

*République Algérienne Démocratique Populaire.*  
**Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique.**  
**Université Kasdi Merbah- OUARGLA-**



## **THESE**

Présentée au département des sciences de la matière  
Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière

Pour obtenir le diplôme de

**DOCTORAT SCIENCE EN CHIMIE**

**Option : Chimie organique**

Par

**Rahou Ismahan**

Thème

**Synthèse, Séparation Chirale et Evaluation  
Biologique des Dérivés 4-Iminoflavan**

Soutenue le 15/01/2020 devant le JURY:

<b>Président</b>	<b>Mr. DENDOUGUI Hocine</b>	Professeur à l'université d'Ouargla
<b>Examineur</b>	<b>Mme SALHI Nesrine</b>	Professeur à l'université d'Ouargla
<b>Examineur</b>	<b>Mr. BECHKI Lazhar</b>	Professeur à l'université de Ghardaia
<b>Examineur</b>	<b>Mme BOUZIANE Mebarka</b>	Maître de conférences à l'université d'Ouargla
<b>Promoteur</b>	<b>Mr. BELBOUKHARI Nasser</b>	Professeur à l'université de Béchar
<b>Co- Promoteur</b>	<b>Mr. SEKKOUM Khaled</b>	Maître de Conférences à l'université de Béchar

*À mes parents.*

*Vous m'avez transmis le courage et la ténacité,*

*Vous m'avez, tout le temps, soutenu afin de bien mener mes études.*

*Vous avez su m'épauler et m'orienter durant les moments difficiles et les remises en question afin que jamais je ne baisse les bras..*

*À ma famille.*

*Je remercie la meilleure famille du monde (la mienne). Merci pour l'affection infinie et pour votre présence à mes côtés. C'est grâce à vous, que je suis arrivée jusque-là.*

*À Zineb*

*Tu as toujours été là pour me motiver et me conseiller dans mes choix. Tu savais ce dont j'avais besoin et ce dont j'étais capable ; tu m'as aidé à progresser. Merci encore.*

## Avant-propos

Avant toute chose, je remercie « Allah », le tout puissant, de m' avoir donné la force et la patience pour accomplir ma tâche.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été menés au Laboratoire des Molécule Bioactive & Séparation Chirale à l'université Fahri Mohammed de Béchar.

Je remercie chaleureusement le professeur **Belboukhari Nasser**, le directeur du (BMCSL). Je tiens à le remercier, d'une part, en tant que encadreur, faisant preuve d'une grande disponibilité et sachant redonner du courage dans les moments difficiles avec de nouvelles idées chaque jour, et d'autre part, c'est l'homme qui a su me faire partager son goût et son enthousiasme pour la recherche. Avec lui, j'ai appris que la chromatographie est une grande école de patience.

Je remercie également, Monsieur le docteur **Sekkoum Khaled**, Maître de conférences à l'université de Béchar, qui a assuré le Co-encadrement de ce travail et qui m'a beaucoup aidé au cours de ma formation. Merci de m' avoir transmis de nouveaux principes scientifiques fondés sur une base de créativité et de motivation.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail

Je remercie Monsieur **Dendougui Kocine**, Professeur à l'université Kasdi Merbah Ouargla pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **Bechki Lazhar**, Professeur à l'université de Shardaia, de m' avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ce travail.

Je remercie madame **Salhi Mervine** professeur à l'université kasdi Merbah Ouargla, et à madame **Bouziane Mebaraka** Maître de conférences à l'université d'Ouargla, Qui ont bien voulu d'être examinateurs de notre travail de recherche.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur le Professeur **Cheriti Abdelkrim**, directeur du LPSO pour ses précieux conseils et son soutien amical pendant ces quatre années.

Je suis très redevable envers **Kacem, Nouria** de m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et partagé des discussions très enrichissantes. Je tiens à exprimer également ma profonde gratitude à **Abdelbari M** Maître assistante à l'université de Béchar pour les discussions pédagogiques toujours fructueuses et qui ont été utiles pour la rédaction de certains points de cet ouvrage.

Je remercie tous mes collègues qui ont contribué à créer une ambiance de travail agréable : ma grande sœur **Zohra** et ma petite sœur **Picha**, merci à **Amine**; ta gentillesse et ton aide tout au long de mon cursus.

Toutes les expressions de reconnaissance pour mes parents qui voulaient tout le temps que je passe mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable, Merci pour tout, je vous admire.

Un grand merci à mes sœurs et mes frères, pour tout l'amour qu'ils n'hésitent jamais à me prouver.

Que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire, d'une manière directe ou indirecte, en soient très sincèrement remerciés. Je souhaite que la lecture qui s'offre à leur curiosité, leur procure, la satisfaction qu'ils espéraient.

*Les Publications Internationales*

*Internationales*

(1) Rahou, J., Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., Aboul-Enein, H.Y.;

*Liquid Chromatographic Separation of Novel 4-Amino-Flavanes Series Diastereomers on a Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phase*

*Journal of Chromatographic Science, (2016); 1-7*

*Nationales*

(2) Rahou, J., Sekkoum, K., Belboukhari, N. :

*Antibacterial Activities of Substituted 4-Iminoflavanes*

*Journal of Advanced Research in Science and Technology (2019):6-2*

*Communications orales*

(1) Rahou J., Sekkoum, K et Belboukhari, N.

*Chiral Separation of 4-Iminoflavan Derivatives on Several Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases by HPLC.*

*12<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS) Ankara, Turkey, Juin 26-29 2018.*



## Résumé

Dans ce travail nous nous intéressons à la synthèse, l'activité biologique et la séparation chirale des énantiomères et des diastéréoisomères des dérivés de 4-Iminoflavanes.

Nous avons développé une méthode de synthèses simples à partir de la molécule flavanone. Ces synthèses sont basées sur des réactions de condensation et de réduction en utilisant comme réactifs des amines primaires et la pyridine. Ceci nous a permis de préparer Vingt-et-un nouveaux dérivés de flavanone jamais décrits à ce jour. Tous les produits obtenus sont analysés et caractérisés par IR, UV, RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C.

La séparation chirale par CLHP de tous les produits synthétisés **2-22** a été accomplie en mode de phase normal et en phase organique polaire en utilisant six phases stationnaires chirales dérivées des polysaccharides (Chiralcel<sup>®</sup>OD-H, Chiralcel<sup>®</sup>OD, Chiralcel<sup>®</sup>OJ, Chiralpak<sup>®</sup>AD, Chiralpak<sup>®</sup>IA et Chiralpak<sup>®</sup>IB) et de diverses phases mobiles de n alcane/alcool. Le mécanisme de discrimination chirale de chaque phase stationnaire en se basant sur la nature et la conformation chimique du sélecteur chirale.

Finalement, tous les produit obtenues nous a conduits à l'étude de leurs activités biologiques (antioxydantes, antibactériennes et antifongiques). Les résultats nous ont permis d'affirmer que la majorité des produits synthétisés ont un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de tous les microorganismes testés. Les tests antifongiques en utilisant les souches de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* sont négatifs. Trois techniques d'évaluation du pouvoir antioxydant appliquées : piégeage du radical DPPH, réducteur du fer (FRAP) et le test de β-carotène. Les produits synthétisés présentent une activité antioxydante remarquable surtout pour les 4-iminoflavanes.

**Mots clés :** Flavanone, Séparation chirale, Diastéréoisomères, CLHP, Activité biologique, Phases stationnaires, DPPH, FRAP.



## المخلص

يهدف هذا العمل إلى التركيب العضوي، دراسة الفاعلية البيولوجية وفصل المتماكبات لمشتقات مركب 4-إمينوفلافونون.

لقد طورنا طريقة تفاعل بسيطة إنطلاقاً من جزيء الفلافانون. تستند هذه التفاعلات على تفاعلي التكتيف والإرجاع باستعمال

أمينات أولية والبيردين كمتفاعلات؛ وقد سمح لنا هذا بإعداد واحد وعشرون مشتقاً جديداً لم يأتي على ذكره من قبل. جميع المركبات الناتجة

تم تمييزها وتحديدتها باستعمال طرق التحليل الطيفية UV، IR،  $^1\text{H}$  RMN،  $^{13}\text{C}$  RMN.

تم فصل كل مشتقات إمينوفلافون 2-22 بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة ضمن شروط الطور العادي و الطور

العضوي القطبي، باستخدام ست أطوار ثابتة متماكبة يدويا من مشتقات السكريات المتعدد Chiralcel®OD H،

Chiralpak®IA، Chiralpak®IB، Chiralpak®AD، Chiralcel®OJ، Chiralcel®OD، مع أطوار سائلة مختلفة

التركيب ألكان /كحول، أتبثت الدراسة أن آلية الفصل للمتماكبات تعتمد على طبيعة و بنية الطور الثابت المتماكب يدويا.

في الأخير تم دراسة النشاطات البيولوجية لكل مركبات ناتجة متمثلة في مضادات الأكسدة، مضادات الفطرية و بكتيرية: بالنسبة

للاختبارات التي أجريت ضد البكتريا أعطت نتائج متباينة و معظمها إيجابية بالنسبة لكل المركبات. إلا أن اختبارات ضد الفطريات باستخدام

سلالات *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. أعطت نتائج سلبية.

بالنسبة لفحص مضادات الأكسدة قد تم إستخدام ثلاث تقنيات التالية: إختبار DPPH، إرجاع الحديد FRAP و تقنية  $\beta$

كاروتين. أغلب المشتقات أظهرت أن لها قدرة تثبيط عالية ضد الجذور بالأخص جزيئات 4-إمينوفلافونون

الكلمات المفتاحية: الفلافانون، فصل المتماكبات، المتماكبة اليدوية، الكروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة، النشاطات البيولوجية،

الطور الثابت، DPPH، FRAP.



## Abstract

This work was interested in the synthesis, biological activity and chiral separation of enantiomers and diastereomers of 4-Iminoflavane derivatives.

First we synthesized a new molecules from flavanone by a simple and easy methods. These syntheses are based on condensation and reduction reactions using as reagents primary amines and pyridine. This allowed us to prepare twenty-one new Flavanone derivatives, which not described until today. The structures of these compounds have been proved by spectroscopic methods IR, UV, RMN<sup>1</sup>H and RMN<sup>13</sup>C.

The HPLC enantiomeric separation of all products **2-22** was accomplished in the normal phase and organic polar mode, using six polysaccharides derived chiral stationary phases (Chiralcel<sup>®</sup>OD-H, Chiralcel<sup>®</sup>OD, Chiralcel<sup>®</sup>OJ, Chiralpak<sup>®</sup>AD, Chiralpak<sup>®</sup>IA and Chiralpak<sup>®</sup>IB) and various n-alkane/alcohol mobile phases. The enantioseparation of these new prepared shows that the chiral recognition mechanism of each stationary phase has been suggested, and based on the chemical nature and conformation of the chiral selector.

Finally, all the synthesis products undergone varied biological activities (antioxidants, antibacterials and antifungals). For our tests against bacteria, the results were different and mostly positive for all compounds. The antifungal tests against *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* were negative. Used for the antioxidant test, the following three techniques : scavenging of the radical DPPH, ferric reducing-antioxidant power (FRAP) and the  $\beta$ - carotene tested. The results of antioxidant activity showed that most derivatives have a high inhibitory ability against radicals in particular the 4-imnoflavans.

**Keywords:** Flavanones, Chiral separation, HPLC, Diastereomers, Chiral stationary phase, Biological activities, DPPH, FRAP.





Avant-propos .....	II
Productions scientifiques .....	IV
المخلص .....	V
Abstract .....	VI
Résumé .....	VII
Sommaire .....	VIII
Liste des abréviations .....	XIII
Liste des figures et schémas.....	XV
Liste des tableaux .....	XIX
Introduction .....	1

## Partie Bibliographique

### CHAPITRE. I : Flavanone et Synthèse des dérivées de Flavanone

I.1. Les Flavonoïdes .....	3
I.2. Flavanone.....	5
I.2.1. Chimie et classification des flavanones.....	5
I.2.2. Synthèse des flavanones .....	5
I.2.3. Extraction des flavanones.....	7
I.2.4. Intérêt et l'utilisation des flavanones.....	7
I.2.5. Relation structure activité cytotoxique des flavanones.....	8
I.3. Synthèses des dérivés flavonoïdiques décrites dans la littérature.....	9
I.3.1. Synthèse des 4-imino-flavones .....	9
I.3.2. Synthèse de divers 2-substitué-4- (2-pyridyl) benzopyran.....	10
I.3.3. Synthèse d'hespéretine-4-one-(benzoyle) hydrazone.....	10
I.3.4. Synthèse des dérivés des hesperitines et hesperidines .....	11
I.3.5. Synthèse de Imino-flavone.....	12
I.3.6. Synthèse de nouvel naringine-oxime.....	12
I.3.7. Réduction et l'oxydation énantiosélective de flavanone .....	13



I.3.8. Synthèse de dérivés benzochromène-4 one-pyrazolyle.....	14
I.3.9. Synthèse de 4-iminonaringénins .....	14
I.4. Conclusion.....	15

## CHAPITRE II : Chiralité et Séparation Chirale des Dérivées de Flavanone

II. 1. Généralité sur la chiralité .....	16
II. 2. Chiralité et bioactivité.....	17
II. 3. Techniques utilisées pour l'obtention des énantiomères purs .....	19
II. 3.1. La synthèse asymétrique .....	19
II. 3.2. Résolution du racémique.....	20
II. 4. Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques .....	21
II. 5. La chromatographie liquide de haute performance (CLHP).....	21
II. 6. Séparation chirale par CLHP utilisant des phases stationnaires chirals à base de polysaccharide.....	21
II.7. La séparation chirale des dérivés de flavanones par CLHP .....	23
II.7.1. La discrimination chirale de Flavanone .....	24
II.7.2. La résolution des énantiomère de Methoxyflavanones par CLHP .....	24
II.7.3. La séparation chirale des dérivés de l'hespéretine par CLHP.....	25
II.7.4. La séparation chirale des énantiomère de quelques dérivés de Flavanone par CLHP .....	26
II.7.5. La séparation des énantiomères des 4-Iminonaringénine.....	26
II. 8. Mécanisme de résolution chirale.....	27
II.9. Conclusion .....	28



## Partie Expérimentale

## CHAPITRE III : Synthèse des Dérivées de Flavanone

III. Introduction.....	30
III. 1. L'objectif .....	30
III.2. Matériel et Méthode .....	31
III.2.1. Synthèse des 4-Imino-flavanes 2-15.....	31
III.2.1.1. La colonne chromatographie.....	33
III.2.1.2. La cristallisation.....	34
III.2.2. Réduction des 4-iminoflavanes 16-18 .....	34
III.2.3. Synthèse des 4-Hydroxyflavanes 19-21 .....	34
III.2.4. Synthèse de 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine 22 .....	35
III.2.5. Séparation par chromatographie CCM et CLC:.....	35
III.2.6. Analyse spectrale des composées synthétisé.....	36
III.3. Résultat et Discussion.....	37
III.3.1. Synthèse des 4-Imino-flavanes 2-15 .....	37
III.3.2. Synthèse des 4-Amino-flavanes 16-18 .....	40
III.3.3. Synthèse des 4-hydroxyflavanes 19-21 .....	41
III.3.4. Synthèse de 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine 22 .....	42
III. 4. Analyse spectrale des différente composée synthétisé .....	43
III.4.1. Analyse par spectroscopie IR .....	43
III.4.2. Analyse par spectroscopie UV .....	45
III.4.3. Analyse spectral RMN <sup>1</sup> H et RMN <sup>13</sup> C.....	47
III. 5. Interprétation des spectres .....	47
III.5.1. Analyse spectrale N-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan 8 .....	47
III.5.2. Analyse spectral de N-(m-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan 17 .....	49
III.5.2. Analyse spectral de 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol 22 .....	51
III.6. Conclusion :.....	53
III.7. Partie expérimental .....	54



**CHAPITRE IV: La Séparation Chirale des Dérivés de Flavanones par CLHP**

IV. Introduction.....	68
IV.1. Objectif .....	68
IV.2. Chromatographie liquide à haute performance .....	69
IV.3. Conception générale d'un appareil de CLHP .....	69
IV.4. Présentation du système CLHP SHIMADZU LC 20-A.....	70
IV.5. Identification des énantiomères .....	71
IV.6. Calculs des facteurs chromatographiques.....	71
IV.7. Matériel et méthode .....	73
IV.7.1. Appareillage .....	73
IV.7.2. La phase mobile.....	74
IV.7.3. Les phases stationnaires chirales .....	74
IV.7.4. Conditions chromatographiques .....	76
IV.7.5. Principes de fonctionnement de CLHP .....	76
IV.8. Résultat et discussion .....	76
IV.8.1. La séparation chirale des 4-iminoflavanes 2-15.....	76
a) L'étude de la séparation en mode phase organique polaire (100% alcool) .....	76
b) L'étude de la séparation chirale en mode phase normale.....	80
IV.8.2. La séparation des dérivés de flavanone 16-22.....	85
IV.8.3. Mécanisme de résolution.....	88
IV. 9. Conclusion.....	89

**CHAPITRE V : Evaluation Biologique des Dérivées de Flavanone**

V. Introduction.....	90
V.1. Objectif .....	90
V.2. Matériel et méthode.....	91



V.2.1. Tests d'activité antimicrobienne .....	91
V.2.1.1. Matériels et équipements utilisés .....	91
V.2.1.2. Milieu de culture utilisé .....	91
V.2.1.2. Préparation des solutions .....	93
V.2.1.3. Préparation des précultures .....	93
V.2.1.4. Evaluation de concentration des spores par dilution et comptage .....	94
V.2.1.5. l'activité antimicrobienne .....	94
V.2.2. Activité antioxydant .....	95
V.2.2.1. Test de l'activité antioxydante au moyen de DPPH.....	95
V.2.2.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène .....	96
V.2.2.3. Réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power).....	98
V.3. Résultat et discussion .....	99
V.3.1. Activité antibactérien .....	99
V.3.1.1. Activité antibactérienne des 4-iminoflavanes.....	99
V.3.1.2. Activité antibactérienne des 4-aminoflavanes, 4-hydroxyflavanes et 2-Phenyl-4- (pyridin-2-yl) chroman-4-ol .....	101
V.3.2. Test antifongique sur <i>Fusarium oxysporum</i> .....	102
V.3.3. Activité antioxydante.....	103
V.3.3.1.Pouvoir antiradicalaire des produits sur le DPPH.....	103
V.3.3.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène .....	108
V.3.3.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power).....	109
V.3.3.4. Discussion d'activité antioxydant .....	110
V.4. Conclusion .....	111
Conclusion générale .....	113
Références Bibliographiques .....	115
Annexe .....	129



CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CLC	Chromatographie Liquide sur Colonne
CCEM	Chromatographie Capillaire Electrocinétique Micellaire
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Dichroïsme Circulaire
CDMPC	Cellulose tris (3,5- dimethylphenylcarbamate)
CoA	Coenzyme A
CG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPS	Chromatographie en Phase Fluide Supercritique
<i>J</i>	Constante de couplage
<i>d</i>	Dextrogyre
$\delta$	Déplacement chimique
°C	Degrés Celsius
EC	Electrophorèse capillaire
FRAP	Ferric Reducing-Antioxidant Power
KBr	Bromure de Potassium
<i>k'</i>	Facteur de Capacité.
<i>l</i>	Lévogyre
PEEK	Polyether- Ether cétone
PM	Phase Mobile
PS	Phase Stationnaire
R	Rectus
Rs	Facteur de résolution
$\alpha$	Sélectivité
$\nu$	Fréquence d'absorption
S	Sinister
$\lambda$	Longueur d'onde
$\mu\text{g}$	Microgramme
m	Multiplé
nm	Nanomètre
ppm	Partie Par Million



Pf	Point de fusion
PDA	Potato Dextrose Agar
PSC	Phase Stationnaire Chirale
$^1\text{H}$	Proton
Rdt	Rendement
Rf	Rapport au Front.
SM	Spectrométrie de Masse
UV	Ultraviolet
UV/Vis	Ultraviolet/Visible



## Liste des Figures

### CHAPITRE I : Flavanone et Synthèse des Dérivés de Flavanone

Figure I. 1. Classes des flavonoïdes. ....	4
Figure I. 2. Squelette de base des flavanones .....	5

### CHAPITRE II : Chiralité et Séparation Chirale des Dérivés de Flavanone

Figure II.1 : Structure de base des Flavanones. ....	16
Figure II.2. Une molécule chirale d'un acide aminé, et son image dans un miroir .....	17
Figure II.3. Quelques exemples (activité biologique et configuration absolue). ....	18
Figure II.4. Structure de quelques polysaccharides. ....	22
Figure II. 5. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de Flavanone sur la colonne Chiralcel®OD. ....	24
Figure II. 6. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4-Hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel®OD-H. ....	25
Figure II.7. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4-iminothaizol-hesperitine sur la colonne Chiralcel®OJ. ....	25
Figure II.8. Chromatogramme présentant la séparation d'un mélange des énantiomères de 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone et 6-hydroxyflavanone. ....	26
Figure II.9. Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de deux produits sur la colonne Chiralpak®IB. ....	27
Figure II.10. (a) Structure optimisée de triphénylcarbamate de cellulose. (b) Les emplacements possibles des interactions. ....	27

### CHAPITRE III : Synthèse des Dérivés de Flavanone

Figure III.1. Structure de base des flavanones. ....	30
Figure III.2. Spectre IR de produit 8 'N-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan'. ....	47
Figure III.3. Spectre RMN <sup>1</sup> H de produit 8. ....	48
Figure III.4. Spectre IR de produit 17' N-(m-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan'. ....	49





Figure III.5. Spectre RMN <sup>1</sup> H de produit 17.....	50
Figure III.6. Spectre IR de produit 22 '2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol' .....	51
Figure III.7. Spectre RMN <sup>1</sup> H de produit 22.....	52

#### CHAPITRE IV: La Séparation Chirale des Dérivés de Flavanones par CLHP

Figure IV.1 : Structure de base des flavanones.....	65
Figure IV.2. Système CLHP SHIMADZU LC-20A isocratique .....	70
Figure IV.3. Les colonnes chirales utilisées .....	74
Figure IV.4. Les chromatographies présentent les séparations de quelque produits sur les phases stationnaires chirale.....	80
Figure IV.5. Resolution des diastéréoisomères en phase normal avec different phase PSCs....	85
Figure IV.6. Resolution des diastéréoisomères en phase normal sur la colonne Chiralcel®OJ .	87

#### CHAPITRE V : Evaluation Biologique des Dérivés de Flavanone

Figure V.1. Structure de DPPH (1,1-diphényl 2 picrylhydrazyle) .....	95
Figure V.2. Structure de β-carotène.....	97
Figure V.3. Diamètres des zones d'inhibition des 4-iminoflavanes vis-à-vis aux souches bactériennes à gram négatif et à gram positif.....	100
Figure V.4. Activités des produits vis-à-vis à Staphylocoque.....	101
Figure V.5. Diamètres des zones d'inhibition des dérivés de flavanones 16-22 vis-à-vis aux souches bactériennes à gram négatif et à gram positif .....	102
Figure V.6. Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique, de la flavanone 1 et des 4-iminoflavane 5, 6, 7, 10, 14. ....	105
Figure V.7. Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations des dérivés de flavanone 16-22.....	107
Figure V.8. Les Plaques CCM apprêt le test antioxydant.....	108
Figure V.9. Pouvoir réducteur des 4-iminoflavanes testé par la méthode de FRAP .....	109
Figure V.10. Pouvoir réducteur des dérivés de flavanone testé par la méthode de FRAP.....	110



## Liste des Schémas

### CHAPITRE. I : Flavanone et Synthèse des Dérivés de Flavanone

Schéma I. 1. Synthèse de la flavanone à l'aide de catalyseur acide méthyl sulfonique.....	6
Schéma I. 2. Synthèse de la flavanone à l'aide catalyseur hétérogène.....	6
Schéma I. 3 : Synthèse de la flavanone dans des conditions ambiantes.....	7
Schéma I. 4. Synthèse de Flavanone hydrazone et le bis imino-flavanone. ....	9
Schéma I. 5. Synthèse des 4-imino-flavones.....	10
Schéma I. 6. Synthèse de 2-substitued-4-(2-pyridyl) benzopyran.....	10
Schéma I. 7. Synthèse de l'hespéretine-4-one-(benzoyl) hydrazone. ....	11
Schéma I. 8. Méthode de préparation des 4-iminohespéretines.....	11
Schéma I. 9. Synthèse des 4-iminohesperidines. ....	11
Schéma I. 10. Synthèse des 6-bromo-4-methoxy-4-(phenyl substitué) iminoflavone.....	12
Schéma I. 11. Synthèse de l'oxime de la naringine. ....	13
Schéma I. 12. Synthèse des cis et trans flavanes-4-ol.....	13
Schéma I. 13. Synthèse de benzochromène-4 one-pyrazolye. ....	14
Schéma I. 12. Synthèse des 4-iminonaringenins. ....	14

### CHAPITRE II : Chiralité et Séparation Chiral des Dérivés de Flavanone

Schéma II.1. La synthèse de la L-DOPA®. ....	20
--	----

### CHAPITRE III : Synthèse des Dérivés de Flavanone

Schéma III.1. Réaction de formation des 4-iminoflavanes et 4-aminoflavanes .....	30
Schéma III.2. Réaction de formation des 4-aminoflavanes .....	31
Schéma III.3. Méthode de préparation de nouvelle dérivée de flavanone.....	31
Schéma III.4. Méthode de préparation des 4-imino-flavanes 2-15.....	31
Schéma III.5. Méthode de préparation de 4-amino-flavane 16-18.....	34



Schéma III.6. Méthode de préparation de 4-Hydroxyflavane 19-21.....	35
Schéma III.7. Méthode de préparation de 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine 22.....	35
Schéma III.8. Le mécanisme de formation des 4-imino-flavanes 2-15.....	39
Schéma III.9. Le mécanisme de formation des 4-amino-flavanes 16-18.....	41



**CHAPITRE II : Chiralité et Séparation Chirale des Dérivés de Flavanone**

Tableau II.1. L'effet de chiralité sur l'activité pharmacologique de quelque principe actif de médicament.....	18
Tableau II.2. les PSCs de polysaccharides commercialisés.....	23

**CHAPITRE III : Synthèse des Dérivés de Flavanone**

Tableau III.1. Les réactifs utilisés.....	32
Tableau III. 2 Résultats obtenus des 4-Imino-flavanes.....	37
Tableau III.3. Résultats obtenus des 4-Amino-flavanes.....	40
Tableau III.4. Les résultats obtenus des 4-Hydroxyflavanes.....	42
Tableau III.5. Le résultat de la synthèse du 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine. ....	43
Tableau III.6: Les bandes caractéristiques en IR pour les imino-flavanones.....	44
Tableau III.7. Les bandes caractéristiques en UV pour les imino-flavanones. ....	46

**CHAPITRE IV: La Séparation Chirale des Déricés de Flavanones par CLHP**

Tableau IV.1. Les caractéristiques des phases stationnaires chirales utilisées.....	75
Tableau IV.2. Résultat chromatographique en phase organique polaire.....	77
Tableau IV.3. Résultat chromatographique en phase normal.....	81
Tableau IV.4. Résultat chromatographique en phase normale des produits. ....	85

**CHAPITRE V : Evaluation Biologique des Dérivés de Flavanone**

Tableau V.1. Provenances et caractéristiques des souches testées.....	92
Tableau V.2. les valeur des IC50 de l'acide ascorbique et les produit synthétisé. ....	108
Tableau V.3. Résultats du test antioxydant des produits 1-22 après la révélation par $\beta$ -carotène.....	109





---

*Introduction  
Générale*

---



Récemment on a remarqué des progrès rapides dans l'hémisynthèse, des produits chirale avec une diversité structurale important. Cette approche est devenue un sujet majeur dans la synthèse, ainsi que la découverte et l'élaboration du principe actif des médicaments.

Le développement d'un énantiomère isolé offre des avantages théoriques et cliniques qui permettent deux stratégies possibles : un développement initial d'un énantiomère pur ou en une séparation du racémat [1, 2]. Dans le second cas, la séparation d'énantiomères demeure un problème difficile. Cependant, plusieurs méthodes de séparation existent. L'une de ces méthodes est la chromatographie préparative basée sur l'adsorption selective d'énantiomères par phase stationnaire chirale. Cette méthode a donné des résultats très satisfaisants [3].

Actuellement, parmi les méthodes chromatographiques; celle de la 'Chromatographie Liquide à Haute Performance' (CLHP) représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères. Quelque soit son application : directe ou indirecte, cette méthode (CLHP) se caractérise par sa rapidité, son efficacité et sa sensibilité. [4, 5].

Les composés chiraux biologiquement actifs sont naturels ; simples ou complexes, dont on sait faire la synthèse [6]. Ils peuvent être aussi non naturels, dans ce cas-là ils doivent être testé par des essais biologiques ou par optimisation de l'activité thérapeutique.

Plusieurs réactions ont été décrites dans la littérature, afin d'améliorer l'utilisation de flavonoïdes [7-9] dans des formulations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires; sans altérer leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Celles-ci permettent aussi la fonctionnalisation des flavonoïdes ; plus précisément les flavanones [10], qui exceptionnellement, possèdent un centre chiral à la position C2 avec deux formes stéréoisomériques [11].

Les flavanones sont des substances très répandues dans le règne végétal, faisant partie intégrante de notre nourriture journalière. Ainsi, elles sont largement considérées comme des agents responsables de l'accroissement d'espérance de vie chez les individus, dont le régime alimentaire est riche en fruits et en légumes. Elles ont été longuement étudiées pour leur activité antioxydante qui capte les radicaux libres [11].

Depuis 2010, notre laboratoire (BMCSL) Laboratoire Molécule Bioactive & Séparation Chirale à l'université de Béchar a développé un axe de recherche consacré principalement à la synthèse



et à la séparation chirale des substances bioactives. Dans ces deux contextes, le but de cette étude se focalise sur la synthèse la séparation et l'évaluation biologique de Vingt et un dérivés de Flavanone.

Cette étude s'articule autour de cinq chapitres :

Le premier donne une mise au point bibliographique sur la flavanone et la synthèse des dérivés de Flavanone, plus particulièrement leur réactivité et leur utilisation thérapeutique.

Le deuxième est consacré aux différentes méthodes de séparation chirale de quelques dérivés de flavanone et leur domaine d'utilisation.

Le troisième, s'articule autour de la synthèse des nouvelles molécules, non décrites dans la littérature ; obtenues par des réactions de condensations et de réductions en position 4, qui présente un centre réactif important dans la flavanone.

Le quatrième est un 'screening' sur la séparation de dérivés Imino-flavane par des sélecteurs chiraux différents.

Le dernier chapitre concerne les tests antibactériens des différents produits synthétisés. Ces tests ont été réalisés sur des souches, dont cinq bactéries et une fongique. Ainsi, Les dérivés de Flavanone ont été testés aussi en tant qu'antioxydants en utilisant le  $\beta$ -carotène, le test FRAP et la méthode de DPPH comme créateur des radicaux.

Cette étude se termine par une conclusion générale suivie par des visions perspectives.





---

# *Partie Bibliographique*

---

CHAPITRE. I : Flavanone et Synthèse des Dérivées de Flavanone

CHAPITRE II : Chiralité et Séparation Chirale des Dérivées de  
Flavanone







---

# Chapitre 01

## Flavanone et Synthèse des Dérivés de Flavanone

---



I.1. Les flavonoïdes .....	3
I.2. Flavanone .....	5
I.2.1. Chimie et classification des flavanones .....	5
I.2.2. Synthèse des flavanones.....	5
I.2.3. Extraction des flavanones .....	7
I.2.4. Intérêt et l'utilisation des flavanones .....	7
I.2.5. Relation structure activité cytotoxique des flavanones .....	8
I.3. Synthèses des dérivés flavonoïdiques décrites dans la littérature .....	9
I.3.1. Synthèse des 4-imino-flavones .....	9
I.3.2. Synthèse de divers 2-substitué-4- (2-pyridyl) benzopyran.....	10
I.3.3. Synthèse d'hespéretine-4-one-(benzoyl) hydrazone .....	10
I.3.4. Synthèse des dérivés des hesperitines et hesperidines .....	11
I.3.5. Synthèse de Imino-flavone.....	12
I.3.6. Synthèse de nouvel naringine-oxime .....	12
I.3.7. Réduction et l'oxydation énantiosélective de flavanone .....	13
I.3.8. Synthèse de dérivés benzochromène-4 one-pyrazolyle.....	14
I.3.9. Synthèse de 4-iminonaringenins .....	14
I.4. Conclusion .....	15

Les fruits et les légumes sont des sources riches en micronutriments tels que les vitamines et les antioxydants. Parmi ces phytoconstituants, les flavanones sont largement distribuées dans environ plus de 42 familles de plantes, particulièrement dans les *Compositae*, les *Leguminosae* et les *Rutaceae*. Il y a quelques décennies, les flavanones ont été considérées comme une classe mineure des Flavonoïdes, comme les chalcones, les dihydrochalcones, les dihydroflavonols et les aurones. Cependant, durant les 15 dernières années, le nombre des flavanones connues est devenu si grand qu'ils apparaissent maintenant parmi les classes flavonoïdiques principales comme les flavones, les isoflavones, les flavanols, les flavonols et les anthocyanidines [12-14].

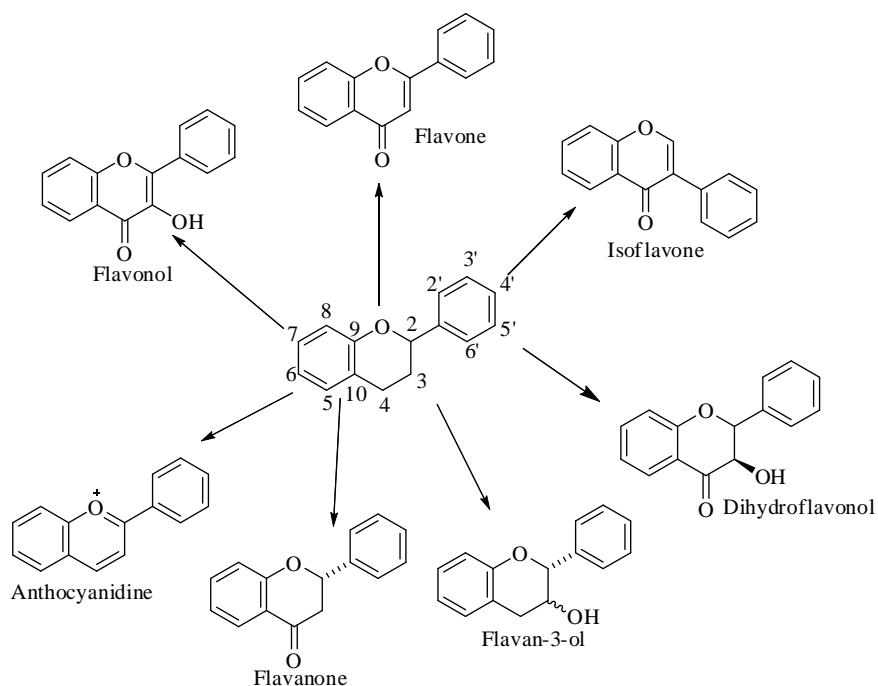
### I.1. Les flavonoïdes

Vers l'an 2003 plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiées [15] Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores, leur fonction principale semble être la coloration des plantes (thé, raisin, baies, agrumes) [15. 16-22] Ils présentent une classe de métabolites secondaires de plante [23] et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes, écorces, graines et boissons [17, 24-27]. Ils sont considérés comme des pigments responsables des nuances de jaune, d'orange, et de rouge dans les plantes fleurissantes, ils sont également des facteurs importants pour la croissance, le développement, et la défense des plantes [14, 28].

Les flavonoïdes n'ont pris leur essor dans la pharmacopée occidentale que depuis quelques années, même si leur biodisponibilité n'est pas encore complètement élucidée. Ils ont été isolés par le scientifique Chervreul. E en 1814, mais n'ont été réellement découverts, qu'en 1937, par Albert Szent-Györgyi, qui mit en exergue leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce scientifique hongrois a reçu le prix Nobel pour ses recherches sur la vitamine C et les propriétés biochimiques des flavonoïdes [29, 30].

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols et les flavanones **Figure I.1**. Ces derniers sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités anti inflammatoires, anticancéreuses, antivirales et antioxydantes [31].

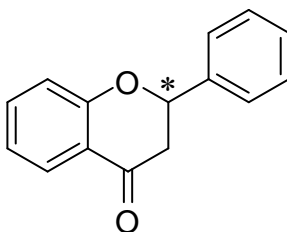




**Figure I. 1.** Classes des flavonoïdes.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent entre-eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et sur la chaîne intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides sur une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles [32].

Dans ce travail, nous sommes intéressé aux flavanones (dérivés de 2-phénylchroman-4 one) **Figure I. 2** qui sont principalement présentées en agrumes tel que l'orange, le pamplemousse et le citron [6, 31, 29]; on les appelle les citroflavonoïdes [33] où elles sont habituellement identifiées comme flavanone-7-O-glycosides [20, 34].



**Figure I. 2.** Squelette de base des flavanones

## I.2. Flavanone

### I.2.1. Chimie et classification des flavanones

Les flavanones (2-phenyl- 2,3 dihydro-benzopyran-4-one), une des douze sous-classes des flavonoïdes, sont principalement trouvée dans les agrumes et les légumes souvent comme 7-O-glycosides. Les flavanones présentent un dispositif structural unique, qui les distingue de toutes autres classes des flavonoïdes [35-38]. Les flavanones sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C-2 et C-3 et par la présence d'un centre de chiralité en C-2 à l'exception des 3-hydroxy-flavanones ou les dihydroflavonols qui sont caractérisés par deux carbones chirales en positions 2 et 3. Le carbone en position 2 est naturellement de configuration S [17, 28, 39].

Comme tous autres flavonoïdes, les flavanones peuvent être classifiées dans plusieurs sous-groupes selon la substitution (hydroxylation, méthylation, prénylation, benzoylation, glycosylation, etc.) des atomes de carbone appropriés dans le squelette, c.-à-d., C-5, C-6, C-7, et C-8 du cycle A, C2', C-3', C-4', C-5', et C-6' du cycle B, et C2 du cycle C dans les flavanones [12, 40]. Les dérivés C-alkylés sont relativement courants, surtout les dérivés C-prénylés. Les dérivés C-méthylés sont fréquemment rencontrés chez les Myrtaceae. Ce type de composé a déjà été isolé des racines de *P. hostmannianum* [28]. En 2010 environ 350 flavanones aglycones et 100 flavanones glycosides ont été découverts dans la nature [12].

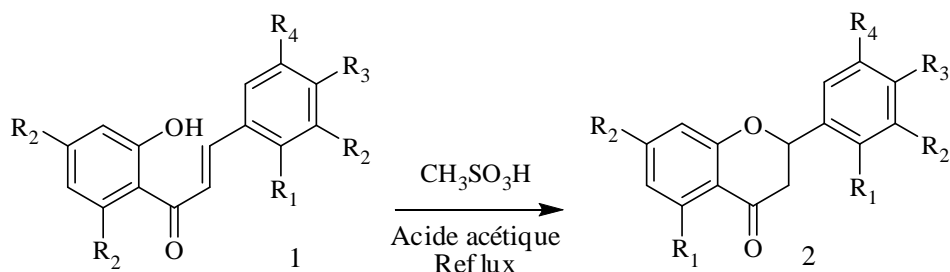
### I.2.2. Synthèse des flavanones

Les dérivés de flavanone représentent des intermédiaires importants dans la synthèse de composés possédant une activité anticancéreuse, anti-inflammatoire, antibactérienne et antiHIV [40, 41]. Une flavanone peut être préparée par une réaction de condensation de type Claisen-Schmidt entre la 2-hydroxyacétophenone et les dérivés du benzaldéhyde suivie d'une isomérisation de l'intermédiaire, la 2-hydroxychalcone [12, 40, 42]. Cette réaction de cyclisation intramoléculaire peut être catalysée par des acides ou des bases en milieu homogène. D'autres voies de synthèse qui font appel à l'électrochimie, la photochimie ou l'isomérisation thermique sont également utilisées [12, 42].

Dernièrement, pour améliorer la synthèse de flavanones, la catalyse hétérogène a été mis au point : par exemple, En 2012 Zubaidha et *al.* décrit l'utilisation de l'acide méthyl sulfonique comme

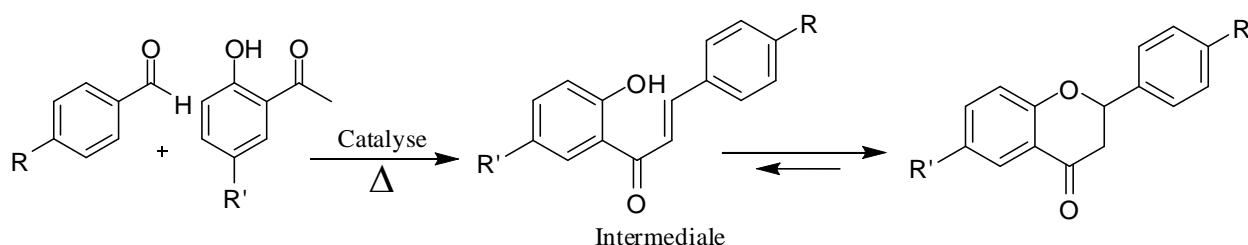


un organocatalyseur efficace pour la synthèse des flavanones substitués à partir de 2'-hydroxy chalcones avec de bons rendements et un temps de réaction courte **Schéma I. 1** [43].



**Schéma I. 1.** Synthèse de la flavanone à l'aide de catalyseur acide méthyl sulfonique.

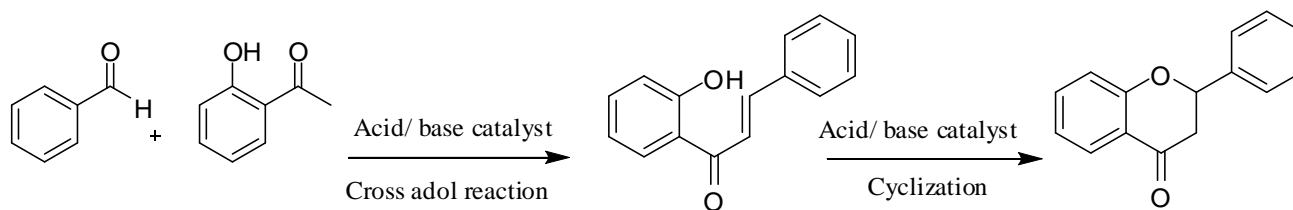
En 2011, B.A. Dar et *al.* trouve un procédé simple par une réaction monotope pour la synthèse des flavanones, en présence de  $\text{SO}_4^{2-} / \text{ZrO}_2$  comme un catalyseur hétérogène réutilisable décrit. Les réactions ont été réalisées avec ou sans solvant à 140°C, avec des temps de réaction de 3-4 heures. Dans ces conditions, plusieurs exemples ont été décrits avec de très bons rendements (73-87%) et jusqu'à 83% de sélectivité. Le catalyseur est facilement recyclé et réutilisé sans perte de son activité catalytique **Schéma I. 2** [44].



**Schéma I. 2.** Synthèse de la flavanone à l'aide d'un catalyseur hétérogène

Vashishtha, M et *al.* (2015) cite une synthèse efficace et sélective de flavanone. L'activité catalytique des solutions aqueuses d'agents tensioactifs d'ammonium quaternaire de NaOH a été étudiée d'une manière efficace et sélective pour la synthèse de flavanone par une réaction d'aldolisation croisée de benzaldéhyde eto-hydroxy-acétophénone (comme réaction modèle) dans des conditions ambiantes (30 ° C) **Schéma I. 3** [45].





**Schéma I. 3 :** Synthèse de la flavanone dans des conditions ambiantes.

### I.2.3. Extraction des flavanones

Jusqu'à maintenant, plusieurs techniques conventionnelles d'extraction ont été rapportées pour les phénols des peaux de citron comme : l'extraction par solvants, l'extraction par l'eau chaude, l'extraction alcaline, l'extraction par les résines, l'extraction par irradiation, extraction par enzymes, et l'extraction par les fluides supercritiques [46].

Ces techniques conventionnelles ou plus créatrices peuvent causer la dégradation des composés visés dus aux hautes températures et le temps prolongé d'extraction, L'extraction par irradiations peut poser quelques risques relatifs à la santé dus à l'ignorance des critères de sûreté pendant l'irradiation. En outre, l'extraction par les enzymes est limitée due aux problèmes de la dénaturation d'enzymes.

Avec les prix croissants de l'énergie et la nécessité pour réduire les émissions de CO<sub>2</sub>, les industries alimentaires sont contestées de trouver de nouvelles technologies afin de réduire la consommation d'énergie, et satisfaire les exigences légales sur les émissions, ainsi pour la réduction des coûts et l'accroissement de la qualité aussi bien que la fonctionnalité [13, 46].

Cependant, les solvants organiques bénins et non-toxiques de catégorie comestible comme l'éthanol, n-butanol et l'isopropanol sont recommandés. L'utilisation de ces solvants pour la technique d'extractions par ultrasons est très efficace pour l'extraction des polyphénols des peaux d'oranges. D'ailleurs, une nouvelle approche de la chimie verte sans solvant a été développée en utilisant l'extraction par micro ondes et l'hydrodiffusion [13, 46].

### I.2.4. Intérêt et l'utilisation des flavanones

Les études soutiennent l'hypothèse que la consommation régulière des nourritures contenant les flavonoïdes peut réduire le risque des maladies mortelles, en particulier les maladies cardiovasculaires et quelques types de cancers [47-49]. Les flavanones étant plus répandues dans le règne



végétal que les chalcones et dihydrochalcones, leurs activités biologiques ont particulièrement été étudiées avec un intérêt particulier pour les dérivés C-alkylés [28].

Leurs influences positives sur la santé des personnes ont sensiblement augmenté sans interruption. La consommation des agrumes en ces dernières années attendre une production mondiale de 82 millions de tonnes en session 2009-2010, parmi laquelle les fruits d'oranges avec environ 50 millions de tonnes. L'utilisation domestique et industrielle de ces grandes quantités d'agrumes, particulièrement pour la production du jus, a comme conséquence l'accumulation des montants élevés de sous-produits tels que les résidus de peau, de graine, de cellules et de membrane qui représentent environ la moitié du poids du fruit. Ces sous-produits peuvent être employés pour la production de la mélasse, les pectines, les huiles essentielles, le limonène et les bétails alimentaires. [13, 46]

En outre, les sous-produits du citron sont une bonne source des composés phénoliques, particulièrement les glycosides caractéristiques des flavanones qui incluent principalement la naringine, l'hespéridine, le narirutine, et la néohespéridine. Actuellement, leur extraction à partir des peaux a attiré considérablement l'intérêt scientifique, en tant qu'antioxydants normaux principalement en nourritures pour empêcher la rancidité et l'oxydation des lipides [50].

Bien qu'il soit difficile de déterminer la consommation diététique totale de ces composés, il a été estimé que la prise quotidienne des flavanones s'étend entre 25 à 65 mg sur la base de la consommation d'une portion du jus d'orange [50]

### **1.2.5. Relation structure activité cytotoxique des flavanones**

De nombreuses études sur les activités cytotoxiques des flavonoïdes montrent que le pouvoir de ces molécules varie entre les différentes classes de flavonoïdes et entre les molécules d'une même classe. Plusieurs études de recherche à établir une relation entre la structure chimique de flavonoïdes et leurs activités anticancéreuses. Ces études ont été effectuées essentiellement sur des cellules cancéreuses in vitro [51].

