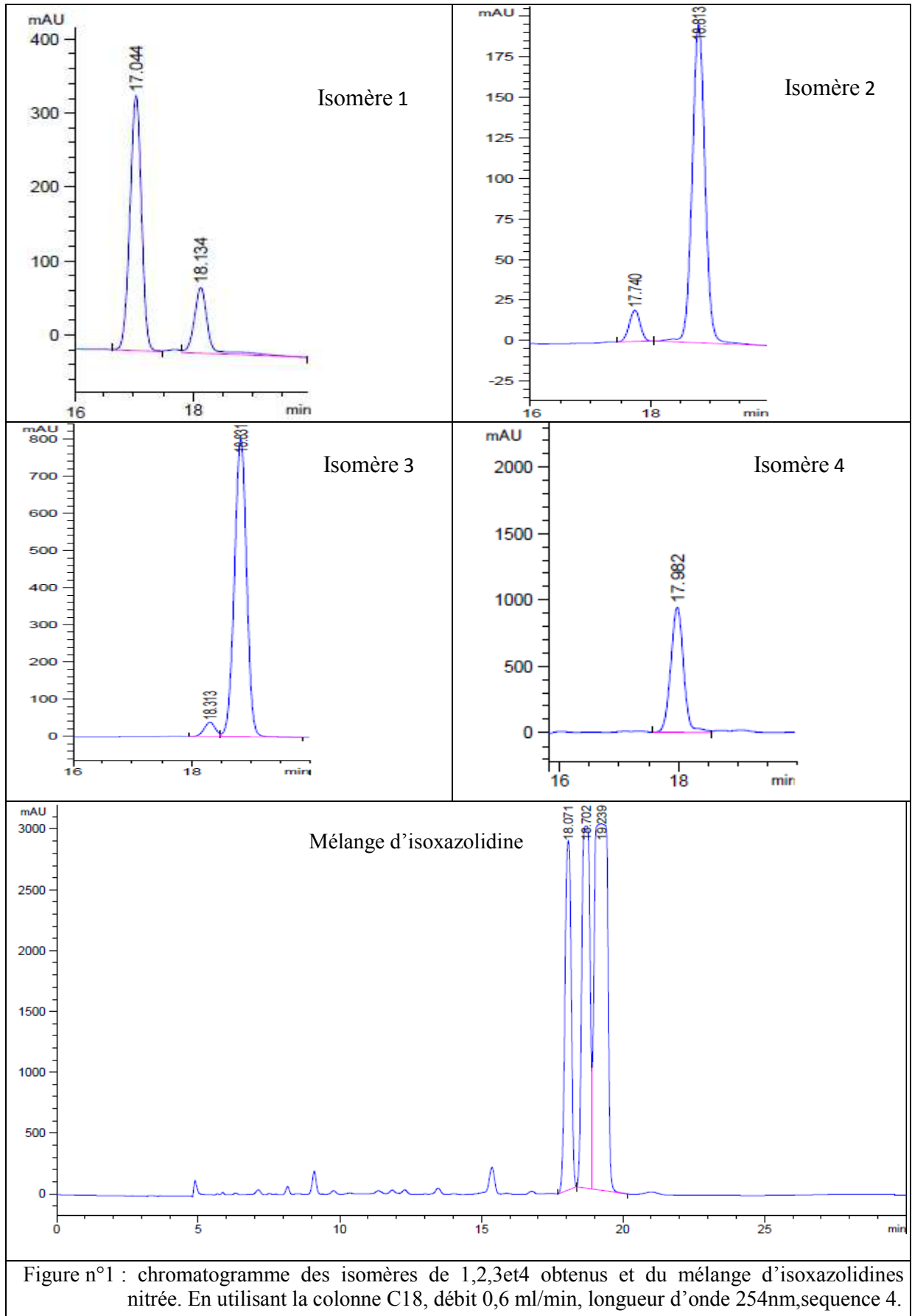


Figure n°1 : chromatogramme des isomères de 1,2,3et4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines nitrée. En utilisant la colonne C18, débit 0,6 ml/min, longueur d'onde 254nm,sequence 4.