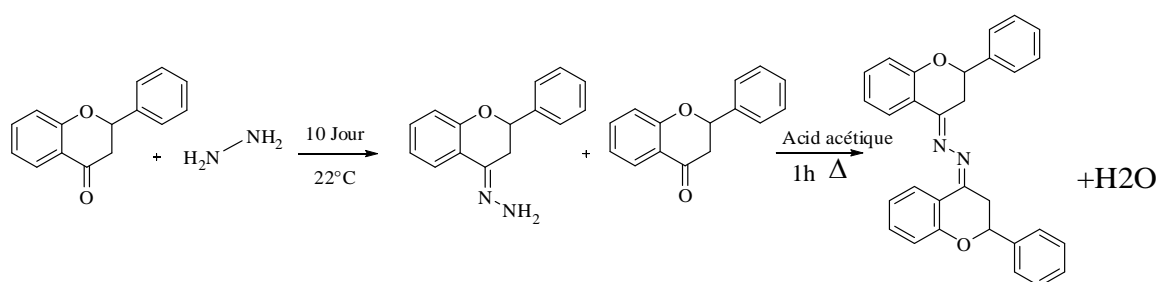
D'autres auteurs, comme Li et *al.* (2008), ont également montré que l'élément majeur concernant la relation entre la structure des flavanones et leur activité cytotoxique était la présence ou non d'un groupe hydroxyle au niveau C3 c'est ainsi que les molécules possédant cette fonction (C3-OH) ne présentaient aucune activité vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires évaluées. Ils ont également mis en évidence que l'alnusine, flavonol possédant un groupe hydroxyle en C3 n'était pas



cytotoxique vis-à-vis des différentes lignées cellulaires testées. Ce qui montre que la présence d'un C3-OH dans la structure des flavanones, isoflavones ou isoflavanones réduit leur cytotoxicité [51, 52].

### I.3. Synthèses des dérivés flavonoïdiques décrites dans la littérature

La réactivité de la position C4 carbonyle des flavonoïdes conduit à la synthèse de nouveaux produits chiraux de dérivés d'imino-flavane. Depuis 1965, Kallay et *al*, étaient en mesure de choisir des conditions réactionnelles telles que l'un des deux produits simples : le flavanone hydrazone et l'azine peuvent être obtenus comme un produit principal **Schéma I. 4** [53].



**Schéma I. 4.** Synthèse de Flavanone hydrazone et le bis imino-flavanone [53].

La littérature décrit un grand nombre de méthodes conduisant à la formation de flavanone et leur dérivés. Toutes ces méthodes de condensation jouent sur la réactivité du groupe carbonyle C4 de flavanones, cela est en partie excité par les aspects théoriques pour obtenir plus d'informations sur le caractère cétonique des dérivées  $\gamma$ -pyrone.

#### I.3.1. Synthèse des 4-imino-flavones

Ullah, M et *al*, 2006 ont effectué la synthèse d'une série des 4-imino-flavones, chauffant au reflux les flavones avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine en présence du  $H_2SO_4$  dans EtOH **Schéma I. 5** [54].





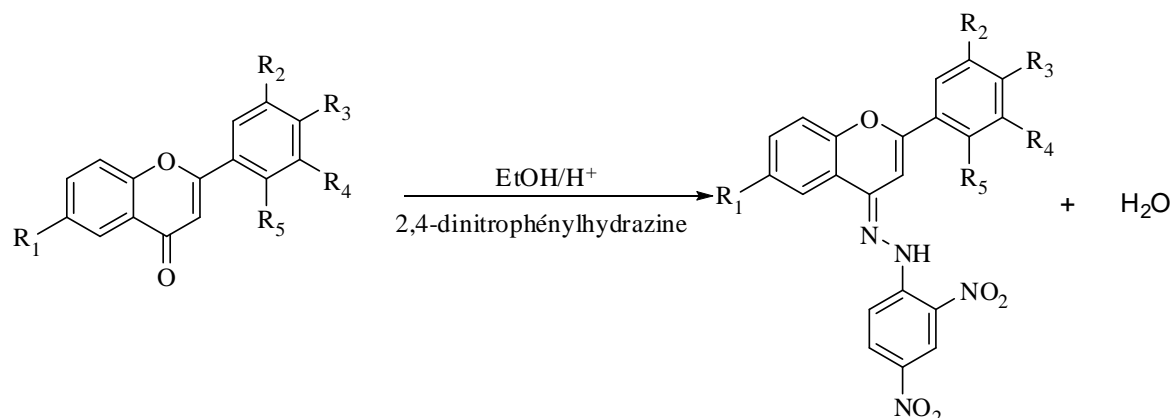


Schéma I. 5. Synthèse des 4-imino-flavones.

### I.3.2. Synthèse de divers 2-substitué-4- (2-pyridyl) benzopyran

En 2009 Tripathi A.K et *al* ont contribué à la synthèse de quelques dérivés de 2-substitué-4-(2-pyridyl) benzopyran par condensation réductrice du 2-substitué-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran avec la pyridine, en milieu MeOH et en présence d'une quantité catalytique de HgCl<sub>2</sub> et de poudre d'aluminium [55]. La structure de ces molécules est très semblable à celle des dérivés flavonoïdiques Schéma I. 6.

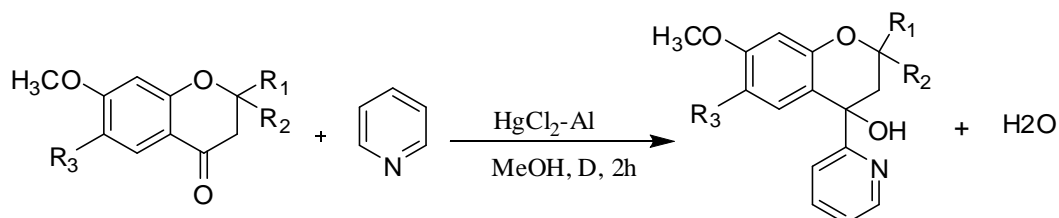


Schéma I. 6. Synthèse de 2-substitué-4-(2-pyridyl) benzopyran [55].

### I.3.3. Synthèse de l'hespétine-4-one-(benzoyle) hydrazone

En 2009 Li et *al*, ont synthétisé et caractérisé une Imino-flavane, c'est l'hespétine-4-one-(benzoyle) hydrazone et leurs complexes de cuivre, de zinc et de lanthanide Schéma I. 7. Tous ces composés ont été préparé à partir de chauffée à reflux l'hespétine en présence de l'acide acétique avec le benzoyle hydrazine. [56, 57]



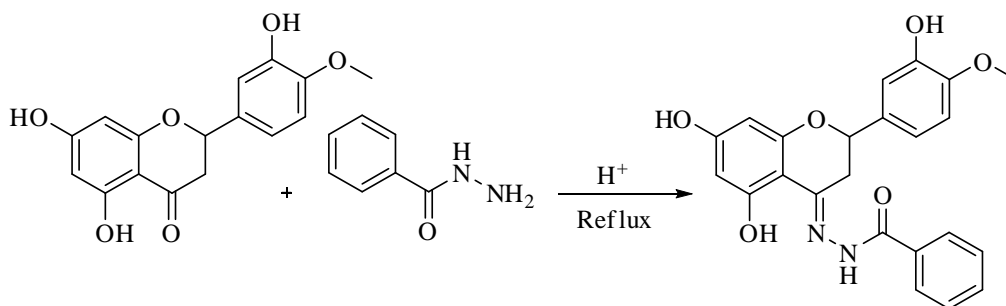


Schéma I. 7. Synthèse de l'hespéretine-4-one-(benzoyle) hydrazone.

### I.3.4. Synthèse des dérivés des hesperidines et hesperitines

En 2011, Belboukhari, N et *al* ont synthétisé et identifié une série de huit nouveaux dérivés imino-hespéridine par réaction de condensation non catalytique entre l'hespéridine et des amines primaires Schéma I. 9 [9, 58].

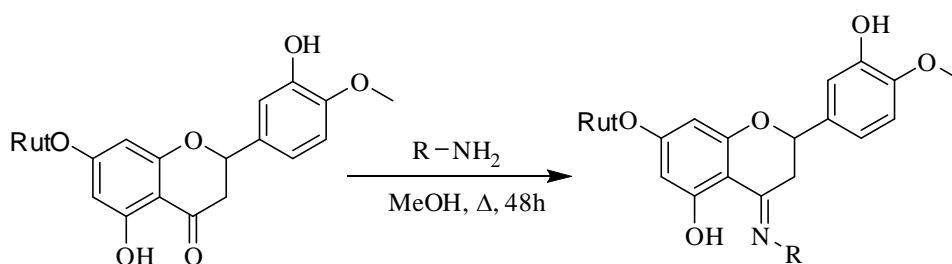


Schéma I. 8. Synthèse des 4-iminohesperidines.

La synthèse de molécules biologiquement actives à partir de molécules naturelles tel que l'hespéretine et hespéridine est obtenue par hydrolyse de l'hespéridine, en utilisant des réactions simples et faciles à réaliser dans des conditions opératoires légères Schéma I. 8 [7, 9].

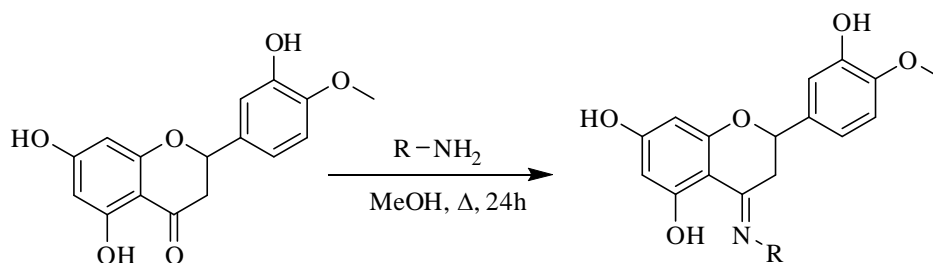
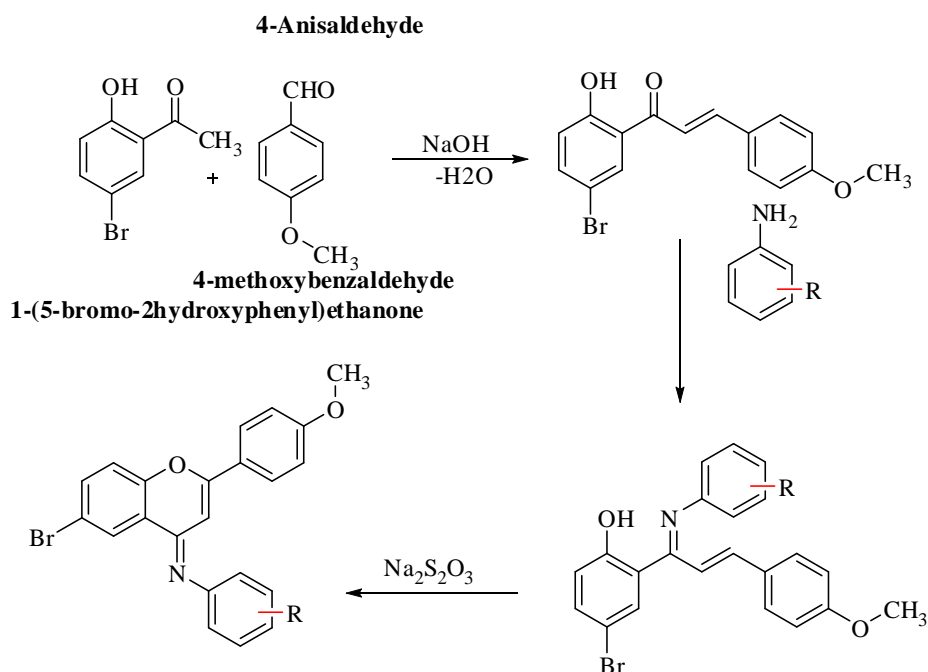


Schéma I. 9. Méthode de préparation des 4-iminohespéretines. [7]



### I.3.5. Synthèse de Imino-flavone

En 2012 un procédé pour la synthèse des dérivés d'imino-flavones par cyclisation oxydative des imin-chalcones, a été établi en présence d'une quantité catalytique d'iode et  $H_2SO_4$  **Schéma I. 10** [59].



**Schéma I. 10.** Synthèse des 6-bromo-4-methoxy-4-(phenyl substitué) iminoflavone.

### I.3.6. Synthèse de nouvel naringine-oxime

Naringin (4',5, 7-trihydroxyflavanone-7-b-L-rhamnoglucoside-(1,2)-a-D-glucopyranoside) est l'un des principaux flavanones dans les agrumes et le pamplemousse.

Un naringine oxime a été préparée par le traitement de la naringine avec du chlorhydrate d'hydroxylamine dans d'éthanol et l'acétate de sodium trihydraté **Schéma I. 11**. La solution a été chauffée au reflux sur un bain d'eau pendant 4 h sous agitation constante. Le rendement de produit était de 60% [60, 61].



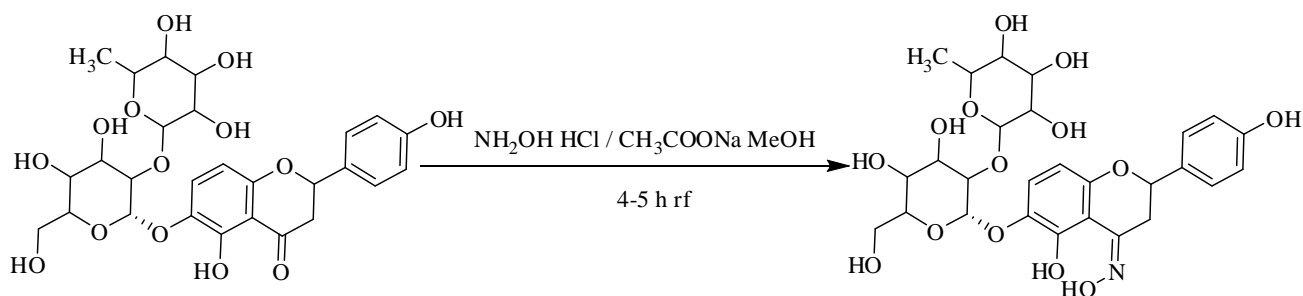
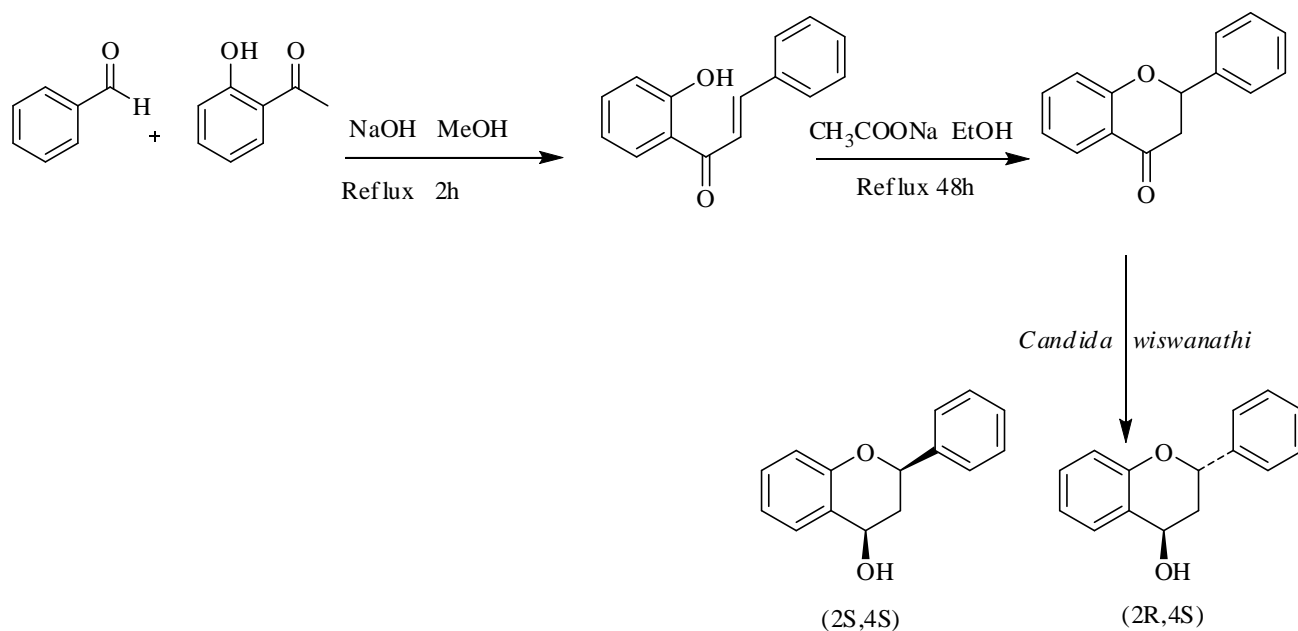


Schéma I. 11. Synthèse de l'oxime de la naringine.

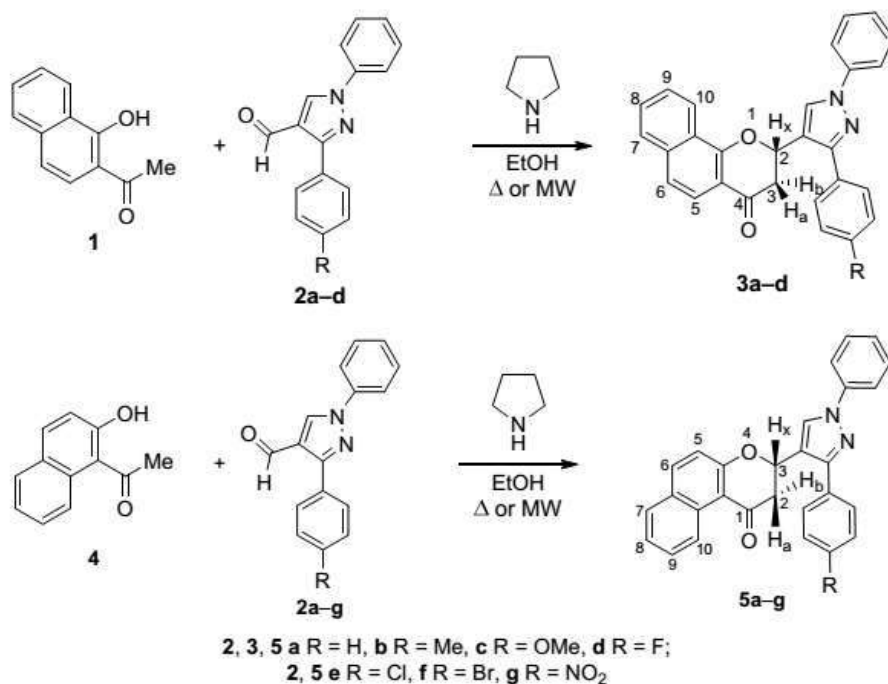
### I.3.7. Réduction et l'oxydation énantiosélective de flavanone

Cette recherche a étudié la stéréochimie de la réduction des flavanones racémiques avec un processus performant simultané de l'oxydation, qui se déroule dans des cultures de souches de levures vivantes **Schéma I. 12**. Les résultats obtenus donne des informations sur la capacité de biocatalyseurs testés pour l'énantiosélective (par rapport à la fois le substrat et le produit) de la réduction et l'oxydation énantiosélective de flavanone pour synthétisée le *cis* et *trans* flavan-4-ols [62].

Schéma I. 12. Synthèse des *cis* et *trans* flavanes-4-ol

### I.3.8. Synthèse de dérivés benzochromène-4 one-pyrazolyle

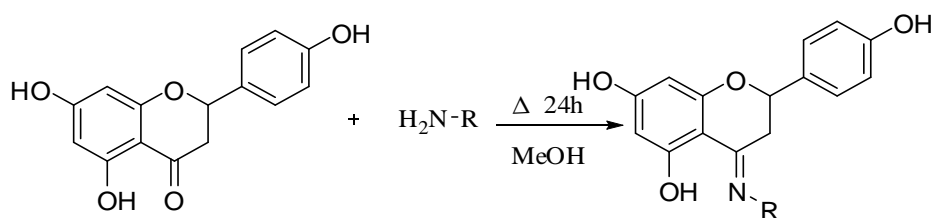
Les composés hybrides contenant à la fois flavanone et des fragments pyrazoliques ont été synthétisés à partir d'acétylnaphthols et pyrazole-4-carbaldéhydes avec de bons rendements à l'aide de rayonnement micro-ondes dans une seule étape **Schéma I. 13**. Les composés synthétisés ont été évalués pour leur activité anti-cancéreuse in vitro envers quatre lignées de cellules cancéreuses humaines [63].



**Schéma I. 13.** Synthèse de benzochromène-4 one-pyrazolyle.

### I.3.9. Synthèse de 4-iminonaringénins

La condensation en position 4 de naringénine avec des amines primaires (propylamine, isobutylamine, tert-butylamine, 2-furfurylamine, et hexylamine) conduit à la formation de nouvelles molécules, les 4-iminonaringénines **Schéma I. 14**. La méthode de synthèse est simple sans catalyse. Les produits sont obtenus avec de bons rendements (47-70%) [64].



**Schéma I. 14.** Synthèse des 4-iminonaringénins.



#### **I.4. Conclusion**

De l'avis ci-dessus, les flavanones sont un groupe de molécules, dont les multiples effets sur la santé, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs et industriels cette dernière décennie, Ils sont connus pour leur activités pharmacologiques diverses sur les différents systèmes de cellules des mammifères.

Dans ce chapitre, nous avons donné un aperçu bibliographique de différentes méthodes de préparation de flavanone et leurs dérivés les plus rapportées dans la littérature. Les dérivés flavonoïdiques peuvent servir de charpentes de base pour un nombre de produits biologiquement actifs.





---

## Chapitre 02

# Chiralité et Séparation Chirale des Dérivées de Flavanone

---

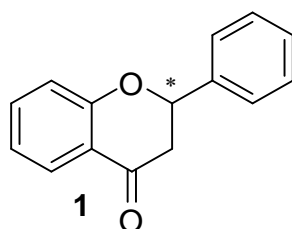


II. 1. Généralité sur la chiralité.....	16
II. 2. Chiralité et bioactivité.....	17
II. 3. Techniques utilisées pour l'obtention des énantiomères purs.....	19
II. 3.1. La synthèse asymétrique.....	19
II. 3.2. Résolution du racémique.....	20
II. 4. Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques.....	21
II. 5. La chromatographie liquide de haute performance (CLHP).....	21
II. 6. Séparation chirale par CLHP utilisant des phases stationnaires chirals à base de polysaccharide.....	21
II.7. La séparation chirale des dérivés de flavanones par CLHP.....	23
II.7.1. La discrimination chirale de Flavanone.....	24
II.7.2. La résolution des énantiomère de Hydroxyflavanones par CLHP.....	24
II.7.3. La séparation chirale des dérivés de l'hespéretine par CLHP.....	25
II.7.4. La séparation chirale des énantiomère de quelques dérivés de Flavanone par CLHP.....	26
II.7.5. La séparation des énantiomères des 4-Iminonaringénine.....	26
II. 8. Mécanisme de résolution chirale.....	27
II.9. Conclusion.....	28

Les molécules organiques chirales peuvent être d'origine naturelle ou synthétique [1]. Un grand nombre de fonctions biologiques et physiques reposent sur la reconnaissance moléculaire générée par la chiralité [65, 66]. La configuration de ces entités moléculaires représente la disposition spatiale des atomes ou des groupes d'atomes. Cette notion de configuration découle directement de la stéréochimie, appelée autrefois la chimie dans l'espace [65].

La séparation chirale est devenue un sujet d'intérêt croissant dans de nombreux domaines tels que la pharmacie clinique, le contrôle de qualité des médicaments et des aliments, l'environnement ou encore en biochimie [67]. Les techniques chromatographiques et électrophorétiques constituent les méthodes de choix pour la séparation et la quantification d'énantiomères [68, 69].

La technologie analytique récemment avancée a fourni l'évidence de l'existence des stéréoisomères de beaucoup de produits naturels. En particulier, les flavanones qui pourraient faire exister à deux configurations différentes à la position C2 **Figure II.1** [70].



**Figure II.1** : Structure de base des Flavanones.

Bien que l'analyse des énantiomères et des épimères des flavanones chirales a été effectuée pendant plus de 20 ans et malgré les avantages thérapeutiques potentiel des flavanones chirales et l'importance de la stéréosélectivité dans l'activité pharmacologique, çà reste souvent un déficit dans les sciences chimiques, pharmaceutiques, et médicales [71, 72].

Dans ce chapitre nous rappellerons quelques notions sur la chiralité et les différentes techniques de séparation, puis nous présenterons des exemples sur la séparation des dérivés de flavanone.

## II. 1. Généralité sur la chiralité

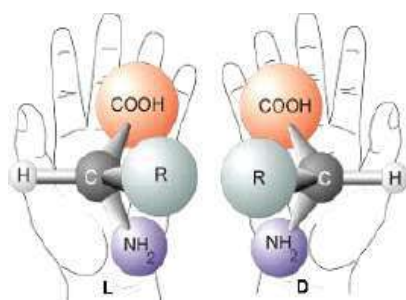
Plusieurs molécules comme plusieurs objets de la vie courante présentent une asymétrie que l'on appelle chiralité. Tout objet, dessin, molécule... etc, qui ne possède pas d'axe de symétrie alternant





(et, par conséquent, ni centre de symétrie, ni plan de symétrie) est dit chiral. Sa chiralité s'exprime par le fait que son image dans un miroir ne lui est pas superposable [73-75].

Le mot chiralité vient du mot grec  $\chi\epsilon\iota\rho$  « kheir » qui signifie main. La définition de la chiralité est toujours la même que celle décrite par Kelvin en 1884 à savoir « objet dépourvu d'éléments de symétrie qui existe sous deux formes non superposables et l'images l'une de l'autre dans un miroir », [76] exactement à l'image de la main gauche et de la main droite **Figure II.2** [77, 78]. Ces deux entités sont nommées des énantiomères [76].



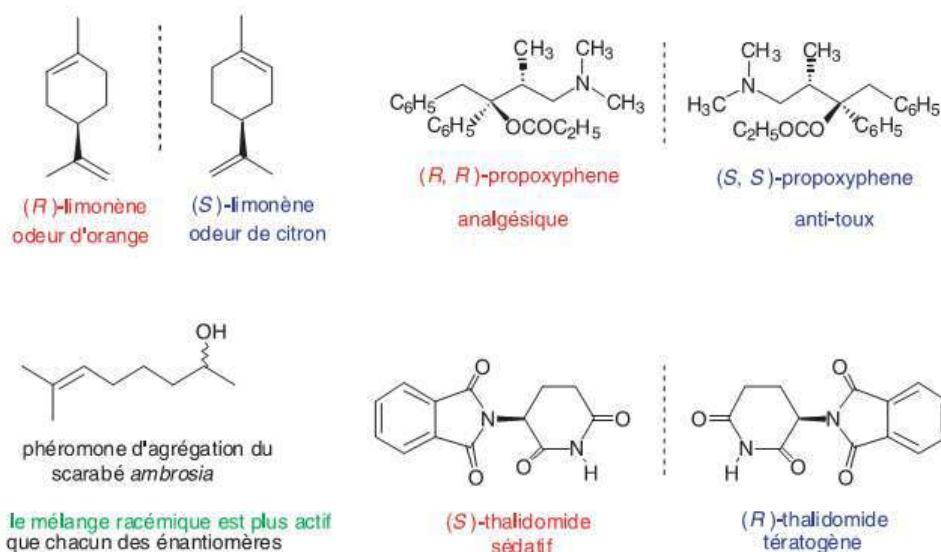
**Figure II.2.** Une molécule chirale d'un acide aminé, et son image dans un miroir. [79, 80]

Les énantiomères sont des structures qui ne sont pas identiques, mais qui sont image spéculaire l'une de l'autre à un plan et non superposables sont dites énantiomères (du nom grec enantio : opposé) ou inverse optique. [81] Le mélange équimolaire de deux énantiomères s'appelle mélange racémique. [82] L'inversion d'un unique centre chiral sur une molécule en possédant plusieurs donne un stéréoisomère qui n'est pas son image dans un miroir. Un tel stéréoisomère est dit diastéréoisomère et l'inversion s'appelle une épimérisation. Généralement, les énantiomères d'une molécule chirale sont désignés différemment (-, +, l, d, S, R, L, D). Deux énantiomères font tourner le plan de polarisation de la lumière en sens opposé l'un de l'autre. On les désigne donc par (+) ou (-) selon qu'ils dévient le plan de polarisation de la lumière vers la droite (substance dextrogyre (d)) ou vers la gauche (substance lévogyre (l)). [83]

## II. 2. Chiralité et bioactivité

Actuellement, les molécules bioactives utilisées en pharmacie, en agrochimie ou en cosmétique sont de plus en plus développées sous forme d'un unique énantiomère **Figure II.3**. Deux énantiomères d'une molécule chirale possèdent, de manière générale, des activités biologiques différentes. [80, 83]





**Figure II.3.** Quelque exemples (activité biologique et configuration absolu).

L'exemple le plus flagrant étant celui où un énantiomère se révèle toxique pour l'organisme alors que l'autre possède une activité bénéfique. L'examen des différents médicaments chiraux commercialisés au 20<sup>ème</sup> siècle, montre qu'il s'agit le plus souvent de mélanges racémiques constitués d'égales proportions des deux énantiomères. [75] Tableau II.1.

**Tableau II.1.** L'effet de chiralité sur l'activité pharmacologique de quelque principe actif de médicament.

Forme (S)	Composé	Forme (R)
Tératogène	Thalidomide	Sédatif
Convulsivant	Barbiturique S	Anesthésiant
L: vitamine C	Acide ascorbique	D : inactif
$\beta$ -bloquant	Propranolol	100fois moins puissant
Ipb gastriques	Sulpiride	d antidopaminer
(S, S)antituberculeux	Ethambutol	(R,S) décroît vision
Antiarthritique	Pénicillamine	Toxique
Stimulant du système nerveux central	Amphétamine	3 a 4 fois moins actif, induit des psychoses paranoïdes



De plus, aujourd'hui, la loi impose à toute société désireuse de développer un nouveau principe actif sous forme racémique, de prouver l'activité des deux énantiomères ou bien de montrer que l'énantiomère dit "indésirable" n'a pas d'effets secondaires. Parmi les plus tristes exemples de l'utilisation de mélanges racémiques, citons les cas de thalidomide, la kétamine et l'éthambutol [84].

Les statistiques en 2010 montre qu'environ la moitié des médicaments mis sur le marché contiennent au moins un centre asymétrique. La majorité est employée sous forme diastéréoisomérique ou racémique. Mais, depuis quelques années, la commercialisation d'un énantiomère pur, de préférence au mélange racémique, a pris un grand essor. L'industrie pharmaceutique a montré au cours de ces dernières années un très fort intérêt pour la production et la commercialisation de médicaments énantio-purs à la place des mélanges racémiques [84-86]

### II. 3. Techniques utilisées pour l'obtention des énantiomères purs

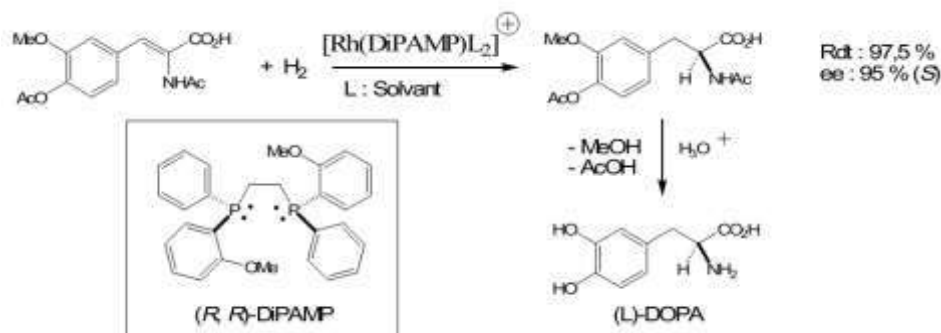
La production de composés énantio-mériquement purs a pris son essor depuis la mise au point de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique et le développement de techniques séparatives performantes à l'échelle préparative. Les méthodes pour obtenir des énantiomères purs peuvent être classées en deux principales catégories, synthèse asymétrique et résolution de racémiques [70, 71]. La première catégorie est basée essentiellement sur une approche chirale incluant des synthèses énantio-sélectives en utilisant des synthons et auxiliaires chiraux, des enzymes ou des processus catalytiques énantio-sélectifs. La deuxième catégorie est une approche racémique et, dans ce cas-là, les énantiomères sont obtenus par la discrimination de diastéréoisomères (cristallisation, membranes, biocapteurs ou méthodes électrophorétiques et chromatographiques) [3, 67].

#### II. 3.1. La synthèse asymétrique

En 1904, Marckwald a donné une définition des synthèses asymétriques qui reste d'actualité : « Les synthèses asymétriques sont celles qui, à partir de corps de structure symétrique et en utilisant intermédiairement des substances optiquement actives, mais sans faire intervenir aucun processus analytique, conduisent à des produits optiquement actifs » [3, 87]. Ainsi, la synthèse asymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale. Cette transformation nécessite l'aide d'un auxiliaire chiral qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur. L'auxiliaire chiral, employé en quantité stoechiométrique par rapport au substrat, transforme directement le substrat achiral en l'énantiomère désiré. La première synthèse



asymétrique industrielle a été la préparation de la L-DOPA<sup>®</sup>, en 1975, par W. S. Knowles (prix nobel en 2001) en utilisant un catalyseur chiral **Schéma II.1**. Ce dernier est un complexe de rhodium ayant une phosphine chirale (Ethane-1,2-diylbis[(2-méthoxyphényl)phénylphosphane] DIPAMP) comme ligand chélatant. La L-DOPA a ensuite été commercialisée comme médicament antiparkinsonien par la société Hoffmann-La-Roche [80, 85].



**Schéma II.1.** La synthèse de la L-DOPA<sup>®</sup>.

### II. 3.2. Résolution du racémique

La croissance de l'industrie pharmaceutique continuera à conduire le besoin de méthodes de séparation chirale. Une série de sélecteurs chiraux largement applicables et des phases stationnaires chirales (PSCs) sont nécessaires pour répondre au besoin prévu de séparations énantiomériques des divers composés [88-90]. Pour beaucoup de médicaments, seulement les mélanges racémiques sont disponibles pour l'usage clinique. Puisque les différents stéréoisomères des médicaments causent souvent différentes réponses physiologiques, l'utilisation des isomères purs pourrait obtenir des effets thérapeutiques plus exacts [91].

La résolution des racémiques a toujours été considérée comme l'un des problèmes les plus difficiles en chimie. Deux aspects coexistants :

- La séparation chirale analytique lorsqu'il s'agit de caractériser la pureté énantiomérique d'un composé ou de suivre le devenir du mélange racémique, par exemple dans une métabolisation [68, 92, 93].
- La séparation chirale préparative pour obtenir des énantiomères de grande pureté optique lorsque la synthèse énantiosélective fait défaut [68, 92, 93].



Plusieurs méthodologies ont été utilisées pour résoudre les mélanges racémiques. Ces différentes techniques peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes classiques, regroupant les méthodes de biotransformations et la cristallisation et les technologies « plus modernes » comprenant les méthodes par membranes chirales, les biocapteurs, les méthodes chromatographiques et électrophorétiques [68, 93].

#### II. 4. Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques

De part leur simplicité, sensibilité et robustesse, la chromatographie et l'électrophorèse capillaire (EC) sont deux techniques qui remportent le plus de succès dans le domaine de la discrimination chirale. Elles ont notamment prouvé leur efficacité lors de la séparation des énantiomères de produits pharmaceutiques, phytosanitaires et agroalimentaires [68, 76, 73].

Parmi les techniques chromatographiques employées pour la séparation chirale, on peut citer la chromatographie liquide de haute performance (CLHP), la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase supercritique (CPS). La chromatographie en phase liquide (CLHP) est de loin la plus utilisée [68, 69, 94].

#### II. 5. La chromatographie liquide de haute performance (CLHP)

La CLHP représente une technique de choix pour la quantification des énantiomères. On peut estimer qu'environ 90% des séparations chirales se font par CLHP et de nombreux sélecteurs chiraux sont disponibles. La séparation chirale sur les PSCs peut être développée en utilisant trois modes chromatographiques différents : en phase normale, en polarité de phase inversée et en mode organique polaire [1, 67, 68].

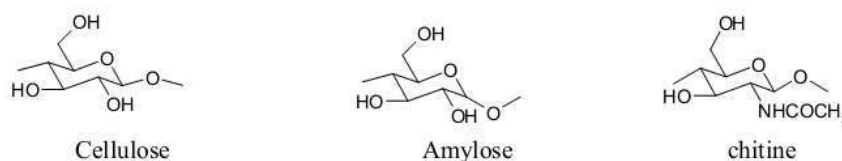
#### II. 6. Séparation chirale par CLHP utilisant des phases stationnaires chirales à base de polysaccharide

Les polysaccharides tels que la cellulose, l'amylose, et la chitine **Figure II.4** [95] le chitosane et l'amylopectine [1] sont optiquement les polymères actifs les plus abondants sur la terre et peuvent être aisément modifiés à des carbamates et des esters par des réactions avec les isocyanates et les chlorures d'acides, respectivement [96, 97]. La cellulose et l'amylose possèdent un fort potentiel d'application en séparation chirale. En effet, ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composée de n unités de D.(+).glucose reliées par des ponts  $\beta$  (1.4) pour la cellulose et



par des ponts  $\alpha$  (1.4) pour l'amylose. Chacune de ces unités contribue à la reconnaissance chirale des solutés avec lesquels elle interagit. Les résolutions obtenues par ces deux polymères naturels sont généralement faibles. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, la cellulose et l'amylose ont été modifiées par dérivation des fonctions hydroxy (.OH) libres [66, 67, 96].

La dérivation de ces groupements hydroxy (.OH) permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules.

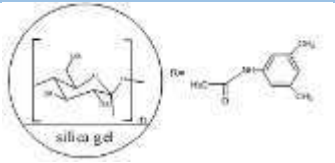
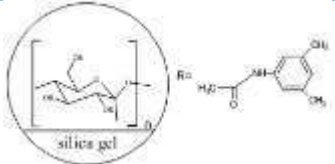
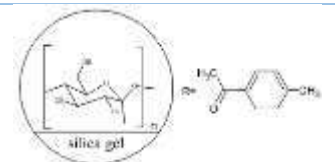
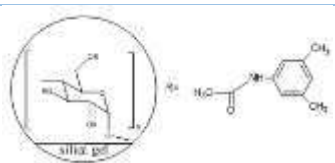
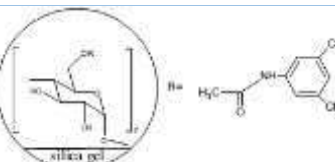
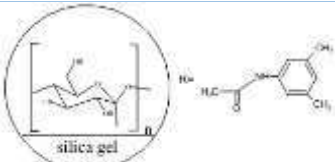


**Figure II.4.** Structure de quelques polysaccharides [96].

Nombreuses publications ont démontré que la cellulose 3,5.diméthylphénylcarbamate, l'amylose 3,5.diméthylphénylcarbamate et la cellulose tris (4. méthylbenzoate) peuvent réaliser la résolution chirale de plus de 80% des médicaments actuellement disponibles sur le marché **Tableau II.2** [75].



Tableau II.2. Les PSCs de polysaccharides commercialisés [71, 98-105].

Colonne	Structure	Nom	Application
Chiralcel <sup>®</sup> OD		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Alcaloïdes, tropines, amines, $\beta$ .bloquants
Chiralcel <sup>®</sup> OD-H		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Alcaloïdes, tropines, amines, $\beta$ .bloquants
Chiralcel <sup>®</sup> OJ		Cellulose tris-(4-methylbenzoate)	Aryl methyl esters, aryl methoxy esters
Chiralpak <sup>®</sup> AD		Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Alcaloïdes, tropines, amines, $\beta$ .bloquants
Chiralpak <sup>®</sup> IA		Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Quinazolines, Alcaloïdes, tropines, amines, $\beta$ .bloquants, flavanones
Chiralpak <sup>®</sup> IB		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	Alcaloïdes, tropines, amines, $\beta$ .bloquants

## II.7. La séparation chirale des dérivés de flavanones par CLHP

Les énantiomères et les diastéréo-isomères peuvent avoir différentes propriétés médicales dans un environnement chiral, les réactivités, les bioactivités et les toxicités [69]. Certains flavanones ont été évalués en tant que médicaments potentiels et en tant que marqueurs importants pour le contrôle de qualité de nourriture. Comme nous avons vu, les flavanones contiennent un noyau de chromanone

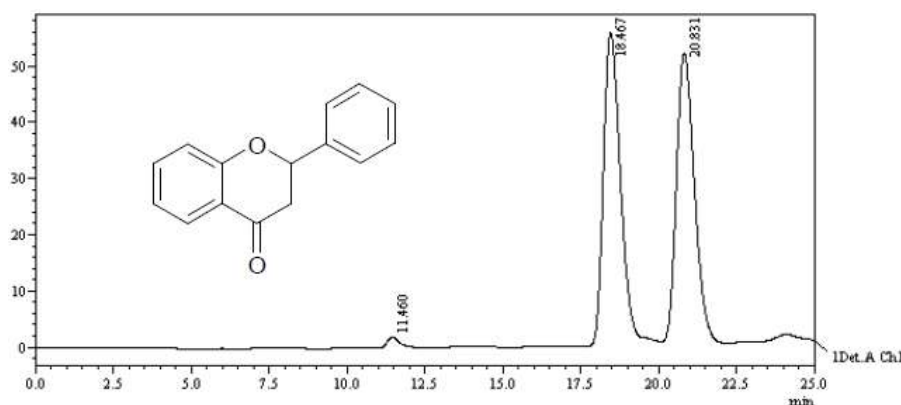


qui existe souvent comme deux énantiomères 2R et 2S, dérivant de son centre stéréogénique au carbone C2 [67]

Les développements des technologies en chimie analytique ont permis la mise en évidence de l'existence des stéréoisomères dans beaucoup de produits naturels. En particulier, les flavanones qui peuvent exister en deux configurations différentes à la position C2. Les énantiomères et les diastéréoisomères peuvent avoir différentes propriétés biologiques dans un environnement chiral. Par conséquent il faut développer des méthodes analytiques rapides, sélectives et sensibles pour la séparation des stéréo-isomères afin de déterminer la source bioactive. Dans ce travail nous présentons les différentes méthodes et techniques de la séparation chirale des flavanones et leurs dérivés décrites dans la littérature.

### II.7.1. La discrimination chirale de Flavanone

Les travaux préliminaires ont été réalisés au sein de notre équipe dans ce domaine [11]. En 2012 la séparation chirale par CLHP de treize flavanones a été réalisée en mode de phase normale et en phase organique polaire, ils sont utilisés six phases stationnaires chirales à base des polysaccharides et diverses phases mobiles de n alcane/alcool.



**Figure II. 5.** Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de flavanone sur Chiralcel<sup>®</sup>OD. Phase mobile : Isopropanol, débit : 0.2ml/min, volume d'injection : 20  $\mu$ L, détection : 254nm,  $\alpha=1.337$ ,  $R_s= 2.290$  [11].

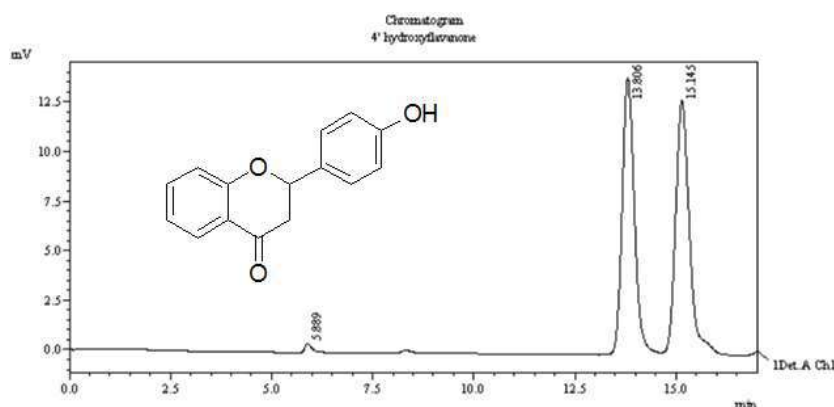
### II.7.2. La résolution des énantiomères de Hydroxyflavanones par CLHP

La séparation énantiomérique CLHP de quatre hydroxyflavanones substituées dans des positions; 4', 5, 6 et 7 respectivement ont été réalisées en mode de phase normale sur des phases





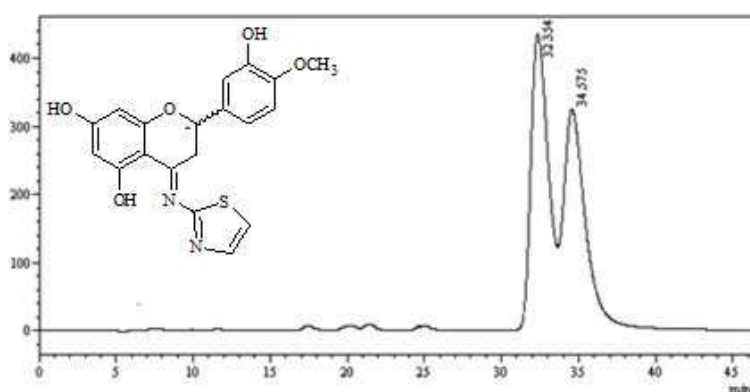
stationnaires chirales à base des polysaccharides (Chiralpak<sup>®</sup>IA et Chiralpak<sup>®</sup>IB) et diverses phases mobiles n-hexane / Isopropanol.



**Figure II. 6.** Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de Hydroxyflavanone sur la colonne Chiralcel<sup>®</sup>OD-H. Phase mobile : n heptan/Isopropanol 90 :10, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20  $\mu$ L, détection : 254nm,  $\alpha$ =1.169,  $R_s$ = 2.336 [106].

### II.7.3. La séparation chirale des dérivés de l'hespétine par CLHP

Hemmal. S *et al.* en 2013 ont étudié la séparation chirale des dérivées de hespétine par CLHP. La séparation chirale de ces composées a été réalisée en deux modes sur quatre phases stationnaires chirales à base des polysaccharides. Les résultats démontrent clairement que le système chromatographique basé sur des PSCs dérivés de polysaccharides fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des dérivées de l'hespétine [7].

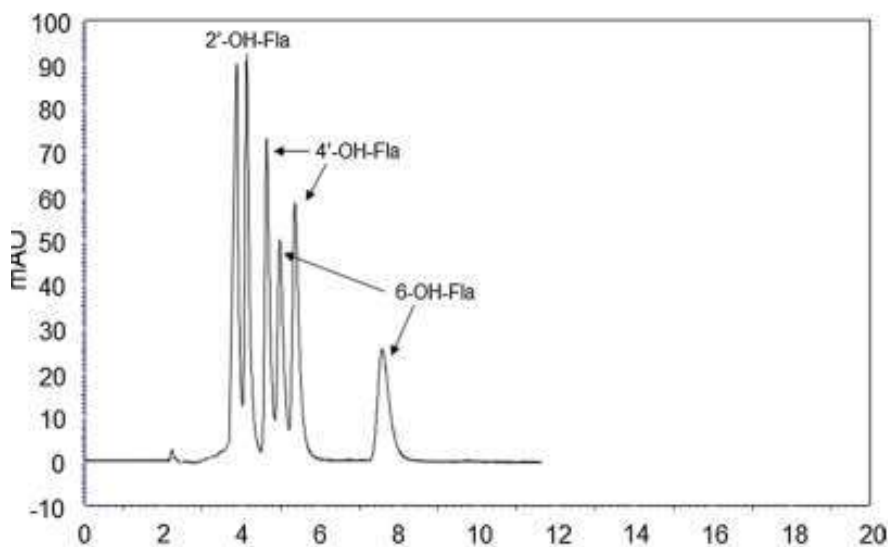


**Figure II.7.** Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de 4-iminothazol-hesperitine sur la colonne Chiralcel<sup>®</sup>OJ. Phase mobile : hexan/Isopropanol 70 :30, débit : 0.5ml/min, volume d'injection : 20  $\mu$ L, détection : 254 nm,  $R_s$ = 1.22 [7].