Annexe B

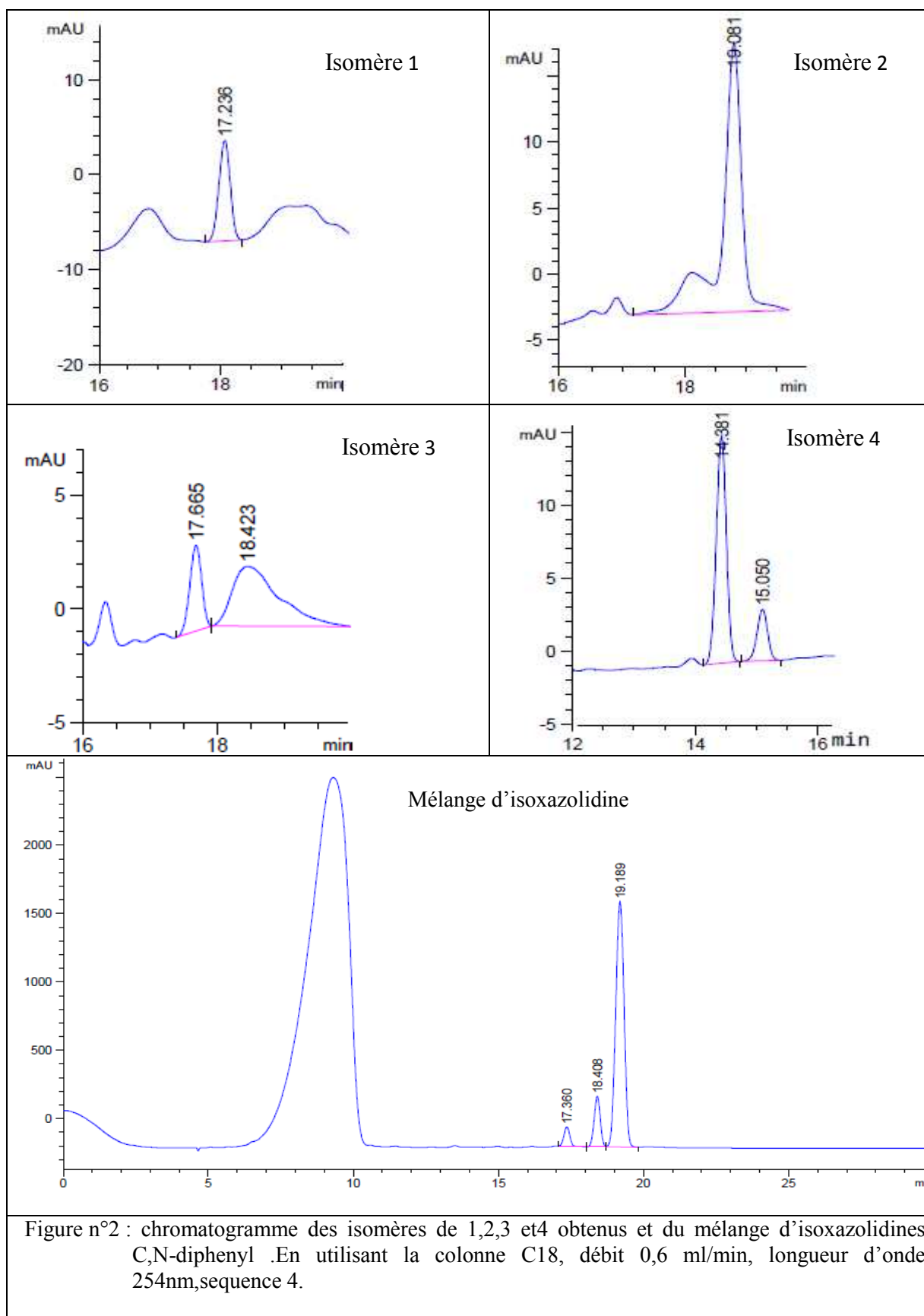


Figure n°2 : chromatogramme des isomères de 1,2,3 et4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines C,N-diphenyl .En utilisant la colonne C18, débit 0,6 ml/min, longueur d'onde 254nm,sequence 4.