#### II.7.4. La séparation chirale des énantiomères de quelques dérivés de flavanone par CLHP

La séparation des énantiomères de flavanone et de 5 dérivés chiraux de flavanone a été étudiée sur deux colonnes chirales expérimentales à base de polysaccharides par chromatographie liquide haute performance avec du méthanol, de l'éthanol, de l'acétonitrile, du n-hexane / éthanol et du n-hexane / 2-propanol [11].



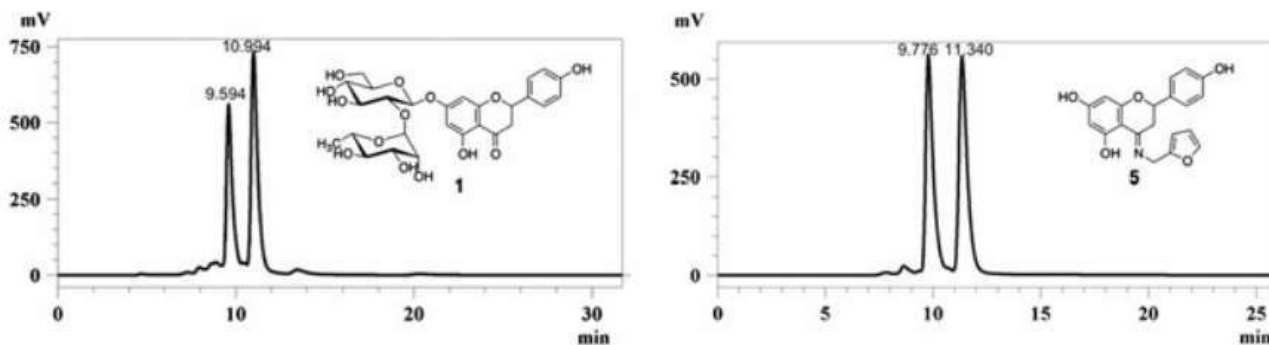
**Figure II.8.** Chromatogramme présentant la séparation d'un mélange des énantiomères de 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone et 6-hydroxyflavanone sur la colonne ADMPC. Phase mobile : Ethanol + 0.1 % FA (v/v) [107].

Avec le squelette du polysaccharide, le rôle significatif des substituants dans le fragment phényle des sélecteurs chiraux, ainsi que la structure de l'analyte, ont été observés sur la rétention et l'énantiosélectivité.

#### II.7.5. La séparation des énantiomères des 4-Iminonaringénine

La naringine et les 4-iminonaringénines ont été analysés par CLHP en présence de deux phases stationnaires chirales à base de polysaccharide : Chiralpak<sup>®</sup>IB et Chiralcel<sup>®</sup>OD, et différentes phases mobiles. Le 2-propanol a montré une forte énantiosélectivité pour la naringine et ses dérivés sur la colonne Chiralpak<sup>®</sup>IB [65].



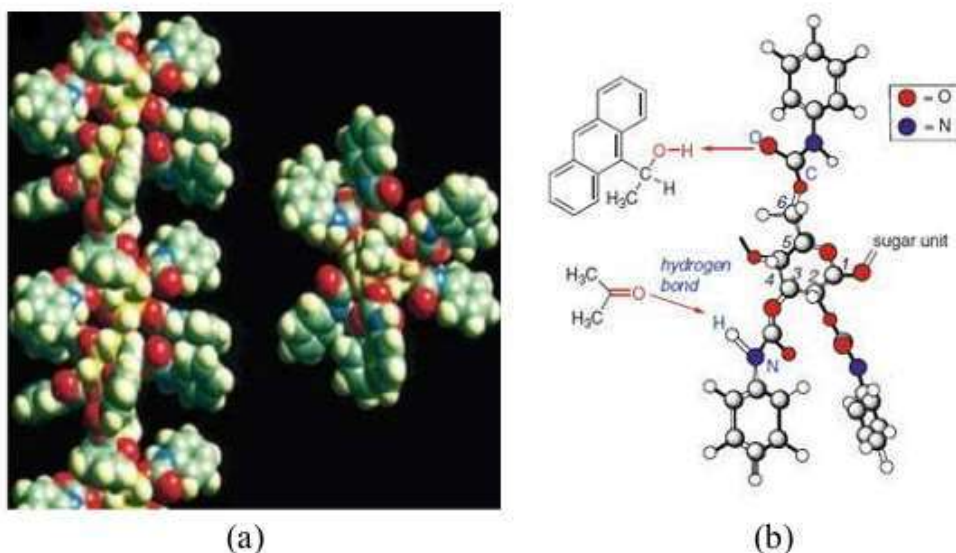


**Figure II.9.** Chromatogramme présentant la résolution des énantiomères de deux produits sur la colonne Chiralpak®IB. Phase mobile : 100% EtOH, détection : 280 nm, [65].

Tous ces résultats démontrent clairement que le système chromatographique basé sur des PSCs dérivés de polysaccharides fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des dérivés de flavanones.

## II. 8. Mécanisme de résolution chirale

Les PSCs basé sur les polysaccharides dérivatisés (déposés ou chimiquement immobilisé sur le gel de silice), les dérivés tri. (phenylcarbamate) et tri (benzoate) d'amylose et de cellulose, sont bien connus pour leur enantioselectivité extrêmement large et efficacité de séparation élevée [108].



**Figure II.10.** (a) Structure optimisée de triphenylcarbamate de cellulose. (b) Les emplacements possibles d'interaction ont expliqué pour l'identification chirale sur la cellulose triphenylcarbamate PSCs de cellulose [108].



Les groupes polaires de carbamoyl localisent de préférence à l'intérieur et près des centres chiraux sur l'épine dorsale de D.glucose, alors que les groupes aromatiques hydrophobes localisent à l'extérieur de la chaîne de polymère **Figure II.10**. Les interactions de liaison hydrogène entre les parties polaires (comme .OH, .NH<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, O, COO, .COOH) des analytes chirales et les groupes de carbamate sur le polysaccharide ce qui facilite la formation d'un complexe diastéréomérique de soluté/PSC.

D'autres interactions intermoléculaires telles que des interactions  $\pi.\pi$  entre les groupes phényle sur la PSC et les groupes aromatiques de l'analyte, des interactions dipôle.dipôle, et des interactions stériques dues à la structure hélicoïdale des PSCs jouent des rôles importants dans le processus de reconnaissance chirale [102, 108, 109].

Également les chaînes latérales entourant les épines dorsales hélicoïdales de polymère peuvent créer des cavités chirales. La partie aromatique des analytes chiraux peut s'insérer dans ces cavités et apporter une contribution additionnelle à la stabilité du complexe analyte PSC.

La capacité de reconnaissance chirale des phases stationnaires basées en polysaccharide est sensiblement influencée par les substituants présentés sur le groupement phényle du polymère d'hydrocarbure puisque ces substituants changeront l'acidité du groupement NH et la polarité du groupement C=O de carbamate. L'introduction d'un groupe méthylique électro.donneur ou d'un halogène électro.attracteur à la position méta et/ou para de cycle phénylique améliore souvent la capacité de reconnaissance chirale du PSC [68, 110-112].



## II.9. Conclusion

Malgré le fait que beaucoup de propriétés physique sont identiques pour des énantiomères, la chiralité est un phénomène essentiel pour la vie, Les différences de propriétés pharmacologique, biologique et toxiquo-écologique, pouvant exister entre les deux énantiomères d'un principe actif, ont conduit au développement de nombreuses techniques permettant l'obtention des deux formes énantiomériquement pures.

Dans ce chapitre, nous avons montré que les méthodes de chromatographie liquide sont des techniques couramment utilisées pour l'analyse de produits chiraux. Un large panel de sélecteurs chiraux est proposé aux analystes, dont certains sont spécialement dédiés à l'une ou l'autre des techniques évoquées précédemment

Cependant, aucun additif chiral n'étant universel et devant la complexité des mécanismes de reconnaissance chirale, il est difficile de choisir le sélecteur chiral le plus adapté à la résolution des énantiomères d'une molécule donnée. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la forme de chromatographie, la plus largement utilisée actuellement, la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P), puisque la chromatographie en phase liquide est la méthode de référence en raison de la variété des sélectivités offertes par les colonnes disponibles commercialement et de son utilisation possible à l'échelle préparative. En particulier, les phases stationnaires à base de polysaccharides (cellulose, amylose) dérivés assurent plus de 80 % (selon les statistiques de l'année 2014) des séparations des molécules pharmaceutiques grâce à la complémentarité de plusieurs systèmes de solvants (phase normale, phase polaire organique ou phase inverse).





---

## *Partie Expérimentale*

---

CHAPITRE III : Synthèse des Dérivées de Flavanone

CHAPITRE IV : La Séparation Chirale des Dérivés de Flavanones par  
CLHP

CHAPITRE V : Evaluation Biologique des Dérivées de Flavanone





---

## Chapitre 03

# Synthèse des Dérives de Flavanone

---



III. Introduction .....	30
III. 1. L'objectif .....	30
III.2. Matériel et Méthode .....	31
III.2.1. Synthèse des 4-Imino-flavanes .....	31
III.2.2. Réduction des 4-iminoflavanes .....	34
III.2.3. Synthèse des 4-Hydroxyflavanes .....	34
III.2.4. Synthèse de 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine .....	35
III.2.5. Analyse par chromatographie CCM et CLC: .....	35
III.2.6. Analyse spectrale des composées synthétisé .....	36
III.3. Résultat et Discussion.....	37
III. 4. Analyse spectrale des différente composée synthétisé .....	43
III.4.1. Analyse par spectroscopie IR .....	43
III.4.2. Analyse par spectroscopie UV .....	45
III.4.3. Analyse spectral RMN <sup>1</sup> H et RMN <sup>13</sup> C .....	47
III. 5. Interprétation des spectres .....	47
III.5.1. Analyse spectrale N-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan .....	47
III.5.2. Analyse spectral de N-(m-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan .....	49
III.5.2. Analyse spectral de 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol .....	51
III.6. Conclusion : .....	53
III.7. Partie expérimental .....	54

### III. Introduction

Les produits imines fonctionnels, ont fait l'objet de nombreuses études et compte tenu de leur utilités en synthèse organique, de plus la réaction d'hydrogénation des composés carbonylés en alcools correspondants est une réaction d'une grande importance dans l'industrie de la chimie fine. La fabrication de ces produits, très utilisés dans les domaines, pharmaceutique, cosmétique, agro-alimentaire etc.... Nous avons pensé à choisir une molécule de départ plus ou moins simple c'est la flavanone en préparant une série de nouvelles dérivées de flavanone,

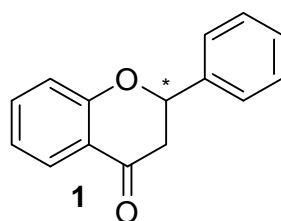


Figure III.1. Structure de base de flavanone.

#### III. 1. L'objectif

En réalisant dans ce travail la synthèse d'une série des imino-flavanes optiquement active à partir des amines primaires et des aminoflavanes par des réactions de réduction en deux modes opératoires.

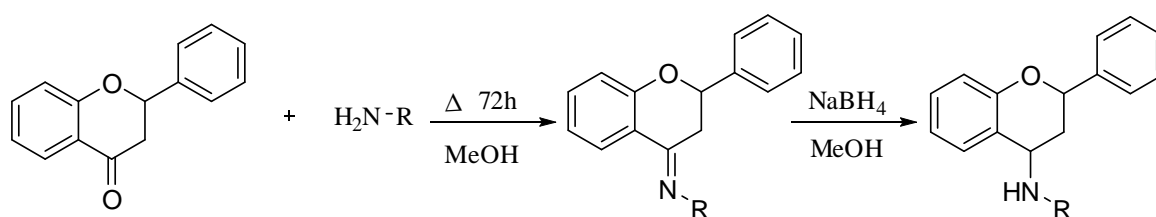


Schéma III.1. Réaction de formation des 4-iminoflavanes et 4-aminoflavanes (1<sup>er</sup> mode opératoire).





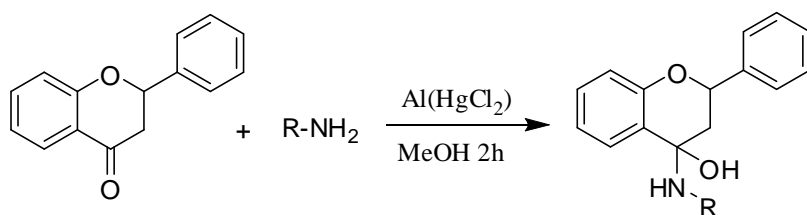


Schéma III.2. Réaction de formation des 4-aminoflavanes (2<sup>ème</sup> mode opératoire)

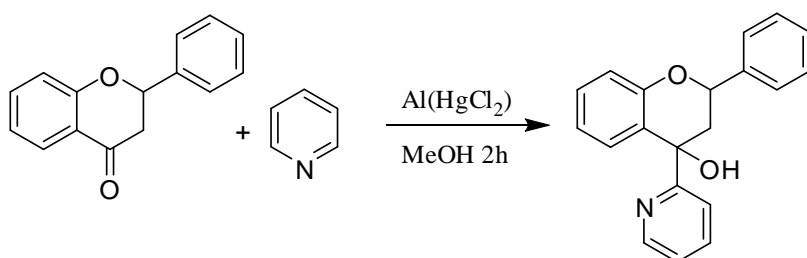


Schéma III.3. Méthode de préparation de nouvelle dérivée de flavanone.

## III.2. Matériel et Méthode

### III.2.1. Synthèse des 4-Imino-flavanes 2-15

La condensation en position 4 de flavanone **1** avec des amines primaires conduit à la formation de nouvelles molécules n'ont décrites dans la littérature, les 4-Imino-flavanes **2-15** Schéma III.4.

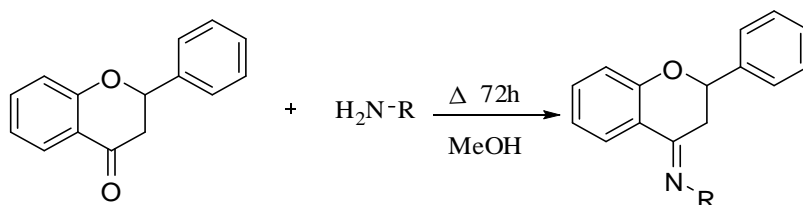
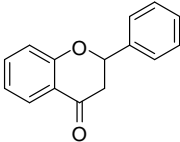
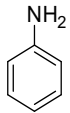
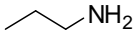

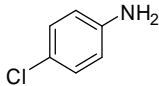
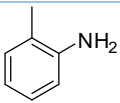
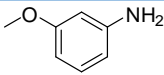
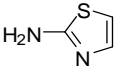
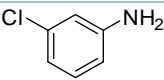


Schéma III.4. Méthode de préparation des 4-imino-flavanes 2-15

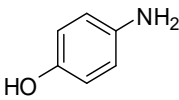
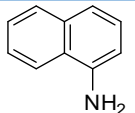
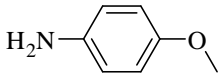
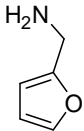
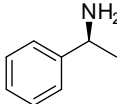
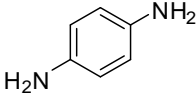
Les réactifs utilise sont présente dans le tableau suivant :



Tableau III.1. Les réactifs utilisés

Réactif	Structure	Formule brute	
		Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion ou T° ébullition (°C)
1	Flavanone 	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> 224,26 76-78 Cristaux blanc	
2	Aniline 	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N 93,11 184	
3	Propylamine 	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N 59,11	
4	Tertbutylamine 	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N 73,14	
5	4-Chloroaniline 	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClN 127,58 67-70	
6	<i>o</i> -Toluidine 	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N 107,16	
7	<i>m</i> -Anisidine 	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO 123,16	
8	2-Aminothiazol 	C <sub>3</sub> N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S 100,14 85-88	
9	3-Chloroaniline 	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClN 127,58 93-96	



	Réactif	Structure	Formule brute	
			Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion ou T° ébullition (°C)
10	4-Aminophenol		C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO	109,13
11	1-Naphthylamine		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N	143,19
12	<i>p</i> -Anisidine		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	137,18
13	Fufuralamine		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> ON	97,12 70
14	(S)- (-)- $\alpha$ -Methylbenzylamine		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	121,18
15	<i>p</i> -Phenylene diamine		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	108,14 68

On place dans un ballon monocol 1.3 mmol de flavanone et 1.3 mmol de l'amine dissout dans 5 ml de méthanol, puis on adapte sur ce ballon un réfrigérant. On chauffe au reflux (pendant 24 à 48 h), jusqu'à disparition des réactifs. On laisse refroidir. Les milieux réactionnels sont alors filtrés afin d'éliminer les produit secondaire puis concentrés par évaporation à l'aide d'un rotavape, À la suite on purifie les produits synthétisés. La purification des produits **2-15** ce fait par deux méthodes:

### II.2.1.1. La colonne chromatographie

L'échantillon résultant de ce traitement est dilué dans un minimum de solvant d'éluion (1mL) est alors déposé sur une colonne préparative contenant de la silice (Silica gel 27, Fluka). L'éluant utilisé est le même que celui utilisé pour l'analyse par CCM : acétate d'éthyle cyclohexane (20 : 80



V/V) pour les produits (2, 3, 4 et 7) et acétate d'éthyle/chloroforme (10 : 90 V/V) pour la purification des produits 5, 6, 8 et 13. En sortie de la colonne, les fractions sont collectées à un débit de 1 ml/min.

### II.2.1.2. La cristallisation

Les produits (9, 10, 11, 12 et 14) est chauffée dans un minimum de solvant (EtOH/H<sub>2</sub>O v/v) chaude, et recristallisés dans l'éthanol.

### III.2.2. Réduction des 4-iminoflavanes 16-18

Introduire l'imine préparée dans un erlenmeyer ; ajouter 1.32 mL d'éthanol absolu. Agiter et refroidir à 5°C. Tout en maintenant l'agitation, introduire 26 mg de NaBH<sub>4</sub> par petites portions. La température ne doit pas dépasser 10°C. Laisser reposer 10 min puis filtrer sur papier filtre. Laver le solide avec un peu d'éthanol froid ; Sécher soigneusement sur papier filtre et peser la masse.

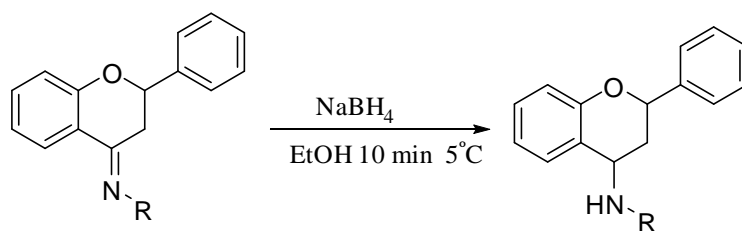


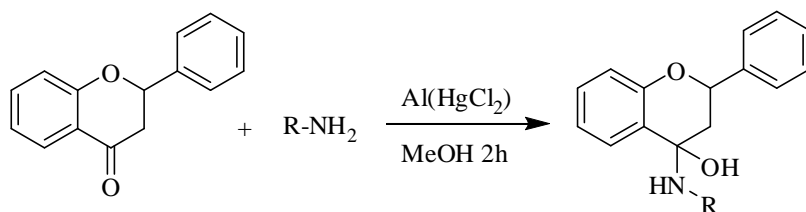
Schéma III.5. Méthode de préparation de 4-amino-flavane 16-18.

### III.2.3. Synthèse des 4-Hydroxyflavanes 19-21

On place dans un ballon monocol 5.3 mmol de poudre d'aluminium et 5.3 mmol HgCl<sub>2</sub> dissout dans 30 mL d'éthanol on chauffe au reflux à 120 °C pendant 20 minutes, on ajoute un mélange de 1.3 mmol de l'amine et 1.3 mmol de flavanone sous agitation vigoureuse et le contenu est chauffé au reflux pendant 2h.

Le mélange réactionnel a été refroidir et ensuite versé dans 2N de NaOH (20 mL) sous agitation pendant 10 minutes. On ajoute 20 mL d'acétate d'éthyle. A l'aide d'une ampoule à décanté on sépare les deux phases.



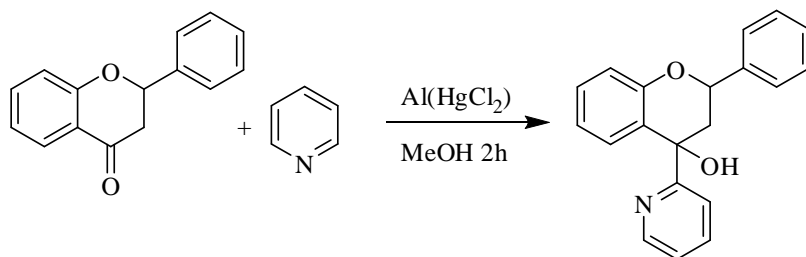


**Schéma III.6.** Méthode de préparation de 4-Hydroxyflavane **19-21**.

### III.2.4. Synthèse de 2-(2- phénylchroman-4-yl) pyridine **22**

On place dans un ballon monocol 5.3 mmol de poudre d'aluminium et 5.3 mmol  $\text{HgCl}_2$  dissout dans 30 ml d'éthanol on chauffe au reflux à  $120\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes, on ajoute un mélange de 1.3 mmol de pyridine et 1.3 mmol de flavanone sous agitation, le contenu a été chauffé au reflux pendant 2h.

Le mélange réactionnel est refroidi et ensuite versé dans 2N de NaOH (20 mL) sous agitation pendant 10 minutes. On ajoute 20 mL d'acétate d'éthyle. A l'aide d'une ampoule à décanté on sépare les deux phases.



**Schéma III.7.** Méthode de préparation de 2-(2- phénylchroman-4-yl) pyridine **22**.

### III.2.5. Séparation par chromatographie CCM et CLC:

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice avec indicateur fluorescent (20×20 cm, 60 F254). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants : acétate d'éthyle / cyclohexane (30 : 70 V/V) et le système d'acétate d'éthyle /éther de pétrole (20 : 80 V/V).



### III.2.6. Analyse spectrale des composées synthétisé

Au cours de notre travail nous avons utilisé l'appareillage suivant :

- Les points de fusion ont été obtenus par des tubes capillaires sur un appareillage de type B-540 Büchi.
- Le spectromètre de type SPECORD 200 PLUS - 223E1121 a été utilisée, afin d'obtenir les spectres UV, le solvant utilise est le MeOH.
- L'analyse des spectres UV des produits a été enregistrée dans le MeOH. Chaque produit donne des déplacements (bathochrome ou hypsochrome) sur les deux bandes (I et II) par rapport à celles obtenus pour la molécule flavanone
- Les spectres d'absorption IR ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Spectrum one équipé d'un accessoire ATR. Les bandes d'absorption  $\nu_s$  sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$ . Seuls les pics significatifs sont listés
- Les spectres RMN<sup>1</sup>H ont été enregistrés à 400 MHz sur un appareil Bruker AC 400. Les produits ont été analysés dans le méthanol (MeOD-d<sub>4</sub>:  $\delta = 3.31$  ppm), le chloroforme (CDCl<sub>3</sub>:  $\delta = 7.25$  ppm) avec comme référence interne le tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm et les constantes de couplage  $J$  en Hz. Les signaux sont désignés par les abréviations suivantes : s, singulet, d, doublet, t, triplet, m, multiplet.
- Les spectres RMN<sup>13</sup>C ont été enregistrés à 100,6 MHz avec découplage 1H en large bande sur un appareil Bruker AC 400. Les produits ont été analysés dans le méthanol (MeOD-d<sub>4</sub>:  $\delta = 49.00$  ppm), le chloroforme (CDCl<sub>3</sub>:  $\delta = 76.7$  ppm) avec comme référence interne le tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm.



### III.3. Résultat et Discussion

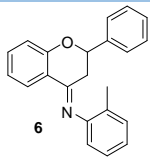
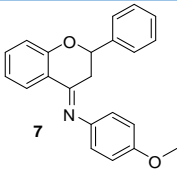
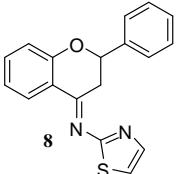
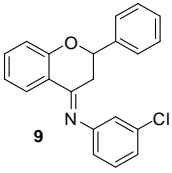
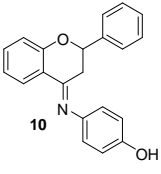
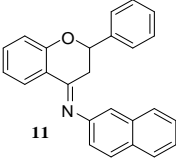
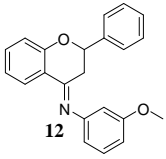
#### III.3.1. Synthèse des 4-Imino-flavanes 2-15

La méthode de synthèse des 4-Imino-flavanes **2-15** est s'effectué en additionnant un équivalent de la flavanone **1** avec un équivalent de différentes amines primaires RNH<sub>2</sub> sans catalyseur. Après 3 jours de reflux dans le méthanol, les 4-Imino-flavanes sont obtenues avec de bons rendements (15-98%). Les amines primaires utilisées sont : Aniline, Propylamine, tert-Butylamine, 4-Chloroaniline, *o*-Toluidine, *m*-Anisidine 4-Aminothiazol, 3-Chloroaniline, 4-Aminophenole, 1-Naphthylamine, *p*-Anisidine, Fufuralamine, (S)-(-)-A-Methylbenzylamine et *p*-Phénylene-diamine. Les résultats obtenus pour la préparation des 4-Imino-flavane sont résumés dans le **Tableau III. 2**

**Tableau III. 2.** Résultats obtenus des 4-Imino-flavanes **2-15**.

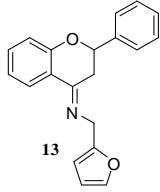
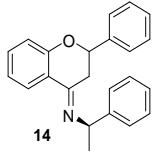
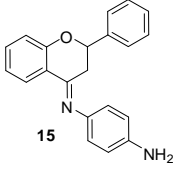
Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
2		0.36	Acétate d'éthyle/cyclohexane 20 : 80	66	89-90
3		0.21	Acétate d'éthyle/cyclohexane 20 : 80	52	74-75
4		0.29	Acétate d'éthyle/ cyclohexane 20 : 80	83	72-73
5		0.66	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	85	78-79



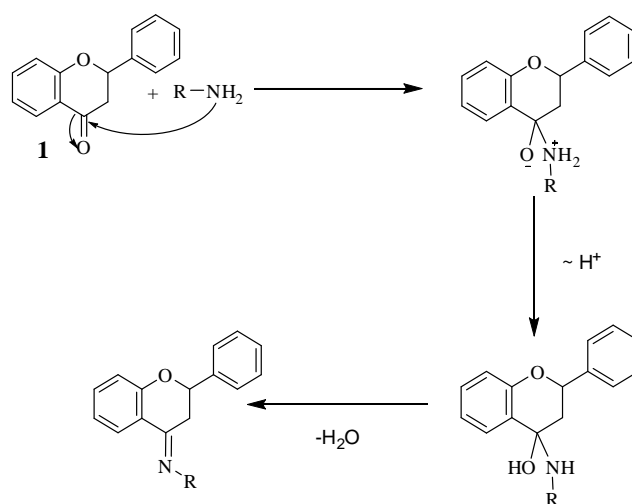
Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
6		0.55	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	60	84-85
7		0.50	Acétate d'éthyle/cyclohexane 20 : 80	98	49-50
8		0.77	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	15	99-100
9		0.22	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	75	76-77
10		0.64	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	70	138-139
11		0.5	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	22	50-51
12		0.87	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	88	146-147





Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
13		0.82	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	98	100-101
14		0.68	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	72	59-60
15		0.64	Acétate d'éthyle/chloroforme 10 : 90	87	80-81

Le mécanisme de formation de la fonction imine en carbone (4) du cycle C de la flavanone est initié par l'attaque nucléophile de l'atome d'azote sur le groupement cétone de la molécule flavanone, et suivi par une protonation de l'atome d'oxygène, et finalement une déprotonation de l'atome d'azote, forme la fonction imine et élimine une molécule d'eau **Schéma III.8.**



**Schéma III.8.** Le mécanisme de formation des 4-imino-flavanes 2-15.

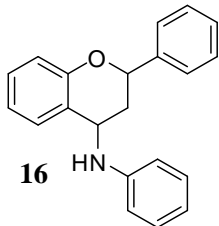
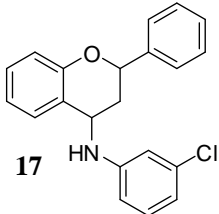
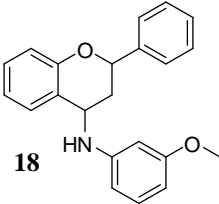


### III.3.2. Synthèse des 4-Amino-flavanes 16-18

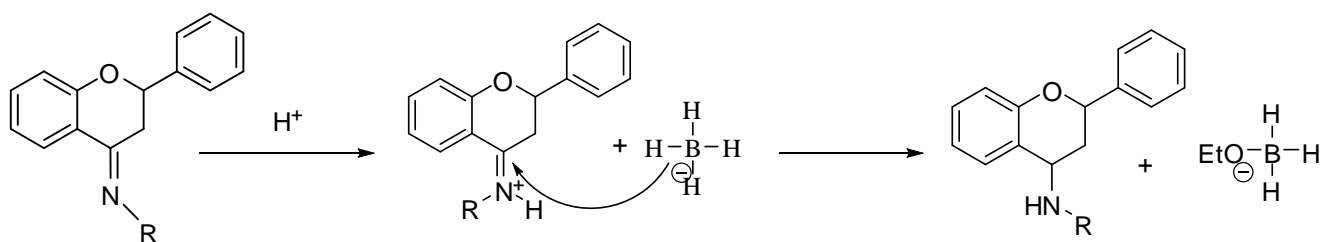
La préparation des 4-amino-flavanes a été réalisée par la réduction de la fonction imine en position 4. Nous avons choisi trois 4-imino-flavanes obtenus avec des bons rendements qui sont : **N-phényle-4-imino-flavane**, **N-3-chlorophenyl-4-imino-flavane** et **N-4-methoxyphenyl-imino-flavane**. La réaction de réduction a été effectuée par l'addition du NaBH<sub>4</sub> sur les iminoflavanes synthétisés pour obtenir une autre série des 4-Amino-flavanes **16-18** avec un rendement moyen entre (18-53%).

Les résultats obtenus pour la préparation des 4-amino-flavanes sont résumés dans le **Tableau III.3**.

**Tableau III.3.** Résultats obtenus des 4-Amino-flavanes **16-18**.

Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
16		0.54	Acétate d'éthyle/cyclohexane 30 :70	18%	77-78
17		0.8	Acétate d'éthyle /cyclohexane 30 :70	30%	78-79
18		0.14	Acétate d'éthyle /cyclohexane 30 :70	53%	76-77





**Schéma III.9.** Le mécanisme de formation des 4-amino-flavanes **16-18**.

Dans la seconde partie nous avons envisagé la préparation des dérivés d'amines secondaire correspondants aux imines (**2**, **9** et **12**) préparés précédemment par la réduction de ces derniers en utilisant le borohydride de sodium  $\text{NaBH}_4$  comme agent réducteur selon la réaction suivant :

L'insertion directe du  $\text{NaBH}_4$  réduit sélectivement les imines en amines correspondants en présence d'un solvant organique polaire (l'éthanol absolu) à  $0^\circ\text{C}$  suivi d'une hydrolyse du milieu à température ambiante avec de l'eau distillée, selon la réaction suivante **Schéma III.9**.

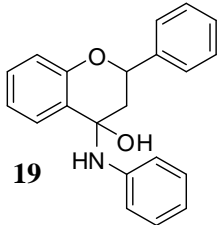
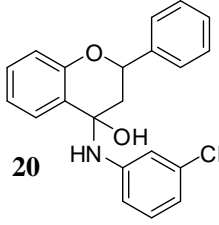
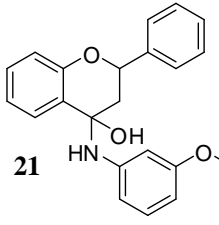
L'ajout du borohydride de sodium à l'imines fait un dégagement de l'hydrogène gazeux et volatil et après quelques instant le mélange réactionnel change de couleur du coloré au transparent ce qui signifie à l'œil nu la fin de la réduction et c'est confirmé par un CCM.

### III.3.3. Synthèse des 4-hydroxyflavanes 19-21

La méthode de synthèse des 4-hydroxyflavanes est simple, elle s'effectue en ajoutant un équivalent de la flavanone **1** avec un équivalent de trois amines primaires Aniline, 4 Chloroaniline et *m*-Anisidine avec  $\text{Al}(\text{HgCl}_2)$  comme catalyseur. Après 2 heures de reflux dans le MeOH, les 4-Hydroxy-flavanes sont obtenues avec bon rendements (75-96%). Les résultats obtenus pour la préparation des 4-amino-flavanes sont résumés dans le **Tableau III.4**.



Tableau III.4. Les résultats obtenus des 4-Hydroxyflavanes 19-21.

Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
19		0.65	Acétate d'éthyle /éther de pétrole 20 :80	96%	86-87
20		0.63	Acétate d'éthyle /éther de pétrole 20 :80	98%	131-132
21		0.86	Acétate d'éthyle /éther de pétrole 20 :80	75%	111-112

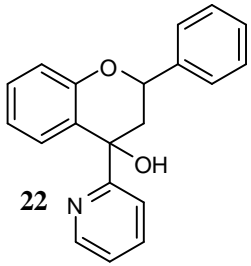
#### III.3.4. Synthèse de 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine 22

La réaction est effectuée de la même manière, en mélangeant les deux réactifs avec une quantité catalytique Al ( $\text{HgCl}_2$ ). Après deux heures d'agitation, les 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine **22** est récupérés avec de très bons rendements 99%.

Les résultats obtenus pour la préparation des 2-(2- pénylchroman-4-yl) pyridine **22** sont rapportés dans le **Tableau III.5**.



**Tableau III.5.** Le résultat de la synthèse du 2-(2- phénylchroman-4-yl) pyridine **22**.

Entrée	Produit	Rf	Eluant	Rdt%	Pf, °C
22	 22	0.71	Acétate d'éthyle /éther de pétrole 20 :80	99%	118-119

La synthèse des 4-iminoflavanes par les amines primaires donne de bon rendement pour la plupart des amines utilisés à l'exception des produits **8** et **11** (15 %, 22 %) respectivement. La diminution du rendement de produit **11** due à la délocalisation électronique de naphthalène qui diminue la nucléophilie de l'atome d'azote. Pour le produit **8** l'hétéroatome du soufre dans le 4-iminothiazol a compliqué l'attaque nucléophile sur le groupement cétone de la molécule flavanone

Les dérivés de 4-iminoflavanes synthétisés **2-15** sont généralement solubles dans les alcools MeOH et EtOH par contre, ils sont peu solubles dans l'éther diéthylique et le chloroforme et insoluble dans l'eau.

La condensation des 4-aminoflavanes par les amines primaires avec le catalyseur Al (HgCl<sub>2</sub>) donne de bon rendement (75%; 98%) par rapport à la synthèse des amino-flavanes sans catalyseur (12%; 53%).

### III. 4. Analyse spectrale des différents composés synthétisés

#### III.4.1. Analyse par spectroscopie IR

Le **Tableau III. 6** récapitule les bandes d'absorption les plus caractéristiques des dérivés iminoflavanes synthétisés.

Les spectres IR des vingt-et-un produits présentent trois principales bandes vibrationnelles à 1636-1602 cm<sup>-1</sup>, 1579-1503 cm<sup>-1</sup> et à 1339-1049 cm<sup>-1</sup> correspondent respectivement à : la fonction imine (C=N), les doubles liaisons (C=C) aromatique et les liaisons (C-O et C-N).



Tableau III.6: Les bandes caractéristiques en IR pour les iminoflavanes.

Composé	IR $\nu_{max}^{Kbr}$ en cm <sup>-1</sup>							
	OH	H-N	=CH arom	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>	C=O	C=N	C=C arom	C-O, C-N
<b>1</b>	-	-	3078	-	1689	-	1503	1148
<b>2</b>	-	-	3078	-	-	1607	1547	1142
<b>3</b>	-	-	3060	3037	-	1601	1579	1148
<b>4</b>	-	-	3084	2963	-	1604	1548	1094
<b>5</b>	-	-	3060	2918	-	1601	1579- 1498	1148
<b>6</b>	-	-	3086	2960, 2850	-	1605	1547- 1498	1142
<b>7</b>	-	-	3067	3033, 2918	-	1604	1547- 1491	1178, 1142
<b>8</b>	-	-	3024, 2918	-	-	1612, 1578	1577- 1497	1148
<b>9</b>	-	-	3084	2960-2860	-	1606	1547- 1498	1153
<b>10</b>	3412	-	2968	-	-	1612	1547- 1498	1093
<b>11</b>	-	-	3088	2926-2856	-	1611	1554- 1498	1051
<b>12</b>	-	-	3067	2927, 2853	-	1609	1553- 1491	1178, 1077
<b>13</b>	-	-	3089	2916, 2866	-	1612	1550- 1498	1150, 1051
<b>17</b>	-	3375	3067	2935, 2853	-	-	1572- 1407	1322, 1178, 1115



Composé	OH	H-N	=CH arom	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>	C=O	C=N	C=C arom	C-O, C-N
<b>18</b>	-	3375	3050	3000, 2945, 2863	-	-	1570- 1400	1310, 1188, 1120
<b>19</b>	3416	3063	3078	-	-	-	1547- 1409	1369, 1115
<b>20</b>	3412	3285	3084				1555- 1404	1333, 1050
<b>21</b>	3409	3282	3067	3163, 2935, 2853	-	-	1572- 1407	1322, 1178
<b>22</b>	3415	-	3020	2925, 2846	-	1636	1574- 1333	1339, 1250, 1049

D'après le **Tableau III.6**, nous remarquons l'absence de la bande d'absorption à  $1689\text{ cm}^{-1}$  (caractéristique à la liaison C=O de la flavanone **1**) pour les tous les produits **2-22** ainsi l'apparition d'une nouvelle bande entre  $1601\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$  caractéristique à la double liaison C=N, cela montre bien la formation des iminoflavanes **2-13**. Souf les produits **8** et **21** qui porte une fonction imine dans le cycle thiazole et le cycle pyridine respectivement.

Les composés **17-22** sont caractérisés par l'existence d'une fonction amine (C-N), leurs bandes d'absorptions sont observées à  $1310\text{-}1369\text{ cm}^{-1}$ , ce qui confirme l'existence des nouveaux produits.

Les composés **3, 4, 6, 7, 12, 18** sont caractérisés par l'existence d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) leurs bandes d'absorptions sont observées à  $3037$  jusqu'à  $2927\text{ cm}^{-1}$ . En ce qui concerne les composés **10** et **19-22**, ils sont caractérisés par la présence de la fonction Hydroxyl (OH) à  $3409\text{-}3415\text{ cm}^{-1}$ .

#### III.4.2. Analyse par spectroscopie UV

L'analyse des spectres UV des produits **2-22** a été enregistré dans le MeOH. Chaque produit présente différents déplacements (bathochrome ou hypsochrome) sur les deux bandes (I et II) par rapport à celles obtenus pour la molécule flavanone **1**. Le **Tableau III. 7**



D'après les résultats d'analyse spectroscopique UV, la flavanone **1** présente une bande maximal caractéristique à 228 nm (Bande II), et une autre vers 324 nm (Bande I). la condensation de flavanone par des amines primaire est caractérisé par les déplacements bathochromes de la bande I pour tous les produits **2-15**. La plupart des imines montre des déplacements hypochromes sur la bande II. Sauf les produits **4, 11, 14** et **15** présentes des déplacements bathochromes sur la bande II ( $\Delta\lambda=74$  nm). la réduction de la fonction carbonyle de flavanone est caractérisé par les déplacements bathochromes de la bande I pour tous les produits **16-22**. La plupart des amines montre des déplacements hypochromes sur la bande II.

**Tableau III.7.** Les bandes caractéristiques en UV pour les produits **1-22**.

Composé	UV $\lambda_{max}$ nm	
	Bande II	Bande I
<b>1</b>	228	324
<b>2</b>	276	320
<b>3</b>	268	322
<b>4</b>	289	325
<b>5</b>	265	320
<b>6</b>	270	321
<b>7</b>	270	320
<b>8</b>	273	316
<b>9</b>	274	320
<b>10</b>	260	314
<b>11</b>	256	325
<b>12</b>	276	322
<b>13</b>	271	315
<b>14</b>	276	325
<b>15</b>	276	350
<b>16</b>	253	321
<b>17</b>	253	321
<b>18</b>	252	319





19	247	321
20	250	320
21	252	318
22	252	318

La bande (II) pour le déplacement électronique ( $\pi \rightarrow \pi^*$ )

La bande (I) pour le déplacement électronique ( $n \rightarrow \pi^*$ )

### III.4.3. Analyse spectral RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C

Les résultats d'analyse de spectroscopie RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C sont donnés pour chaque composé dans la partie expérimentale ci-dessous.

## III. 5. Interprétation des spectres

### III.5.1. Analyse spectrale *N*-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan 8

#### ○ Analyse IR

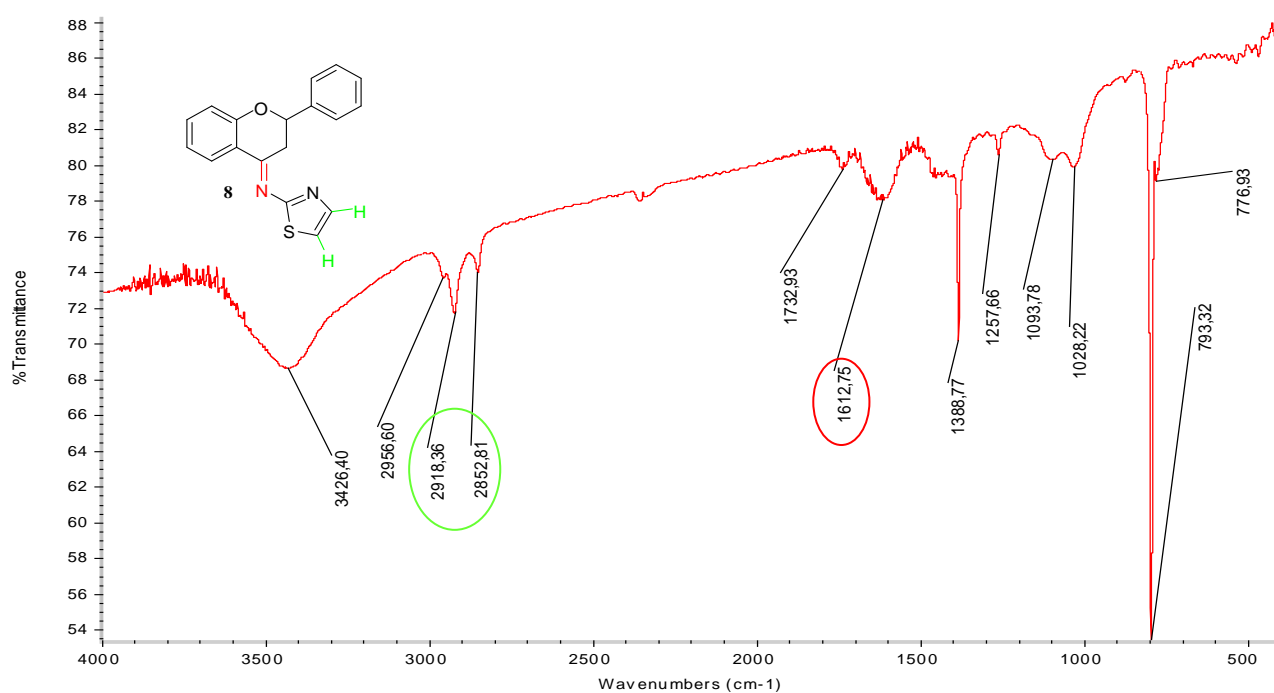


Figure III.2. Spectre IR de produit 8 '*N*-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan'.

Les spectres IR fournissent des informations structurales importantes sur cette réaction de condensation.

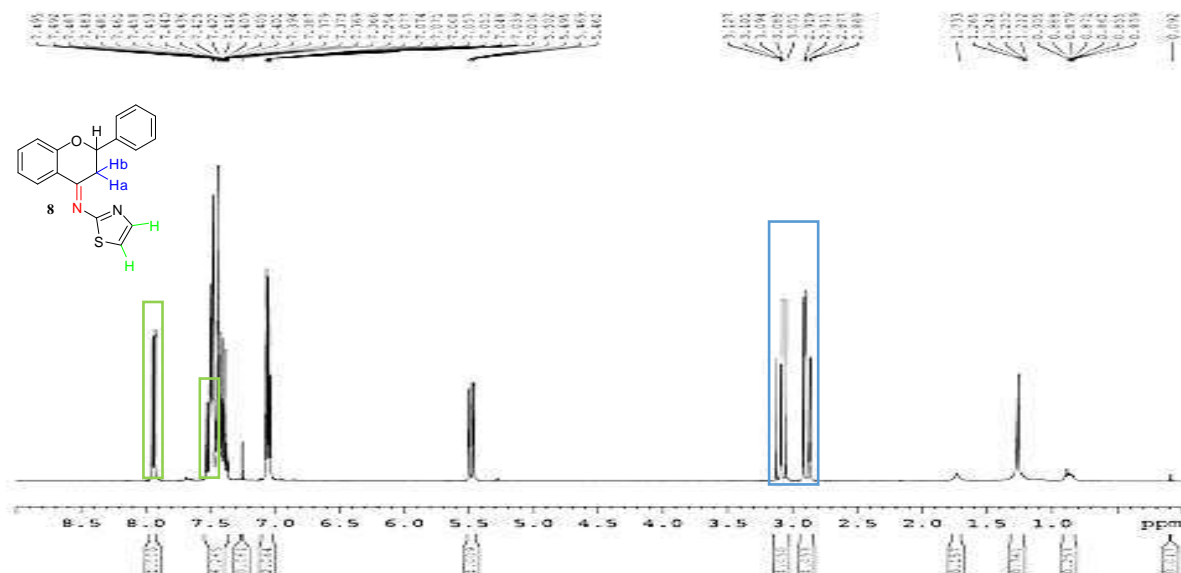


Le spectre IR d'imino-flavane **8** présente des bandes d'absorption caractéristiques aux vibrations d'élongation des liaisons : C=N, C=C et C-O, et l'absence de la bande d'absorption à 1689  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la vibration d'élongation du groupement carbonyle C=O en position C-4 de la Flavanone, confirme la formation d'imino-flavane **8**. Les bandes d'absorption correspondent à la vibration de la liaison (C=N) pour le composé **8** apparie à 1612  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes d'absorption dues aux vibrations d'élongation des protons de cycle thiazole ont été observées à une intensité forte vers 3024-2918  $\text{cm}^{-1}$ .

### ○ Analyse UV

L'étude des spectres UV pour le composé **8** montre une absorption maximale pour les deux bandes (I et II) pour le spectre enregistré dans le MeOH, donc la condensation nucléophile de 2-aminothiazol sur la flavanone provoque un déplacement bathochrome dans la bande I avec  $\Delta\lambda = 45$  nm, et un déplacement hypochrome dans la bande II avec  $\Delta\lambda = 08$  nm par rapport à celle de la flavanone.

### ○ Analyse RMN<sup>1</sup>H



**Figure III.3.** Spectre RMN<sup>1</sup>H de produit **8**.

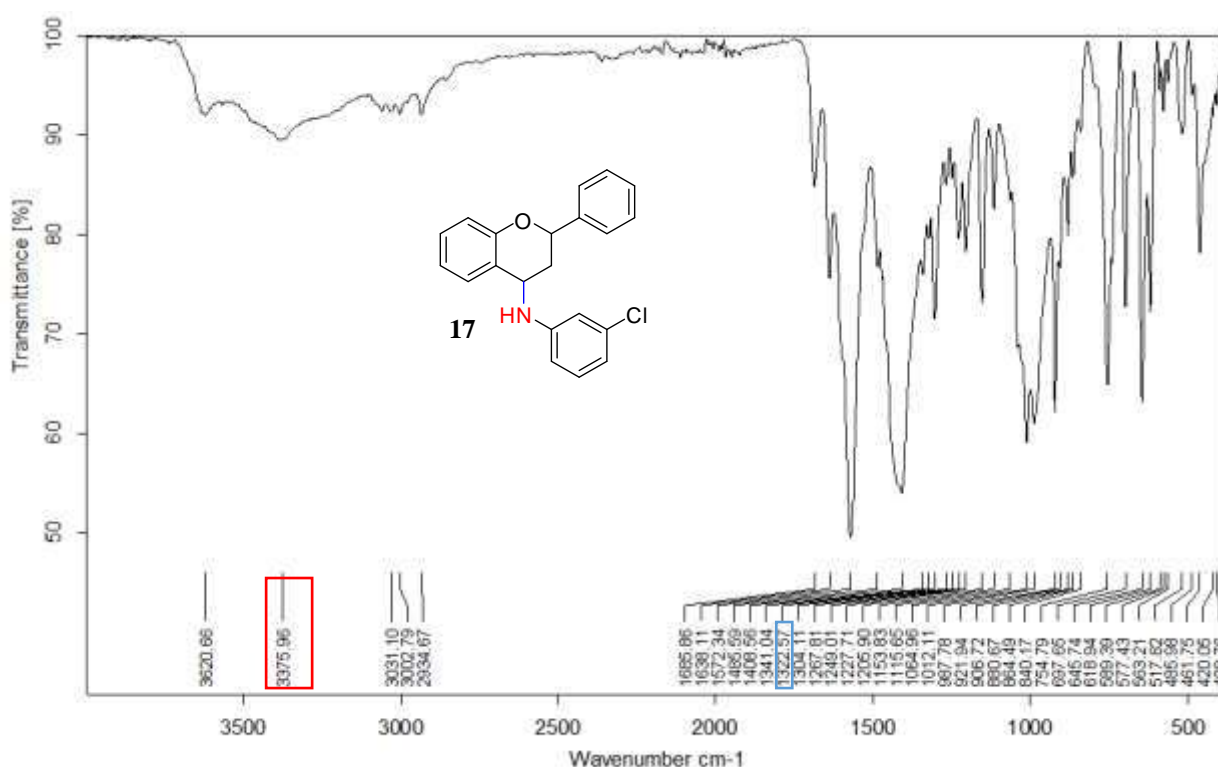
L'analyse spectroscopie RMN<sup>1</sup>H d'imino-flavane **8** montre la présence:



- des signaux déblindés vers 7.48-7.36 ppm correspondant aux C-H aromatiques du cycle B (H-2',3',4',5') et H-5 de cycle A
- Deux pics à 7.07 ppm et 7.03 ppm caractérisés les protons en position 6 et 7 dans le cycle A.
- Un signal vers 7.93 avec une intégration de 1 proton H correspond au H-8
- deux singuliers appariés à 7.95 ppm et à 7.52 ppm correspondent respectivement aux protons aromatiques H-4'' et H-5'' dans le cycle thiazole.
- Un doublet de doublet à 5.50 ppm avec une intégration de 1 proton H correspond au H-2 carbone asymétrique.
- Deux doublets de doublets qui s'intègrent pour 2 protons H apparaissant respectivement à 3.12 et 2.91 ppm correspondent aux H-3<sup>b</sup>, H-3<sup>a</sup> deux protons diastéréoisotopiques.

### III.5.2. Analyse spectrale de *N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan **17**

- Analyse IR



**Figure III.4.** Spectre IR de produit **17** '*N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan'.

La structure de *N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan **17** a été confirmée par l'analyse spectroscopique IR enregistré en KBr, qui montre l'existence d'une bande d'absorption à intensité faible vers  $\nu = 1322 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à la vibration de groupement (C-N) et l'apparition d'une bande

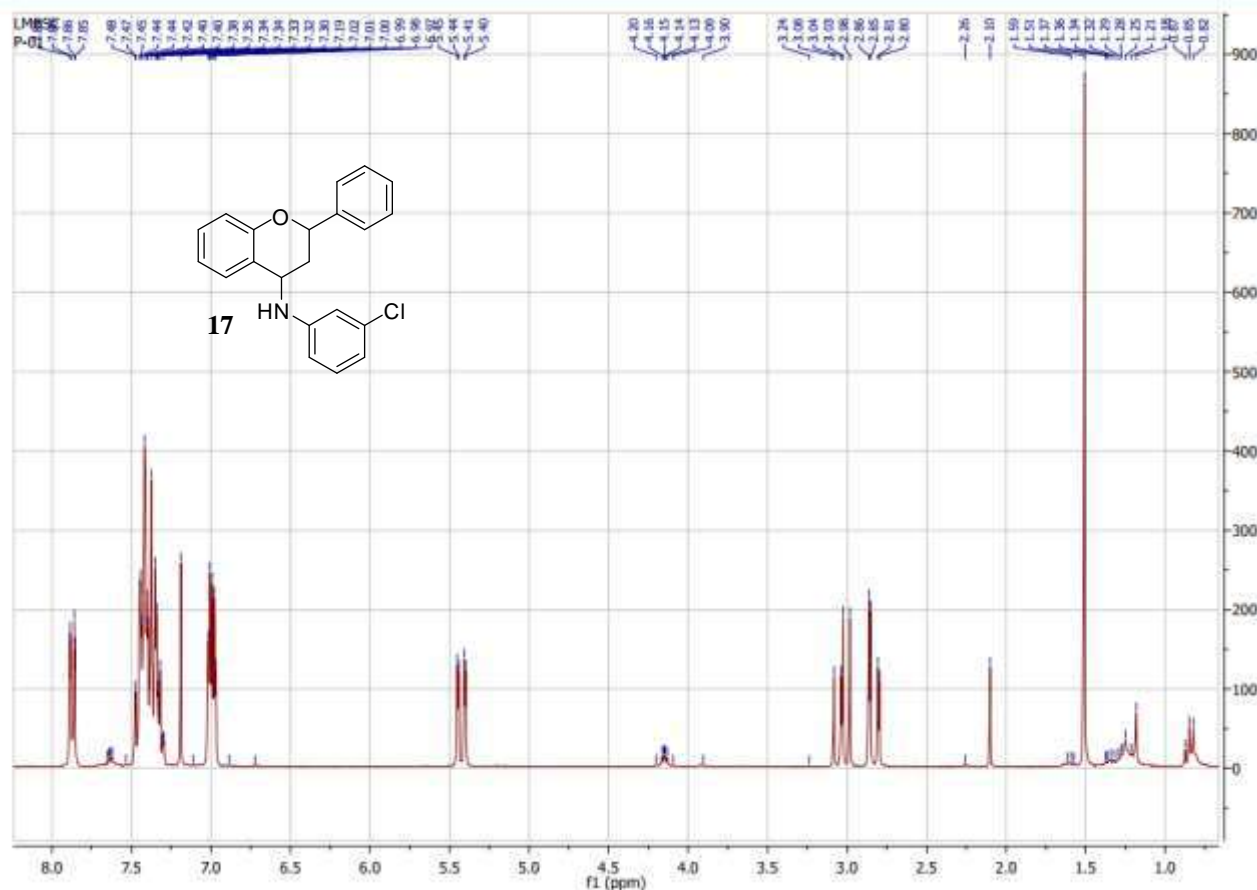


d'absorption attribuée à la vibration de groupement (C=N). La bande d'absorption observée à 3375  $\text{cm}^{-1}$  est correspond à la vibration d'élongation de la liaison (N-H), alors que la vibration d'élongation des groupements fonction (C-O) et (C=C) ont une bande d'absorption large environ 1178  $\text{cm}^{-1}$  et 1572-1407  $\text{cm}^{-1}$ .

- **Analyse UV**

L'étude de spectre UV pour le *N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan **17** montre des bandes d'absorption maximales à 253 nm (Bande II), et à 321 nm (Bande I), avec des déplacements bathochromes.

- **Analyse RMN<sup>1</sup>H**



**Figure III.5.** Spectre RMN<sup>1</sup>H de produit **17**.

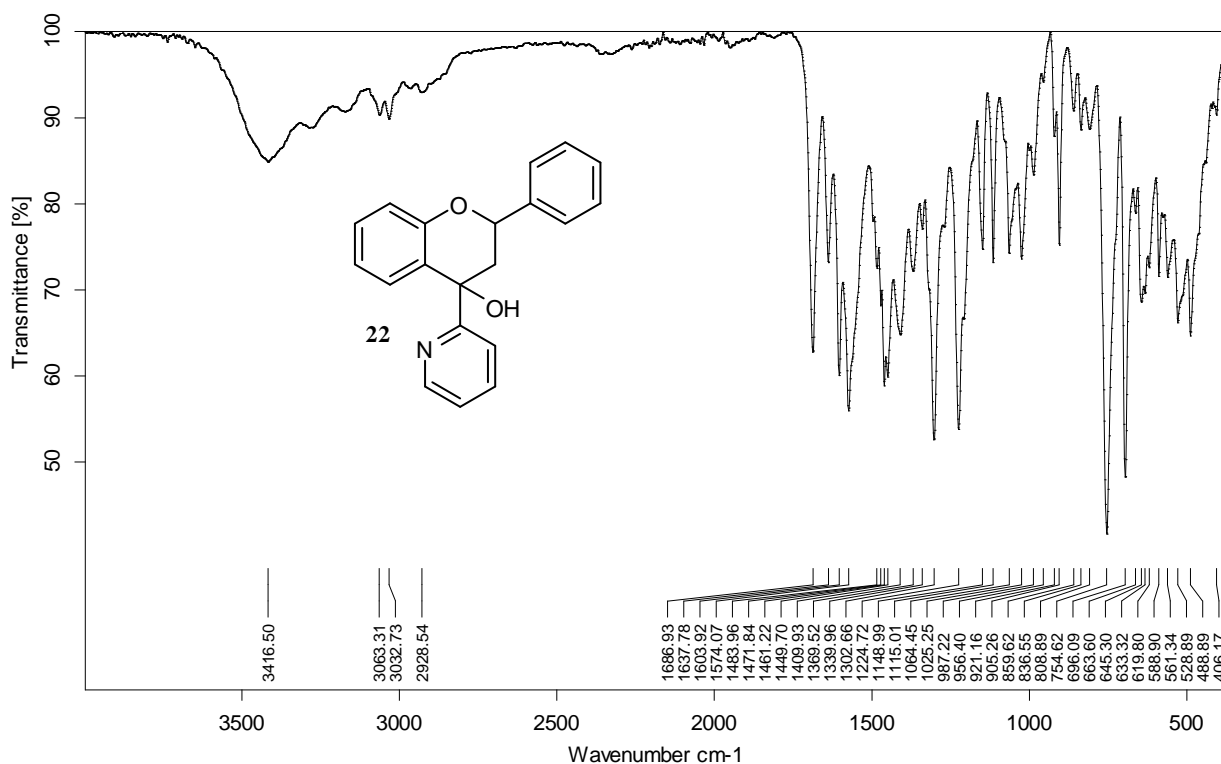


L'analyse spectroscopie RMN<sup>1</sup>H *N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan **17** montre la présence de:

- Des signaux déblindés vers 7.47-7.39 ppm correspondant aux C-H aromatiques du cycle B (H-2', 3', 4', 5', 6').
- Deux pics à 7.09 ppm et 7.01 ppm caractérisés les protons en position 6 et 8 dans le cycle A.
- deux singuliers appartiennent à 6.98 ppm et à 6.99 ppm correspondent respectivement aux protons aromatiques H-3'' et H-6''.
- Un doublet de doublet à 5.45 ppm avec une intégration de 1 proton H correspond au H-2 carbone asymétrique.
- Deux doublets de doublets qui s'intègrent pour 2 protons H apparaissant respectivement à 2.98 et 2.79 ppm correspondent aux H-3<sup>b</sup>, H-3<sup>a</sup> deux protons diastéréoisotopique

### III.5.2. Analyse spectral de 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol **22**

- **Analyse IR**



L'analyse spectrale IR de ce composé montre la présence d'une bande d'absorption due à la vibration des liaisons (C-C) et (C=C) vers  $\nu = 1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $\nu = 1574\text{-}1332 \text{ cm}^{-1}$ , et une bande d'absorption à  $\nu = 1049 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration de la liaison (C-O), alors que la vibration d'élongation de groupements hydroxyle est une bande d'absorption vers  $\nu = 3415 \text{ cm}^{-1}$ .

#### ○ Analyse UV

L'analyse spectroscopique UV du produit 22 enregistré dans le MeOH montre une bande d'absorption maximale apparaît à 252 nm (effet bathochrome) de la bande II, et une autre bande d'absorption à intensité réduite de la bande I à 318 nm (effet hypsochrome).

#### ○ Analyse RMN<sup>1</sup>H

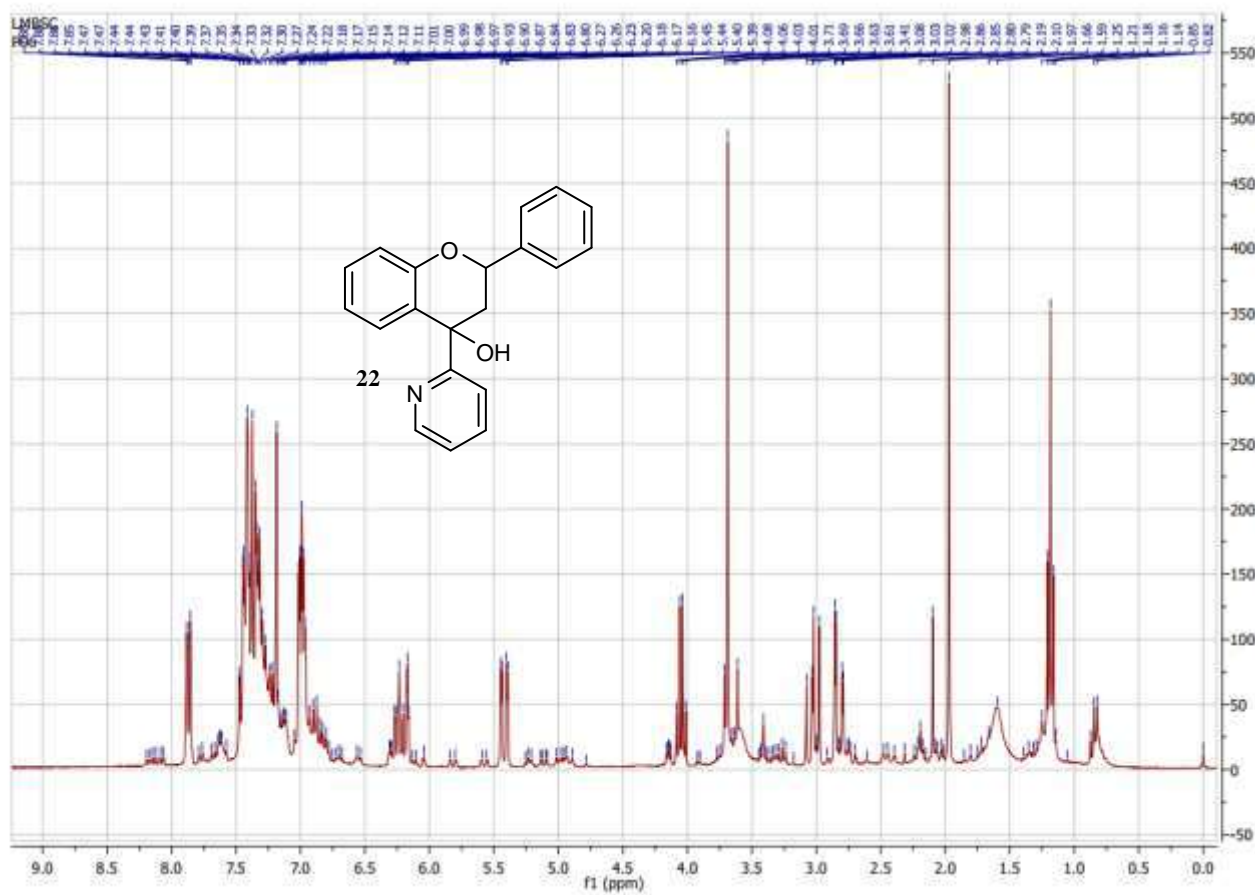


Figure III.7. Spectre RMN<sup>1</sup>H de produit 22.



- Des signaux déblindés vers 7.65-7.57 ppm correspondant aux C-H aromatiques du cycle B (H-2', 3', 4', 5', 6').
- Deux singuliers appariés à 9.0 et 7.68 ppm correspondent respectivement aux protons aromatiques H-3'' et H-5'.
- Un doublet de doublet à 5.45 ppm avec une intégration de 1 proton H correspond au H-2 carbone asymétrique.
- Deux doublets de doublets qui s'intègrent pour 2 protons H apparaissant respectivement à 3.08 et 2.98 ppm correspondent aux H-3<sup>b</sup>, H-3<sup>a</sup> deux protons diastéréoisotopiques.
- Un signal singulier vers 5.45 ppm correspondant aux OH.

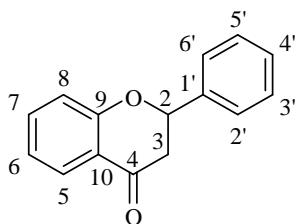
### III.6. Conclusion :

Notre laboratoire s'intéresse à la synthèse de molécules biologiquement actives à partir de molécules naturelles tel que la flavanone. Nous avons choisi dans ce travail la synthèse de dérivés des amines et des imines parce que ce type de synthèse se déroule dans des conditions opératoires simples, à une température ambiante de sorte rapide et efficace avec minimum de temps et avec très bons à excellent rendement.

Nous avons développé de nouvelles synthèses simples à partir de la molécule flavanone. Ces synthèses sont basées sur des réactions de condensations et de réduction en utilisant comme réactifs des amines primaires et la pyridine. Ceci nous a permis de préparer Vingt-et-un nouveaux dérivés de flavanone. Tous les produits obtenus sont analysés et caractérisés par des méthodes spectroscopie IR, UV, RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C. Ces molécules portent un ou deux centres chiraux, ce qui nous a conduit à effectuer en modes chromatographiques ; la séparation d'énantiomères et des diastéréoisomères par CLHP en utilisant les PSCs à base de polysaccharides.



## III.7. Partie expérimental

 Flavanone (1)


**Masse Molaire :** 244.25 g/mole (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>).

**Aspect :** poudre blanche.

**Point de fusion :** 89-90°C.

**UV  $\lambda_{\max}^{\text{DMF}}$  nm:** 228, 324.

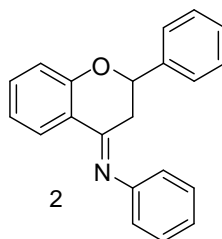
**IR  $\nu_{\max, \text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ :** 1689 (C=O), 1503)-1498(C=C), 1148 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.93(1H, dd, 2.8, 0.8, H-8), 7.53-7.36 (5H, m, H-2',3',4',5'), 7.05(2H, m, H-6, 7), 5.46(1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 3.08(1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>b</sup>), 2.87(1H, dd, 3.2, 13.4, H-3<sup>a</sup>)

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 191.9(C-4), 161.5(C-9), 138.7(C-1'), 136.1(C-8), 128.8(C-3',5'), 127.0(C-6, 4'), 126.1(C-2',6'), 121.6(C-5), 120.9(C-7), 118.1(C-8), 77.3(C-2), 44.6(C-3).

 N-Phényl 4-iminoflavane (2)

Ce produit est préparé à partir de flavanone (0.12 g ; 0.5 mmol) et de l'aniline (0.16 g ; 0.5 mmol). purification de produit par CLC dans le système de solvant acétate d'éthyle cyclohexane (20 : 80 V/V)



**Masse Molaire :** 299.13 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO).

**Rendement :** 66%.

**Aspect :** poudre jaune.

**Point de fusion :** 89-90°C.

**UV  $\lambda_{\max}^{\text{DMF}}$  nm:** 276, 320.

**IR  $\nu_{\max, \text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ :** 3078 (=CH), 1607 (C=N), 1547-1498(C=C), 1142 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.87 (1H, d, 8.02, H-5), 7.83 (1H, dd, 7.3, 8.1, H-7), 6.96 (1H, dd, 8.02, 7.3, H-6), 7.57 (2H, dd, 6.4, 2.8, H-2', 6'), 7.53 (1H, dd 6.4, 6.3, H-4'), 7.53



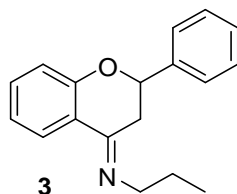


(2H, dd, 6.3, H-3', 5'), 6.81 (1H, d, 8.1, H-8), 7.13 (2H, dd, 6.3, 6.4, H-3'', 5''), 6.75 (1H, dd, 6.3, 6.4, H-4''), 6.63 (2H, dd 6.4, 2.7, H2'', 6''), 5.40 (1H, dd, 3.2, 2.8, H-2), 2.99 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>b</sup>), 2.77 (1H, dd, 3.2, 13.6, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 165.7 (C-4), 163.4 (C-5), 156.7, (C-7), 131.7 (C-6) 131.5 (C-8), 143.0 (C-9), 127.2 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.7 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.4 (C-2), 44.6 (C-3), 146.5, (C-1''), 115.0 (C-2''), 115.0 (C-6''), 118.3 (C-4''), 129.2 (C-3''), 129.2 (C-5'').

### 🚦 N-Propyl imine-4-flavane (3)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et de le propylamine (0.07 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le mélange de solvant acétate d'éthyle cyclohexane (20 : 80 V/V)



**Masse Molaire :** 265.15 g/mole (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO).

**Rendement :** 52%.

**Aspect :** poudre vert.

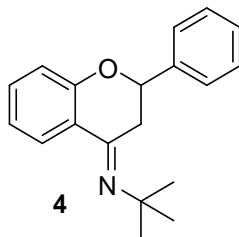
**Point de fusion :** 74-80°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 265, 320.

**IR ν<sub>max</sub>, KBr cm<sup>-1</sup>:** 1607 (C=N), 1547-1519 (C=C), 1142 (C-O).

### 🚦 N-Tertbutyl 4-iminoflavane (4)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et de le tertbutylamine (0.09 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le mélange de solvant acétate d'éthyle cyclohexane (20 : 80 V/V)



**Masse Molaire :** 279.16 g/mole (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO).

**Rendement :** 83%.

**Aspect :** poudre ce couleur verte.

**Point de fusion :** 72-74°C.



UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm: 265, 320.

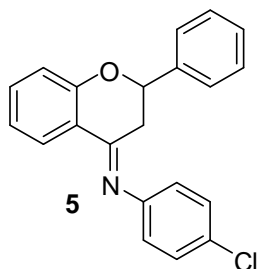
IR  $\nu_{\text{max, KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3084 (=CH), 2960-2860 (CH<sub>3</sub>), 2919 (CH<sub>2</sub>), 1607 (C=N), 1547-1498(C=C), 1105 (C-O),

RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm: 7.87 (1H, d, 8.02, H-5), 7.83 (1H, m, H-7), 6.96 (1H, d, H-6), 7.57 (2H, d, H-2', H-6'), 7.53 (1H, m, H-4'), 7.31 (2H, d, H-3', 5'), 6.81 (1H, d, H-8), 5.40 (1H, dd, 3.2, 2.8, H-2), 2.99 (1H, dd, 2.8, 13.6 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.77 (1H, dd, 3.2, 13.6 Hz, H-3<sup>a</sup>), 1.30 (9H, m, 3CH<sub>3</sub>).

RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm: 165.7 (C-4), 163.4 (C-5), 156.7 (C-7), 131.7 (C-6), 131.5 (C-8), 143.0 (C-9), 127.2 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.7 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.4 (C-2), 52.1 (C-1''), 44.6 (C-3), 30.1(3CH<sub>3</sub>).

#### N-(p-Chloro-Phenyl) 4-iminoflavan (5)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et le 4-Chloroaniline (0.14 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le système acétate d'éthyle/chloroforme (10:90 V/V).



Masse Molaire : 333.5 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>NOCl).

Rendement : 85%.

Aspect : poudre marron foncé

Point de fusion : 72-73°C.

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm: 265, 320.

IR  $\nu_{\text{max, KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3060 (=CH arom), 2918 (CH<sub>2</sub>), 1601 (C=N), 1579-1498 (C=C), 1148 (C-O).

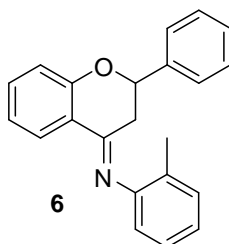
RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm: 7.85 (1H, d, H-5), 7.80 (1H, dd, H-7), 7.58 (2H, dd, 6.1, 2.3, H-2', 6'), 7.54 (1H, dd, 6.2, 6.3, H-4'), 7.33 (2H, dd, 6.1, 6.2, H-3', 5'), 7.01 (1H, dd, 5.9, 6.1 H-5''), 6.69 (1H, d, 6.1, H-2''), 6.55 (1H, d, 2.3, H-3''), 6.43 (1H, dd, 6.2, 2.3, H-6''), 6.96 (1H, dd, 6.1, 6.4, H-6), 6.81 (1H, d, 6.1, H-8), 5.38 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 2.96 (1H, dd, 3.2, 13.6, H<sub>3</sub><sup>b</sup>), 2.76 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>a</sup>).

RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm: 164.6 (C-4), 163.6 (C-5), 156.3 (C-7), 132.0 (C6), 131.7 (C-8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.8 (C-2), 44.4 (C-3), 148.1 (C-1''), 102.1 (C-4''), 159.8 (C-3''), 107.6 (C-2''), 130.4 (C-5''), 104.0 (C-6'').



✚ **N-(2-Me Phenyl) 4-iminoflavan (6)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et le O-Toluidine (0.14 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le système acétate d'éthyle/chloroforme (10 : 90 V/V)



**Masse Molaire :** 313.15 g/mole (C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>NO).

**Rendement :** 60%.

**Aspect :** solide jaune.

**Point de fusion :** 84-85°C.

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 270, 321.

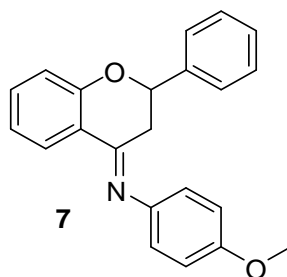
**IR  $\nu_{\text{max, KBr}}$  cm<sup>-1</sup>:** 3086 (=CH arom), 2960 (CH<sub>3</sub>), 1605 (C=N), 1547-1498 (C=C), 1142 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.89-7.80 (3H, m, H-7,8,9), 7.57-7.50 (3H, m, H-3',4',5'), 7.46 (1H, m, H-3''), 7.33-7.14 (3H, m, H-2',6',4''), 6.98 (1H, d, 1.2, H-6), 6.67 (2H, m, H-2'',6''), 5.38 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 2.96 (1H, dd, 3.2, 13.6, H3<sup>b</sup>), 2.76 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>a</sup>), 2.03 (3H, s, 2''-CH<sub>3</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 191.9 (C-9), 163.6 (C-1''), 156.1 (C-4), 145.4 (C-5''), 138.7 (C-1'), 130.7 (C-6, 8), 129.4 (C-3''), 128.3 (C-3',5'), 127.1 (C-4'), 126.8 (C-2',6'), 121.6 (C-4''), 117,1-120.9 (C-8,6,5,2'',6''), 77.3 (C-2), 44.6 (C-3), 29.7 (C-7'').

✚ **N-(m-Methoxy phenyl) 4-iminoflavan (7)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et le o-Anisidine (0.16 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le système acétate d'éthyle/chloroforme (10 : 90 V/V)



**Masse Molaire :** 313.15 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>).

**Rendement :** 88%.

**Aspect :** solide jaune.

**Point de fusion :** 146-147 °C.

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 276, 322.

**IR  $\nu_{\text{max, KBr}}$  cm<sup>-1</sup>:** 3067 (=CH arom), 2960 (CH<sub>3</sub>), 1604 (C=N), 1547-1491 (C=C), 1178, 1142 (C-O).

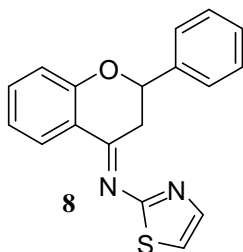


**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz) δ en ppm:** 7.88 (1H, d, H-5), 7.84 (1H, dd, H-7), 7.56 (2H, dd, H-2',6'), 7.53 (1H, dd, H-4'), 7.33 (2H, dd, H-3', H-5'), 6.21 (1H, d, H-2''), 6.35 (1H, dd, H-4''), 7.05 (1H, dd, H-5''), 6.24 (1H, dd, H-6''), 6.96 (1H, dd, H-6), 6.83 (1H, d, H-8), 5.33 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 2.91 (1H, dd, 3.2, 13.6, H<sup>3b</sup>), 2.77 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>a</sup>), 3.71 (3H, s, 3''-O-CH<sub>3</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 164.8 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.6 (C-10), 126.7 (C-1'), 138.9 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.3 (C-2), 44.6 (C-3), 148.1 (C-1''), 101.0 (C-2''), 160.7 (C-3''), 107.9 (C-4''), 130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

#### ✚ N-(2-thiazolyl) 4-iminoflavan (8)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et le 2-Aminothiazol (0.13 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le système acétate d'éthyle/chloroforme (10 : 90 V/V)



**Masse Molaire :** 206.08 g/mole (C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS).

**Rendement :** 15%.

**Aspect :** solide marron.

**Point de fusion :** 98-100°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 273, 316.

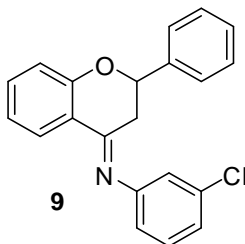
**IR ν<sub>max</sub>, KBr cm<sup>-1</sup>:** 1612, 1578 (C=N), 1577-1497 (C=C), 1148 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz) δ en ppm:** 7.95 (1H, d, 1.6, H-4''), 7.93 (1H, m, H-8), 7.48-7.36 (5H, m, H-5, 2',3',4',5'), 7.52 (1H, d, 1.6, H-5''), 7.07-7.03 (2H, m, H-6,7), 5.50 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 3.12 (1H, dd, 2.8, 10.4, H-3<sup>b</sup>), 2.91 (1H, dd, 3.2, 10.8, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 192.0 (C-4), 161.6 (C-2'', C-10), 138.7 (C-1''), 136,2 (C-9), 128,8-126,2 (C-2',3',4',5',6',6, 8), 121-120 (C-7,5), 118(C-5''), 79.6 (C-3), 44.7(C-2).

#### ✚ N-(m-Chloro-Phenyl) 4-iminoflavan (9)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g ; 1.3 mmol) et le 3-Chloroaniline (0.17 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par CLC dans le système acétate d'éthyle/chloroforme (10 : 90 V/V)



**Masse Molaire :** 304,5 g/mole (C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NCl)

**Rendement :** 75%.

**Aspect :** solide jaune.

**Point de fusion :** 76-77 °C.

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 274, 320.

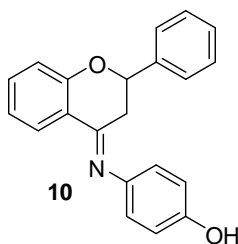
**IR  $\nu_{\text{max}}$ , KBr  $\text{cm}^{-1}$ :** 3084 (=CH arom), 2960-2960 (CH, CH<sub>2</sub>), 1606 (C=N), 1547-1498 (C=C), 1153 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.85 (1H, d, H-5), 7.80 (1H, dd, H-7), 7.58 (2H, dd, 6.1, 2.3, H-2', H-6'), 7.54 (1H, dd, 6.2, 6.3, H-4'), 7.33 (2H, dd, 6.1, 6.2, H-3', H-5'), 7.01 (1H, dd, 5.9, 6.1 H-5''), 6.69 (1H, d, 6.1, H-4''), 6.55 (1H, d, 2.3, H-2''), 6.43 (1H, dd, 6.2, 2.3H-6''), 6.96 (1H, dd, 6.1, 6.4, H-6), 6.81 (1H, d, 6.1, H-8), 5.38 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 2.96 (1H, dd, 3.2, 13.6, H<sub>3</sub><sup>b</sup>), 2.76 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 164.6 (C-4), 163.6 (C-5), 156.3 (C-7), 132.01 (C-6), 131.7 (C-8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.8 (C-2), 44.4 (C-3), 148.17 (C-1''), 102.1 (C-2''), 159.85 (C-3''), 107.6 (C-4''), 130.4 (C-5''), 104.01 (C-6'').

#### N-( Hydroxyl-Phenyl) 4-iminoflavan (10)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g; 1.3 mmol) et le 4-Aminophenol (0.14 g; 1.3 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 315.13 g/mole (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO).

**Rendement :** 70%.

**Aspect :** poudre noire.

**Point de fusion :** 138-139°C.

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 260, 314.

**IR  $\nu_{\text{max}}$ , KBr  $\text{cm}^{-1}$ :** 3412(OH), 1612 (C=N), 1547-1498 (C=C), 1093 (C-O).

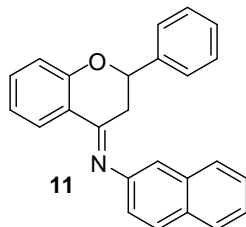
**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 12.80 (1H, s, 4''-OH), 7.89 (1H, m, H-8), 7.42( 6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6', 7), 7.04 (1H, m, H-6), 6.98 (4H, m, H-2'', 3'', 5'', 6''), 5.41 (1H, dd, 2.5, 13.2, H-2), 3.05 (1H, dd, 3.6, 2.8, H-3<sup>b</sup>), 2.85 (1H, dd, 3.6, 2.8, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 165.7 (C-4), 163.4 (C-4''), 156.7 (C-7), 131.7 (C-6) 131.5 (C-8), 143.01 (C-9), 127.2 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.7 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.4 (C-2), 44.6 (C-3), 146.5 (C-1''), 115.0 (C-2''), 115.0 (C-6''), 129.2 (C-3''), 129.2 (C-5'').



✚ **N-(2-Naphtyl) 4-iminoflavan (11)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g; 1.3 mmol) et le 1-Naphtylamine (0.19 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 315.13 g/mole (C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>NO).

**Rendement :** 22%.

**Aspect :** poudre jaune

**Point de fusion :** 50-53°C.

**UV  $\lambda_{\max}^{\text{DMF}}$  nm:** 276, 325.

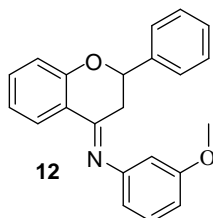
**IR  $\nu_{\max, \text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ :** 3088(=CH), 2926-2856 (CH arom) 1611 (C=N), 1554-1498 (C=C), 1051 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.96 (1H, d, 6.3, H-5), 7.93 (1H, dd, 6.4, 6.3, H-7), 7.51 (2H, dd, 6.1, 2.7, H-6', 2'), 7.48 (1H, dd, 5.9, 6.1, H-4') 7.37 (2H, dd, 6.1, 6.1, H-3', 5'), 7.13 (1H, dd, 6.3, 6.4, H-6), 7.06 (1H, d, 6.3, H-8), 5.41 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 3.26 (1H, dd, 2.8, 10.4, H-3<sup>b</sup>), 2.93 (1H, dd, 3.2, 10.8, H-3<sup>a</sup>), 6.79 (1H, d, 2.3, H-1''), 6.75 (1H, dd, 2.3, 8.4, H-3''), 7.51 (d, 8.4 Hz, H-4''), 7.55 (1H, d, 8.25, H-5''), 7.09 (1H, dd, 8.4, 6.9, H-6''), 7.23 (1H, dd, 6.9, 8.55, H-7''), 7.50 (1H, d, 8.55, H-8)

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 165.7 (C-4), 163.3 (C-5), 156.1, (C-7), 132.7 (C-6) 132.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.5 (C-10), 126.7 (C-1'), 138.85 (C-2'), 138.1 (C-6'), 128.7 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 111.57 (C-1''), 140.76 (C-2''), 119.95 (C-3''), 129.04 (C-4''), 127.58 (C-5''), 123.40 (C-6''), 126.35 (C-7''), 126.43 (C-8), 134.57 (C-9), 129.1, (C-10).

✚ **N-(m-Methoxy phenyl) 4-iminoflavan (12)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g; 1.3 mmol) et le *p*-Anisidine (0.18 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 313.13 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>).

**Rendement :** 88%.

**Aspect :** poudre jaune

**Point de fusion :** 50-53°C.



UV  $\lambda_{\max}^{\text{DMF}}$  nm: 276, 322.

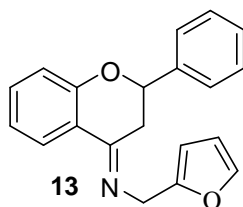
IR  $\nu_{\max, \text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3067(=CH), 2927-2853 (CH arom) 1609 (C=N), 1553-1491 (C=C), 1178, 1077 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.88 (1H, d, H-5), 7.84 (1H, dd, H-7), 7.56 (2H, dd, H-2', H-6'), 7.53 (1H, dd, H-4'), 7.33 (2H, dd, H-3', H-5'), 6.21 (1H, 1d, H-2''), 6.35 (1H, dd, H-4''), 7.05 (1H, dd, H-5''), 6.24 (1H, dd, H-6''), 6.96 (1H, dd, H-6), 6.83 (1H, d, H-8), 5.33 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 2.91 (1H, dd, 3.2, 13.6, H<sup>3b</sup>), 2.77 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>a</sup>), 3.71 (3H, s, 3''-O-CH<sub>3</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 164.8 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.6 (C-10), 126.7 (C-1'), 138.9 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.3 (C-2), 44.6 (C-3), 148.1 (C-1''), 101.0 (C-2''), 160.7 (C-3''), 107.9 (C-4''), 130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

### N-Furfuryl 4-iminoflavan (13)

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.3 g; 1.3 mmol) et le Fufuralamine (0.12 g ; 1.3 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 313.13 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>).

**Rendement :** 98%.

**Aspect :** poudre marron

**Point de fusion :** 100-102°C.

UV  $\lambda_{\max}^{\text{DMF}}$  nm: 271, 315.

IR  $\nu_{\max, \text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$ : 3087(=CH ar), 2926-2851 (CH, CH<sub>2</sub>), 1609 (C=N), 1554-1491 (C=C), 1157, 1215 (C-O).

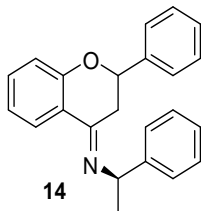
**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.93 (1H, d, 6.3, H-5), 7.93 (1H, dd, 6.1, 6.2, H-7), 7.50 (2H, dd, 6.3, 2.6, H-2', H-6'), 7.49 (1H, dd, 6.1, 5.9, H-4'), 7.38 (2H, dd, 6.1, 6.2, H-3', 5'), 7.10 (1H, dd, 6.2, 6.3, H-6), 7.06 (1H, d, 6.1, H-8), 5.42 (1H, dd, 2.8, 3.2, H-2), 3.16 (1H, dd, 2.8, 10.4, H-3<sup>b</sup>), 2.89 (1H, dd, 3.2, 10.8, H-3<sup>a</sup>), 7.69 (1H, d, 6.3, H-3''), 6.60 (1H, dd, 6.7, 6.3 H-4''), 7.26 (1H, d, 6.7, H-5''), 3.39 (s, 1''-CH<sub>2</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 165.7 (C-4), 163.3 (C-5), 156.12 (C-7), 132.7 (C-6) 132.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.5 (C-10), 126.7 (C-1'), 138.85 (C-2'), 138.1 (C-6'), 128.7 (C-3'), 128.4 (C-5') 129.3 (C-4'), 111.5(C-1''), 140.7 (C-2''), 119.95 (C-3''), 129.04 (C-4''), 127.5 (C-5''), 123.4 (C-6''), 126.3 (C-7''), 126.4 (C-8), 134.5 (C-9), 129.1 (C-10), 78.0 (C-2), 43.6 (C-3), 152.1 (C-2''), 105.5 (C-3''), 110.3 (C-4''), 140.8 (C-5''), 17.3 (C-1'').



✚ **N-(S)- (-)- $\alpha$ -Methylbenzyl 4-iminoflavane (14)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.2 g ; 0.8 mmol) et de le (S)- (-)- $\alpha$ -Methylbenzylamine (0.10 g ; 0.8 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 327.16 g/mole ( $C_{23}H_{21}NO$ ).

**Rendement :** 72%.

**Aspect :** Poudre marron jaunâtre.

**Point de fusion :** 56-60°C.

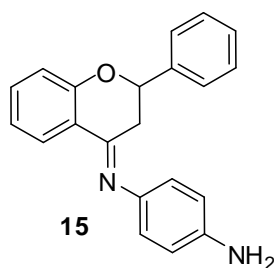
**UV  $\lambda_{max}^{DMF}$  nm:** 276, 325.

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.93(1H, d, 1.6, H-8), 7.51-7.26(10H, m, H-7,2',3',4',5',6',2'',3'',5'',6''), 7.13(1H, d, H-5), 6.85(1H, d, H-6), 4.16(1H, m, H-7''), 3.51(1H, dd, H-2), 3.13(1H, dd, 13.2, 3.6, H-3<sup>b</sup>), 2.91(1H, dd, 13.2, 2.8, H-3<sup>a</sup>), 1.26(3H, m, CH<sub>3</sub>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 161.5(C-4), 159.5(C-10), 144.1(C-1''), 138.7(C-1'), 132.2-132.6(C-6,8), 129.4-128.1(C-3',5',3'',5''), 127.3-127.0(C-2',4',6'), 126.5-126.0(C-2'',6''), 125.7(C-4''), 124.9(C-5), 121.4(C-7), 118.1(C-9), 77.3(C-2), 65.8(C-7''), 30.9(C-3), 25.3(7''-CH<sub>3</sub>).

✚ **Nl-(2-phenylchroman-4-ylidene)benzene-1,4-diamine (15)**

Ce produit est préparé à partir de la flavanone (0.2 g ; 0.8 mmol) et de le P-Phenylenediamine (0.08 g ; 0.8 mmol). Purification de produit par cristallisation.



**Masse Molaire :** 315.13 g/mole ( $C_{21}H_{19}N_2O$ ).

**Rendement :** 87%.

**Aspect :** Poudre marron jaunâtre.

**Point de fusion :** 80-82°C.

**UV  $\lambda_{max}^{DMF}$  nm:** 276, 350.

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.58 (1H, dd, 7.3, 8.1, H-7), 7.41 (1H, dd, 8.02, 7.3, H-6), 7.38 (5H, m, H-2',3',4',5', 6'), 7.33 (2H, dd 6.4, 2.7, H2'', 6''), 7.26 (1H, d, 8.1, H-8), 6.98 (1H,

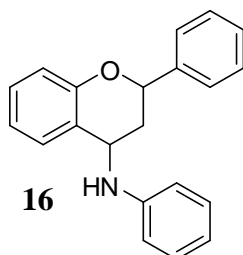




d, 8.02, H-5), 6.63 (2H, dd, 6.3, 6.4, H-3'', 5''), 5.32 (2H, s, 4''-NH<sub>2</sub>), 5.0 (1H, dd, 3.2, 2.8, H-2), 2.20 (1H, dd, 2.8, 13.6, H-3<sup>b</sup>), 1.9 (1H, dd, 3.2, 13.6, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 157.2 (C-9), 150.8 (C-4), 146.9 (C-4''), 141.3 (C-1''), 138.3 (C-1'), 131.6 (C-5), 131.4 (C-7), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5'), 127.6 (C-4'), 127.7 (C-2'), 127.1 (C-6'), 123.0 (C-2''), 123.0 (C-6''), 120.4 (C-6), 117.3 (C-10), 114.8 (C-3''), 114.8 (C-5''). 114.5 (C-8), 83.4 (C-2), 38.8 (C-3),

#### N-phényle-amino-flavane



**Masse Molaire :** 299.13 g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO).

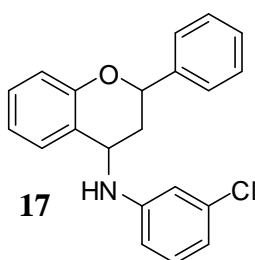
**Rendement :** 18%.

**Aspect :** poudre jaune.

**Point de fusion :** 77-78°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 253, 321.

#### N-(*m*-Chloro-Phenyl) 4-aminoflavan (17)



**Masse Molaire :** 127.58 g/mole (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>ClN).

**Rendement :** 30%.

**Aspect :** poudre jaune.

**Point de fusion :** 78-79°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 253, 321.

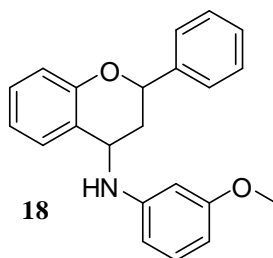
**IR ν<sub>max, KBr</sub> cm<sup>-1</sup>:** 3375 (N-H), 3067 (=CH ar), 2935 (C-H), 2853, 3002 (CH, CH<sub>2</sub>), 1572-1407(C=C), 1322 (C-N), 1178 (C-O), 697 (CH ar).



**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz) δ en ppm:** 7.39-7.47 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 7.09 (1H, d, H-6), 7.01(1H, d, 8-H), 6.98(2H, m, H-3'',6''), 5.45 (1H, dd, 2.9, 5.2, H-2), 4.03 (1H, m, H-1'), 3.08 (1H, m, 7.3, H-4), 2.98 (1H, dd, 5.2,7.3, 13.2, H-3<sup>b</sup>), 2.79 (1H, m, 2.9, 7.3, 13.2, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 161.4 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9),127.0 (C-10), 126.7 (C-1'), 118.1 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 118.14 (C-4'), 77.3 (C-2), 79.2 (C-3), 126.1 (C-1''), 101.00 (C-2''), 128.85 (C-3''), 107.9 (C-4''),130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

 **N-(*m*-Methoxyphenyl) 4-aminoflavan (18)**



**Masse Molaire :** 123.16g/mole (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO).

**Rendement :** 53%.

**Aspect :** poudre jaune pale.

**Point de fusion :** 76-77°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 252, 319.

**IR ν<sub>max, KBr</sub> cm<sup>-1</sup>:** 3375 (N-H), 3050 (=CH ar), 2945 (C-H), 2863, 2980 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1570-1480(C=C), 1188, 1120 (C-O), 698 (CH ar).

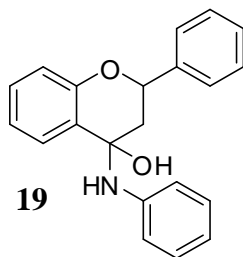
**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz) δ en ppm:** 7.39-7.47 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 5.45 (1H, dd, J=2.9 & 5.2Hz, H-2), 4.03 (1H, m, H-1'), 3.08 (1H, m, J= 7.3, H-4), 3.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.98 (1H, dd, J=5.2,7.3, 13.2 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.79 (1H, m, J=2.9, 7.3, 13.2 Hz, H-3<sup>a</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 161.4 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9),127.0 (C-10), 126.7 (C-1'), 118.1 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 118.14 (C-4'), 77.3 (C-2), 79.2 (C-3), 126.1 (C-1''), 101.00 (C-2''), 128.85 (C-3''), 107.9 (C-4''),130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').



🚦 **2-phenyl-4-(phenylamino) chroman-4-ol(19)**

Ce produit est préparé à partir de flavanone (0.15g ; 0.6mmol) et de l'aniline (0.20g ; 0.6mmol).



**Masse Molaire :** 301g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO).

**Rendement :** 96%.

**Aspect :** poudre blanc

**Point de fusion :** 86-87 °C

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 247, 321.

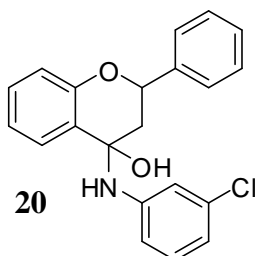
**IR  $\nu_{\text{max}}$ , KBr cm<sup>-1</sup>:** 3416 (OH), 3063 (N-H), 3078 (=CH arom), 1547–1409 (C=C), 1369 (C-N), 1115 (C-O).