Annexe B

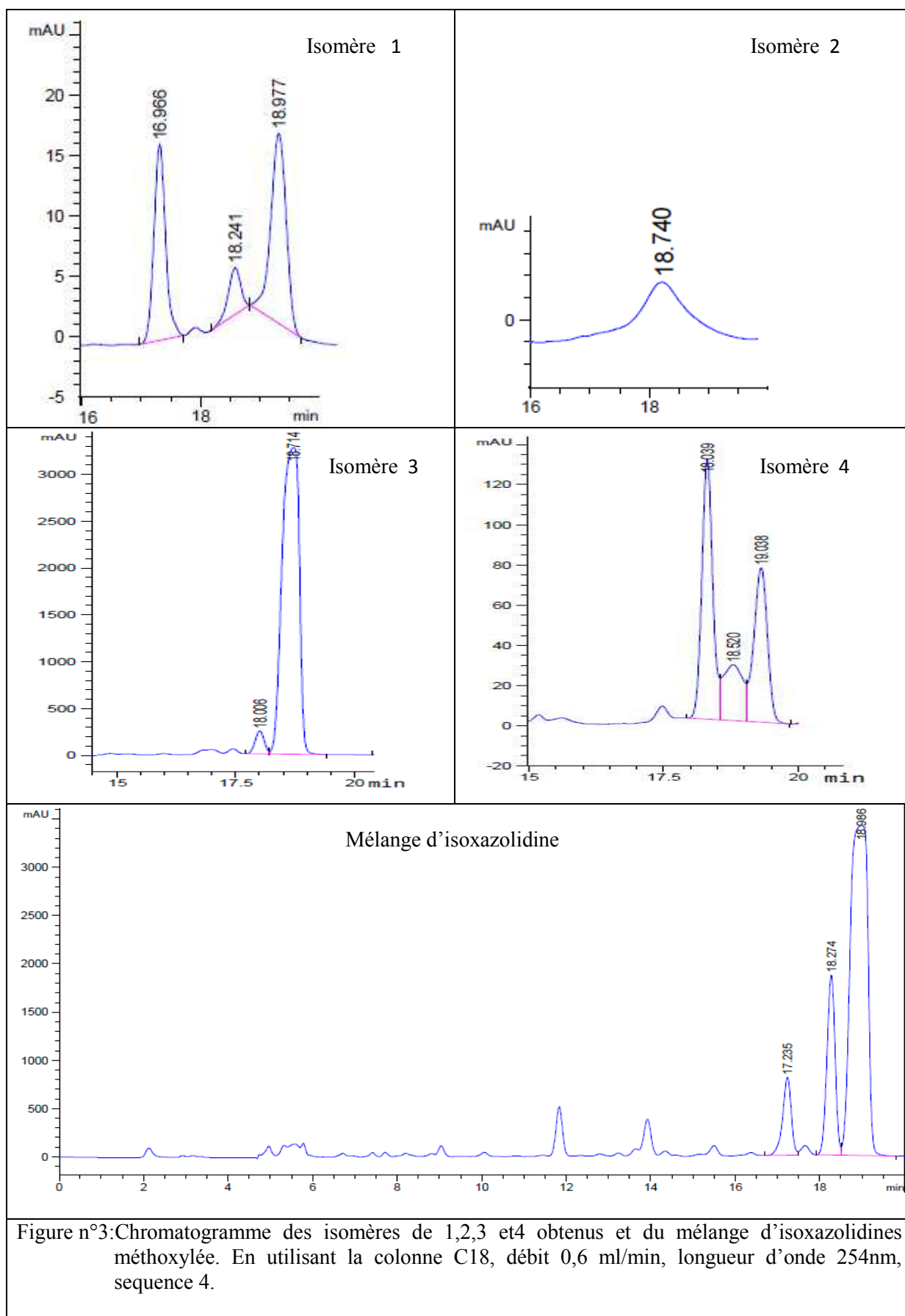


Figure n°3: Chromatogramme des isomères de 1,2,3 et 4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines méthoxylée. En utilisant la colonne C18, débit 0,6 ml/min, longueur d'onde 254nm, séquence 4.