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.27-7.30 (2H, m, H-4'',6''), 6.87-6.98 (2H, d, H-3'',7'), 6.79 (1H, s, NH), 5.39 (1H, dd, 4.9, 5.2, H-2), 3.08 (1H, dd, 4.9, 24.6 Hz, H-3<sup>a</sup>), 2.98 (1H, dd, 5.2, 24.6 H3<sup>b</sup>), 2.06 (1H, s, OH).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 191.9 (C-4), 163.4 (C-5), 156.7, (C-7), 120.9 (C-6) 131.5 (C-8), 127.0 (C-9), 126.1 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 76.5 (C-2), 44.6 (C-3), 146.5, (C-1''), 128.7 (C-2''), 128.7(C-6''), 118.3 (C-4''), 118.1 (C-3''), 121.6 (C-5'').

🚦 **4-(3-chlorophenylamino)-2-phényl chroman-4-ol (20) :**

Ce produit est préparé à partir d'une réaction entre la flavanone (0.3g ; 1.3mmol) et de 3-chloroaniline (0.44g ; 1.3mmol),



**Masse Molaire :** 335.5g/mole (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>OCIN).



**Rendement :** 98 %.

**Aspect :** marron (huileuse).

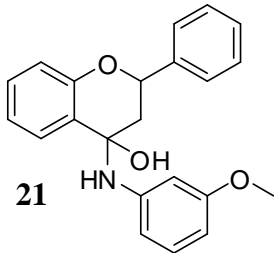
**Point de fusion :** 131-132°C.

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 250 , 320.

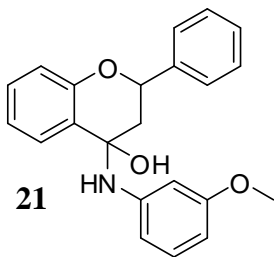
**IR  $\nu_{\text{max, KBr}} \text{ cm}^{-1}$ :** 3412(OH), 3285(N-H), 3084 (=CH arom), 1555-1480(C=C), 1050 (C-O),

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.22 (1H,m, H-6''), 7.02 (1H, d, H-5''), 6.92 (1H, d, H-7''), 5.45 (1H, s, NH), 5.39 (1H, dd, 2.8, 7.8Hz, H-2) ,3.08 (1H, dd, 2.8, 13.2, , H-3<sup>a</sup>), 2.98 (1H, dd, 7.8, 13.2, H<sup>3</sup><sup>b</sup>), 2.06 (1H, s ,OH)

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  en ppm:** 79.6 (C-4), 118.8 (C-5), 156.3 (C-7), 128.6 (C-6), 131.7 (C-8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.0 (C-2), 77.4(C-3), 136.4 (C-1''), 102.1 (C-2''), 118.8 (C-3''), 107.6 (C-4''), 128.6 (C-5''), 104.0 (C-6'').

 **4-(3-methoxyphenylamino) 2-phényl chroman-4-ol (21)**

Ce produit est préparé à partir de flavanone (0.3g ; 1.3mmol) et de *m*-anisidine (0.16g ; 1.3mmol).



**Masse Molaire :** 331g/mole (C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>).

**Rendement :** 75%

**Aspect :** pâte marron.

**Point de fusion :** 111-112°C

**UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{DMF}}$  nm:** 252, 318.

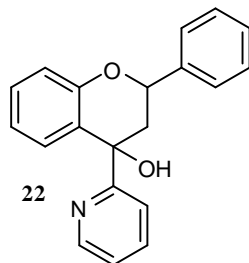
**IR  $\nu_{\text{max, KBr}} \text{ cm}^{-1}$ :** 3409(OH), 3282(N-H), 3067 (=CH ar), 2980 (CH<sub>3</sub>), 2935 (CH<sub>2</sub>), 2853 (CH), 1572-1460(C=C), 1178(C-O),

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz)  $\delta$  en ppm:** 7.33 (1H, d, H-5''), 7.18 (1H, m, H-6''), 6.27(1H, d, H-3''), 6.23 (1H, s, NH), 5.45 (1H, s, OH), 5.39 (1H, dd, 7.2, 2.9, H-2), 3.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.08 (1H, dd, 7.2, 13.2, H-3<sup>b</sup>), 2.98 (1H, dd, 2.9, 13.2, H<sup>3</sup><sup>a</sup>).



**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 191.6 (C-4), 163.5 (C-5), 101.1 (C-7), 76.5 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.0 (C-10), 126.7 (C-1'), 118.1 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 118.14 (C-4'), 44.6 (C-3), 118.1 (C-1''), 101.0 (C-2''), 101.1 (C-3''), 107.9 (C-4''), 130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

**2-phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol (22)**



**Masse Molaire :** 123.16g/mole (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO).

**Rendement :** 99%.

**Aspect :** poudre orange.

**Point de fusion :** 118-119°C.

**UV λ<sub>max</sub><sup>DMF</sup> nm:** 252, 318.

**IR ν<sub>max</sub>, KBr cm<sup>-1</sup>:** 3415(OH), 2925 (CH<sub>2</sub>), 2846 (CH), 1636 (C=N), 1574-1460 (C=C), 1049(C-O).

**RMN<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub> J3, J2 Hz) δ en ppm:** 9,0 (1H,d, H3''), 7.68 (1H, m, H-5''), 7.65-7.57 (6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6', 6''), 7.25 (1H, m, H-5), 6.19 (3H, m, H-6, 7, 8), 5.45 (1H, s, OH), 5.39 (1H, dd, J=2.8 & 7.1Hz, H-2), 3.08 (1H, dd, J=2.8 & 13.2Hz, H-3<sup>a</sup>), 2.98 (1H, dd, J=7.1 & 13.2Hz, H3<sup>b</sup>).

**RMN<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ en ppm:** 145.45(C-1''), 138.7 (C-3''), 136.37 (C-6''), 130 (C-5''), 129 (C-9), 128 (C-6', 2', 5''), 126.2 (C-7), 121.6 (C-4''), 120,9 (C-6), 118.1 (C-8), 77 .44 (C-4), 76.98 (C-2), 76.55 (C-3).





---

## Chapitre 04

# La Séparation Chirale des Dérivés de Flavanones par CLHP

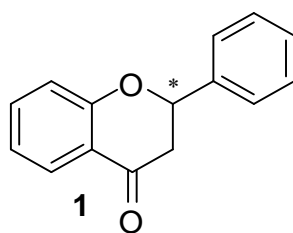
---



IV. Introduction .....	68
IV.1. Objectif.....	68
IV.2. Chromatographie liquide à haute performance .....	69
IV.3. Conception générale d'un appareil de CLHP.....	69
IV.4. Présentation du système CLHP SHIMADZU LC 20-A.....	70
IV.5. Identification des énantiomères.....	71
IV.6. Calculs des facteurs chromatographiques .....	71
IV.7. Matériel et méthode.....	73
IV.7.1. Appareillage .....	73
IV.7.2. La phase mobile .....	74
IV.7.3. Les phases stationnaires chirales.....	74
IV.7.4. Conditions chromatographiques.....	76
IV.7.5. Principes de fonctionnement de CLHP .....	76
IV.8. Résultat et discussion .....	76
IV.8.1. La séparation chirale des 4-iminoflavanes 2-15.....	76
a) L'étude de la séparation en mode phase organique polaire (100% alcool) .....	76
b) L'étude de la séparation chirale en mode phase normale.....	80
IV.8.2. La séparation des dérivés de flavanone 16-22.....	85
IV.8.3. Mécanisme de résolution.....	88
IV. 9. Conclusion.....	89

## IV. Introduction

En flavanones, Le C2 soutient un atome d'hydrogène en plus du cycle phénolique B, et deux atomes d'hydrogène en C-3. Deux formes stéréoisomériques de chaque structure de flavanone sont possibles, puisque le C2 est un centre d'asymétrie. **Figure IV.1** En conséquence, le cycle B peut être dans la configuration (2S) - ou (2R). La grande majorité des flavanones isolés à partir des plantes sont lévogyre ou (-) - (2S)- flavanones, parce que la réaction enzymatique catalysant la conversion des chalcones en flavanones est stéréospécifique [41, 113].



**Figure IV.1** : Structure de base des flavanones.

L'obtention de ces composés présente un intérêt clinique majeur vu leur activité athérosclérose, anti-inflammatoire, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale ...etc [28, 114, 115]. Bien que l'analyse des énantiomères et des épimères des flavanones chirales a été effectuée pendant plus de 20 ans et malgré les avantages thérapeutiques potentiel des flavanones chirales et l'importance de la stéréosélectivité dans l'activité pharmacologique, l'analyse chirale des flavanones reste un défi dans les sciences chimiques, pharmaceutiques, et médicales.

### IV.1. Objectif

L'objectif de cette partie de travail repose sur l'étude de la séparation chirale des dérivés 4-iminoflavanes, 4-aminoflavanes et 4-hydroxyflavanes par CLHP,

Ces molécules portent un ou deux centre chiral, ce qui nous a conduit à effectuer en deux modes chromatographiques : en phase normal et en phase organique polaire; la séparation d'énantiomères et des diastéréoisomères est fait par CLHP en utilisant les PSCs à base de polysaccharides. Nous avons ensuite optimiser tous les conditions analytiques.



## IV.2. Chromatographie liquide à haute performance

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP [11, 36, 118].

Notre travail expérimental nous a permis dans un premier lieu de comprendre les principes de fonctionnement des modules constituant un système CLHP Shimadzu 20-A disponible dans notre laboratoire.

## IV.3. Conception générale d'un appareil de CLHP

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou polyether-etherketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars) [11, 36, 116].

L'écoulement des faibles débits obéit à la loi de Poiseuille. La vitesse de la phase mobile est maximum au centre des canalisations et nulle au contact des parois. Une dispersion des composés se produit donc inévitablement. Pour améliorer les séparations on fait donc en sorte que le volume de phase mobile hors-colonne soit le plus réduit possible (10 % du volume mort de la colonne) [116-118].

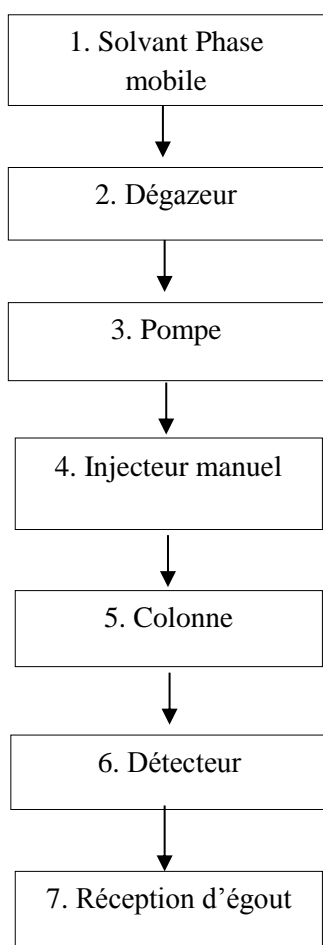




#### IV.4. Présentation du système CLHP SHIMADZU LC 20-A

Depuis plus de 30 ans, SHIMADZU développe et commercialise des systèmes HPLC réputés pour leur précision et leur robustesse inégalées. SHIMADZU propose un large choix de modules et de solutions :

Les modules LC série (LC-20A) sont utilisés avec les systèmes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) de Shimadzu étudiés pour donner des analyses de haute précision et de grande sensibilité [11].



**Figure IV.2.** Système CLHP SHIMADZU LC-20A isocratique

1. La phase mobile est extraite de la bouteille réservoir et pompée dans les tubulures.
2. Le dégazeur élimine l'air dissous de la phase mobile, empêchant la formation de bulles d'air et par conséquent, toute élévation, dérive ou autre irrégularité de la ligne de base causée par l'air dissous.
3. La pompe envoie la phase mobile dans l'injecteur manuel, la colonne et le détecteur (dans cet ordre) et finalement dans le récipient d'égout.



4. Des échantillons sont injectés dans le système par l'injecteur manuel avec une seringue.
5. La colonne contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.
6. Un détecteur UV, ( $\lambda = 290$  nm pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule 12  $\mu$ L il permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser.
7. La phase mobile en provenance du détecteur s'écoule dans le récipient d'égout

#### IV.5. Identification des énantiomères

Les énantiomères résolus sont identifiés en comparant leurs temps de rétention à ceux des différents énantiomères optiquement purs dans les conditions identiques. Si les énantiomères actifs optiquement purs ne sont pas disponibles, alors l'identification des énantiomères résolus devrait être effectuée par le détecteur optique (dichroïsme circulaire)[36].

#### IV.6. Calculs des facteurs chromatographiques

Après réalisation de la séparation chirale complète, le calcul des facteurs chromatographiques est très essentiel. Les facteurs les plus importants à calculer sont le facteur de rétention ( $k'$ ), le facteur de séparation ( $\alpha$ ), et le facteur de résolution ( $R_s$ ) et les surfaces des pics pour les énantiomères résolus. Les valeurs de ces paramètres peuvent être calculées par logiciel d'exploitation (Shimadzu® LC solution) [11].

##### a) Temps de rétention

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention  $t_R$ , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal  $t_R$  est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps  $t_M$ , appelé temps mort (désigné également par  $t_0$ ) [104, 118]

##### b) Facteur de rétention k (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale  $m_T$  est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités :  $m_M$  dans la phase mobile et  $m_S$  dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé facteur de rétention, est indépendant de  $m_T$  [104, 118].



$$k' = \frac{m_s}{m_M} = \frac{C_s \cdot V_s}{C_M \cdot V_M} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Le facteur de rétention, encore appelé facteur de capacité  $k$ , est un paramètre très important de la chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Pour cette raison il est quelque fois désigné par  $k'$  au lieu de  $k$ . Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (capacité). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que  $k$  ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés [116, 117].

### c) Facteur de séparation (sélectivité)

Le facteur de séparation  $\alpha$  permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme. Il ne peut, par définition, être inférieur à 1. Il est défini par la relation suivante [117]:

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre.  $\alpha$  à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. le facteur de séparation est d'environ 1,5 [104, 116, 118].

### d) L'efficacité de colonne

Le nombre de plateaux théoriques est une mesure quantitative et théorique de la performance d'une colonne chromatographique. Pour chaque étape d'optimisation, le nombre de plateaux théoriques est exprimé par la formule suivante :

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

$w_{1/2}$  : largeur à mi-hauteur [118].



### e) Facteur de résolution

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution  $R_s$  qui est calculé à partir du chromatogramme.

La résolution  $R_s$  entre les pics 1 et 2, Cette valeur mesure la qualité de séparation et d'absence de recouvrement entre les 2 pics considérés. C'est une fonction des trois caractéristiques (efficacité, sélectivité et rétention), dont l'expression est [118]:

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2} = \frac{k}{k + 1} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{\sqrt{N}}{4}$$

## IV.7. Matériel et méthode

Dans notre travail nous avons étudié la séparation des énantiomères et des diastéréoisomères de flavanone et les quatorze dérivés des flavonanes par CLHP chirale en utilisant six colonnes chirales à base de polysaccharides (cellulose et amylose) et l'étude de la séparation chirale de flavanone et les sept dérivées de flavanone par CLHP. En utilisant deux colonnes chirales à base de polysaccharides (cellulose) chiralecel<sup>®</sup>O-DH et chiralecel<sup>®</sup>OJ.

### IV.7.1. Appareillage

Les études sont réalisées sur un poste de CLHP Shimadzu<sup>®</sup> 20 A, les différents modules qui composent cette installation sont :

- ✓ Une pompe Shimadzu<sup>®</sup> LC 20 AD (Kyoto, Japan).
- ✓ Un dégazeur Shimadzu<sup>®</sup> DGU 20 A5 (Kyoto, Japan).
- ✓ Un système d'injection manuel, vanne d'injection Rheodyne 1907 à boucle de 20  $\mu$ L.
- ✓ Seringue d'injection Hamilton 25  $\mu$ L.
- ✓ Un détecteur UV Shimadzu<sup>®</sup> SPD-20 A (Kyoto, Japan), ( $\lambda = 254$  nm pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule 12  $\mu$ L.
- ✓ Un système de commande et de contrôle (Shimadzu<sup>®</sup> CBM-20Alite) qui permet de gérer les différents modules.
- ✓ Un logiciel d'exploitation (Shimadzu<sup>®</sup> LC solution) pour enregistrer et traiter les chromatogrammes.



Les phases mobiles sont préalablement filtrés (verre fritté 0,45  $\mu\text{m}$ ) et dégazés aux ultrasons puis par le dégazeur. Toutes les colonnes sont utilisées à une température ambiante.

#### IV.7.2. La phase mobile

Les solvants utilisés doivent être de qualité HPLC et doivent être filtrés à travers d'un filtre 0,45 $\mu\text{m}$ , avant leur utilisation. Il faut que les solvants utilisés soient miscibles. Si on va utiliser un mélange de solvants organiques et de tampons, il faut tester la miscibilité et la solubilité de l'échantillon dans ce mélange, avant utilisation [11].

Les solvants utilisés étaient de qualité HPLC, le n-heptane de Reidel-deHaën (seelze, Allemagne), Propanol-2 de MERCK KGaA (darrnstadt Allemagne), n-hexane, méthanol et l'éthanol du Sigma-Aldrich (Seelze, Allemagne). Les solutions de chaque produit (5 mg/ml) ont été préparées dans le méthanol.

#### IV.7.3. Les phases stationnaires chirales

Les colonnes utilisées sont : Chiralpak<sup>®</sup>AD, Chiralpak<sup>®</sup>IA, Chiralpak<sup>®</sup>IB, Chiralcel<sup>®</sup>O-DH, Chiralcel<sup>®</sup>OD et Chiralcel<sup>®</sup>OJ, ont été obtenus à partir de Chiral Technologies Europe (Illkirch Cedex, France). Les dimensions des colonnes sont 250mm $\times$ 4.6mm et les diamètres particulaire sont 5 $\mu\text{m}$  pour le Chiralcel<sup>®</sup>OD-H, Chiralpak<sup>®</sup>IA, Chiralpak<sup>®</sup>IB, et 10  $\mu\text{m}$  pour les autres colonnes.

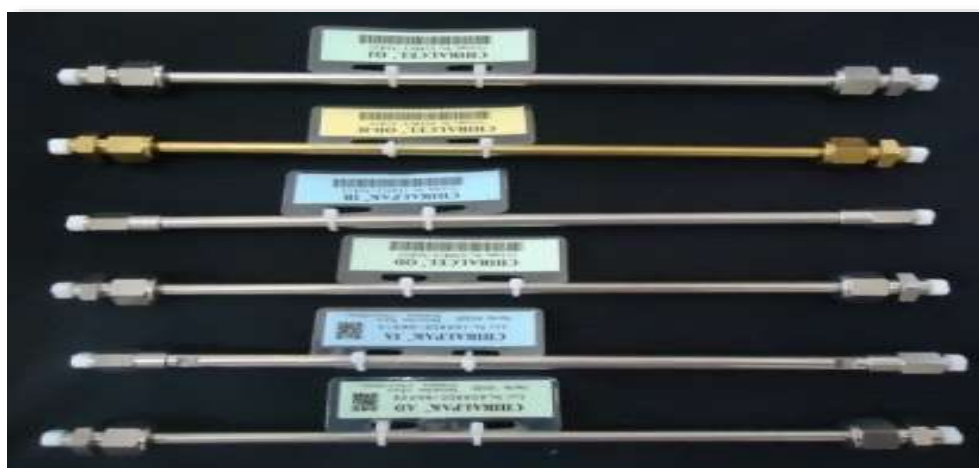


Figure IV.3. Les colonnes chirales utilisées



**Tableau IV.1.** Les caractéristiques des phases stationnaires chirales utilisées.

Colonne	Structure	Nom	Diamètre (mm)	Type
Chiralcel <sup>®</sup> OD		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	10	déposée
Chiralcel <sup>®</sup> OD-H		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	déposée
Chiralcel <sup>®</sup> OJ		Cellulose tris-(4-methylbenzoate)	10	déposée
Chiralpak <sup>®</sup> AD		Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	10	déposée
Chiralpak <sup>®</sup> IA		Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	Immobilisée
Chiralpak <sup>®</sup> IB		Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)	05	Immobilisée

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.



#### IV.7.4. Conditions chromatographiques

On laisse l'appareil de CLHP marcher pendant environ 60 minutes ou jusqu'à la stabilisation de la ligne de base au débit sélectionné pour chaque phase mobile. (0.1 ml/min pour le propanol-2, 0.2ml/min pour l'éthanol 0.2-0.3 ml/min pour le mélange alcool/alcane). On injecte un volume approprié (20  $\mu$ l) de la solution du composé à étudié. On attend jusqu'à ce que les chromatogrammes soient apparus et observer la résolution chirale.

#### IV.7.5. Principes de fonctionnement de CLHP

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans un tube appelé colonne chromatographique. La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions entre les solutés, la phase mobile et la phase stationnaire. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent la séparation désirée.

La phase mobile, poussée par une pompe sous haute pression, parcourt en permanence le système chromatographique. Le mélange de solutés dissout dans un solvant est injecté par l'intermédiaire d'une vanne, puis transporté à travers le système chromatographique.

Au niveau de la colonne, les composés en solution se répartissent suivant leur affinité, entre la phase mobile et la phase stationnaire. La théorie de la séparation montre que le signal enregistré à la sortie d'un détecteur approprié en fin de colonne à la forme d'un pic. Si la séparation est bonne, chaque pic représente un constituant du mélange à séparer. L'ensemble des pics enregistrés est appelé, chromatogramme.

### IV.8. Résultat et discussion

#### IV.8.1. La séparation chirale des 4-iminoflavanes 2-15

##### a) L'étude de la séparation en mode phase organique polaire (100% alcool)

L'énantiosélectivité de six PSCs a été premièrement étudié en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles polaires (100% alcool). On utilise comme phase mobile le Propanol-2 avec un débit de 0.1 mL/min et une longueur d'onde  $\lambda=290$  nm pour détecter la plupart des composés



injectés. Le **Tableau IV.2.** illustre les résultats chromatographique obtenus par CLHP dans les condition cités auparavant.

**Tableau IV.2.** Résultat chromatographique en phase organique polaire.

Composé	PSCs	tr1	tr2	Rs	$\alpha$
<b>1</b>	Chirapak AD	23.500	24.438	0.582	1.130
	Chiralcel OD	25.648	28.555	2.049	1.276
	Chiralpak IB	25.502	27.578	1.679	1.222
	Chiralpak IA	17.861	18.164	0.152	1.114
	Chiralcel OD-H	29.957	31.120	0.887	1.056
<b>2</b>	Chiralcel OD-H	31.007	35.483	3.140	1.155
	Chiralpak IB	25.351	28.430	2.022	1.322
	Chiralpak IA	28.329	36.743	1.469	1.300
	Chiralpak AD	23.426	24.256	0.077	1.116
	Chiralcel OD	25.351	28.430	2.022	1.322
<b>3</b>	Chiralpak IA	18.857	19.321	0.608	1.036
	Chiralpak AD	23.521	24.450	0.463	1.127
	Chiralcel OD	26.801	31.539	2.553	1.423
	Chiralpak IB	24.832	27.576	1.827	1.199
<b>4</b>	Chiralpak AD	23.521	24.450	0.463	1.127
	Chiralcel OD	27.356	31.440	2.438	2.098
	Chiralpak IB	24.704	27.359	1.848	1.279
<b>5</b>	Chiralpak IA	49.940	51.043	0.120	1.027
	Chiralcel OD	24.487	26.734	1.026	1.260
	Chiralpak IB	25.026	26.991	1.354	1.079
<b>6</b>	Chirapak AD	23.432	29.506	4.272	1.829
	Chiralcel OD-H	30.365	33.684	1.774	1.112





Composé	PSCs	tr1	tr2	Rs	A
6	Chiralcel OD	26.720	29.262	1.327	1.097
	Chiralpak IB	24.533	26.059	1.127	1.181
7	Chiralpak AD	23.399	26.352	1.339	1.073
	Chiralcel OD	26.734	29.209	1.247	1.119
8	Chiralpak AD	23.303	24.216	0.371	1.087
	Chiralcel OD-H	30.180	34.390	2.867	1.146
	Chiralcel OD	26.741	29.329	0.506	1.173
	Chiralpak IB	50.960	52.496	0.596	1.051
9	Chiralcel OD-H	30.269	34.563	2.805	1.290
	Chiralcel OD	26.656	31.340	2.119	1.494
	Chiralpak IB	50.744	52.203	0.450	1.033
	Chiralpak AD	28.903	29.939	0.833	1.037
10	Chiralcel OD-H	26.315	28.436	2.262	1.089
	Chiralcel OD	20.477	24.608	2.300	1.269
	Chiralpak IB	50.407	51.734	0.340	1.073
11	Chiralcel OD	26.528	30.816	2.375	1.195
	Chiralpak IB	62.325	66.912	1.673	1.084
12	Chiralpak IB	51.172	49.765	0.512	1.035
13	Chiralcel OD-H	29.450	32.116	0.206	1.116
14	Chiralpak IA	47.154	48.631	0.734	1.055
	Chiralcel OD	26.222	29.622	1.989	1.329
15	Chiralpak AD	23.342	26.014	1.642	1.270
	Chiralcel OD-H	28.893	32.504	2.477	1.012
	Chiralcel OD	25.798	27.761	1.174	1.158

$R_s$ , facteur de résolution;  $tr1$ , temps de rétention de 1<sup>er</sup> diastéréoisomères élué;  $tr2$ , temps de rétention de 2<sup>ème</sup> diastéréoisomères élué;  $\alpha$ , facteur de séparation.



La séparation de la flavanone et des produits synthétisés a été réalisée sur Chiralcel<sup>®</sup>OD, Chiralcel<sup>®</sup>OD-H et Chiralpak<sup>®</sup>IB avec le propanol-2 comme phase mobile, ont donnés des bonnes valeurs de résolution **Figure IV.4**.

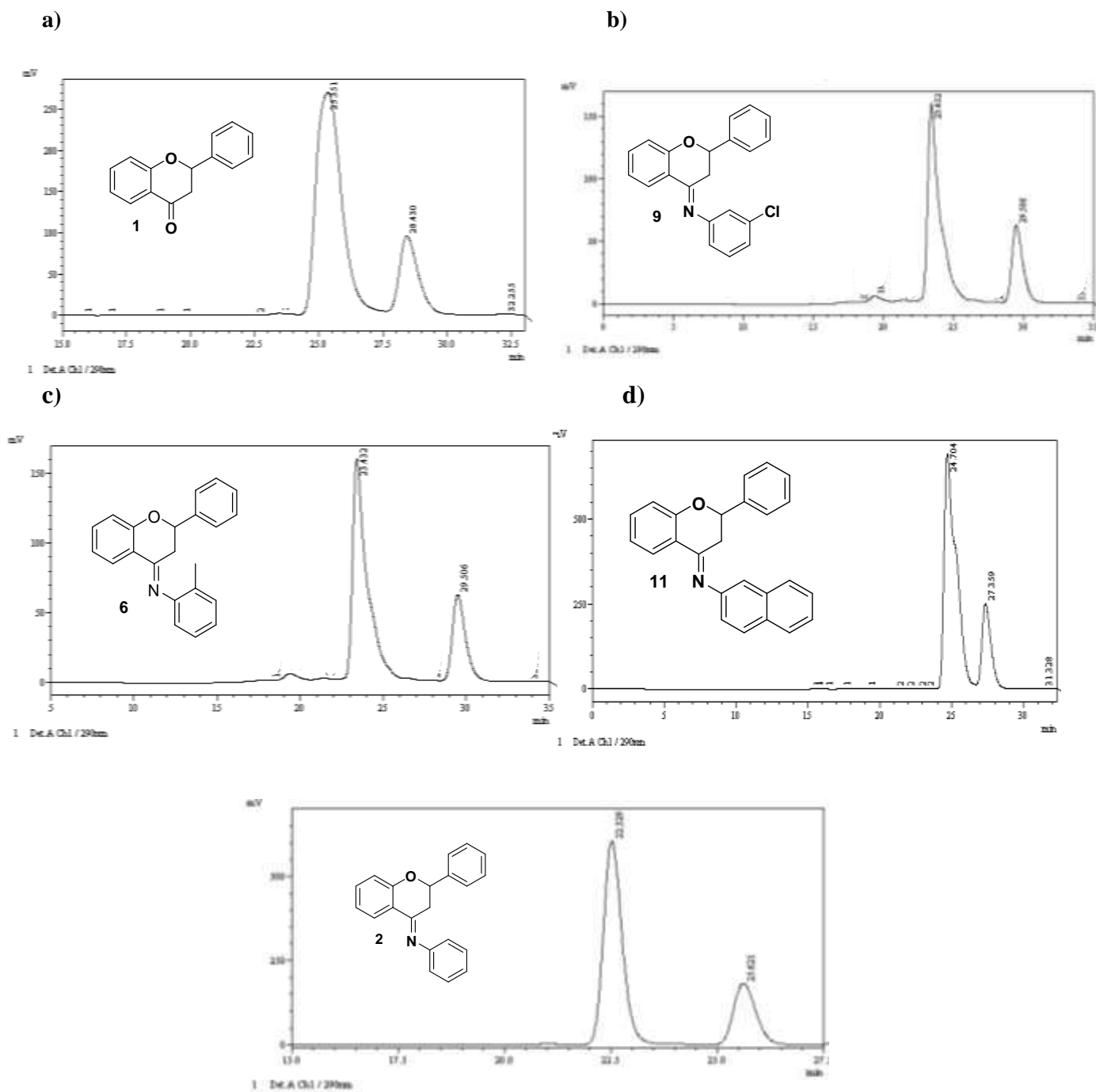
Généralement, les temps de rétention des énantiomères et les diastéréoisomères séparés pour la flavanone **1** et les produits **2-5** est plus court que pour les produits **6-15**.

L'amylose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) déposée sur le gel de silice (Chiralcel<sup>®</sup>OD et OD-H) présente la meilleure énantiosélectivité vis-à-vis la majorité des produits étudiées avec un temps de rétention plus long, peut-être due à la nature de phase mobile (propanol-2) et à la diminution de la valeur de débit. Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak<sup>®</sup>IA pour la majorité des produits, et les autres sont séparés avec des mauvaises valeurs de résolution, qui ne dépasse pas le  $R_s=1.4$ .

Les diastéréoisomères de produit **13** sont séparés seulement avec la colonne Chiralcel<sup>®</sup>OD-H mais avec une mauvaise valeur de résolution  $R_s=0.206$ , et la meilleur séparation est faite pour le produit **6** sur la phase stationnaire Chiralpak<sup>®</sup>AD avec une valeur de résolution  $R_s=4.272$ .

La séparation des diastéréoisomères des produits n'est pas réussie sur la phase stationnaire chirale Chiralcel<sup>®</sup>OJ dans ces conditions, peut-être la diminution de la polarité de la phase mobile va donner une séparation.





**Figure IV.4.** Les chromatographies présentent les séparations de quelque produits sur les phases stationnaires : (a) Chiralcel® OD; (b) Chiralcel® OD-H; (c) Chiralpak® AD; (d) Chiralcel® OD-H; (e) Chiralcel® OD-H. phase mobile: propanol-2 (100%). débit 0.1 ml/min, T:25°C, détecteur UV à  $\lambda=290\text{nm}$ .

### b) L'étude de la séparation chirale en mode phase normale

La séparation de flavanone et les produits synthétisés ont été réalisés sur six phases stationnaires chirales avec diverse phase mobiles de n alcool/alcane.



Tableau IV.3. Résultat chromatographique en phase normal.

PSCs	Eluant Débit ml/min	Composé	Facteurs			
			Tr min	Rs	$\alpha$	
Chiralpak IA	Hexane/EtOH 95 : 5 0.5	1	20.278 20.763	2.999	1.050	
		2	20.310 21.008	0.749	1.050	
		3	19.261 19.626	0.343	1.029	
		4	18.857 19.321	0.608	1.036	
		5	19.630 20.326	0.799	1.038	
		7	10.241 11.591	2.477	1.145	
		9	17.222 18.111	1.457	1.081	
		10	16.919 17.669	1.104	1.059	
		11	16.958 17.960	1.598	1.093	
		12	17.001 17.990	1.685	1.092	
		13	17.004 17.972	1.710	1.068	
		14	18.234 19.254	1.567	1.085	
		15	16.885 17.726	1.326	1.079	
		Hexane Propanol-2 90 : 10 0.1	1	58.182 61.154	1.304	1.102
			4	10.458 13.809	1.435	1.361
	6		57.337 60.406	1.258	1.054	
	8		55.014 57.486	1.061	1.049	
	9		54.217 56.308	0.878	1.042	
	15		56.260 58.962	1.156	1.057	
	Chiralcel OD-H	Heptane/propanol-2 90 : 10 0.3	1	26.391 31.817	5.004	1.342
			2	22.529 25.621	3.490	1.246
			3	22.638 25.706	3.512	1.136
			4	22.586 25.680	3.482	1.247
			5	22.744 25.866	3.658	1.246
			6	22.350 25.239	3.624	1.191
			7	22.283 25.101	3.698	1.236
			8	22.456 25.321	3.693	1.233
9			26.271 28.641	3.623	1.291	
10			26.315 28.436	2.262	1.089	
13			26.189 28.355	2.273	1.084	
14			26.032 28.175	2.264	1.088	



PSCs	Eluant Débit ml/min	Composé	Facteurs				
			Tr min	Rs	$\alpha$		
Chiralcel OD	Hexane/propanol-2 90 :10 0.2	1	31.084 32.169	0.912	1.070		
		2	30.799 31.822	0.646	1.067		
		3	30.532 31.498	0.548	1.057		
		4	30.632 31.494	0.471	1.057		
		5	31.525 32.852	0.774	1.084		
		6	30.677 31.872	0.717	1.079		
		7	33.596 35.369	1.221	1.098		
		8	30.217 31.279	0.523	1.067		
		9	29.544 31.024	1.112	1.106		
		10	30.381 32.041	1.104	1.067		
		11	30.789 32.191	0.869	1.092		
		12	25.173 27.005	1.528	1.162		
		13	30.838 32.366	0.932	1.051		
		14	30.988 32.975	1.097	1.135		
		15	31.136 32.458	0.845	1.044		
Chiralpak IB	Hexane/propanol-2 95 :05 0.4	1	14.482 16.104	3.132	1.235		
		2	14.424 15.985	3.089	1.118		
		3	13.788 14.566	1.531	1.078		
		4	14.533 15.303	1.656	1.141		
		5	14.322 15.246	1.533	1.065		
		6	14.208 15.109	1.599	1.076		
		8	13.822 14.630	1.648	1.128		
		9	9.577 10.377	1.520	1.128		
		10	14.438 15.973	3.136	1.114		
		12	13.859 14.689	1.283	1.121		
		15	13.714 14.498	1.460	1.067		
		Chiralcel OJ	Hexane/EtOH 80 :20 0.2	2	7.631 22.716	4.368	2.714
				5	23.996 37.775	4.212	1.477
				6	22.956 36.229	3.247	1.554
				7	27.110 37.963	4.888	1.467
10	19.353 32.347			3.034	1.691		



Aucune séparation n'a été réalisée sur Chiralpak®IA pour ce composé en mode organique polaire, par contre, on observe une très bonne séparation des produits en phase normal. Chiralpak®IA peut résoudre tous les composés étudiés avec des phases mobiles apolaire le cas du mélange hexane/éthanol.

La séparation des diastéréoisomères des produits est réussie sur les phases stationnaires chirales Chiralcel®OJ et Chiralpak®IA dans ces conditions, sachant que les composés sont polaires, donc la diminution de la polarité de la phase mobile améliore la qualité de séparation.

La séparation complète ( $R_s > 1.5$ ) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose Chiralpak®IB, Chiralcel®OD et OD-H, la valeur de résolution est étendue de 0.471 à 5.71, les valeurs basses de la résolution ont été obtenues avec les PSCs à base d'amylose Chiralpak®IA et Chiralpak®AD.

Les composés **1**, **5** et **6** ont été résolus avec une bonne résolution par toutes les PSCs avec différentes phases mobiles,

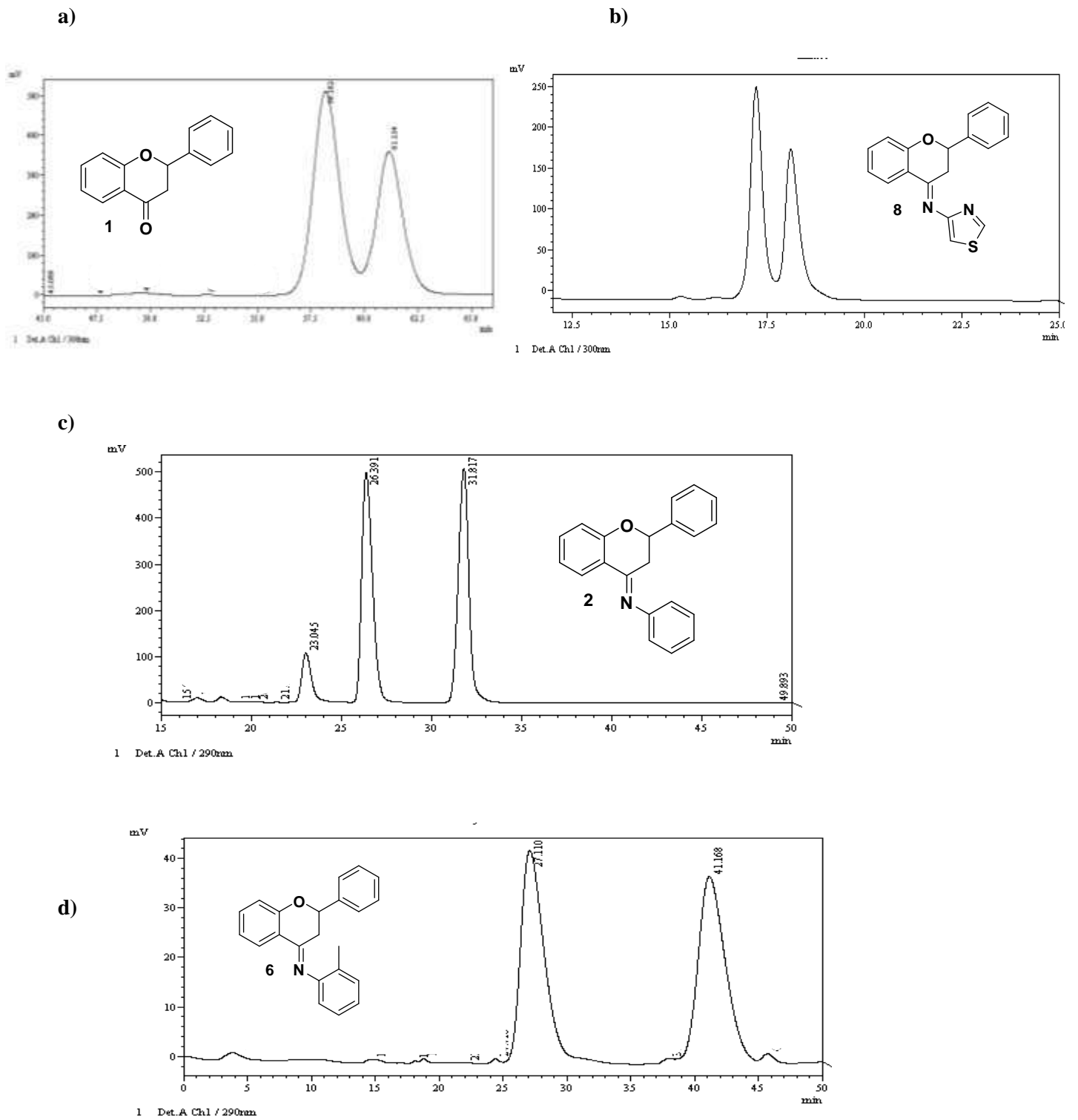
La sélection de la colonne chirale appropriée est la partie la plus essentielle et la plus provocante de développement de méthode de séparation chirale. En effet, le processus de discrimination chirale est sensible non seulement aux structures de l'analyte et du PSCs mais également aux conditions de séparation.

Généralement la colonne Chiralcel®OD-H a montré une plus haute énantioselectivité que tous les autres colonnes pour la plupart des composés en deux d'élution.

Cette technique séparative repose en général sur la formation de complexes diastéréoisomériques labiles entre chaque énantiomère et la phase stationnaire chirale. La sélectivité dépend alors de la différence de stabilité des complexes formés [41].

Comme a été rapporté dans le **Tableau IV.3**, les valeurs de résolution les plus élevées ont été réalisées pour les deux produits **2**, **10** et la flavanone **Figure IV.5**.





**Figure IV.5.** Resolution des diastéréoisomères en phase normale avec different phase PSCs, T:25°C, phase mobile (a) Chiralpak<sup>®</sup> IA; n-hexane/ propanol-2 90:10, (b) Chiralpak<sup>®</sup> IA n-hexane/EtOH 95:05 (c) Chiralcel<sup>®</sup> OD-H heptane/propanol-2 90:10 (d) Chiralcel<sup>®</sup> OJ n-Hexan/EtOH 80 :20



## IV.8.2. La séparation des dérivés de flavanone 16-22

L'énantiosélectivité de deux PSCs (Chiralcel<sup>®</sup>OJ et Chiralcel<sup>®</sup>OD-H) a été premièrement étudié en analysant les composés étudiés avec des phases mobiles normales. On utilise défèrent phase mobile n alcane /alcool avec un débit de 0.4 ml et une longueur d'onde  $\lambda=290$  nm pour détecter la plupart des composés injectés. Le tableau IV.4. Illustre les résultats obtenus par CLHP sous ces conditions.

**Tableau IV.4.** Résultat chromatographique en phase normale des produits 16-22.

Produit	CSP	k	$\alpha$	R	Phase mobile (v/v)
16	Chiralcel <sup>®</sup> OD-H	1.88	2.28	1.32	Propanol-2 100
		2.36			
17	Chiralcel <sup>®</sup> OJ	1.78	1.56	1.73	Hex/EtOH 80/20
		2.79	1.61	2.58	
		4.81	1.15	1.05	
		5.22	1.14	1.16	
	5.99				
	Chiralcel <sup>®</sup> OD-H	1.89	1.21	0.38	Propanol-2 100
		2.29			
18	Chiralcel <sup>®</sup> OJ	2.80	1.90	2.51	Hex/EtOH 80/20
		5.34	1.15	0.80	
		6.15	1.43	3.54	
		8.81			
19	Chiralcel <sup>®</sup> OJ	2.78	1.73	3.03	Hex/EtOH 80/20
		4.82	1.06	0.43	
		5.14	1.14	1.01	
		5.90			
		Chiralcel <sup>®</sup> OD-H	1.80	1.32	0.47





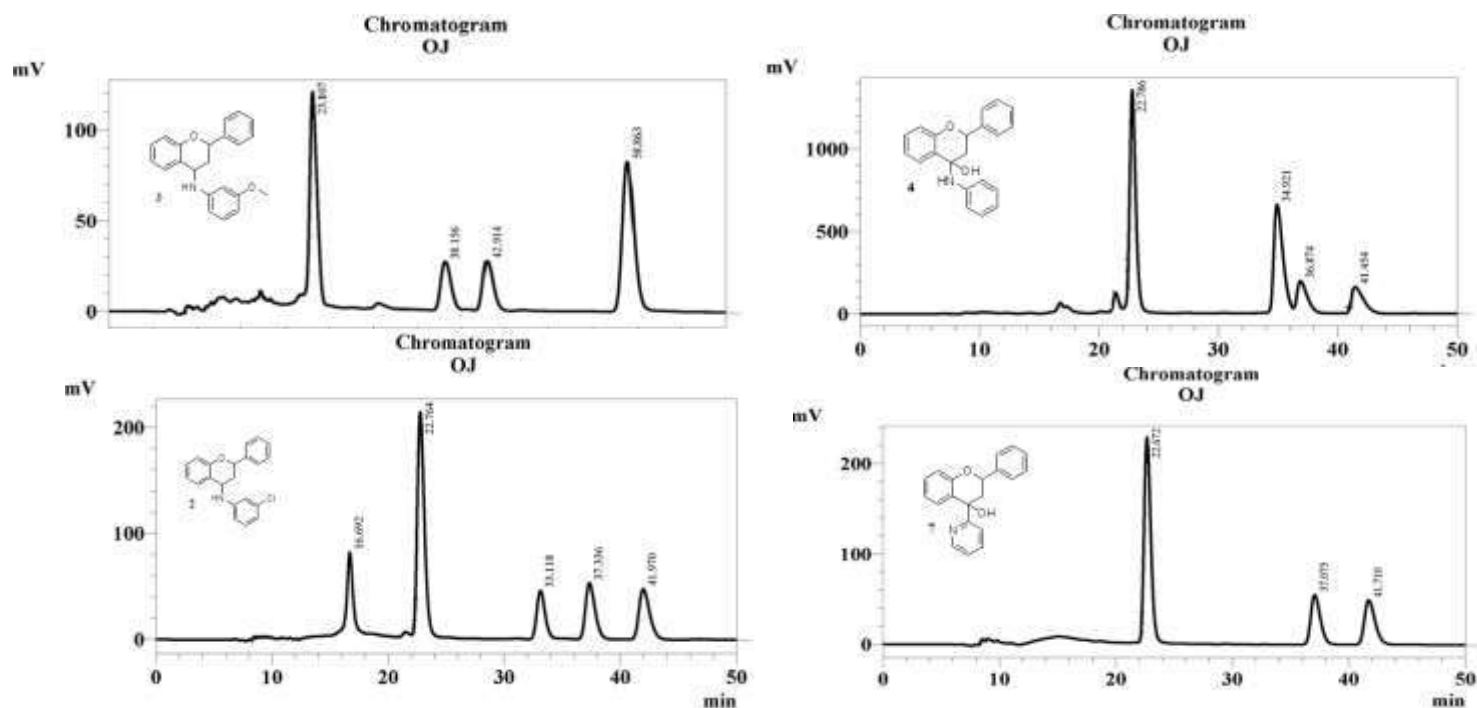
		2.38			
<b>20</b>	Chiralcel®OD-H	1.88	1.25	3.98	Propanol-2 100
		2.36			
<b>21</b>	Chiralcel®OJ	1.40	1.28	0.3	Hex/EtOH 80/20
		1.80			
<b>22</b>	OD-H	2.74	-	-	Propanol-2 100
	OJ	2.77	1.86	3.60	Hex/EtOH 80/20
		5.17	1.15	1.16	
		5.95			

**Rs**, facteur de résolution ; **tr**, temps de rétention ;  **$\alpha$** , facteur de séparation.

La séparation de flavanone et des produits synthétisés réalisées sur les deux colonnes Chiralcel®OJ et Chiralcel®OD-H en phase mobile normal, a donnée des bonnes valeurs de résolution

**Figure IV.6.**





**Figure IV.6.** Résolution des diastéréoisomères en phase normal sur la colonne Chiralcel®OJ, phase mobile Hexane/EtOH 80/20 débit 0.4 ml/min, T:25°C, détecteur UV à  $\lambda=290\text{nm}$

Généralement, les temps de rétention des énantiomères et les diastéréoisomères séparés pour la flavanone 1 et les produits sont égaux. L'amylose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) séparer par chiralcel®OJ présente la meilleure énantiosélectivité vis-à-vis la majorité des produits étudiées avec un temps de rétention plus long, peut-être due à la nature de phase mobile (20 % EtOH ; 80% Hexane) la valeur de débit reste constante.

Dans notre étude par CLHP en deux modes chromatographique, nous avons réussi à réaliser une analyse qualitative des composés synthétisés. La séparation complète ( $R_s > 1.5$ ) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose : le Chiralcel®OD-H et Chiralcel®OJ. Les PSCs cellulosiques sont utilisés, avec un grand succès. De plus, en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge.

La séparation des diastéréoisomères des produits pour le deuxième centre chirale C4 n'est pas réussie sur la phase stationnaire chirale Chiralcel®OD-H dans ces conditions, peut-être la diminution de la polarité de la phase mobile va donner une séparation acceptable..



Les composés **16**, **19** et **20** ont été séparés avec des bonnes valeurs de résolution par les deux PSCs avec différentes phases mobiles. La sélection de la colonne chirale appropriée est la partie la plus essentielle pour le développement de méthode de séparation chirale. En plus, le processus de discrimination chirale est sensible non seulement aux structures de l'analyte et du PSCs mais également aux conditions de séparation.

#### IV.8.3. Mécanisme de résolution

Cette technique séparative repose en général sur la formation de complexes diastéréoisomériques labiles entre chaque énantiomère et la phase stationnaire chirale. La sélectivité dépend alors de la différence de stabilité des complexes formés.

Cette étude est centrée, dans un premier temps, sur l'optimisation de différents paramètres chromatographiques comprenant la composition de la phase mobile, nature de solvant organique et débit pour obtenir l'énantiorésolution complète de tous les composés étudiés.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu sur la mise en évidence du mécanisme de reconnaissance chirale de certains sélecteurs chiraux polysaccharidiques basant sur la nature chimique et les autres caractéristiques telles que les dimensions particulières de gel de silice, le type de fixation de sélecteur chirale sur le support chromatographique (déposés ou chimiquement immobilisé) d'une part, et de la structure des molécules étudiées (natures et positions des substituants) d'autre part.

La grande majorité de dérivés chiraux contiennent assez de groupes fonctionnels (cycle aromatique, hydroxyle, carboxyle, amine) autour de leurs centres chiraux qui sont cruciaux pour la reconnaissance chirale. Ces groupes fonctionnels importants permettent au PSC à base des polysaccharides d'agir avec les analytes par des interactions  $\pi$ - $\pi$ , liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, ou les interactions stériques [118].

La raison principale de la résolution optique des PSCs est la stabilité des complexes diastéréomérique entre les énantiomères et la phase stationnaire.

Il existe des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre le groupe phényle du PSCs à base de cellulose et le groupement aromatique des produits (cycle B). Les substituants sur le cycle phénylique jouent également un rôle important dans l'énantiosélectivité.



De plus la présence de l'alcool dans la phase mobile fait une concurrence avec la phase stationnaire chirale pour la formation de liaisons hydrogènes avec les analytes.

Cette étude récente basée sur un ensemble d'essai de 15 composés chirales a indiqué que deux PSCs à base de polysaccharide (Chiralcel<sup>®</sup>OD et Chiralcel<sup>®</sup>OD-H) ont démontré l'énantioselectivité est 90% d'analytes examinées, tandis que deux phases le Chiralpak<sup>®</sup>IA et Chiralpak<sup>®</sup>AD ont montré un indice de réussite inférieur à 50%.

#### IV. 9. Conclusion

Dans cette étude d'analyse par CLHP en deux modes chromatographique, nous avons réussi à réaliser une analyse chirale qualitative des composés synthétisés. La séparation complète ( $R_s > 1.5$ ) a été toujours réalisée sur les PSCs à base de cellulose le Chiralcel<sup>®</sup>OD et Chiralcel<sup>®</sup>OD-H. Les PSCs cellulosiques ou amylosiques sont utilisés, avec un grand succès en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge. Cependant, ils ne sont pas dirigés spécifiquement contre une molécule cible prédéterminée. Donc, un « screening » des sélecteurs disponibles doit être réalisé afin de développer une méthode de séparation appropriée aux énantiomères

Les résultats ne justifient clairement que le système chromatographique basé sur des PSCs dérivés de polysaccharides fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des aminoflavanes. Dans le mode normal, Chiralcel<sup>®</sup>OJ a montré une haute énantioselectivité par rapport à les autres colonnes.

La résolution dépend de la nature et de la concentration de modificateur alcoolique. Les résultats fournis par cette étude démontrent clairement que le système chromatographique basé sur la PSC déposé fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des dérivés de flavanone.





---

# Chapitre 05

## Evaluation Biologique des Dérives de Flavanone

---



V. Introduction .....	90
V.1. Objectif .....	90
V.2. Matériel et méthode .....	91
V.2.1. Tests d'activité antimicrobienne .....	91
V.2.1.1. Matériels et équipements utilisés .....	91
V.2.1.2. Milieu de culture utilisé .....	91
V.2.1.2. Préparation des solutions .....	93
V.2.1.3. Préparation des précultures .....	93
V.2.1.4. Evaluation de concentration des spores par dilution et comptage .....	94
V.2.1.5. l'activité antimicrobienne .....	94
V.2.2. Activité antioxydant .....	95
V.2.2.1. Test de l'activité antioxydante au moyen de DPPH .....	95
V.2.2.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène .....	96
V.2.2.3. Réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) .....	98
V.3. Résultat et discussion .....	99
V.3.1. Activité antibactérien .....	99
V.3.1.1. Activité antibactérienne des 4-iminoflavanes .....	99
V.3.1.2. Activité antibactérienne des 4-aminoflavanes, 4-hydroxyflavanes et 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol .....	101
V.3.2. Test antifongique sur <i>Fusarium oxysporum</i> .....	102
V.3.3. Activité antioxydante .....	103
V.3.3.1. Pouvoir antiradicalaire des produits sur le DPPH .....	103
V.3.3.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène .....	108
V.3.3.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) .....	109
V.3.3.4. Discussion d'activité antioxydant .....	110
V.4. Conclusion .....	111

## V. Introduction

Les études soutiennent l'hypothèse que la consommation régulière des nourritures contenant les flavonoïdes peut réduire le risque des maladies mortelles, en particulier les maladies cardiovasculaires et quelques types de cancers [119-121]. Les flavanones étant plus répandues dans le règne végétal que les chalcones et les dihydrochalcones, leurs activités biologiques sont étudiées avec un intérêt particulier pour les dérivés C alkylés [122].

En plus la présence d'un atome d'azote dans une molécule organique confère à cette dernière des propriétés spécifiques très importantes. De nombreux composés organiques naturels possèdent un ou plusieurs atomes d'azote. D'autre part, certaines amines sont des produits de base de synthèses diverses, telles que celles de médicaments et des fibres textiles comme les nylons [123].

Malgré l'importance des antibiotiques et leur utilité dans le traitement de diverses maladies infectieuses, plusieurs obstacles se sont manifestés: résistance, multi résistance, toxicité; ce qui a poussé un grand nombre des gens à forces traitements pour se diriger vers la médecine douce ou médecine naturelle "moderne" avec ses différentes disciplines: phytothérapie, aromathérapie, nutrithérapie (diétothérapie), basée sur les connaissances antiques et leurs applications scientifiques rigoureuses, in vitro (au laboratoire) et même in vivo (essais cliniques); qui s'est montrée aussi efficace et moins nuisibles que les remèdes chimiques.

### V.1. Objectif

Dans cette optique, on s'est intéressé à la recherche des nouvelles molécules bioactives d'origine naturel comme les flavanones.

Vu l'importance biologique de la flavanone et les 21 produits obtenus, notre principal objectif pour cette partie est l'évaluation biologique des dérivés de flavanone synthétisés en tant qu'antioxydantes et antimicrobiennes, tout en comparant par rapport à la molécule de la flavanone. .



## V.2. Matériel et méthode

### V.2.1. Tests d'activité antimicrobienne

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne sont inspirées de celles décrites par les recommandations du comité européen des tests de sensibilité aux antimicrobiennes et de la société française de microbiologie (EUCAST, 2003[124]; CaSfm, 2008[125]).

L'aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis à la substance réputée antimicrobienne. Ce test consiste en application de disques imprégnés de molécules à tester sur une gélose préalablementensemencée par une souche bactérienne. La molécule à tester va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie.

#### V.2.1.1. Matériels et équipements utilisés

- Autoclave de type Pbi ;
- Etuve ;
- Incubateur ;
- Réfrigérateur (ENIEM, Algeria) ;
- Gaz butane et bec bunsen ;
- Tubes stériles ;
- Pipettes Pasteur ;
- Pipettes graduée et micropipette ;
- Embouts pour micropipette ;
- Boîtes de Pétri ;
- Erlen Meyer (1000 ml) ;
- Plaque chauffante (VELP, SCIENTIFICA).

#### V.2.1.2. Milieu de culture utilisé

- Müeller-Hinton ;
- PDA acidifié.



## a) Les souches microbiennes testées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne des produits synthétisés sont les suivants :

Deux souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC25922

Trois souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : gram positive *Bacillus cereus*. ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Staphylococcus aureus*. ATCC 25923.

**Tableau V.1.** Provenances et caractéristiques des souches testées

Les souches testées		Origine	
Bactéries	Gram négative	<i>Escherichia coli</i>	Institut Pasteur
		ATCC 25922	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Institut Pasteur
		ATCC 27853	
	Gram positive	<i>Bacillus cereus</i> .	Institut Pasteur
		ATCC 11778	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Laboratoire Produits Naturels . Université de Tlemcen
		<i>Staphylococcus aureus</i> .	Institut Pasteur
		ATCC 25923	

## b) Souche pour tester l'activité antifongique

Dans cette étude, on a utilisé le champignon *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (INRAA: Institut National de la Recherche Agronomique de L'Algérie ; Adrar).

## c) Conservation des souches bactériennes

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).





#### d) Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antibactériens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents produits;
- **Müller Hinton** : on chauffe 38 g de Mueller Hinton ajusté à un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution complète, puis on stérilise ce milieu préparé à l'aide d'un autoclave à une température de 121 °C (1.05 bar). Après 15 min de stérilisation, le milieu a été refroidi et coulé dans des boîtes pétri stériles.
- **PDA acidifié** : 4 g de l'extrait de pomme de terre a été mis en suspension avec 15 g d'agar agar et 20 g de glucose, et on ajuste le mélange à un litre d'eau distillée et en mélangeant sous chauffage le tout à l'aide d'une plaque chauffante jusqu'à la dissolution complète, puis, le milieu a été stérilisé à l'aide d'un autoclave à une température de 121 °C (1 bar). Après 20 min de stérilisation, le milieu a été refroidi et coulé, puis acidifié par l'addition de l'acide lactique dans des boîtes pétri stériles. Les boîtes sont gardées au réfrigérateur après le séchage à la température ambiante jusqu'à l'utilisation au test antifongique.

#### V.2.1.2. Préparation des solutions

Des masses de chaque produit ont été dissous dans des volumes appropriés de DMSO, pour obtenir une série de 5 µl d'une solution correspondant à des quantités de 100 µg de produit a été utilisée pour imprégner des disques stériles de papier de diamètre de 6 mm. Les disques ont ensuite été séchés à la température ambiante.

#### V.2.1.3. Préparation des précultures

Une suspension bactérienne d'une densité optique comprise entre 0,08 à 0,1 à 620 nm équivalent à 0.5Mc Farland sont préparées avec de l'eau physiologique (0,9% de NaCl) après avoir réactivé les souches bactérienne sur Bouillon nutritif à 37°C pendant 18 à 24h. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.



#### V.2.1.4. Evaluation de concentration des spores par dilution et comptage

A partir d'un erlen contenant 1L d'eau physiologique, on a mesuré 200 mL dans un autre erlen de 250 mL, puis les deux erlens sont stérilisés avec les matériels nécessaires (tubes à essais, pipettes pasteur, pipette graduée et embouts) à l'aide d'un autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Après la stérilisation, on ajoute un volume d'eau physiologique stérile à un milieu des spores de *Fusarium oxysporum* déjà cultivée sur un milieu de culture de SNA, pour obtenir les spores en solution, qu'est considéré comme la solution mère.

La réalisation de la dilution se fait à l'aide d'un 1 ml de solution mère des spores dans les tubes à essais contenant auparavant 9 mL d'eau physiologique. Ensuite, on a inoculé et ensemençer 100 µl des spores de chaque tube dans des boîtes pétri contenant PDA acidifié. L'incubation de ces boîtes se fait à 20-21 °C pendant 120 heures.

#### V.2.1.5. l'activité antimicrobienne

Les micro-organismes à tester sont ensemençés par des écouvillons stériles sur le milieu Muller-Hinton pour les bactéries à tester et étalé à l'aide d'une pipette pasteur pour les champignons sur le milieu PDA. Les boites sont laissées à température ambiante.

Après séchage à la température ambiante, pour permettre à la gélose de se solidifier; des disques stériles en papier whatman de 6 mm de diamètre, imbibés avec 20µl des surnageants à tester sont aseptiquement déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des milieux Muller-Hinton et milieux PDA, préalablement ensemençés avec les souches tests. Les durées et les températures d'incubation ont été de 24h à 37 C° pour les souches bactériennes et de 5 à 7 jours à 21C° pour la souche fongique, la lecture est réalisée et toutes zones d'inhibition de croissance autour des disques même de faible diamètre, est considérée comme résultat. Les manipulations sont répétées trois fois pour s'assurer du bon déroulement de la méthode.

Des boites dites « témoins » sont incubés en même temps que l'expérimentation et dans les mêmes conditions ne contenant que le milieu de culture, les disques de papier Wathman imbibés par la solution de DMSO.



### V.2.2. Activité antioxydant

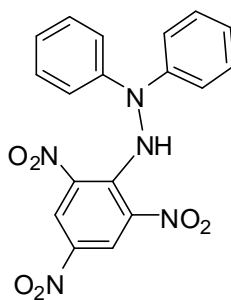
Dans la revue de Cristina Popovici et *al* (2009) sont dite « (Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO<sup>•</sup> par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS<sup>•</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH<sup>•</sup> (diphényl-picrylhydrazyle) »[126].

A travers notre étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas ni pour caractériser les proportions antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, ni ne peut donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante. L'utilisation de plus d'une méthode est donc nécessaire et nous avons choisi : le test du DPPH (diphényl picryl-hydrayl), test de β-carotène et Test FRAP (réduction de fer) pour leurs facilités de mise en œuvre, pour évaluer l'activité antioxydante de nos produits; ceci nous permettra de mieux généraliser les résultats.

#### V.2.2.1. Test de l'activité antioxydante au moyen de DPPH

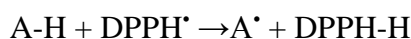
Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est stable, coloré et centré sur l'azote

**Figure V.1** [127, 128].



**Figure V.1.** Structure de DPPH (1,1-diphényl 2 picrylhydrazyle)

La réduction du DPPH<sup>•</sup> par un donneur d'atome H (AH) conduit à radical (A<sup>•</sup>) et au la 2,2-diphényl 1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) [126].



Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température). L'IC50 (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH<sup>\*</sup>) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. Plus l'IC50 est petite, plus la molécule est antioxydante.

#### a) Préparation de la solution DPPH dans le méthanol

1 mg de DPPH est dissout dans 25ml de méthanol (solution stock). Le mélange est conservé dans un réfrigérateur à 4°C l'obscurité. La solution peut être utilisée dans un intervalle de 1 à 4 jours.

#### b) Préparation de la solution mère

Pour préparer la solution mère, dissoudre 2 mg du résidu de chaque produit dans 2mL de méthanol. Le témoin positif utilisé est l'acide ascorbique préparé de la même façon que les produits synthétisés.

#### c) Préparation des concentrations des échantillons :

A partir de la solution mère, des concentrations des dérivés de flavanone ont été préparés : 0,625 mg/ml ; 0,3125 mg/ml ; 0,156 mg/ml ; 0,078 mg/ml ; 0,039 mg/ml et 0,0195 mg/ml.

#### d) Test antioxydant

1,9 mL de la solution de DPPH ont été ajoutés à 100 µl pour chaque concentration des dissout dans le méthanol. Après agitation par un vortex les flacons sont placés à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre UV-Visible., en utilisant le méthanol comme blanc. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures séparés.

#### V.2.2.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de β-carotène

Le β-carotène (provitamine A) **Figure V.2** est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'activité antioxydante a été évaluée par la mesure à 470nm de la cinétique de décoloration du β-carotène en l'absence ou en présence d'antioxydant [127].



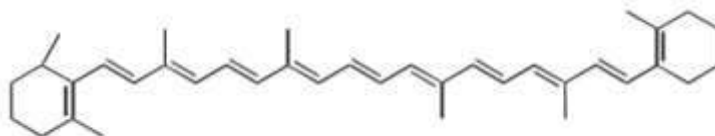


Figure V.2. Structure de  $\beta$ -carotène.

#### a) Matériels et équipements utilisés

- Ballon de 200 ml ;
- Réfrigérant ;
- Plaque chauffante ;
- Mélangeur ;
- Elévateur ;
- Ampoule à décantier ;
- Barreau magnétique ;
- Pipette ;
- Thermostat ;
- Cristalliseur ;
- Evaporateur rotatif de type R-210 Büchi ;
- Plaque CCM ;
- Lampe UV de type Spectrolin, Model ENF-260/FE.

#### b) Produits utilisés

- Ethanol ;
- Hydroxyde de potassium (KOH);
- n-Hexane ;
- Eau distillé ;
- Phénolphtaléine ;
- Sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

#### c) L'extraction de $\beta$ -carotène

10 g de carotte broyée ont été mélangées avec 40 ml de 99.8% éthanol et 10 ml de 100% hydroxyde de potassium (poids/volume) à reflux. Après 30 minutes, le mélange à été refroidi à température ambiante.



Dans une ampoule à décanté, on met le mélange avec 50 ml de n-hexane. La partie organique a été enlevée à l'aide d'une pipette et récupérée dans un bécher, et on ré-extrait la partie éthanolique deux fois avec 50 ml de n-hexane. Une solution de phénolphtaléine (1%) a été ajoutée à l'extrait hexanolique pour vérifier n'importe quel alcali. Ensuite, l'extrait hexanolique a été alors filtré à l'aide du sulfate de sodium anhydre. Le résidu a été enlevé à pression réduite à 45 °C en utilisant un évaporateur rotatif.

#### d) Le test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène

La détection des substances antioxydante dans nos différents produits a été réalisée grâce au test de  $\beta$ -carotène, dont le principe est de capturer les radicaux libres fournis par le  $\beta$ -carotène après l'exposition à une lampe UV. Nous avons procédé de la manière suivante :

Une masse de 10 mg du chaque produit a été dissous dans 1 ml de DMSO. Ensuite, les dépôts des spots de nos produits se fait à l'aide d'un tube capillaire sur une plaque de CCM. Après séchage à l'air ambiante, la plaque CCM a été giclé avec une solution chloroformique à 5 mg/ml de  $\beta$ -carotène, puis on laisse la plaque sous une lampe UV à 254 nm jusqu'à la décoloration. Les zones d'activité antioxydante ont été déterminées par l'apparition d'une coloration jaune sur fond blanc. La vitamine C a utilisée comme référence (ou l'acide ascorbique).

#### V.2.2.3. Réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

Le pouvoir antioxydant d'une solution comme le plasma est déterminé par le test de réduction des ions ferriques FRAP. Le réactif est fraîchement préparé en mélangeant une solution de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) et de chlorure ferrique dans un tampon acétate à faible pH. L'absorbance du mélange (produit et réactif) est lue à 593nm toutes les 15s durant une période n'excédant pas 10 minutes. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme  $Fe^{2+}$  [128-132].

Cette technique est déterminée par **Oyaizu (1986)**. Les différentes concentrations des produits (1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mg/mL) dans l'eau distillée (1 mL) sont mélangées avec 2.5 mL de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque



concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. La concentration CI50 qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

### V.3. Résultats et discussion

#### V.3.1. Activité antibactérien

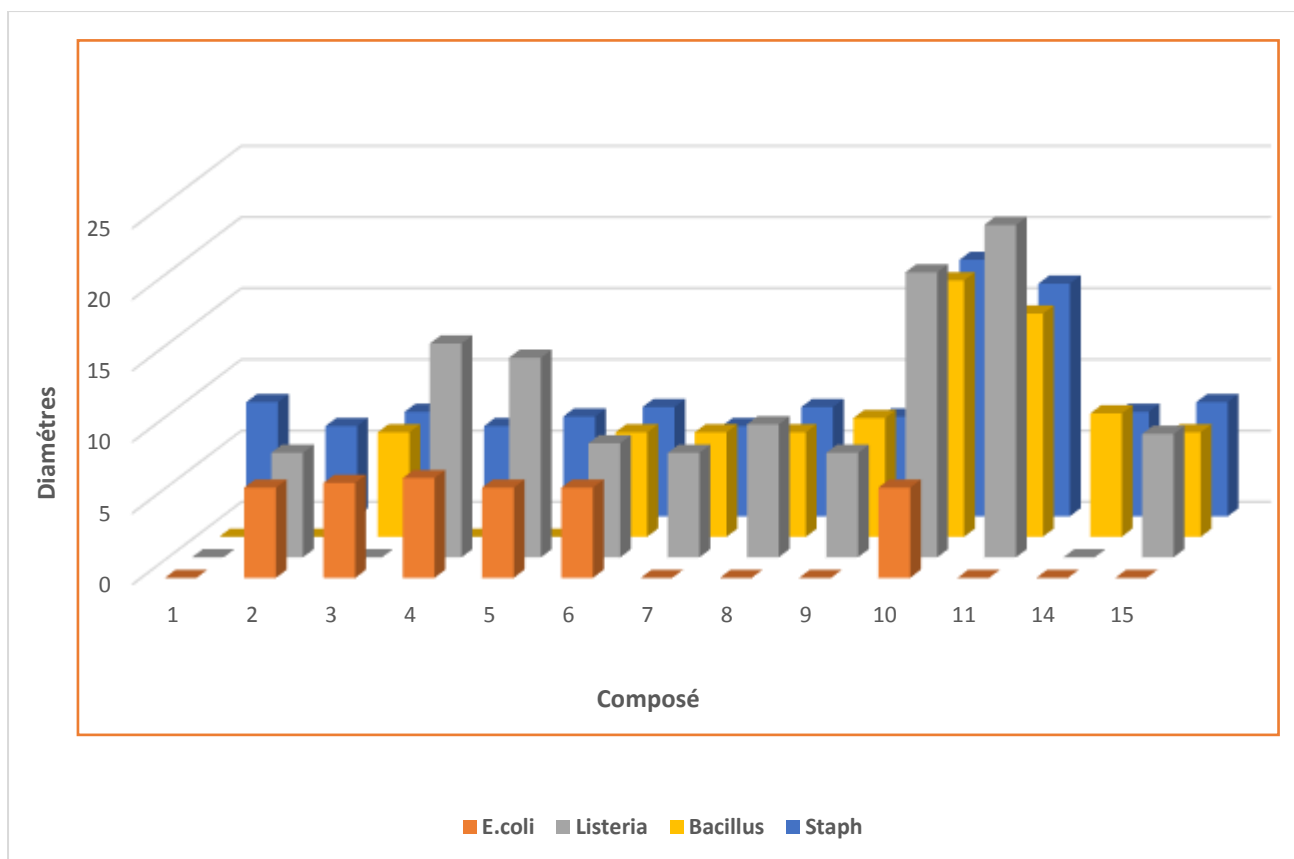
L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un éventuel effet antibactérien des produits synthétisés obtenues. Le principe comme il a été déjà décrit consiste àensemencer le milieu gélosé par un germe-test et l'amener au contact de la substance à tester tout en déterminant des zones d'inhibition. Après l'incubation pendant 24 heures à 37°C, l'action du produit est déterminée par le diamètre d'inhibition qui apparaît clair autour de la zone de contact.

Il est à rappeler que la lecture s'effectue toujours en comparaison avec un témoin ne contenant que le milieu de culture ainsi que le germe à tester et le solvant DMSO, ce témoin est toujours ensemencé en même temps que les autres boîtes de l'expérimentation et dans les mêmes conditions.

##### V.3.1.1. Activité antibactérienne des 4-iminoflavanes

Les diamètres des zones d'inhibition des dérivés de flavanones vis-à-vis aux souches bactériennes cocci et bacilles à gram négatif et à gram positif sont illustrés dans la **Figure V.3**.





**Figure V.3.** Diamètres des zones d'inhibition des 4-iminoflavanes vis-à-vis aux souches bactériennes à gram négatif et à gram positif.

L'activité antibactérienne de la flavanone et 4-iminoflavanes ont été étudiées contre cinq bactéries pathogènes, à savoir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

D'une manière générale, il y'a une activité assez bien définie sur la croissance de la plupart des souches testé (les diamètres d'inhibition varient de 6.33 à 23.33 mm) de plus, ces dérivés ne montrent aucun effet sur la souche *Pseudomonase*.. D'après l'historgramme, on remarque que la flavanone présente une faible activité contre les souches testé, par contre sont dérivées ayant des activités très important surtout pour les deux produit **11** et **10** (**Figure V.4**). D'autre par les produits synthésisés agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, que certain composé peut avoir une action très importante sur un germe (par exemple la sensibilité de *staphylococcus* à tous les composés). Alors d'autre ont une action moindre, voire même nulle sur un autre comme le cas de produit **13**, qui n'a aucun sensibilité contre la plupart des souches testées.







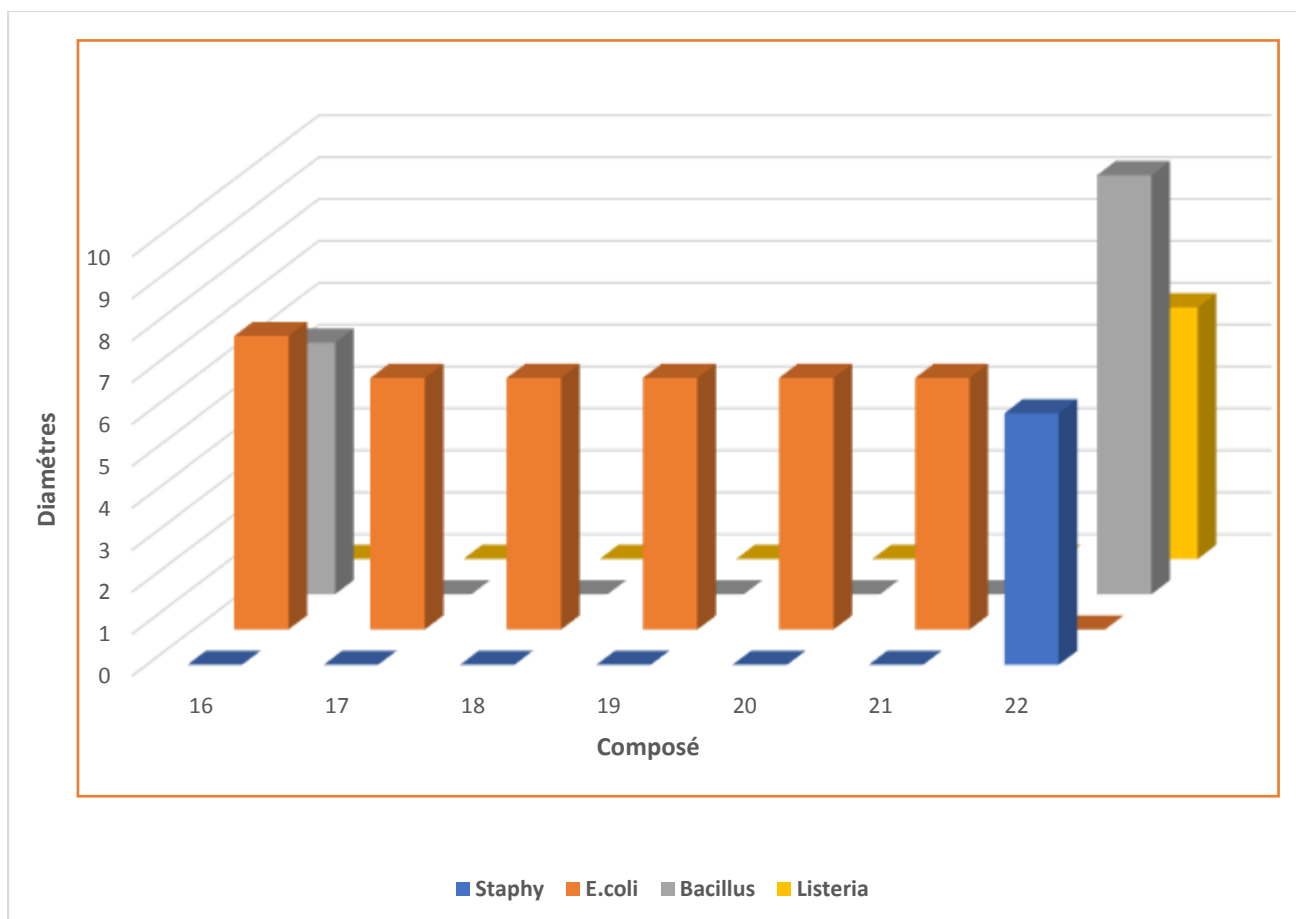
**Figure V.4.** Activités des produits vis-à-vis à *Staphylocoque*.

Cette étude a montré que les dérivés flavanones ont présenté une activité antibactérienne très importante vis-à-vis la majorité des souches testées. C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance bactérienne, le produit permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

#### **V.3.1.2. Activité antibactérienne des 4-aminoflavanes, 4-hydroxyflavanes et 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol**

Les diamètres des zones d'inhibition des produits **16-22** vis-à-vis aux souches bactériennes cocci et bacilles à gram négatif et à gram positif sont illustrés dans la **Figure V.5**.





**Figure V.5.** Diamètres des zones d'inhibition des dérivés de flavanones 16-22 vis-à-vis aux souches bactériennes à gram négatif et à gram positif

La figure présente les diamètres des zones d'inhibition en mm pour les quatre souches testées par les 4-aminoflavanes **16-18**, 4-hydroxyflavanes **19-21** et 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol **22** avec une concentration de 100µg/ml. L'histogramme montre des activités variables entre les souches bactériennes. Quelques souches bactériennes sont sensible vis-à-vis aux produits synthétisé. Les meilleures zones d'inhibition sont obtenues par le composé **22** contre la souche bactérienne *Bacillus*, et le composé **16** contre la bactérie *E.coli*. Toutes les bactéries montrent une sensibilité vis-à-vis les produits sauf la souche *Listeria*. L'histogramme présent que les composés ne montrent aucune activité vis-à-vis aux la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* testées sauf le produit **22** avec une zone d'inhibition faible.

### V.3.2. Test antifongique sur *Fusarium oxysporum*

La flavanone et les 21 produits n'ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis à *Fusarium oxysporum*.

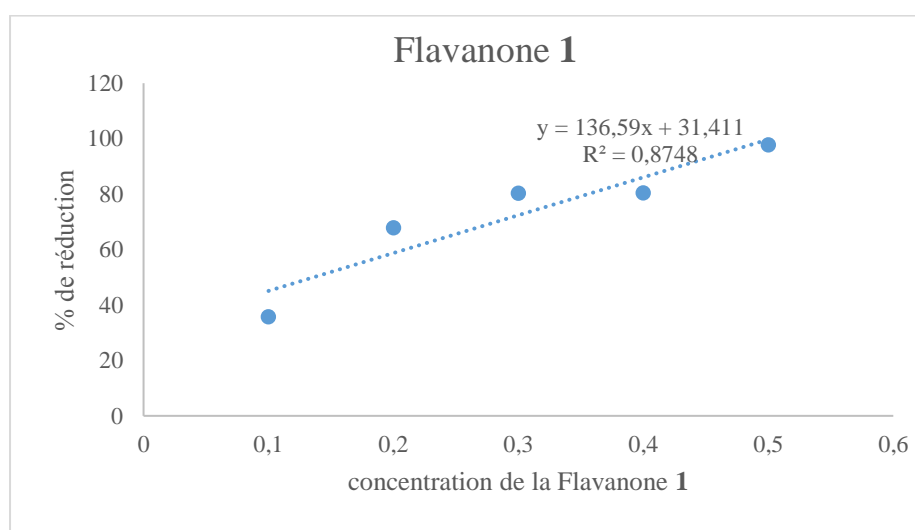
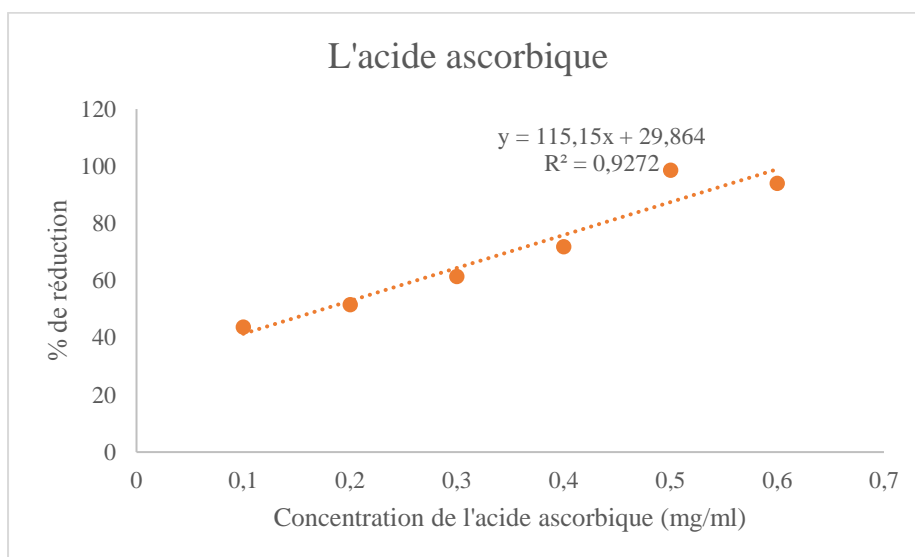


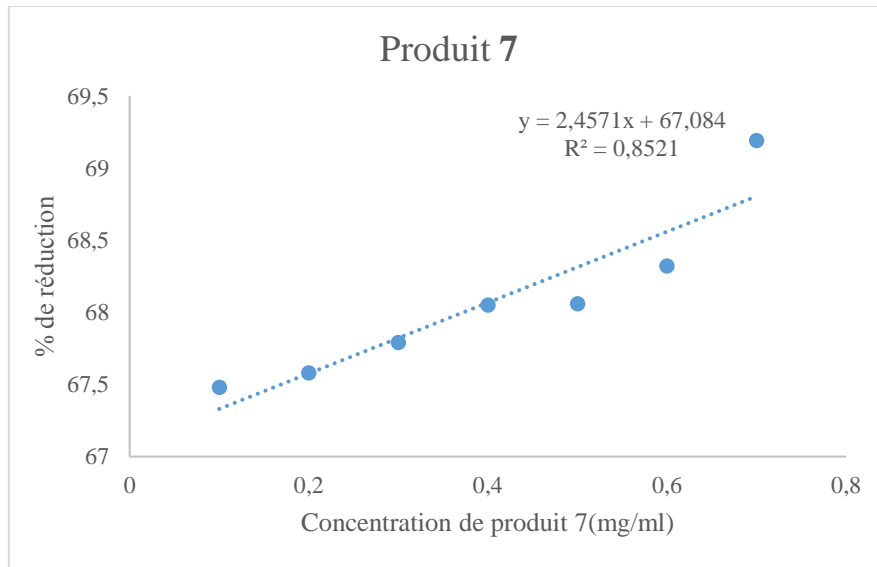
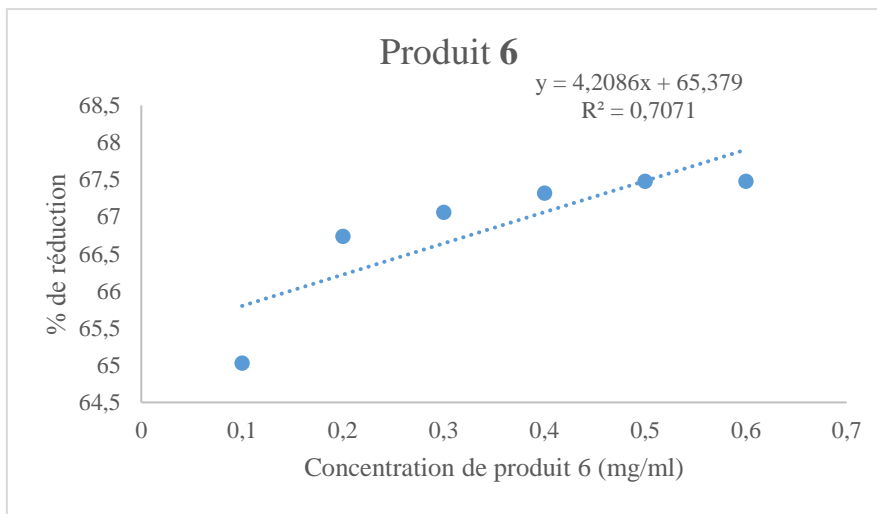
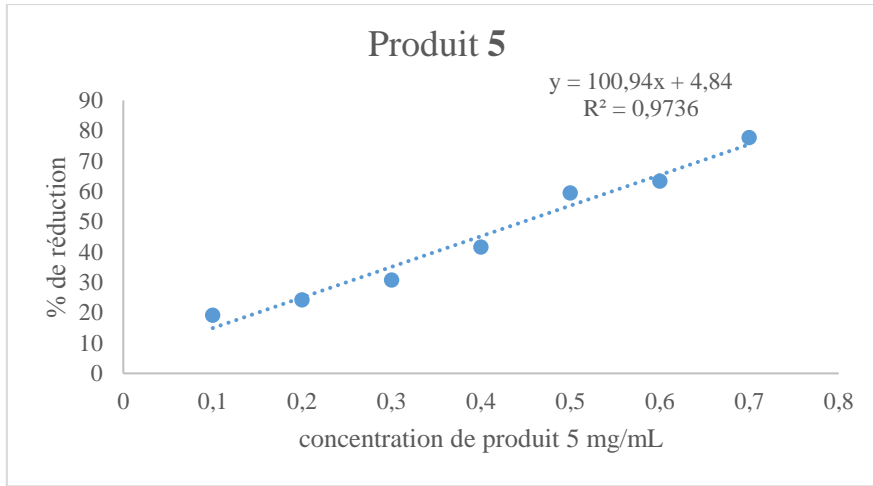
### V.3.3. Activité antioxydante

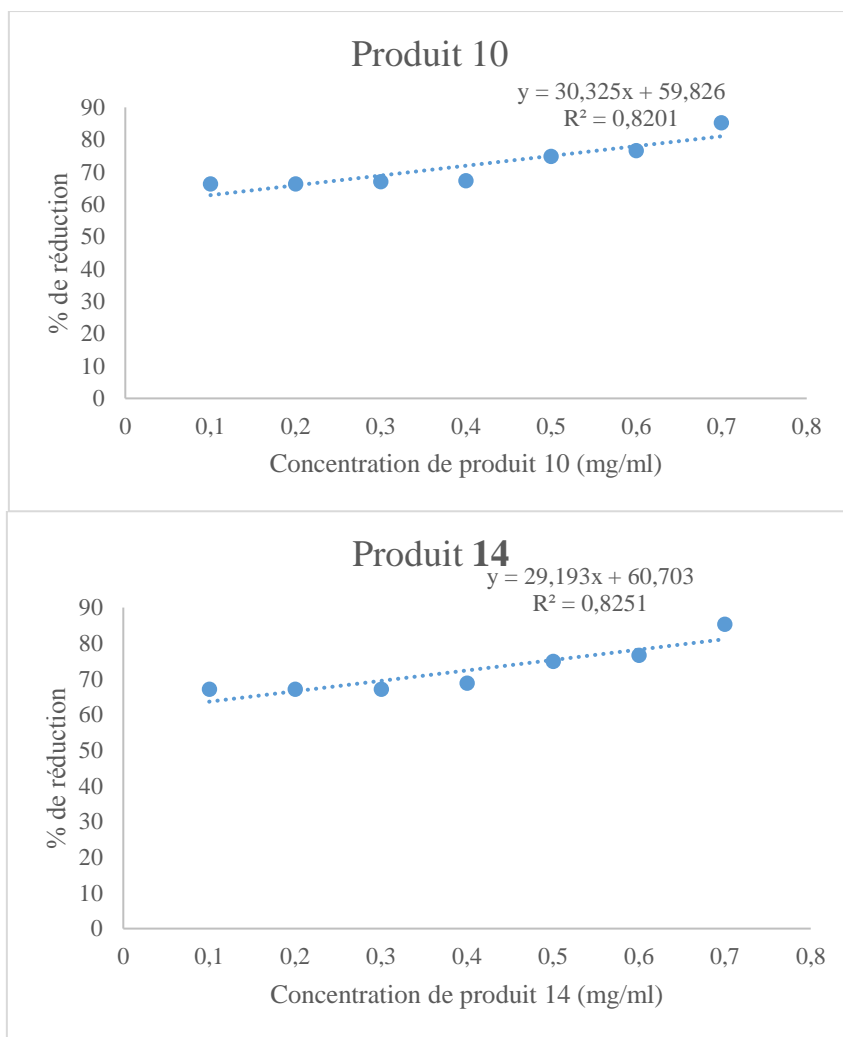
#### V.3.3.1. Pouvoir antiradicalaire des produits sur le DPPH

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des dérivés de flavanone. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes ayant une allure c'est presque une droite de type  $y=a+bx$ , avec la présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire.

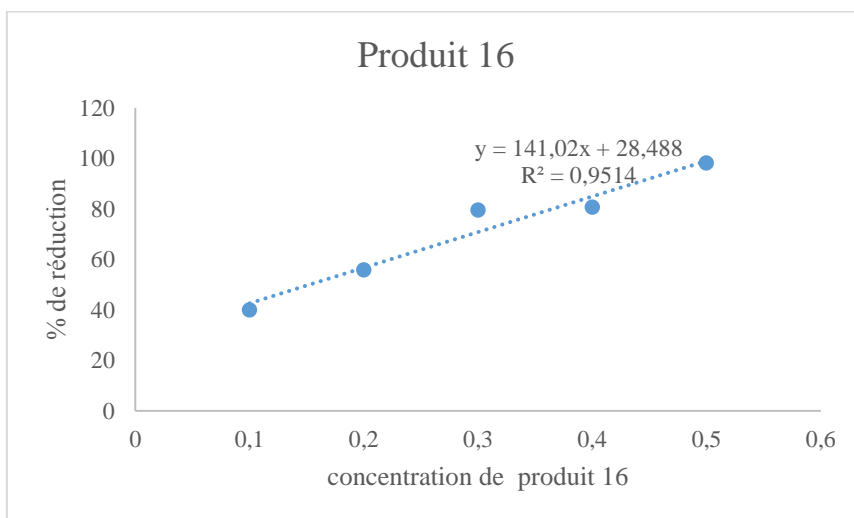
Dans un premier temps, la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions du DPPH• ont été évalués et les résultats sont présentés sur les **Figure V.6** et **Figure V.7**. Six concentrations de solutions du DPPH• faites dans du méthanol dans l'intervalle 0.1-0.6 mg/ml ont été testées.

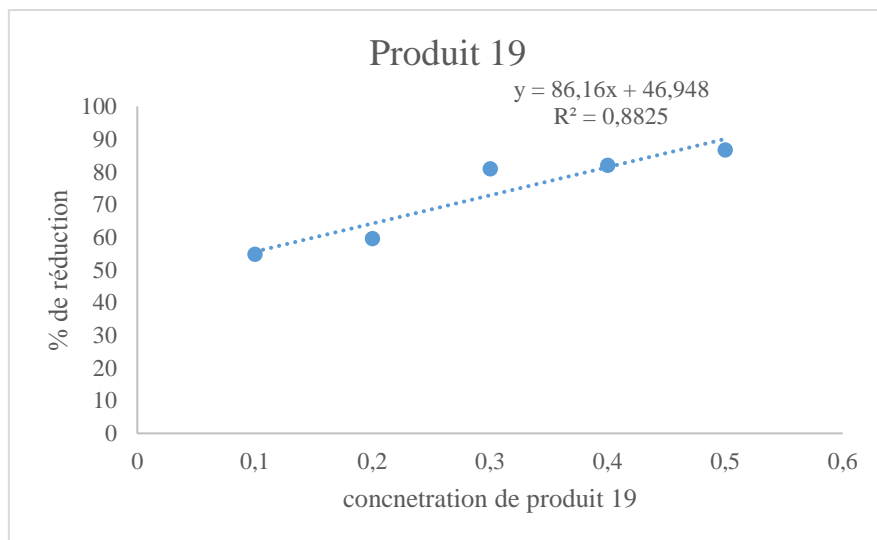
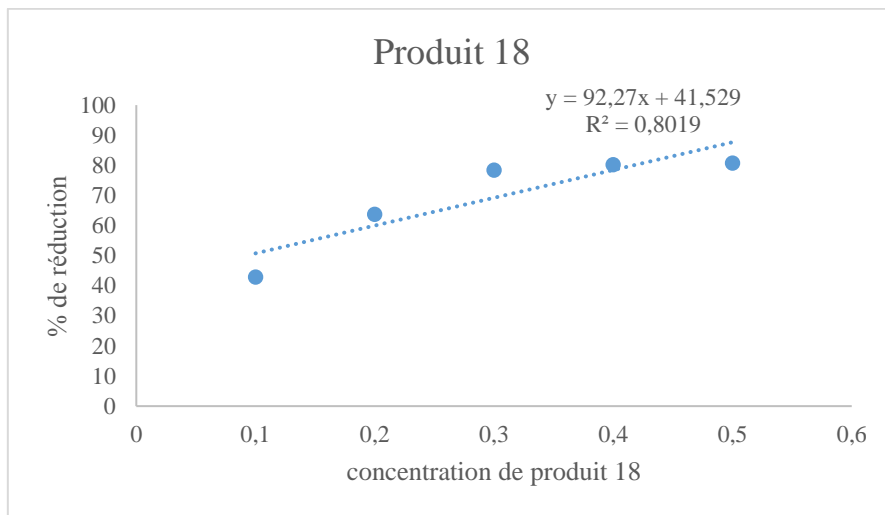
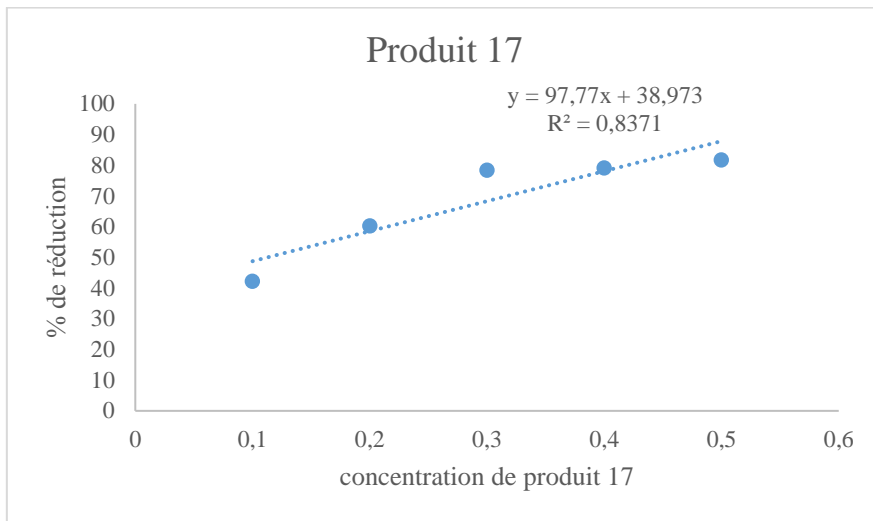


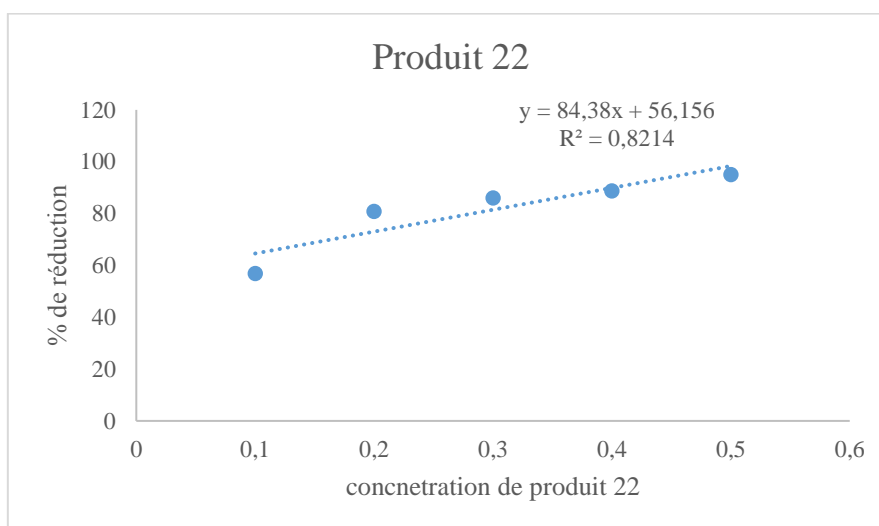
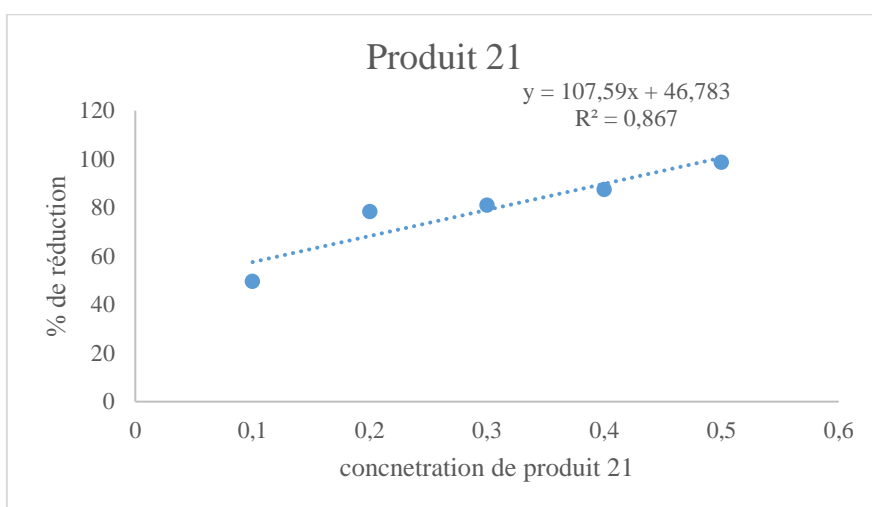
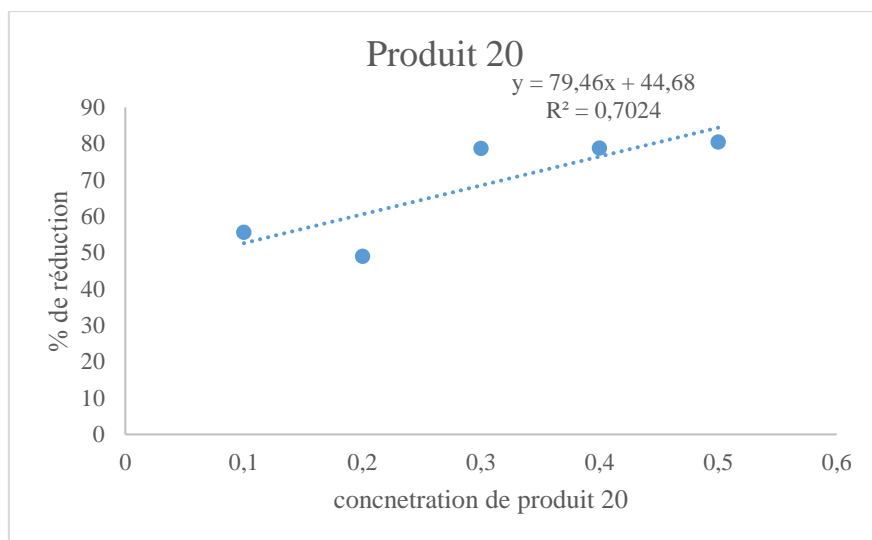




**Figure V.6.** Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique, de la flavanone 1 et des 4-iminoflavane 5, 6, 7, 10, 14.