Annexe B

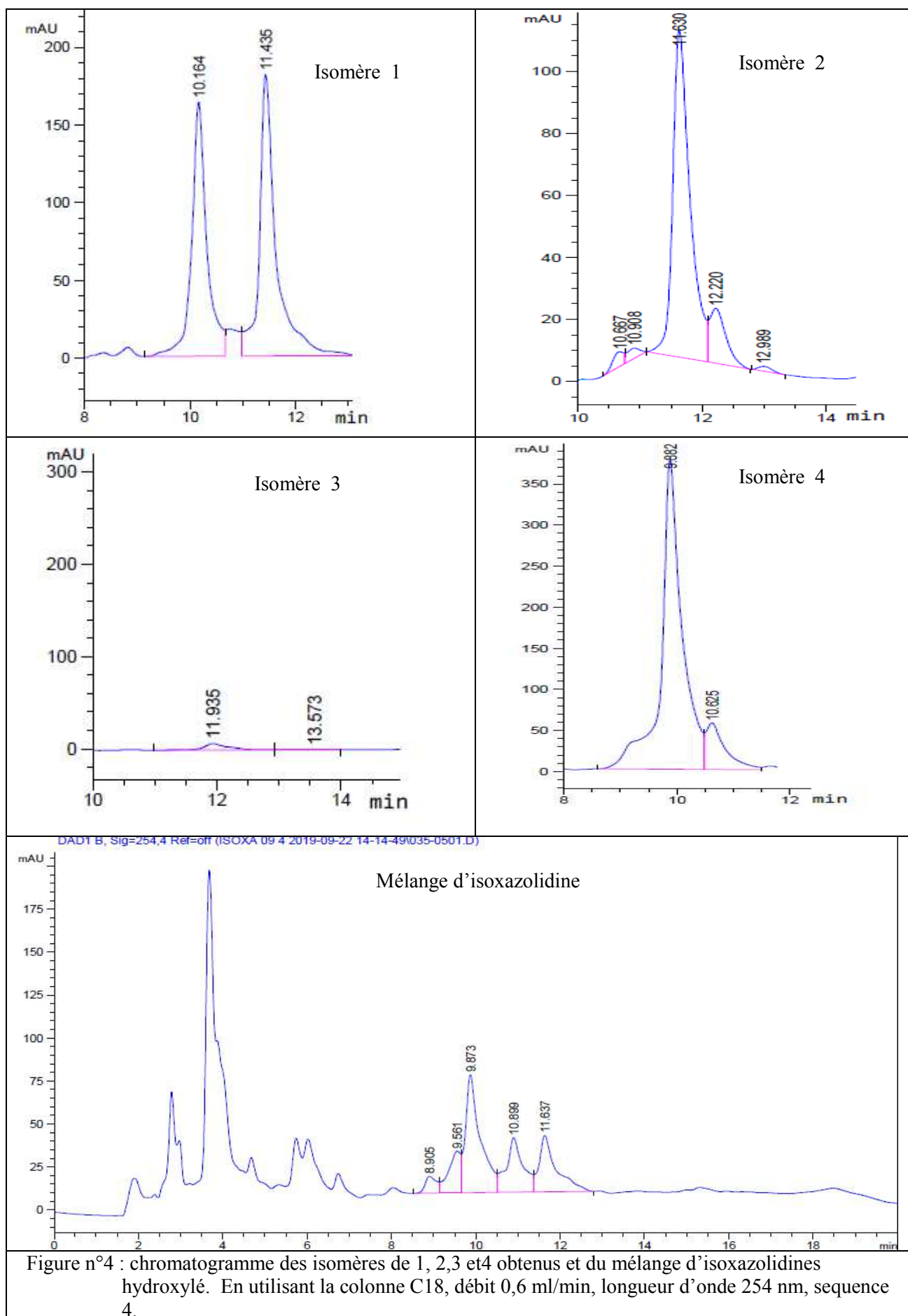