**Figure V.7.** Pourcentage de réduction du radicale libre DPPH en fonction des concentrations des dérivés de flavanone **16-22**.



La IC<sub>50</sub> est la concentration de l'acide ascorbique ou de produit qui peut réduire 50% du DPPH, cette dernière est déterminée graphiquement, par les formules des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des composés testés.

**Tableau V.2.** les valeurs des IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique et des produits synthétisés.

<b>Composés</b>	L'acide ascorbique	Flavanone 1	Produit 5	Produit 6	Produit 7	Produit 10	Produit 14
<b>IC<sub>50</sub> (mg /ml)</b>	0.174	1.360	0.44	0.036	0.037	0.32	0.069
<b>Composés</b>	Produit 16	Produit 17	Produit 18	Produit 19	Produit 20	Produit 21	Produit 22
<b>IC<sub>50</sub> (mg /ml)</b>	1.52	1.12	0.91	0.035	0.66	0.29	0.07

### V.3.3.2. Test de l'activité antioxydante au moyen de $\beta$ -carotène

Les résultats ont montré que tous nos produits ont une réaction positive au  $\beta$ -carotène. Suivant l'intensité des spots **Tableau V.3.**



**Figure V.8.** Les Plaques CCM après le test antioxydant

(Test antioxydant au moyen de  $\beta$ -carotène, la plaque après l'exposition au 254 nm ; Vc : Vitamine C).

Le tableau présente les résultats obtenus pour l'activité antioxydante de nos produits, après la décoloration de la plaque CCM.



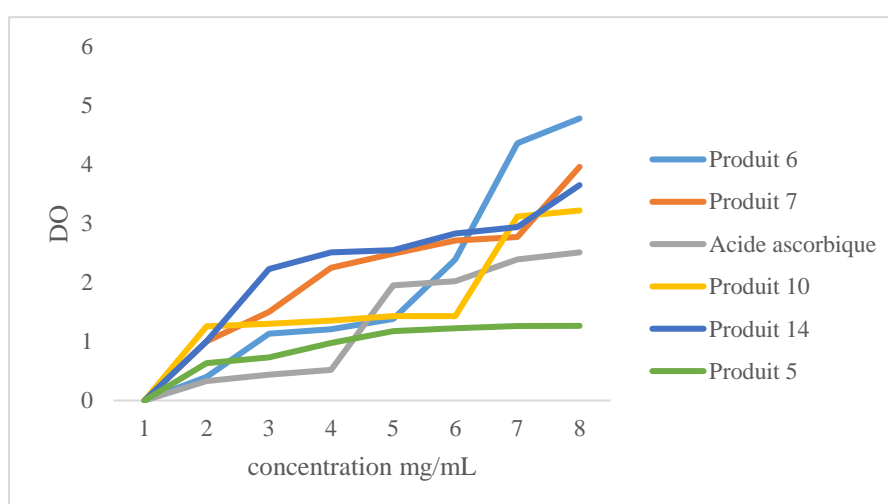


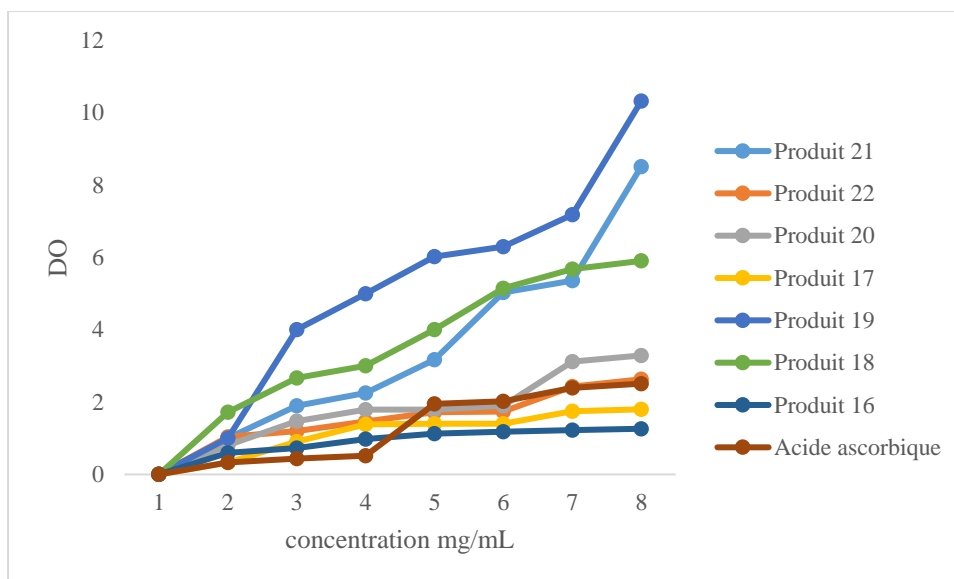
**Tableau V.3.** Résultats du test antioxydant des produits 1-22 après la révélation par  $\beta$ -carotène.

Composé	La couleur	Intensité
Vc	Jaune	++
1	Jaune	+
5	Jaune	+
6	Jaune	+++
7	Jaune	+++
10	Jaune	+++
14	Jaune foncé	++
16	Jaune	++
17	Jaune	+
18	Jaune foncé	++
19	Jaune foncé	+++
20	Jaune	++
21	Jaune	++
22	Jaune	++

### V.3.3.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

L'analyse du pouvoir réducteur est basé sur la mesure de l'augmentation de l'absorbance des ions ferriques ( $\text{Fe}^{2+}$ ) formés.

**Figure V.9.** Pouvoir réducteur des 4-iminoflavanes testé par la méthode de FRAP



**Figure V.10.** Pouvoir réducteur des dérivés de flavanone testé par la méthode de FRAP

#### V.3.3.4. Discussion d'activité antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante des produits sont enregistrés dans les figures (6, 7, 8, 9 et 10). Le test antioxydant été négatif pour les produits **2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 15**. À des fins comparatives à un antioxydant standard, l'acide ascorbique était utilisé. Dans notre travail, l' $IC_{50}$  de l'acide ascorbique est de l'ordre de 0,174mg/ml. D'autres chercheurs ont trouver différentes valeurs d' $IC_{50}$  inferieur à nos résultats pour l'acide ascorbique Viuda-Martos et *al* (2010) ( $IC_{50}$ =0.42mg/ml) [133]; Bouziane M et *al* (2016) ( $IC_{50}$ =0.34mg/ml) [134].

Parmi les **treize** dérivés, le produit **6** est le plus actif, avec une valeur d' $IC_{50}$  de 0,036 mg/ml, les autres produits (**7, 14** et **19**) ont une  $IC_{50}$  inférieure à 0.17mg/ml; l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée pour les produits **5** et **16**.

L'activité antiradicalaire des iminoflavanes **6** et **7** sont plus forte que celle des autres dérivés de flavanone, et même plus actifs que l'acide ascorbique.

Cette activité est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement NH des composés étudiés. En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH-H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène. Pour le mécanisme de piégeage de radical, la réaction



entre l'antioxydant et DPPH• dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant les groupes suivant NH- et OH- [135]. Certains composés réagissent rapidement avec DPPH•, réduisant un nombre de molécules de DPPH• radical égal au nombre de groupements [136].

Les dérivés de la flavanone ont présenté une activité antioxydante. L'ensemble des produits synthétisés a présenté des spots jaunes avec un fluorescent différent utilisant le test au moyen de  $\beta$ -carotène. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées. Dans nos conditions expérimentales, chacun des produits synthétisés a un pouvoir antioxydant mais avec une intensité variable. On observe aussi que les produits **6**, **7**, **19** et **10** ont des spots jaune plus foncé que les autres, alors on peut tenir compte ces composés comme des antioxydants.

D'après les graphes, nous constatons que les 4-aminoflavanes et les 4-hydroxyflavanes présente une activité importante réduisant le fer suivi de 2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol, alors que les 4-iminoflavanes ont présente un pouvoir réducteur inférieur par rapport à ces deux séries des produits. Aussi, nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des produits.

Plusieurs réactions ont été décrites dans la littérature pour améliorer l'utilisation de flavonoïdes dans des formulations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires sans altération de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. En particulier, la condensation des flavanones avec des amines est une des voies intéressantes et prometteuses pour améliorer leur capacité antiradicalaire et aussi une certain sensibilité par rapport des souches bactériennes.



#### V.4. Conclusion

Finalemment et en dernière partie, nous avons étudié dans cette partie les activités biologiques (anti-oxydantes, antibactériennes, et anti-fongiques) des dérivés de flavanone synthétisés

L'activité antimicrobienne de ces molécules a montré le pouvoir inhibiteur de ces composés par rapport à tous les microorganismes testés; en particulier les produits **10** et **11**

Tous les dérivés synthétisés présentent une activité antioxydante très importante sur les radicaux libres, relativement au DPPH, reducteur de fer et la  $\beta$ -carotène. Le pouvoir antioxydant des dérivés 4-iminoflavans sont moyens à forts en général, avec des  $IC_{50}$  inférieure à 0.17mg/ml. Le pouvoir antiradicalaire de ces dérivés est moyen à fort en général. Les trois produits **6**, **7** et **19** ont donné une activité antioxydante très importante.





---

# *Conclusion Générale*

---



Au cours de ces travaux de recherche, nous avons synthétisé des nouveaux dérivés de flavanone non décrits dans la littérature. Ces études sont focalisées surtout vers la Synthèse, la Séparation Chirale et l'Evaluation Biologique de ces dérivés, qui s'intègre dans l'un des axes de recherche développé dans notre laboratoire (LMBCS).

Trois parties développées dans ce travail :

La première partie porte sur la synthèse des dérivés de flavanone. Cette partie nous a permis de donner un aperçu sur les principales méthodes utilisées dans la préparation de ces dérivés. Quinze composés de 4-iminoFlavnes **2-15** ont été préparés avec des excellents rendements par condensation de flavanone avec des amines primaires selon une nouvelle méthode simple et mis en œuvre sans catalyseur.

Nous avons également procédé à la synthèse de trois nouveaux produits à savoir les 4-aminoflavanes **16-18**. Ces composés différemment substitués sont obtenus avec des bons rendements par la réduction de la fonction imine en position 4 de trois composées 4-iminoflavane en présence d'une quantité catalytique de tétrahydruroborate de sodium.

Une autre réaction de réduction importante a été effectuée par la condensation du carbonyle de flavanone avec trois amines primaires, ce qui a permis d'obtenir une nouvelle 4-hydroxyflavanes **19-21** avec des rendements satisfaisant, en faisant réagir cette fois-ci le complexe d'aluminium et le chlorure de mercure.

Ces résultats, nous a encouragé à faire une nouvelle synthèse simple d'un nouveau composé **2-phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol (22)** obtenu avec un excellent rendement de 99 %, en faisant réagir cette fois-ci la pyridine avec la flavanone.

Ces composés sont caractérisés et identifiés par les méthodes spectroscopiques IR, UV, RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C.

Ces molécules portent un ou deux centre chiral, ce qui nous a conduit à effectuer en deux modes chromatographiques; la séparation d'énantiomères et des diastéréoisomères par CLHP en utilisant les PSCs à base de polysaccharides.



Les résultats obtenus dans cette étude démontrent clairement que le système chromatographique basé sur des PSCs dérivés de polysaccharides fournit un outil analytique puissant pour l'identification et la quantification des mélanges isomériques des dérivés de flavanones.

Dans les deux modes, Chiralcel®OD-H a montré une haute énantioselectivité par rapport aux autres colonnes pour la séparation des 4-iminoflavanes **2-15**. Par contre, dans la séparation des produits **16-21** portant deux centres chiraux la colonne Chiralcel®OJ a montré une haute énantioselectivité dans le mode normal. Il est évident que chaque changement dans la structure affecte ou influe sur la séparation chirale car chaque atome a sa propre empreinte.

Dans la troisième partie de cette étude, nous avons testé les propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de nos produits synthétisés.

L'activité antimicrobienne de ces molécules a montré leurs pouvoirs inhibiteurs par rapport à tous les microorganismes testés; en particulier les produits *N*-(**Hydroxyl-Phenyl**) **4-iminoflavan (10)** et *N*-(**2-Naphtyl**) **4-iminoflavan (11)**. En ce qui concerne l'activité antifongique, les produits synthétisés n'ont pas montré une inhibition fongique vis-à-vis le *Fusarium oxysporum*.

L'activité antioxydante des dérivés synthétisés est très importante sur les radicaux libres, relative au DPPH, le  $\beta$ -carotène et la méthode de FRAP. Les trois produits **6**, **7** et **19** ont donné une activité antioxydante très élevée par rapport aux autres produits.

Nous proposons les perspectives suivantes pour la continuité de cette étude :

- Faire des réactions de complexation entre ces dérivés synthétisés et les métaux de transition afin de préparer d'autres dérivés de la flavanone
- Avancement des tests biologiques afin d'étudier la relation structure-activité par les méthodes théoriques SAR et QSAR.
- Développement de sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible prédéterminé.
- Étude des effets biologiques et thérapeutiques des diastéréoisomères séparés.





---

*Références  
Bibliographiques*

---





1. Khater, Syame. West, Caroline. Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with amylose and cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 2014, vol 1373, p.197-210.
2. Webster, Gregory.K. Kott, Laila. Method development for pharmaceutical chiral chromatography. Separation science and technology, In: Satinder, Ahuja. Stephen, Scypinski. Separation science and technology. Elsevier Inc. USA: AE Amsterdam, The Netherland, 2011, volume 10, chapitre 7, p. 251-282. ISBN: 978-0-12-375680-0.
3. Jeulin, Séverin. Duprat de Paule, Sébastien. Ratovelomanana-Vidal, Virginie. Genét, Jean-Pierre. Champion, Nicolas. Dellis, Philippe. Chiral biphenyl diphosphines for asymmetric catalysis: Stereoelectronic design and industrial perspectives. *PNAS*. 2004, vol 101, no 16, p.5799-5804.
4. Madec, Jonathan. Michaud, Guillaume. Genét, Jean-Pierre. Marinetti, Angela. New developments in the synthesis of heterotopic atropisomeric diphosphines via diastereoselective aryl coupling reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2004, vol 15, p.2253–2261.
5. Chao Xu. Wenqing, Tu, Chun, Lou. Yingying, Hong. Meirong, Zhao. Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta & cypermethrin, *Journal of Environmental Sciences*. 2010, vol 22 no 5, p. 738–743.
6. Hadj. Salem, Jamila. *Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. [en ligne]*. Thèse de doctorat : Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut national polytechnique de lorraine. 10, 2009. [Consultée le 11 Mars 2015]. Disponible à l'adresse : <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748769/document>.
7. Hemmal, Samia. Cheikh, Nawel. Belboukhari, Nasser. Cheriti, Abdelkrim. Chiral separation by HPLC and biological evaluation of some heterocyclic derivatives of hesperetin. *Phyto Chem & Bio Sub Journal*. 2014, vol 8 no 3. p. 2170-1768.
8. Kebièche, Mohammed. Lakroun, Zhoura. Mraïhi, Z. Soulimani, Rachid. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*. 2011, vol 9, no 5, p.274-282.
9. Fandou Gouma, Omar. Cheikh, Naouel. Belboukhari, Nasser. Cheriti, Abdelkrim. Antioxidant activity of Imino-Hesperidin derivatives. *Phyto Chem & Bio Sub Journal*. 2014, vol 8 no1 p. 2170-1768.



10. Van. Doorslaer. Charlie. Wahlen, Joos. Mertens, Pascal. Binnemans, Koen. De. Vos, Dirk. Immobilization of molecular catalysts in supported ionic liquid phases. Dalton Transactions - Royal Society of Chemistry. 2010, vol 39 p. 8377–8390.
11. Lahmer, Nawal. Belboukhari, Nasser. Cheriti, Abdelkrim. Méthodes et techniques de la séparation chirale des flavanones. Phyto Chem & Bio Sub Journal. 2012, vol 6 no 1, p. 2170-1768.
12. Khan, Kamran. Muhammad. Rakotomanomana, Njara. Loonis, Michèle. Dangles, Olivier. Chemical synthesis of citrus flavanone glucuronides. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010, vol 58. p. 8437–8443.
13. Chanet, Audrey. Milenkovic, Dragan. Claude, Sylvain, Maier, Jeanette A. M. Khan, Kamran. Muhammad. Rakotomanomana, Njara. Shinkaruk, Svitlana. Bérard, Annie M. Bennetau-Pelissero, Catherine, Mazur, Andrzej. Morand, Christine. Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. British Journal of Nutrition. 2012. vol. 110. no 4. p. 1-12.
14. Chebil, Latifa. Anthoni, Julie. Humeau, Catherine. Gerardin, Christine. Engasser, Jean-Marc. Ghou, Mohamed. Enzymatic acylation of flavonoids: effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. J Agric Food Chem. 2007. vol 55 p. 9496–9502.
15. Macheix, Jean-Jacques. Fleuriet, Annie. JAY-ALLEMAND, Christian. Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Vol. 1. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes, Suisse. 2005. ISBN : 2 88074 625 6 47 /b.
16. Marnewick, Jeanine. Joubertb, Elizabeth. Josepha, Shamiel. Swanevelderc, Sonja. Swartd, Pieter. Gelderblom, Wentzel. Inhibition of tumour promotion in mouse skin by extracts of rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), unique South African herbal teas. Cancer Letters. 2005, vol 224. p. 193–202.
17. Chira, Kleopatra. Suh, J.-H. Saucier, C. Teissédre, P.-L. Les polyphénols du raisin. Phytothérapie. 2008, vol 6. p.75–82.
18. ÖZGÜL, Evranuz, JASIM, Ahmed, MUHAMMAD, Siddiq, NIRMAL, Sinha, Y. H, Hui. Handbook of Vegetables and Vegetable Processing, 2nd Edition. Muhammad Siddiq Mark A. Uebersax. 2018, p.1104. ISBN: 9781119098928.
19. BRENDAN, Bombaci. Need-to-know basis: secrets of your favorite foods and stimulants. Lulu Com Raleigh, États-Unis, 2013, p. 260. ISBN: 1300973773 9781300973775.



20. Wistuba, Dorothee. Trapp, Oliver. Gel-Moreto, Nuria. Galensa, Rudolf. Schurig, Volker. Stereoisomeric separation of flavanones and flavanone-7-o-glycosides by capillary electrophoresis and determination of interconversion barriers. *Analytical chemistry*. 2006, vol 78 p. 3424-3433.
21. Kumar, Shashank. Pandey, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013, vol 2013. p. 1-16.
22. Park, HJ, Kim, MJ, Ha, E. Chung, Jh. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine*. 2008, vol 15.p.147–151.
23. Chebil, Latifa. Humeau, Catherine. Falcimaigne, Aude. Engasser, Jean-Marc. Ghoul, Mohamed. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 2006, vol 41, p.2237–2251.
24. Ghedira, Kamel. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 2005, vol 2005, no 04 p.162-169.
25. Bigoniya, Papiya. Singh, Kailash. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus Sinensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2014, vol 24 p. 330-340.
26. Quattrocchio, Francesca. Baudry, Antoine. Lepiniec, Loïc. Grotewold, Erich. The regulation of flavonoid biosynthesis, In: Grotewold, Erich. *The science of flavonoids*. Springer Science Business Media, Inc. Columbus, Ohio, USA. 2006. Chapitre 4, p 97-122. ISBN : 10: 0-387-28821-X
27. Jorite, Sophia. *La phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel [en ligne]*. Thèse de doctorat : PHARMACIE. Université Bordeaux 2, U.F.R des sciences pharmaceutiques. 5, 2015. [Consultée le 16 Mars 2017]. Disponible à l'adresse : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01188820/document>.
28. Portet, Bénédicte. Fabre, Nicolas. Roumy, Vincent. Gornitzka, Heinz. Bourdy, Geneviève. Chevalley, Séverine. Sauvain, Michel. Valentin, Alexis. Moulis, Claude. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*. 2007, vol 68, p.1312–1320.
29. TULIN OZ, Ayse. KAFKAS, Ebru. Phytochemicals in fruits and vegetables. In: viduranga, waisundara. Naofumi, shiomi. *Superfood and functional food-an overview of their processing and utilization*. BoD – Books on Demand, 2017. p.175-184. ISBN: 978-953-51-2920-2
30. Davies, Kevin. M. Schwinn, E. Kathy. Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. In: Andersen, Øyvind. M. Markham, Kenneth. R. *Flavonoids: Chemistry,*



- Biochemistry and Applications. CRC Press, Boca Raton, US, 2006. p.1256. ISBN:0-8493-2021-6.
31. Aturki, Zeineb, Brandi, Valentina. Sinibaldi, Massimo. Separation of flavanone-7-o-glycoside diastereomers and analysis in citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004, vol 52 p. 5303-5308.
  32. Aires, Alfredo. Phenolics in Foods: Extraction, Analysis and Measurements. In: SOTO-Hernandez, Tenango, Marcos Mariana Palma, Garcia-Mateos, Rosario. Phenolic Compounds Natural Sources, Importance and Applications. Chapitre 3. BoD – Books on Demand. 2017. p.456. ISBN: 978-953-51-2958-5.
  33. Salas, Maria. Paula. Céliz, Gustavo. Geronazzo, Hugo. Daz, Mirta. Resnik, Silvia Liliana. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*. 2010, vol 124 no 2011. p 1411–1415.
  34. Liaudanskas, Mindaugas. Determination of the phenolic composition and antioxidant activity of pear extracts. *Journal of Chemistry*. 2017, vol 2017. p. 1-9.
  35. Siles, Barbara. A. Halsall, H. Brian. Dorsey, John G. Retention and selectivity of flavanones on homopolyptide bonded stationary phases in both normal- and reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1995, vol 704 p. 289-305.
  36. Kanaze, Fi. Bounartzi, Mi. Georgarakis, M. Niopas, I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007, vol 61 p. 472–477.
  37. Cho, Eunae. Jeon, Yukyoung. Jung, Seunho. Chiral separation of hesperetin and hesperetin-o-glycoside in capillary electrophoresis using microbial  $\beta$ -1,2-glucans. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2009, vol 30, no 8 p.1870-1872.
  38. Kunde, Lalita. B. Catalytic synthesis of chalcone and flavanone using Zn–Al hydrotalcite adhere ionic liquid. *Catalysis Communications*. 2009, vol 10, p.1881–1888.
  39. Aliouche, Lamia. Zater, Hanène. Zama, Djamila. Bentamene, Ali. Seghiri, Ramdane. Mekkiou, Ratiba. Benayache, Samir. Benayache, Fadila. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2007, vol 43, no 5, p.618-619.
  40. Bouratoua, Aicha. Touafek, Ouassila. Kabouche, Ahmed. Kabouche, Zahia. Bioactive components of butanolic extract of *Hypericum tomentosum* L. (Clusiaceae). *Der Pharmacia Lettre*. 2013, vol 5, no 2, p.201-204.



41. Bouraiou, Abdelmalek. Debache, Abdelmadjid. Rhouati, Salah. Carboni, Bertrand. Belfaitah, Ali. 1,3-Dipolar cycloaddition of stabilized azomethine ylides to alkenyl quinolines: An efficient route to polyfunctionalized 3-pyrrolidinylquinoline derivatives, *J. Heterocyclic Chem.* 2008, vol no 45, p.329-333
42. Wang, Hui. Niu, Xiao-Di. Zhao, Min. Xiao, Xue-Bin. Wang, Hong-Su. Wang, Zhong-Dong. Solvent-free synthesis of flavanone over new hybrid mesoporous base catalysts. *Chemical Research in Chinese Universities.* 2011, vol 27. no 4, p. 664-668.
43. Kulkarni, Pramod. Wagh, Pradip. Zubaidha, Pudukulathan. An improved and eco-friendly method for the synthesis of flavanone by the cyclization of 2'-hydroxy chalcone using methane sulphonic acid as catalyst. *Chemistry Journal.* 2012, Vol. 02, no 03, p. 106-110.
44. Dar, Bashir. A. Ahmad, Nisar. Patial, Jyoti. Sharma, Parveen. Bindu, Kushal. Maity, Sudip. Singh, Baldev. Sulfated zirconia as an efficient heterogeneous and reusable catalyst for one pot synthesis of flavanones. *Journal of Saudi Chemical Society.* 2011, vol 18. p. 464-468.
45. Vashishtha, Manu. Mishra, Manish. Shah, Dinesh O. Study on catalytic property of NaOH-cationic surfactant solutions for efficient, green and selective synthesis of flavanone. *Journal of Molecular Liquids.* 2015, vol 210, p.151-159.
46. French, Dustin. Schifano, Paul. Cortés-Concepción, José. Hargrove-Leak, Sirena. Li-Al layered double hydroxides as catalysts for the synthesis of flavanone, *Catalysis Communications.* 2010, vol 12, p.92-94.
47. Lu, Yanhua, Zhang, Chongwei, Bucheli, Peter. Wei, Dongzhi. Citrus flavonoids in fruit and traditional chinese medicinal food ingredients in china. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2006, vol 61. p.57-65.
48. WAYNE, R. Bidlack, STANLEY, T. Omaye, MARK, S. Meskin, DEBRA, K.W. Topham. *Phytochemicals As Bioactive Agents*, CRC Press, Washington, USA, 1er Edition, 2000, p. 274. ISBN:9781566767880
49. Bock, Constance. Waldmann, Karl-Heinz, Ternes, Waldemar. Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutrition Research.* 2008, vol 28, p. 879-891.
50. CHEN, Chunxian. *Pigments in Fruits and Vegetables: Genomics and Dietetics.* Illustrée Springer New York, 2015, p 277. ISBN:1493923552.
51. Vallejo, Fernando. Larrosa, Mar. Escudero, Elisa. Zafrilla, Maria P. Cerda, Begona. Boza, Julio. Garcia-Conesa, Maria. Teresa. Espin, Juan. Carlos. Tomas-Barberan, Francisco. A. Concentration



- and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2010, vol 58, p. 6516–6524.
52. Righi, Adne. Negri, Giuseppina. Salatino, Antonio. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Bioorg. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, vol 2013. p.1-14.
53. Kallay, F, Janzs, Géza. Koczor, I. The reaction of flavanone with hydrazine. *Tetrahedron*, Pergaman Press Ltd. Printed in Northern Ireland. 1964, vol 21, p.19-24.
54. Ullah. Mughal, Ehsan. Ayaz, Muhammad. Hussain, Zakir. Hasan, Aurangzeb. Sadiq, Amina. Riaz, Muhammad. Malik, Abdul. Hussainb, Samreen. Choudhary, M. Iqbal. Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006, vol 14, p.4704–4711.
55. Tripathi, Anil. Kumar, Mukherjee, Debaraj. Koul, S. Taneja, Subhash C. Facile synthesis of various 2-substituted-4-(2-pyridyl) benzopyran analogues as target potassium channel opener. *ARKIVOC*. 2009, vol xiii. p. 241-251.
56. Li, Yong. Yang, Zheng-Yin. Wang, Ming-Fang. Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln (III) complexes with hesperetin-4-one-(benzoyl) hydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, vol 44 p. 4585–4595.
57. Li, Yong. Yang, Zheng-Yin. DNA binding affinity and antioxidative activity of copper (II) and zinc (II) complexes with a novel hesperetin Schiff base ligand. *Inorganica Chimica Acta*. 2009, vol 362 p. 4823–4831.
58. Belboukhari, Nasser. Rahou, Ismahan, Cheriti, Abdelkrim. Benmiloud, Abdelrahman. Cheikh, Nawel. Fandou Gouma, Omer. Chiral separation of imino-4-hesperidin derivatives by thin layer chromatography. *Phyto Chem & Bio Sub Journal*. 2011, vol 5, no 2. p. 2170-1768.
59. Patil, Sunil. G. Utale, Prashant S. Gholve, Suresh B. Thakur, Sumer D. Pande, Shri V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of 6-bromo-4-methoxy-4-(substituted phenyl) iminoflavone. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012, vol 4, no 1, p. 501-507.
60. Özyürek, Mustafa. Akpınar, Damla. Bener, Mustafa. Türkkın, Baki. Güçlü, Kubilay. Apak, Resat. Chemico-Biological Interactions Novel oxime based flavanone, naringin-oxime: Synthesis, characterization and screening for antioxidant activity. 2014, vol 212, p.40–46.
61. Kozłowska, Joanna. Potaniec, Bartłomiej, Zarowska, Barbara. Anioł, Mirosław. Synthesis and biological activity of novel O-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. *Journal of Molecules*. 2017, vol 22 no 1485, p. 2209-1485.



62. Dongamanti Ashok. Padmavati, Kadiyala. Lakshmi, Bommidi Vijaya. Sarasija, Madderla. Microwave-assisted one-pot synthesis of pyrazolyl-substituted benzochroman-4-one derivatives and evaluation of their anticancer activity. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2016, vol 52 no 1, p. 15–20.
63. Bassoude, Ibtissam. *Synthèse de nouveaux dérivés pyrazolo[1,5-a]pyrimidiniques à visée biologique [en ligne]*. Thèse de doctorat : Chimie Organique, Pharmacochimie. Thèse doctorat. Université D'orleans. 07, 2012. [Consultée le 11 Mars 2015]. Disponible à l'adresse : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00789954/document>.
64. Bouanini, Meriem. Belboukhari, Nasser. Menéndez, J. Carlos. Sekkoum, Khaled. Cheriti, Abdelkarim. Aboul-Enein, Hassan Y. Chiral separation of novel iminonaringenin derivatives. *Chirality*. 2018, vol 30 no 4, p.484-490.
65. MANKOU. MAKAYA, Amelle. Amandine. *Nouveaux potentiels du noyau imidazole en chimie de coordination de ligands phospho-carbones : effets de charge et versions chirales. [en ligne]*. Thèse de doctorat : Chimie organométallique et de coordination. Université de Toulouse III – Paul Sabatier. 07, 2016. . [Consultée le 28 Mars 2017]. Disponible à l'adresse: <http://thesesups.ups-tlse.fr/3348/1/2016TOU30258.pdf>.
66. MEIERHEMRICH, Uwe. J. Amino acids and the asymmetry of life. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, USA. 2008. p. 242. ISBN: 978-3-540-76886-9.
67. Haroun, Mohamed. Ravelet, Corinne. Grosset, Catherine. Ravel, Anne. Villet, Annick. Peyrin, Eric. Reversal of the enantiomeric elution order of some aromatic amino acids using reversed-phase chromatographic supports coated with the teicoplanin chiral selector. *Talanta*. 2006, vol 68, p.1032–1036.
68. Zaher, Mustapha. Baussanne, Isabelle. Ravelet, Corinne. Halder, Somnath. Haroun, Mohamed. Jennifer Fize, Jean-Luc Decout , Eric Peyrin. Copper(II) complexes of lipophilic aminoglycoside derivatives for the amino acid enantiomeric separation by ligand-exchange liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol 1185, p.291–295
69. Khan, Muzaffar. Viswanathan, Balaji. Rao, D. Sreenivas. Reddy, Rajasekhar. Chiral separation of frovatriptan isomers by hplc using amylose based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography B*. 2007, vol 846, p.119–123.
70. Caccamese, Salvatore. Caruso, Carmelo. Parrinello, Nunziatina. Savarino, Anna. High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones, *Journal of Chromatography A*. 2005, vol 1076, p.155–162.



71. El-Marasy, Salma. A. Abdallah, Heba M.I. El-Shenawy, Siham M. El-Khatib, Aiman S. El-Shabrawy, Osama A. Kenawy, Sanaa A. Anti-depressant effect of hesperidin in diabetic rats. *Revue canadienne de physiologie et pharmacologie*. 2014, vol 92, no 11, p. 945-952.
72. Kostrzewa-Susłow, Edyta. Janeczko, Tomasz. Microbial Transformations of 7-Methoxyflavanone. *Molecules*. 2012, vol 17, p.14810-14820.
73. MILCENT, René *Chimie organique, Stéréochimie, entités réactives et réactions*. EDP Sciences. France. 2007 p. 821. ISBN; 2868838758.
74. LIDE, David. R. *Handbook of chemistry and physics*, 87th ed. CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton. USA. 2006, p.2608, ISBN: 0-8493-0487-3.
75. Sardou, Fanny. *Fabrication Industrielle de Principes Actifs Pharmaceutiques par Separation Chirale et Racemisation Competitivite Mondiale par Rapport aux Voies de Synthese Enantioselective [en ligne]*. Thèse de doctorat : en Pharmacie Université de Lorraine 31. 01, 2014. [Consultée le 29 Mars 2017]. Disponible à l'adresse: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732399/document>.
76. Lecoeur-Lorin, Marie. Delépée, Raphaël. Morin, Philippe. Sensitivity improvement by using contactless conductivity rather than indirect UV detection for the determination of enantiomeric purity of amines by CE. *Electrophoresis* 2009, vol 30, p.487-498.
77. LUBAIN-GERMAIN, Nadège. UZIEL, Jacques. *Chimie organique en 26 fiches - 2e édition*. Dunod, paris, France. 2011, p.160. ISBN : 978-2-10-055400-3.
78. SARKER, Satyajit. NAHAR, Lutfun. *Chemistry for pharmacy students : General, Organic and Natural Product Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, England. 2007, p 369. ISBN : 0470017805.
79. COLLET, André, CRASSOUS, Jeanne. DUTASTA, Jean-Pierre. GUY, Laure. *Molécules chirales stéréochimie et propriétés*. EDP Sciences. CNRS édition, paris, France. 2006, p243, ISBN :2-86883-849-9.
80. Aloui, Asma. Delbecq, Françoise. Sautet, Philippe. Bellefon, Claude. Méric. D. Further insight in the minor/major concept using hydrogen pressure effect in asymmetric hydrogenation. *Journal of Molecular Catalysis A Chemical*. 2012, vol 363-364, p.214-222.
81. ROSSET, Robert. CAUDE, Marcel, Jardy, Alain, *Chromatographie en phases liquides et supercritique*. Paris ; Milan ; Barcelone : Masson, France. 1991, p 919. ISBN 2225823081,
82. Jean-Christian, Lemay. *Mécanismes d'induction de chiralité en catalyse hétérogène [en ligne]*. Mémoire Maîtres Sciences (M. Sc.) Université de sherbrooke, Québec, Canada.2014. [Consultée le 28 Mars 2017]. Disponible à l'adresse : <file:///C:/Users/isma/Downloads/30531.pdf>.





83. Thomasset, Amélia. *Synthese de nouveaux carbenes N-heterocycliques chiraux et applications en catalyse asymetrique [en ligne]*. Thèse de doctorat : en sciences. Université Paris Sud. 10, 2013. [Consultée le 28 Mars 2017]. Disponible à l'adresse: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01070636/document>.
84. WILEN, Samuel. H. ELIEL, Ernest. L. *Stéréochimie des composés organiques*. Tec & Doc Lavoisier. 1999, p 1312. ISBN: 10:2743001607.
85. Cabou, Jérôme. Brocard, Jacques. Péliniski, Lydie. Chiral ferrocenyl diphosphines for asymmetric transfer hydrogenation of acetophenone. *Tetrahedron Letters*. 2005, vol 46, p.1185–1188.
86. Wagnière, Georges H. *On Chirality and the Universal Asymmetry: Reflections on Image and Mirror Image*. John Wiley & Sons, 2007, p. 256. ISBN: 978-3-906-39038-3.
87. Ali, Imran. Al-Othman, Zeid A. Aboul-Enein, Hassan Y. Chiral Separations by HPLC on Immobilized Polysaccharide Chiral Stationary Phases. In: Scriba, Gerhard K. E. *Chiral Separations*. Chapitre 7. Springer Science Business Media, LLC. 2013, p. 970. ISBN: 978-1-62703-262-9.
88. Jane, A. Sellers. Olsen, Bernard. A. Owens, Paul K. Gavin, Peter F. Determination of the enantiomer and positional isomer impurities in atomoxetine hydrochloride with liquid chromatography using polysaccharide chiral stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, vol 41, p.1088–1094.
89. Pirzada, Zainab. Personicka, Michelle. Biba, Mirlinda. Gongga, Xiaoyi. Zhoua, Lili. Schafer, Wes. Roussel, Christian. Welch, Christopher J. Systematic evaluation of new chiral stationary phases for supercritical fluid chromatography using a standard racemate library. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol 1217 no 7, p.1134-1138.
90. Gábor, Tárkányi. Németh, Krisztina. Mizsei, Réka. Toke, Orsolya. Visy, Júlia. Simonyi, Miklós. Jicsinszky, László. Szemán, Julianna, Lajos Szente. Structure and stability of warfarin-sodium inclusion complexes formed with permethylate dmonoamino- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, vol 72, p.292–298.
91. Lee, Mee Sung. Khan, F. Nawaz. Shin, Sung Chul. Jeong, Euh Duck. Kim, Hae Gyeong. Kim, Mi Jin. Cho, Yoon Jae. Cha, Jae-Young. Jin, Jong Sung. Comparison of polarimetry and crown ether-based HPLC chiral stationary phase method to determine (L)-amino acid optical purity. *Food Chemistry*, 2012, vol 135, p.343–347.



92. Gouygou, Maryse. Daran, Jean-Claude. Robé, Emmanuel. Ortéga, Carmen. Chiral diphosphines and diphosphinites derived from 2,2-biphosphole: Stereodynamic ligands for asymmetric catalysis. *Comptes Rendus Chimie*. 2010, vol 13, p.1054–1062.
93. Willock, David. *Molecular symmetry*. John Wiley & Sons Ltd. United Kingdom, p 438. ISBN: 0470853476.
94. He, Brian Lingfeng. Shi, Yueer. Kleintop, Brent. Raglione, Thomas. Direct and indirect separations of five isomers of brivanib alaninate using chiral high. Performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 2008, vol 875, p 122–135.
95. Yamamoto, Chiyo. Okamoto, Yoshio. Chiral separation by HPLC using polysaccharide-based chiral stationary phases. In: GUBITZ, Gerald. SCHMID, Martin. G. *Chiral separations methods and protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USE. 2004, vol 243, ISBN : 978-1-59259-648-5.
96. Kalíková, Květa. Riesová, Martina. Tesařová, Eva. Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE. *Květa Central European Journal of Chemistry*. 2012, vol 10 no 3, p. 450-471.
97. Ahuja, Satinder. Rasmussen, Henrik. *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Elsevier, 2011, p. 532. ISBN : 0080554199.
98. Belboukhari, Nasser, Cheriti, Abdelkrim, Mimouni, Fatima. Z. Rahmani, Smahia. Resolution of Atropisomers of N, N'.Diaryl.2.Iminothiazoline Derivatives by Thin Layer Chromatography, *Analytical Chemistry Letters*. 2011, vol 1, p 1-17.
99. Morante-Zarcelero, Sonia. Hierro, Isabel del. Fajardo, Mariano. Sierra, Isabel. Development and validation of a chiral HPLC method for rapid screening of allylic alcohol asymmetric epoxidation processes, *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol 618, p 102–109.
100. Barnhart, Wesley. W, Gahm, Kyung H. Hua, Zheng. Goetzinger, Wolfgang. Supercritical fluid chromatography comparison of the poly (trans-1,2-cyclohexanediyl bis acrylamide) (PCAP) column with several derivatized polysaccharide based stationary phases, *Journal of Chromatography B*. 2008, vol 875, p.217–229.
101. Wang, Zhenyu. Jonca, Malgorzata. Lambros, Ted. Ferguson, Stephen. Goodnow, Robert. Exploration of liquid and supercritical fluid chromatographic chiral separation and purification of Nutlin.3-A small molecule antagonist of MDM2, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, vol 45, p.720–729.
102. Tekewe, Alemu, Singh, Sawraj. Singh, Manpreet. Mohan, Utpal. Banerjee, U.C. Development and validation of HPLC method for the resolution of drug intermediates: dl.3.Phenyllactic acid,



- dl.O.acetyl.3.phenyllactic acid and ( $\pm$ ).mexiletine acetamide enantiomers, *Talanta*. 2008, vol 75, p.239–245.
103. Vaccher, Marie-Pierre. Charton, Julie. Guelzim, Abdelhalim. Caignard, Daniel-Henry. Bonte, Jean-Paul. Vaccher, Claude. Preparative enantiomeric separation of potent AMP activated protein kinase activator by HPLC on amylose based chiral stationary phase determination of enantiomeric purity and assignment of absolute configuration, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, vol 46, p.920–928.
104. Alain, Berthod. *Chiral recognition in separation methods*. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 2010, p. 337. ISBN: 978-3-642-42369-7.
105. Fernandes, Carla. Tiritan, Maria Elizabeth. Pinto, Madalena M. M. *Chiral Separation in Preparative Scale: A Brief Overview of Membranes as Tools for Enantiomeric Separation*. *Symmetry*. 2017, vol 9, no 206, p.1-19.
106. Lahmar, Nawel. Belboukhari, Nasser. Cheriti, Abdelkrim. Application of immobilized amylose and cellulose chiral stationary phases for the enantioseparation of methoxyflavanones enantiomers by liquid chromatography, *International Journal of Chemical Studies*. 2013, vol 1, no 1, p.1-5.
107. Fanali, Chiara. Fanali, Salvatore. Chankvetadze, Bezhan. HPLC separation of enantiomers of some flavanone derivatives using polysaccharide-based chiral selectors covalently immobilized on silica. *Chromatographia*. 2016, vol 79 p.119–124.
108. Kasat, Rahul. B. Wee, Siao Yee. Loh, Ji Xian. Linda Wang, Nien-Hwa. Franses, Elias I. Effect of the solute molecular structure on its enantioresolution on cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate). *Journal of Chromatography B*. 2008, vol 875, p.81–92.
109. Zhang, Kai. Xue, Na. Shi, Xiaowei. Liu, Weina. Meng, Jing. Du, Yumin. A validated chiral liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of safinamide mesilate; a new anti-Parkinson drug, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, vol 55, p. 220–224.
110. Chen, De-Miao. Qiang, Fu. Na, Li. Song-Xian, Zhang. Qian-Qian, Zhang. Enantiomeric separation of naproxen by high performance liquid chromatography using chiralcel od as stationary phase, *Chin J Anal Chem*. 2007, vol 1, no 35, p.75–78.
111. Ghanem, Ashraf. Hoenen, Hubert. Aboul.Enein, Hassan Y. Application and comparison of immobilized and coated amylose tris.(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of  $\beta$  blockers enantiomers by liquid chromatography. *Talanta*. 2006, vol 68, p.602–609.



112. Subramanian, Ganapathy. *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, Third Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2008, p 641. ISBN: 9783527611737.
113. LAHMER, Nawel. *Etude de la separation chirale des derives flavanone*. Thèse doctorat : Chimie Organique. Université Kasdi Merbah Ouargla. 7, 2018, p 147.
114. Burckhardt, Peter. DAWSON-HUGHES, Bess. WEAVER, Connie. M. *Nutritional Influences on Bone Health: 8th International Symposium*. Springer Science & Business Media, 2013, p 387. ISBN : 9781447127697.
115. Bricout, Hervé. Léonard, Estelle. Len, Christophe. Landy, David. Hapiot, Frédéric. Monflier, Eric. *Impact of cyclodextrins on the behavior of amphiphilic ligands in aqueous organometallic catalysis*. *Beilstein J. Org. Chem.* 2012, vol 8, p.1479–1484.
116. Rouessac, Francis, Rouessac, Annick. Cruche, Daniel, Duverger-Arfulo, Claire. Martel, Arnaud. *Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6e édition, Dunod, Paris. 2016, p 552. ISBN: 210074688X.
117. Corradini, Danilo. Phillips, Terry M. *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker, New York. 2011, p 1008. ISBN: 0203909755.
118. Rao, R. Nageswara. Nagaraju, Donthula. Narasa Raju, A. *Enantiomeric resolution of doxazosin mesylate and its process-related substances on polysaccharide chiral stationary phases*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, vol 41, p.766–773.
119. El-Masry, Sawsan. Amer, Masouda. E. Abdel-Kader, Maged. S. Zaatout, Hala. H. *Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt*. *Phytochemistry*. 2002, vol 60, p.783–787.
120. Arung, Enos. Tangke, Yoshikawa, Keisuke. Shimizu, Kuniyoshi, Kondo, Ryuichiro. 2010. *Isoprenoid-substituted flavonoids from wood of *Artocarpus heterophyllus* on B16 melanoma cells: Cytotoxicity and structural criteria*. *Fitoterapia*. 2010, vol 81, p.120–123.
121. Dong, Xiaowu. Yujie, Liu. Jingying, Yan. Chaoyi, Jiang. Jing, Chen. Tao, Liu. Yongzhou, Hu. *Identification of SVM-based classification model, synthesis and evaluation of prenylated flavonoids as vasorelaxant agents*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008, vol 16, p.8151–8160.
122. Yadav, Prem. P, Ahmad, Ghufra. Maurya, Rakesh. *An efficient route for commercially viable syntheses of furan- and thiophene-anellated b-hydroxychalcones*. *Tetrahedron Letters*. 2005, vol 46, p. 5621–5624.
123. Bruice, Paula. *Organic Chemistry 4th Edition*. Hardcover; Upper Saddle River, Nj: Prentice Hall. 2004, p. 1344. ISBN:9780131407480.