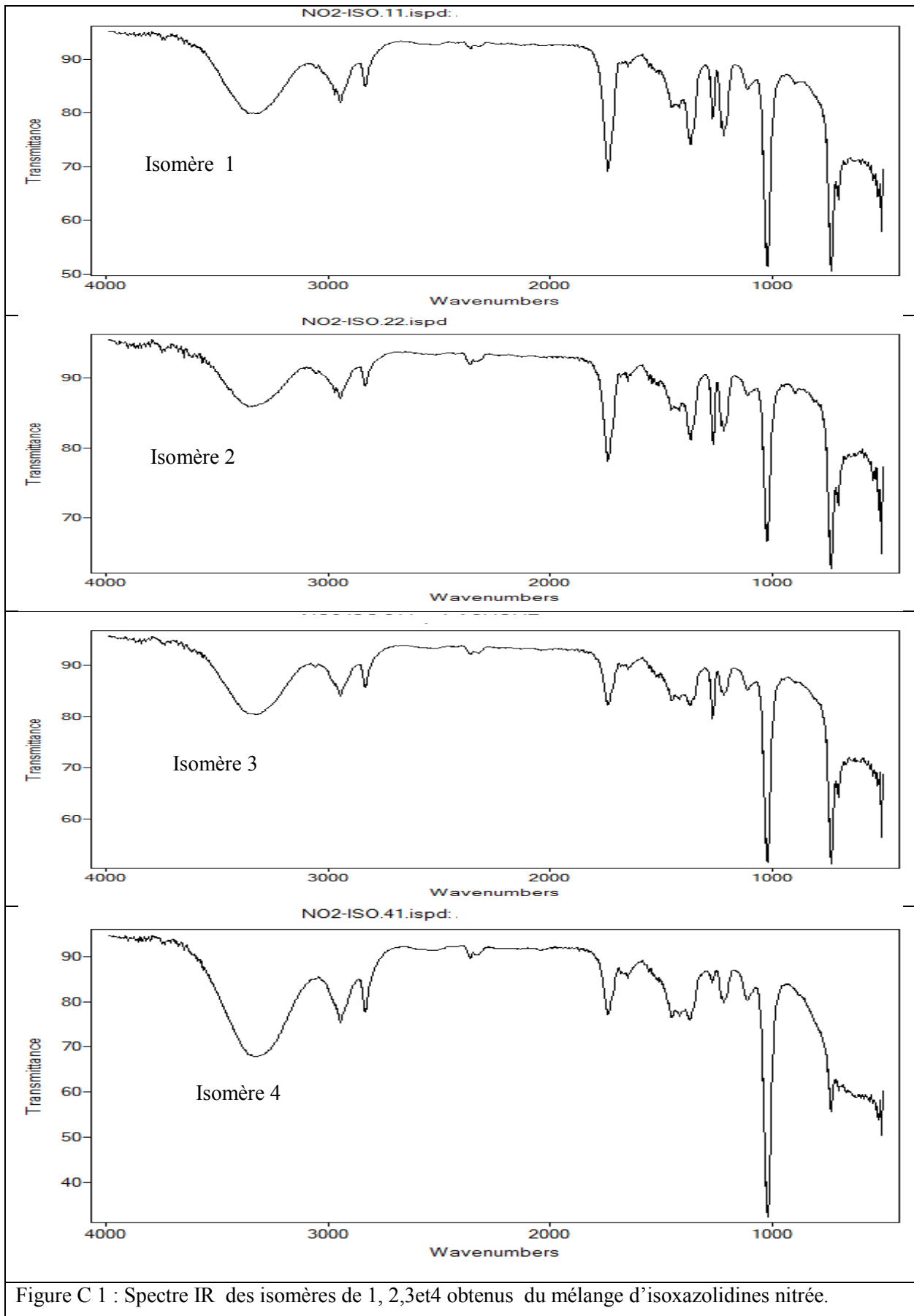
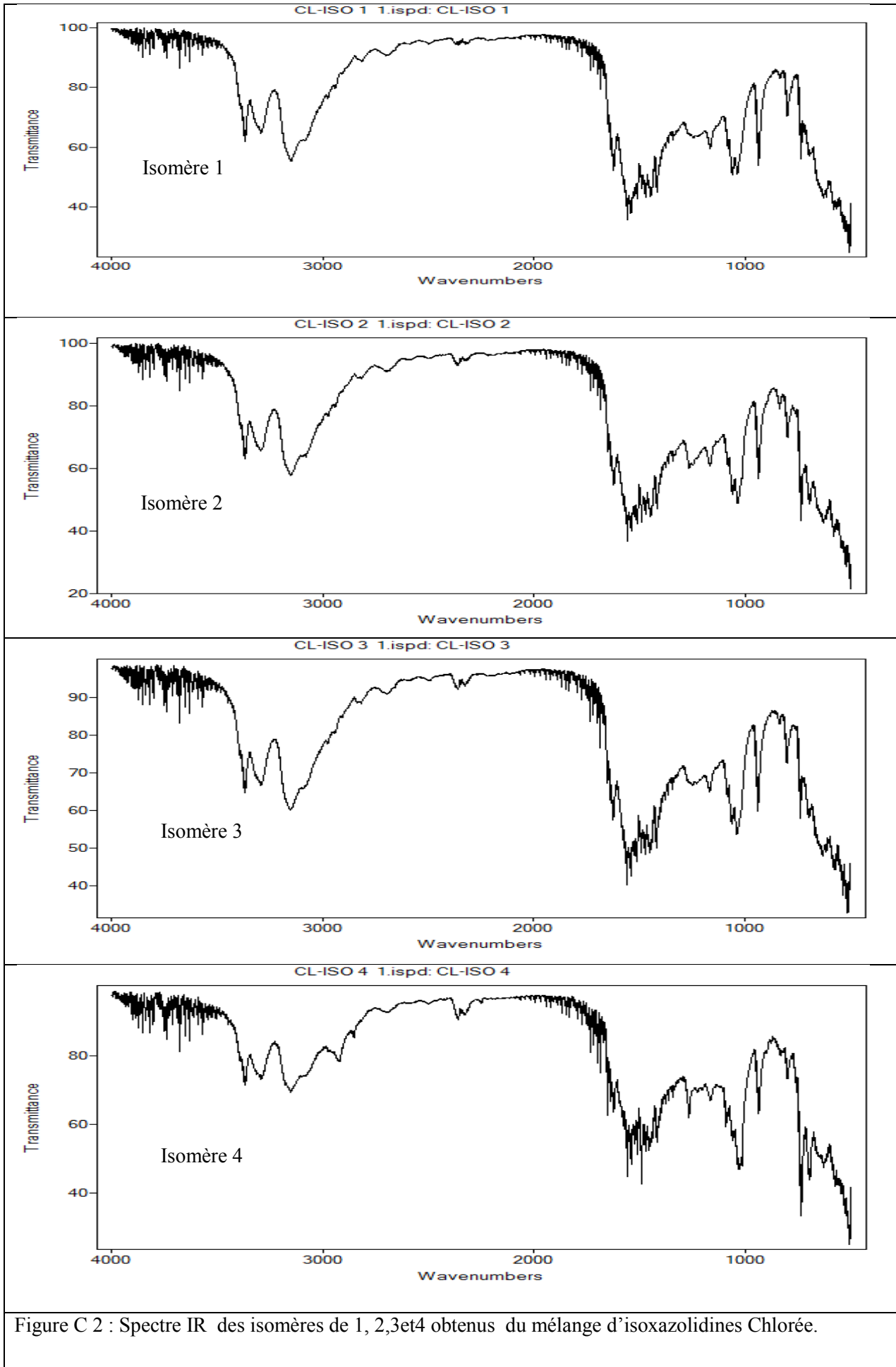


Figure n°4 : chromatogramme des isomères de 1, 2,3 et4 obtenus et du mélange d'isoxazolidines hydroxylé. En utilisant la colonne C18, débit 0,6 ml/min, longueur d'onde 254 nm, sequence 4.

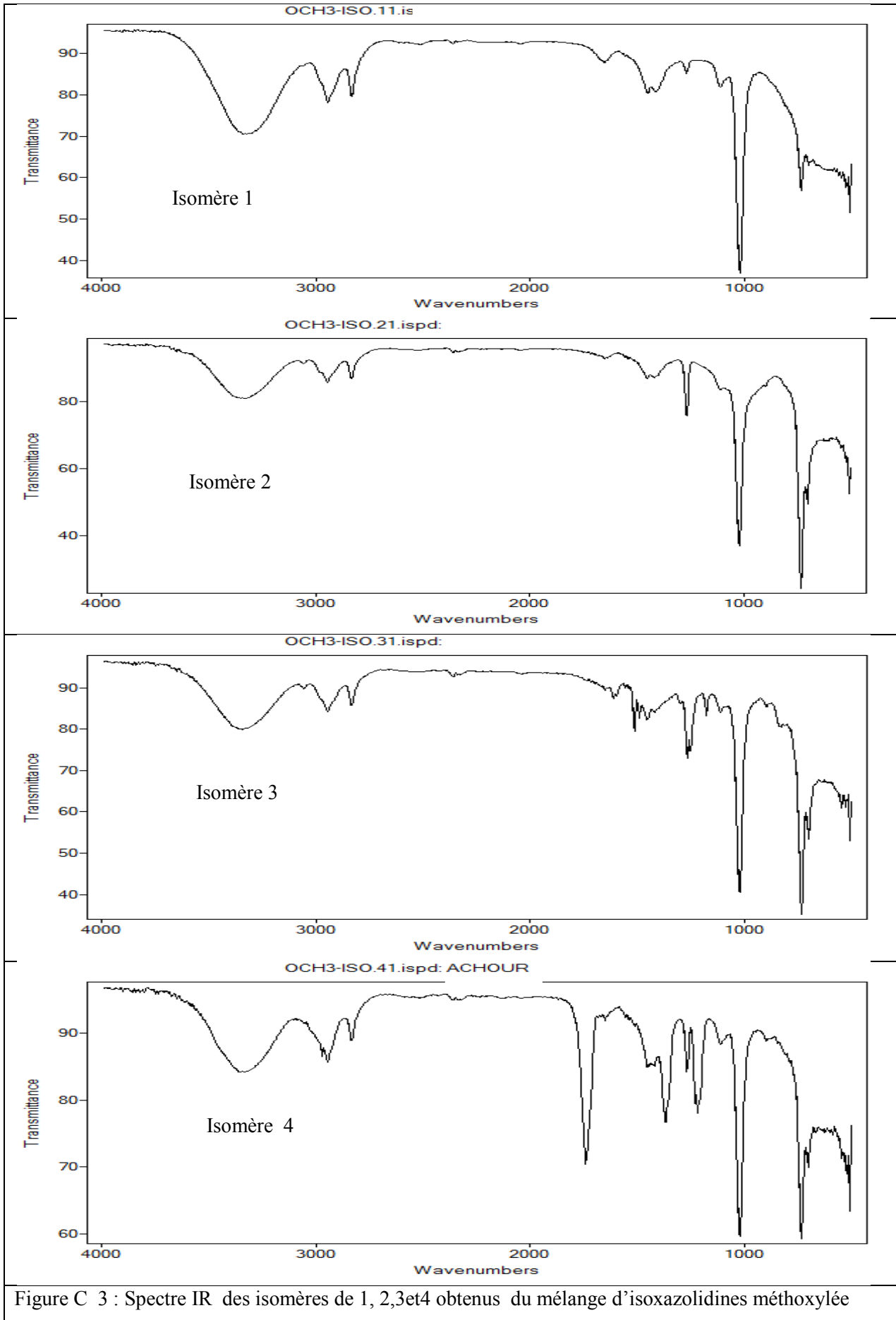
Annexe C



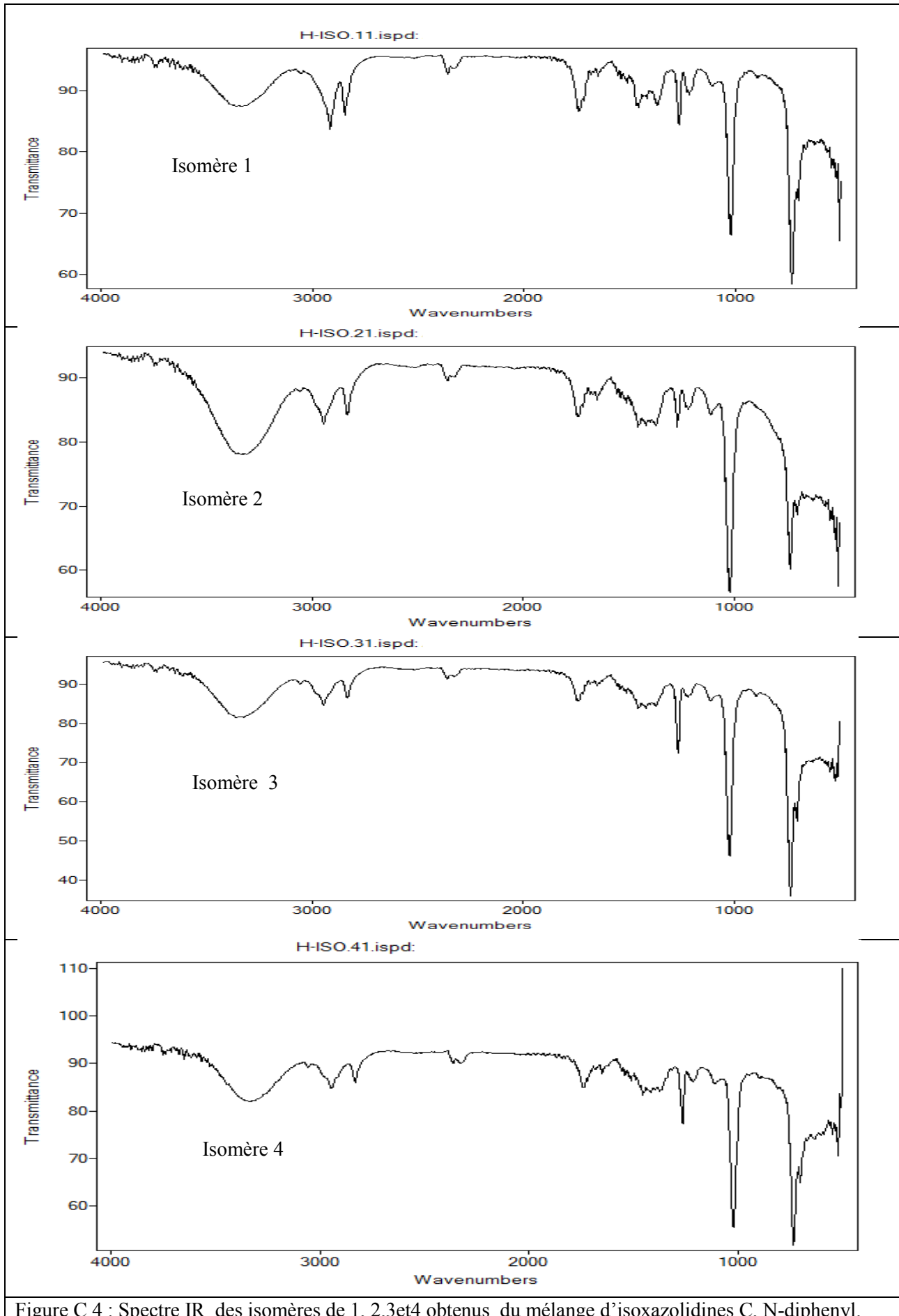
Annexe C



Annexe C



Annexe C



Annexe C