124. Eucast: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Euclid), 2003.
125. Casfm: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Recommandation 2008).
126. Popovici, Cristina. Saykova, Ilonka. Tylkowski, Bartek. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 2009, vol 4, p. 25-39.
127. Aouissi, Hadjer. Gourine, Nadhir. Wang, Hong. Chen, Xiaochun. Bombarda, Isabelle. Boudjeniba, Messaoud. Yousf, Mohamed. Chemical composition, antioxidative, antimicrobial and anti-cancer activities of *Asteriscus graveolens* (Forssk) essential oil. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2018, Vol 18, no 3, p 217–223.
128. Benhammou, Nabila. Atik. Bekkara, Fawzia. Kadifkova. Panovska, Tatjana. C. R. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*. 2009, vol 12, p.1259-1266.
129. Badmanaban, Ramalingam. Patel, Chhaganbhai N. Patel, Vinay. Determination of Polyphenolic Content and In-vitro Antioxidant Capacity of the Leaves of *Lagenaria siceraria* (mol.) standl. *Pharmacognosy Journal*. 2010, vol 2, p.162-169.
130. Hussaina, Abdullah, I. Rathore, Hassaan A. Sattar, Munavvar Z.A. Chatha, Shahzad A.S. Ahmada, Ashfaq Ahmad, Fiaz ud din. Johns, Edward J. Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Industrial Crops and Products*. 2013, vol 45, p. 416–422.
131. Oyaizu, makoto. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 1986, vol 44, p.307-315.
132. Beddou, Fawzia. Bekhechi, Chahrazed. Chabane Sari, Mohammed-Abdelouahab. Atik Bekkara, Fawzia. Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds from *Anvillea Radiata* Coss. & Dur. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*. 2012, vol 3, no 1, p172-187.
133. Viuda-Martos, Manuel. Ruiz Navajas, Yolanda. Sánchez Zapata, Elena. Fernández-López, Juana. Pérez-Álvarez, José A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.* 2010, vol 25, p.13–19.



134. Bouziane, Mebarka. Hadj-Mahammed, Mahfoud. Dehak, Karima. Oussameur, Nadia, Ksikus, Chahrazed. Benzaoui, Fatima. Houari, Ahlem. Antioxidant and antibacterial properties of *Brocchia cinerea* (Vis.) and *Matricaria pubescens* (Desf.) ethyl acetate extracts and their fractions. *Der Pharma Chemica*, 2016, vol 8, no 17, p.232-239.
135. Popovici, Cristina. Saykova, Ilonka. Tylkowski, Bartek. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 2009, vol 4, p.25-39.
136. Brand-Williams, Wendy. Cuvelier, Marie-Elisabeth. Berset, Claudette. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie—Food Science and Technology*, London. 1995, vol 28, no 1, p.25-30.





---

# *Annexe*

---



## Article

# Liquid Chromatographic Separation of Novel 4-Amino-Flavanes Series Diastereomers on a Polysaccharide-Type Chiral Stationary Phase

Ismahane Rahou<sup>1</sup>, Khaled Sekkoum<sup>1</sup>, Nasser Belboukhari<sup>1</sup>, Abdelkrim Cheriti<sup>2</sup>, and Hassan Y. Aboul-Enein<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Bioactive Molecules and Chiral Separation Laboratory, Faculty of Science and Technology, University of Bechar, Bechar, Algeria, <sup>2</sup>Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, Faculty of Science and Technology, University of Bechar, Bechar, Algeria, and <sup>3</sup>Pharmaceutical and Medicinal Chemistry Department, Pharmaceutical and Drug Industries Research Division, National Research Center, Dokki, Giza 12622, Egypt

\*Author to whom correspondence should be addressed. Email: haboulenein@yahoo.com

Received 3 February 2016; Revised 31 March 2016

## Abstract

Two broad approaches for the syntheses of a series of 4-aminoflavanes are used in this study, and they have been prepared in 30–99% overall yields using the reductive condensation of flavanone with primary amine, as a key step. By this methodology, the formyl derivatives of several secondary amines were obtained in good to excellent yields. The structures of all new products have been confirmed by spectral experiences (IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR). However, the present non-stereoselective synthesis results in a mixture of 2–7 diastereomers, which differ from the configuration of the flavanone atom asymmetric center. Since each diastereomer may have different biological activity and pharmacokinetic profile, analytical methods have to be developed for their separation. The 4-aminoflavanes diastereomers were separated using polysaccharide chiral stationary phases columns consisting of cellulose (Chiralcel<sup>®</sup> OD-H and Chiralcel<sup>®</sup> OJ) by high-performance liquid chromatography; the separation was affected by the nature and concentration of the alcohol modifiers in the mobile phase. Separations were carried out under normal phase mode on the Chiralcel<sup>®</sup> OJ column. This method can properly separate the two diastereoisomers (*R*<sub>s</sub> > 2) within an analysis time of <50 min.

## Introduction

Flavonoids as an important group of natural substances have variable phenolic structures, and are found in abundance in fruits, vegetables, grains, flowers, wine and tea (1). Flavanone is an important natural compound with significant potential to cure, treat and prevent tumor, senescence and cardiovascular diseases. It has been a potential source in the search for lead compounds of biologically active agents and has been the focus of extensive research and development in the last 30 years (2–5). *In vitro* experimental studies show that flavonoids act as antioxidants, antimicrobials, antivirals and anti-inflammatories (6, 7). Moreover, flavanone derivatives display important biological activities, such as aldose reductase inhibitors, iron chelators of redox inhibition HIV, cancer, chemoprevention of breast cancer, bacterial and inflammatory diseases (8, 9). Furthermore, flavanones also

serve as important intermediates in the synthesis of many biologically active compounds (10). Many flavonoids containing phenolic or perennial substitution around the flavanone core have been isolated and both have been implicated in the bioactivities of these natural products (11–15). Flavanones, which have chemical structures embedded with a 2-aryl chroman-4-one skeleton, are widely distributed in plants (Figure 1) (16) and are available from synthetic sources (17–22). Thus, investigation of synthetic routes and chemical modification is a new direction in flavanone research (5). For many years, our research laboratory was directed toward the synthesis of flavanone derivatives (23, 24), such as 4-iminoflavan (25) and imino-4-hesperidin (26–28) derivatives, the study of their reactivity and the chiral separation of the target products using different chromatographic methods (29–31). Recently, we reported the simple and efficient reduction



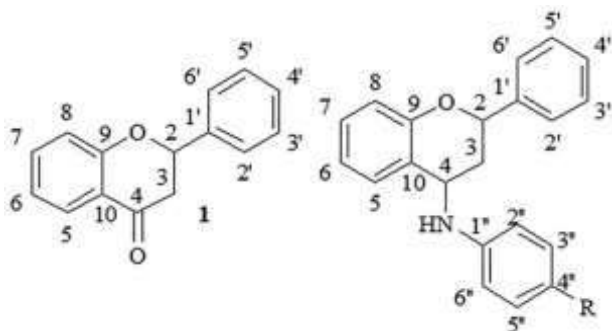


Figure 1. Flavanone 1 and 4-aminoflavane structure.

synthesis of new flavanone derivatives in one step with high yield and no side products. Two methods were investigated to synthesize the target compounds (32,33). The first approach deals with direct reductive amination. When a mixture of carbonyl compound and the amine is treated with an appropriate reducing agent in a single operation, it is termed a direct reductive amination reaction.  $\text{NaBH}_4$  is an inexpensive, safe and environmentally friendly reducing agent. It has been used to reduce  $\text{C}=\text{N}$  bonds in the presence of methanol (32, 33). The second approach is based on the work of Tripathi *et al.* (34) where they reported the synthesis of various 2-substituted-4-(2-pyridyl) benzopyrans using aluminum amalgam as catalyst in reductive condensation of 2-substituted-2h-1-benzopyran derivatives with pyridine as a key step. The abovementioned synthetic approaches were used to prepare novel flavanone derivatives. Flavanones are optically pure compounds; however, owing to a non-stereoselective synthesis, introduction of a primary amine added another asymmetric center yields a 1:1 mixture of diastereomers. Polysaccharide-based chiral stationary phases have been used frequently in the enantioseparation of various classes of organic compounds (35–40). This paper reports the diastereomeric separation of compounds 4-aminoflavanes (their chemical structures as shown in Figure 1) by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a polysaccharide-type chiral stationary phases (CSP). The influence of various operating parameters has been studied to optimize the HPLC separation on the CSPs.

## Methods

### Reagents

For the synthesis of proposed compounds, flavanone and aniline had been purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). *o*-Toluidine, 3-chloroaniline and *m*-anisidine have been purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). All solvents and reagents were obtained from Chemminova (Harboøre, Denmark) and Riedel-deHaën (Sleeze, Germany).

### Synthesis of 4-aminoflavan derivatives 2–3

Flavanone (5 mmol) and primary amine (5 mmol) were refluxed in methanol (5 mL) (Figure 2). After 3 days, the main liquid was heated to the boiling point, and an equal volume of hot water was added. Crystals were obtained upon cooling the mixture. The 4-iminoflavans were recrystallized from ethanol (Figure 2).

Ten milligrams of the previously prepared imine were placed in a 100 mL Erlenmeyer with 5 mL of absolute ethanol. Agitate using a magnetic stirrer and the solution was cooled to 5°C. While stirring with a magnetic stirrer, introduce 0.01 g of sodium borohydride in small portions. The mixture was allowed to stand for 5 min, then filtered, washed with a little cold ethanol and allowed to dry (Figure 3).

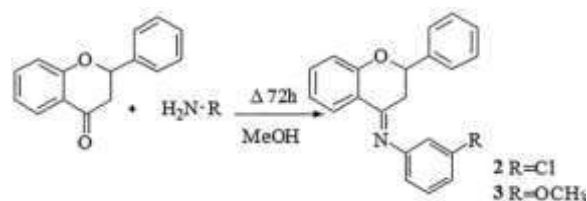


Figure 2. Schematic representation of the synthesis of 4-iminoflavan.

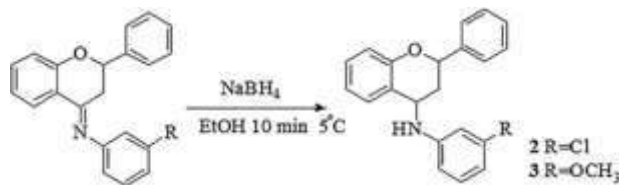


Figure 3. Schematic representation of the synthesis of 4-aminoflavan 2–3.

### Synthesis of 4-(substituted amino) 2-phenyl chroman-4-ol derivatives 4–7

General procedure: To a mixture of  $\text{HgCl}_2$  (0.037 mol) and freshly prepared aluminum powder heated at 120°C for 20 min was added a mixture of pyridine (1.20 mL) or the appropriate primary amine and flavanone 1 (0.0080 mol) with vigorous stirring and the contents were refluxed for 2 h. The reaction mixture was cooled and then poured into 6 N NaOH solution (20 mL) with vigorous stirring. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and the solvent was distilled to give an oily residue. The crude product was chromatographed on silica gel column using petroleum ether:ethyl acetate (80:20 v/v) as eluent to give products 4–7 (Figures 4 and 5).

### High-performance liquid chromatography

HPLC experiments were carried out on a SHIMADZU LC 20-A system equipped with a vacuum degasser, PerkinElmer (Norwalk, CT, USA), Shimadzu® LC 20 AD (Kyoto, Japan) 200 LC pump, injector with 20  $\mu\text{L}$  Rheodyne 1907 sample loop equipped with a UV detector Shimadzu SPD-20 A (Kyoto, Japan). All analytes were dissolved in methanol at concentrations ranging 0.5–1  $\text{mg mL}^{-1}$ . The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  and the UV detector was set at 290 nm. Chromatographic separations were carried out under isocratic mode at a flow rate of 0.4  $\text{mL min}^{-1}$  which may be changed under particular cases at ambient temperature.

Three analytical columns were used in this work: a Exsil C18 ODS column (250 × 4.6 mm ID, particle size 3  $\mu\text{m}$ ), two polysaccharide-based CSPs were evaluated in this study, namely cellulose derivatives: Chiralcel®OD-H [cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)] column (150 × 4.6 mm ID, particle size 5  $\mu\text{m}$ ) and Chiralcel®OJ [cellulose tris (4-methylbenzoate)] column (150 × 4.6 mm I.D, particle size 10  $\mu\text{m}$ ), purchased from Chiral Technologies Europe (Illkirch, France).

HPLC-grade solvents used were: ethanol, 2-propanol, *n*-hexane and methanol.

## Results

### Synthesis of 4-aminoflavan derivatives

There are two approaches applied for the synthesis of 4-aminoflavanes. The first approach deals with the reduction in 4-iminoflavan to the

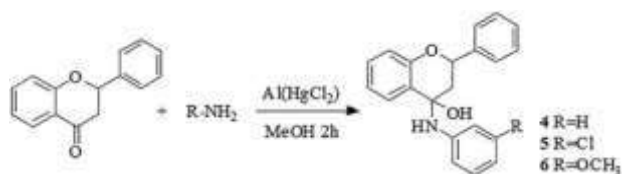


Figure 4. Schematic representation of the synthesis of 4-(substituted amino) 2-phenyl chroman-4-ol derivatives 4–6.

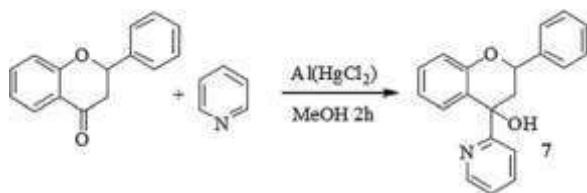


Figure 5. Schematic representation of the synthesis of 2-phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol (7).

corresponding secondary amine by  $\text{NaBH}_4$ . The synthesis of imine was carried out by refluxing the flavanone and appropriate primary amine in methanol without catalysis (25). The results show that the reductive amination of a wide variety of 4-iminoflavan has been successful under this condition and gives the desired products 2–3 in good yields as shown in Figure 6. However, the reduction in flavanone with  $\text{NaBH}_4$  using MeOH as a solvent (33) provided poor yields and requires multiple reaction steps. The second approach requires the presence of electron withdrawing groups, the synthesis of various flavanone derivatives using aluminum amalgam as catalyst in reductive condensation of flavanone with pyridine and an appropriate primary amine as a key step (34). Thus, the reaction was carried out by condensation of flavanone with pyridine in the presence of aluminum amalgam  $[\text{Al}/\text{HgCl}_2]$  to afford the desired 4-(substituted amino) 2-phenyl chroman-4-ol derivatives 4–6 and 2-phenyl-4-(pyridin-2-yl) chroman-4-ol (7) (Figure 6). It was found that the second reaction has a beneficial effect on the synthesis of flavanone derivatives and provided excellent yields.

The structures of all new products have been confirmed by elemental analysis and spectral studies such as infrared (IR), ultraviolet (UV) and nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ). For example, the IR spectra of all compounds did not show any absorption due to the presence of  $\text{C}=\text{O}$ . The synthesized compounds with their physical data are listed below.

*N*-(*m*-Chloro-phenyl) 4-aminoflavan (2): yellow powder, yield 30%,  $F$  78–79°C, UV max (MeOH, nm): 253 (band I); 321 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,375 (N–H), 3,084 (=CH arom), 1,572–1,341 (C=C), 1,322 (C–N), 1,115 (C–O),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7.39–7.47 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 7.29 (1H, d, H-4''), 7.01 (1H, m, H-8), 6.98 (1H, m,  $J = 5.5$ , H-4), 5.45 (1H, ddd,  $J = 2.8$  and 7.0 Hz, H-2), 2.98 (1H, m,  $J = 5.5$ , 7.0, 13.2 Hz, H<sup>3b</sup>), 2.79 (1H, m,  $J = 2.8$ , 5.5, 13.2 Hz, H-3<sup>a</sup>).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 136.3 (C-4), 163.6 (C-5), 156.3 (C-7), 132.01 (C-6), 131.7 (C-8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.8 (C-2), 44.4 (C-3), 148.17 (C-1''), 102.1 (C-2''), 159.85 (C-3''), 107.6 (C-4''), 130.4 (C-5''), 104.0 (C-6'').

*N*-(*m*-Methoxyphenyl) 4-aminoflavan (3): pale yellow powder, yield 53%  $F$  76–77°C, UV max (MeOH, nm): 252 (band I); 319 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,375 (N–H), 3,067 (=CH ar), 2,935 (C–H), 2,853, 3,002 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1,572–1,407 (C=C), 1,322 (C–N),

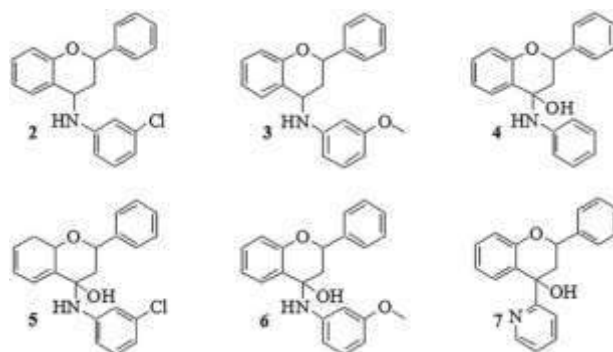


Figure 6. Structures of 4-aminoflavan derivatives.

1,178, 1,115 (C–O), 697 (CH ar).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7.39–7.47 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'), 5.45 (1H, dd,  $J = 2.9$  and 5.2 Hz, H-2), 4.03 (1H, m, H-1'), 3.08 (1H, m,  $J = 7.3$ , H-4), 3.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.98 (1H, dd,  $J = 5.2, 7.3$ , 13.2 Hz, H-3<sup>b</sup>), 2.79 (1H, m,  $J = 2.9$ , 7.3, 13.2 Hz, H-3<sup>a</sup>).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 161.4 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6), 131.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.0 (C-10), 126.7 (C-1'), 118.1 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 118.14 (C-4'), 77.3 (C-2), 79.2 (C-3), 126.1 (C-1''), 101.00 (C-2''), 128.85 (C-3''), 107.9 (C-4''), 130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

2-Phenyl-4-(phenylamino) chroman-4-ol (4): white powder, yield 96%,  $F$  86–87°C, UV max (DMF, nm): 247 (band I); 321 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,416 (OH), 3,063 (N–H), 3,078 (=CH arom), 1,547–1,409 (C=C), 1,369 (C–N), 1,115 (C–O).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7.27–7.30 (2H, m, H-4'', 6''), 6.87–6.98 (2H, d, H-3'', 7'), 6.79 (1H, s, NH), 5.39 (1H, dd,  $J = 4.9$  and 5.2 Hz, H-2), 3.08 (1H, dd,  $J = 4.9$  and 24.6 Hz, H-3a), 2.98 (1H, dd,  $J = 5.2$  and 24.6 Hz, H<sup>3b</sup>), 2.06 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 191.9 (C-4), 163.4 (C-5), 156.7 (C-7), 120.9 (C-6), 131.5 (C-8), 127.0 (C-9), 126.1 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 76.5 (C-2), 44.6 (C-3), 146.5 (C-1''), 128.7 (C-2''), 128.7 (C-6''), 118.3 (C-4''), 118.1 (C-3''), 121.6 (C-5'').

4-(3-Chlorophenylamino)-2-phenyl chroman-4-ol (5): brown powder, yield 98%,  $F$  131–132°C, UV max (MeOH, nm): 250 (band I); 320 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,412 (OH), 3,285 (N–H), 3,084 (=CH arom), 1,555–1,404 (C=C), 1,333 (C–N), 1,050 (C–O).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7.22 (1H, m, H-6''), 7.02 (1H, d, H-5''), 6.92 (1H, d, H-7''), 5.45 (1H, s, NH), 5.39 (1H, dd,  $J = 2.8$  and 7.8 Hz, H-2), 3.08 (1H, dd,  $J = 2.8$  and 13.2 Hz, H-3<sup>a</sup>), 2.98 (1H, dd,  $J = 7.8$  and 13.2 Hz, H<sup>3b</sup>), 2.06 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 79.6 (C-4), 118.8 (C-5), 156.3 (C-7), 128.6 (C-6), 131.7 (C-8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.0 (C-2), 77.4 (C-3), 136.4 (C-1''), 102.1 (C-2''), 118.8 (C-3''), 107.6 (C-4''), 128.6 (C-5''), 104.0 (C-6'').

4-(3-Methoxyphenylamino) 2-phenyl chroman-4-ol (6): light brown powder, yield 75%  $F$  111–112°C, UV max (MeOH, nm): 252 (band I); 318 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,409 (OH), 3,282 (N–H), 3,067 (=CH ar), 2,935 (C–H), 2,853, 3,163 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1,572–1,407 (C=C), 1,322 (C–N), 1,178, 1,339 (C–N), 1,049 (C–O), 697 (CH ar).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7.33 (1H, d, H-5''), 7.18 (1H, m, H-6''), 6.27 (1H, d, H-3''), 6.23 (1H, s, NH), 5.45 (1H, s, OH), 5.39 (1H, dd,  $J = 7.2$  and 2.9 Hz, H-2), 3.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.08 (1H, dd,  $J = 7.2$  and 13.2 Hz, H-3b), 2.98 (1H, dd,  $J = 2.9$  and 13.2 Hz, H<sup>3a</sup>).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 191.6 (C-4),

163.5 (C-5), 101.1 (C-7), 76.5 (C-6) 131.7 (C-8), 143.7 (C-9), 127.0 (C-10), 126.7 (C-1'), 118.1 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 118.14 (C-4'), 44.6 (C-3), 118.1 (C-1''), 101.0 (C-2''), 101.1 (C-3''), 107.9 (C-4''), 130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

2-Phenyl-4-(pyridin-2-yl)chroman-4-ol (7): orange powder, yield 99% F 118–119°C, UV max (MeOH, nm): 252 (band I); 318 (band II), IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3,415 (OH), 1,636 (C = N), 1,574–1,333 (C = C), 1,250 (C–C), 1,049 (C–O).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm) 9.0 (1H, d, H-3''), 7.68 (1H, m, H-5''), 7.65–7.57 (6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6', 6''), 7.25 (1H, m, H-5), 6.19 (3H, m, H-6, 7, 8), 5.45 (1H, s, OH), 5.39 (1H, dd,  $J = 2.8$  and 7.1 Hz, H-2), 3.08 (1H, dd,  $J = 2.8$  and 13.2 Hz, H-3<sup>a</sup>), 2.98 (1H, dd,  $J = 7.1$  and 13.2 Hz, H-3<sup>b</sup>).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 145.45 (C-1''), 138.7 (C-3''), 136.37 (C-6''), 130 (C-5''), 129 (C-9), 128 (C-6', 2', 5''), 126.2 (C-7), 121.6 (C-4''), 120.9 (C-6), 118.1 (C-8), 77.44 (C-4), 76.98 (C-2), 76.55 (C-3).

Preliminary study: the separation by a conventional C18 column  
Preliminary experiments were carried out on a conventional C18-bonded stationary phase, although attempts to resolve some diastereomeric of flavanone derivatives were already reported to be generally unsuccessful. The operating parameters (mobile phase composition, temperature) were optimized in order to achieve the best separation of the products 2–7 diastereomers as illustrated in Figure 7. Therefore, since hydrophobic interactions were insufficient to separate the 4-aminoflavan diastereomers, the use of a chiral cellulose-based stationary phases was investigated in order to obtain a faster and enhanced separations.

## Discussion

### HPLC on a polysaccharide-type stationary phase

This study is focused on the evaluation and comparison of the enantioselective performance of these CSPs (Chiralcel®OD-H and

Chiralcel®OJ) in the two phase separation modes for the novel 4-aminoflavanes. The chromatographic data of analyst are summarized in Table I.

Both the polysaccharide-based CSPs could be used for enantioseparation of the majority of products in the normal phase mode. It is obvious from the comparison of the both columns that the Chiralcel®OJ CSP showed significantly higher enantioselectivity and enantio-resolution values for the tested compounds as shown in Table I. Comparing cellulose tris-(4-methylbenzoate) and cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) cellulose CSPs indicates better enantioselectivity and resolution values, obtained on the first phase.

The complementary effect of the enantioseparation abilities of cellulose tris-(4-methylbenzoate) of cellulose is illustrated on the enantio-resolution of 4-aminoflavan 2, 3, 4 and 7 as shown in Figure 8. Chiralcel®OD-H CSP did not achieve satisfactory separation of the analytes under study. The results in Table I show that five peaks are separated for the product 2. According to the work of Rahou *et al.* (25), the peak with  $k = 1.78$  corresponds to the intermediate product. The enantiomer of *N*-(*m*-chlorophenyl) 4-iminoflavan was resolved on Chiralcel®OJ with a mixture of *n*-hexane and ethanol.

The normal phase mode was found to be more advantageous for the separation of the majority of the studied compounds on the both columns. The chiral recognition mechanism is clearly different in the other separation modes; however, hydrogen bonding and  $\pi$ - $\pi$  interactions of the aromatic moieties of the CSPs with the aromatic parts of the analytes are preferred in the normal phase separation system (35).

Among the various existing CSP, polysaccharide-based stationary phases have proved to be very efficient materials in HPLC in normal mode for the resolution of either chiral compounds or diastereomers. The discrimination power of these polysaccharide-based phases stems from complex interactions (which have not been fully elucidated yet) with the solutes. In summary, a combination of hydrophobic interactions, attractive forces (e.g., hydrogen bonding), dipole-dipole interactions and charge transfer ( $\pi$ - $\pi$ ) formation is believed to explain the molecule recognition process (30, 31, 35).

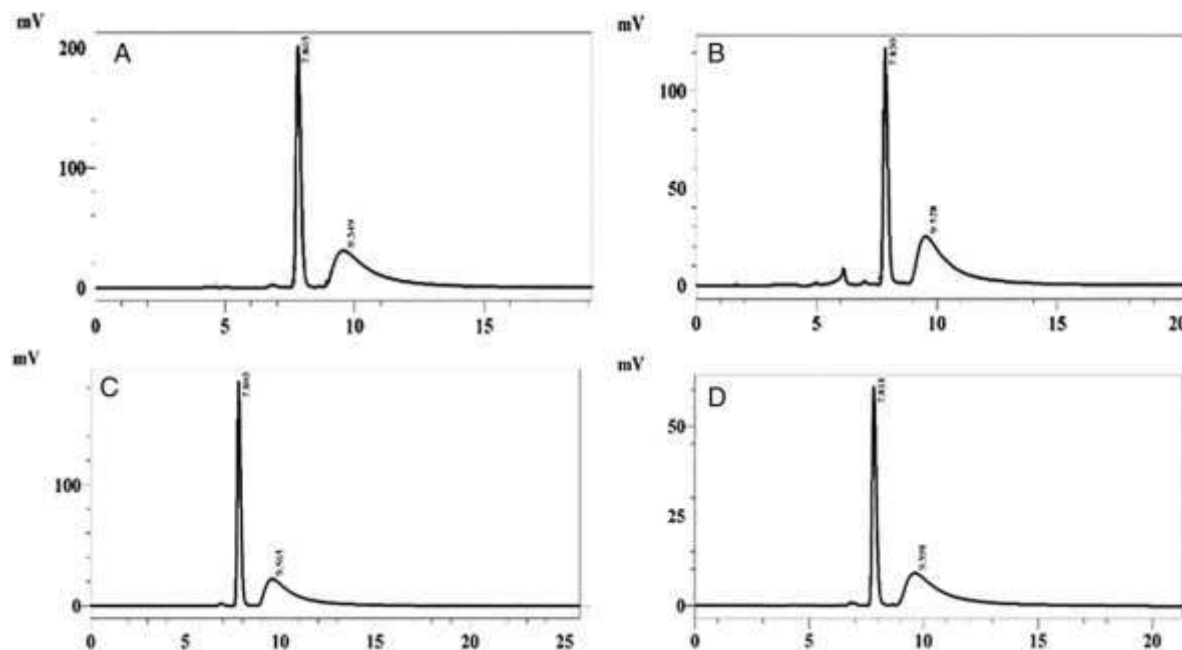


Figure 7. HPLC chromatograms the separation of compounds: 2, 3, 5 and 7 on C18 column stationary phase. Mobile phase: 100% MeOH, flow rate 0.4 mL/min, temperature 25°C, UV detector set at 290 nm.

Table I. The Results Achieved in the Normal Modes

Compound	CSP	<i>k</i>	$\alpha$	<i>R</i>	MP composition (v/v)		
1	Chiralcel®OD-H	7.70	1.23	5.00	Isopropanol 100		
		9.49					
2	Chiralcel®OJ	1.78	1.56	1.73	Hex/EtOH 80/20		
		2.79	1.61	2.58			
		4.81	1.15	1.05			
		5.22	1.14	1.16			
		5.99					
3	Chiralcel®OD-H	1.89	1.21	0.38	Isopropanol 100		
		2.29					
4	Chiralcel®OJ	2.80	1.90	2.51	Hex/EtOH 80/20		
		5.34	1.15	0.80			
		6.15	1.43	3.54			
		8.81					
5	Chiralcel®OD-H	2.78	1.73	3.03	Hex/EtOH 80/20		
		4.82				1.06	0.43
		5.14				1.14	1.01
		5.90					
		2.38					
6	Chiralcel®OD-H	1.88	1.25	3.98	Isopropanol 100		
		2.36					
7	Chiralcel®OJ	1.40	1.28	0.30	Hex/EtOH 80/20		
		1.80					
7	Chiralcel®OJ	2.74	—	—	Isopropanol 100		
		2.77	1.86	3.60	Hex/EtOH 80/20		
		5.17	1.15	1.16			
		5.95					

Retention factor of the eluted enantiomer (*k*), enantioselectivity ( $\alpha$ ) and resolution (*R*).

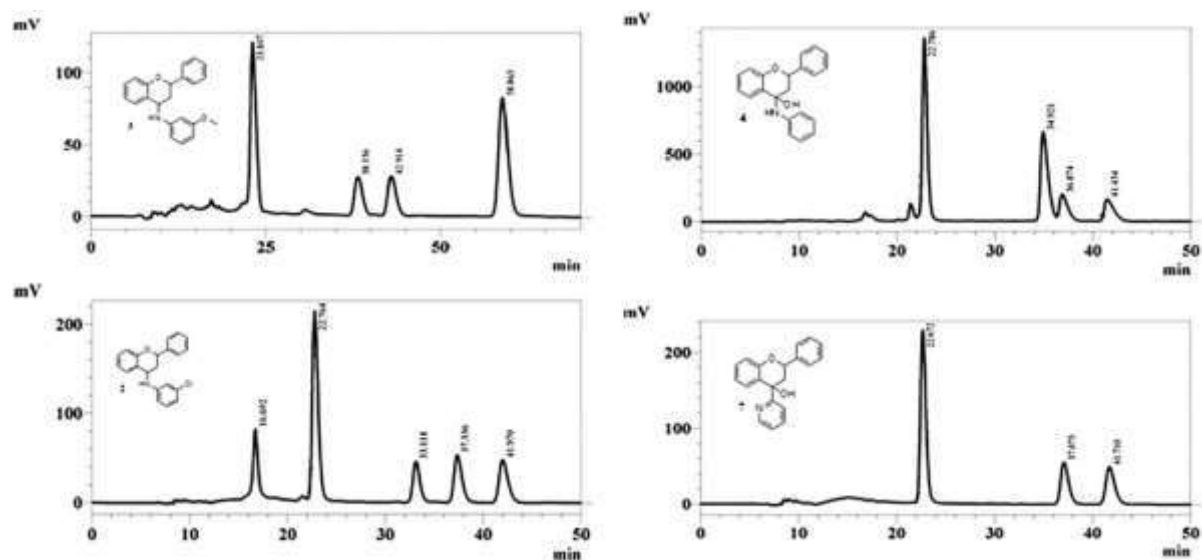


Figure 8. HPLC chromatograms of the enantiomeric separation of compounds 2, 3, 4 and 7 on CSP Chiralcel®OJ. Mobile phase: Hexane/EtOH 80/20 (v/v), flow rate 0.4 mL/min, temperature 25°C, UV detector set at 290 nm.

HPLC enantioseparations of flavanone and their derivatives compounds with a chiral carbon (C2) atom have already been reported on such polysaccharide CSP (24, 25, 29).

The influence of the mobile phase composition (MP) on the diastereomeric separations of the final products was investigated at room temperature. For each pair of diastereomers, the effect on

retention factor (*k*), separation factor ( $\alpha$ ) and resolution (*R*) is reported in Table I.

An increase in the organic modifier amount results in a decrease in retention (*k*) and separation ( $\alpha$ ) factors. This can be explained by a decrease in hydrophobic interactions of the solutes with the stationary phase, as well as  $\pi$ - $\pi$  competing interactions of the solvent toward

the substituted phenyl moieties of the CSP. The diastereomeric resolution of the products 2, 3 and 4 occurs owing to a difference in the magnitude of interactions of each diastereomer with the CSP. In brief, each diastereomer fits stereogenically in a different way into the chiral grooves of the stationary phase, and develops  $\pi$ - $\pi$  interactions of different magnitude with the CSP (28, 29). The diastereomeric separation of compounds 2 and 7 is shown in Figure 2, after optimization of the mobile phase composition.

These chiral stationary phases have the same polymeric backbone which is cellulose, but possessed different derivatization functionality. The results showed that tris-(4-methylbenzoate) cellulose has very broad, and often complementary, enantioselective abilities. In general, normal phase separation mode seemed to be more advantageous for separation of the majority of studied pharmaceuticals using amylose- or cellulose-based columns (35–42).

It is easy to judge from the results which CSP is more efficient to achieve better enantioseparation of flavanone derivatives in the normal phase mode. Chiralcel<sup>®</sup>OD-H column was slightly less effective in separation of these analytes, yet the results do not allow any generalization.

## Conclusion

This investigation describes a simple and efficient synthesis of various flavanones derivatives starting from commercially available materials in high yield. The ability of several polysaccharide-based chiral stationary phases to resolve such diastereomers in the normal phase mode by HPLC is reported. The influence of operating parameters has been studied to optimize the separation. The polysaccharide-based chiral stationary phase (Chiralcel<sup>®</sup>OJ) has demonstrated to be very useful to carry out HPLC separation of 4-aminoflavan diastereomers. However, the combination of Chiralcel<sup>®</sup>OJ and Chiralcel<sup>®</sup>OD-H columns offers a powerful tool for enantioseparation of different types of products in the normal phase mode.

## References

- Middleton, E.J.; Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function; *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (1998); 439: 175–182.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C.; Flavonoids: antioxidants or signalling molecules; *Free Radical Biology and Medicine*, (2004); 36: 838–849.
- Halsteen, B.; Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency; *Biochemical Pharmacology*, (1983); 32: 1141–1148.
- Silberberg, M., Gil-Izquierdo, A., Combaret, L., Remesy, C., Scalbert, A., Morand, C.; Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats; *Biomedicine and Pharmacotherapy*, (2006); 60: 529–535.
- Shi, L., Feng, X.E., Cui, J.R., Fang, L.H., Du, G.H., Li, Q.S.; Synthesis and biological activity of flavanone derivatives; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (2010); 20: 5466–5468.
- Pietta, P.G.; Flavonoids as antioxidants; *Journal of Natural Products*, (2000); 63: 1035–1042.
- Özyürek, M., Akpınar, D., Bener, M., Türkkın, B., Güçlü, K., Apak, R.; Novel oxime based flavanone, naringin-oxime: synthesis, characterization and screening for antioxidant activity; *Chemico-Biological Interactions*, (2014); 212: 40–46.
- Maiti, A., Cuendet, M., Croy, V.L., Endringer, D.C., Pezzuto, J.M., Cushman, M.; Synthesis and biological evaluation of ( $\pm$ )-abyssinone II and its analogues as aromatase inhibitors for chemoprevention of breast cancer; *Medicinal Chemistry*, (2007); 50: 2799–2806.
- Kavala, K., Lin, C., Kuo, C.W., Fang, H., Yao, C.F.; Iodine catalyzed one-pot synthesis of flavanone and tetrahydropyrimidine derivatives via Mannich type reaction; *Tetrahedron*, (2012); 68: 1321–1329.

- Li, W.-D.Z., MA, B.-C.; Simple biomimetic synthesis of dl-chamaejasmine, a unique 3,3'-biflavanone; *Organic Letters*, (2005); 7: 271–274.
- Veitch, N.C., Grayer, R.J.; Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins; *Natural Product Reports*, (2011); 28: 1626–1695.
- Crozier, A., Del-Rio, D., Clifford, M.N.; Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds; *Molecular Aspects of Medicine*, (2010); 31: 446–467.
- Robards, K., Tucker, G.; Bioactivity and structure of biophenols as mediators of chronic diseases; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (2008); 48: 929–966.
- Nibbs, A.E., Scheidt, K.A.; Asymmetric methods for the synthesis of flavanones, chromanones, and azaflavanones; *European Journal of Organic Chemistry*, (2012); 3: 449–462.
- Wang, S.P., Liu, P., Zhai, Y.L., Lin, H.C., Han, Z.Y., Gong, L.Y.; Asymmetric allylic C–H oxidation for the synthesis of chromans; *Journal of American Chemical Society*, (2015); 40: 12732–12735.
- Reddy, M.V.B., Kishore, P.H., Rao, C.V., Gunasekar, D., Caux, C., Bodo, B.; New 2'-oxygenated flavonoids from *Andrographis affinis*; *Journal of Natural Products*, (2003); 66: 295–297.
- Albogami, S.A., Alkhatlan, H.Z., Saleh, T.S., Elazazy, A.M.; Microwave-assisted synthesis of potent antimicrobial agents of flavanone derivatives; *Oriental Journal of Chemistry*, (2014); 30: 435–443.
- Eshghi, H., Rahimizadeh, M., Mousavi, S.M.; Fe(HSO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>: an efficient and heterogeneous catalyst for one-pot synthesis of 2-aryl-chromene-4-ones (flavanones); *Natural Product Research*, (2014); 28: 438–443.
- Dar, B.A., Ahmad, N., Patial, J., Sharma, P., Bindu, K., Maity, S., et al. Sulfated zirconia as an efficient heterogeneous and reusable catalyst for one-pot synthesis of flavanones; *Journal of Saudi Chemical Society*, (2014); 18: 464–468.
- Chandrasekhar, S., Vijeender, K., Reddy, K.V.; New synthesis of flavanones catalyzed by L-proline; *Tetrahedron Letters*, (2005); 46: 6991–6993.
- Choudary, B.M., Ranganath, K.V.S., Yadav, J., Kantam, M.L.; Synthesis of flavanones using nanocrystalline MgO; *Tetrahedron Letters*, (2005); 46: 1369–1371.
- Albogami, S.A., Karama, U., Mousa, A.A., Khan, M.S., Almazroa, A., Alkhatlan, H.Z.; Simple and efficient one step synthesis of functionalized flavanones and chalcones; *Oriental Journal of Chemistry*, (2012); 28: 619–626.
- Belboukhari, N., Cheriti, A., Roussel, C., Vanthuyne, N.; Chiral separation of hesperidin and naringin and its analysis in a butanol extract of *Lau-neaearborescens*; *Natural Product Research*, (2010); 247: 669–681.
- Lahmer, N., Belboukhari, N., Cheriti, A.; Méthodes et techniques de la séparation chiral des flavanones; *PhytoChem BioSub Journal*, (2011); 5: 1–4.
- Rahou, I., Belboukhari, N., Sekkoum, K., Cheriti, A., Aboul-Enein, H.Y.; Chiral separation of 4-iminoflavan derivatives on several polysaccharide-based chiral stationary phases by HPLC; *Chromatographia*, (2014); 77: 17–18.
- Belboukhari, N., Rahou, I., Cheriti, A., Benmiloud, A., Cheikh, N., Fandougouma, O.; Chiral separation of imino-4-hesperidin derivatives by thin layer chromatography; *PhytoChem and BiolSub Journal*, (2011); 5: 170–173.
- Fandougouma, O., Cheikh, N., Belboukhari, N., Cheriti, A.; Antioxidant activity of Imino-Hesperidin derivatives; *PhytoChem and BioSub Journal*, (2014); 8: 45–50.
- Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., Lahmer, N., Naas, A.; In vitro effect of hesperidin & hesperitin on calcium oxalate crystallization: the chiral impact; *PhytoChem and BioSub Journal*, (2014); 8: 51.
- Lahmar, N., Belboukhari, N., Cheriti, A.; Chiral separation of several flavanones by liquid chromatography; *International Journal Chemical Studies*, (2015); 1: 1–5.
- Belboukhari, N.; Enantioseparation of hydroxyflavanones on amylose and cellulose CSPs by HPLC methods; *Journal Chromat Separation Technique*, (2012); 3: 67–68.
- Addadi, K., Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., Aboul-Enein, H.Y.; Screening approach for chiral separation of  $\beta$ -aminoketones by HPLC on various polysaccharide-based chiral stationary phases; *Chirality*, (2015); 27: 332–338.

32. Heydari, A., Arefi, A., Esfandyari, M.; Direct reductive amination of aldehydes and selective reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds by  $\text{NaBH}_4$  in the presence of guanidine hydrochloride in water; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, (2007); 274: 169–172.
33. Zhanga, R., Edgar, K.J.; Water-soluble aminocurdan derivatives by chemoselective azide reduction using  $\text{NaBH}_4$ ; *Carbohydrate Polymers*, (2015); 122: 84–92.
34. Tripathi, A.K., Mukherjee, D., Koul, S., Taneja, S.C.; Facile synthesis of various 2-substituted-4-(2-pyridyl) benzopyran analogues as target potassium channel opener; *ARKIVOC*, (2009); xiii: 241–251.
35. Aboul-Enein, H.Y., Ali, I.; *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, (2003), ISBN: 0-8247-4014-9.
36. Ali, I., Saleem, K., Hussain, I., Gaitonde, V.D.; Polysaccharides chiral stationary phases in liquid chromatography; *Separation and Purification Reviews*, (2009); 38: 97–147.
37. Aboul-Enein, H.Y., Ali, I.; Studies on the effect of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of neбиволol by HPLC; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (2001); 48: 175–188.
38. Ali, I., Gaitonde, V.D., Aboul-Enein, H.Y., Hussain, A.; Chiral separation of  $\beta$ -adrenergic blockers on CelluCoat column by HPLC; *Talanta*, (2009); 78: 458–463.
39. Ali, I., Aboul-Enein, H.Y.; Impact of immobilized polysaccharide chiral stationary phases on enantiomeric separations; *Journal of Separation Science*, (2006); 29: 762–769.
40. Ali, I., Naim, L., Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y.; Chiral separations of piperidine-2,6-dione analogues on Chiralpak IA and Chiralpak IB columns by using HPLC; *Talanta*, (2006); 69: 1013–1017.
41. Geryk, R., Kalíková, K.T., Vozka, J.J., Tesarčíková, E.; Immobilized polysaccharide-based stationary phases for enantioseparation in normal versus reversed phase HPLC; *Chromatographia*, (2015); 78: 909–915.
42. Younes, A.A., Mangelings, D., Heyden, Y.V.; Chiral separations in normal-phase liquid chromatography: enantioselectivity of recently commercialized polysaccharide-based selectors. Part II. Optimization of enantioselectivity; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2011); 56: 521–537.

## Antibacterial activities of Substituted 4-Iminoflavanes

Ismahan Rahou<sup>1,2\*</sup>, Sekkoum Khaled<sup>1</sup> and Belboukhari Nasser<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bioactive Molecule & Chiral separation Laboratory , University of Bechar, Bechar, 08000, Algeria

<sup>2</sup> Faculté des mathématique et sciences de la matière , Université Kasdi Merbah Ouargla

(Received 04 March 2019 - Accepted 12 July 2019 – Published 30 July 2019 )

**Abstract.** A number of 4-iminoflavanes derivatives have been synthesized and evaluated for their antibacterial activities. Synthesis of a 4-iminoflavanes were carried out by condensation of flavanone with a primary amine without a catalysis. The chemical structures of the newly synthesized compounds were verified on the basis of spectral and elemental methods of analysis. Most of the synthesized derivatives were found to be active against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Activity of 4-iminoflavanes was found to be higher than the initial materials flavanone. Investigated compounds having substituents like Cl, OMe and OH at the starting amine exhibited enhanced activity and the presence of electronegative groups in the studied compounds showed a direct relationship to the antibacterial activity.

**Keywords:** Synthesis, Flavanone, 4 - Iminoflavan, Antibacterial

### 1. Introduction

Flavonoid framework is medicinally important structural organization present in many bioactive molecules showing various activities like antiviral, antibacterial, antiprotozoal, oestrogenic, anti-inflammatory, mutagenic, antimutagenic and antineoplastic activities, and is also capable of inhibiting many types of enzymes.[1-4] This class of compounds has received much attention because of their pharmacological activities.[5-8]

The flavanones are a class of flavonoid (naturally occurring polyphenolic compounds) which are extensively distributed in vascular plants.[9] These are minor ingredients of the human diet.[10-11] Many studies have reported that flavanone contains many pharmacological activities [12] like antioxidant effect, inhibition of HIV-1 proteinase, and anticancer [13], vasodilator, antiviral and antiallergenic[14], in addition to antimicrobial [15,16], anti-inflammatory[17] activities. The curiosity in the biological properties of flavanones has resulted extreme synthetic efforts toward the synthesis of different flavanones.[18] Moreover, amino group substituted flavone derivatives exhibit strong antitumour activity in breast cancer cells [19].

\* Corresponding author.

E-mail: [belboukhari.nasser@yahoo.com](mailto:belboukhari.nasser@yahoo.com) (Rahou I.).

Address: University of Bechar, Bechar, 08000, Algeria.

Although, there is some work has been carried out on nitrogen containing flavones; iminoflavones have been reported to show considerable antimicrobial activities and antimalarial activities.[20,21]

It is well known that halogenated compounds are also strongly biologically active, [22,23] but to our knowledge no natural flavonoids have been reported with halogens as substituents. Additionally, we were also interested to check the effect of nitrogen atom at 4-position of flavanes on their biological activity. Therefore, in order to search for new compounds that can be used for the treatment of bacterial infections, this paper describes the synthesis of variably substituted 4-iminoflavanes and in vitro evaluation of the new and known flavanone and 4-iminoflavanes against a number of bacteria.

## 2. Chemistry

In view of the importance of bioactive flavanone and 4-iminoflavanes in recent years as described above, it was thought to replace the oxygen atom of the ketone group of flavanone with a substituted amino group to check their effect as well as the effect of various substituents on the biological activities of flavanone.

The flavanone derivatives (7 compound) were synthesized using flavanone and aniline had been purchased from Sigma-aldrich. Tertbutylamine, *p*-chloroaniline, *m*-chloroaniline, *p*-anisidine, 1-naphthylamine and 4-aminophenol have been purchased from Fluka (Buchs, Switzerland),[24] as shown in Scheme 1.

Flavanone 1 (5 mMol) and aromatic amine (5 mMol) were refluxed in methanol (5 ml), after 3 days, the main liquid was heated to the boiling point, and an equal volume of hot water was added. Crystals were obtained upon cooling the mixture. The 4-iminoflavans were recrystallized from ethanol.[24]

A simple and one pot process for the synthesis of 4-iminoflavanes in the presence of methanol without catalysis, Under these conditions several products were found with very good yields (70–98%).

All of the compounds 2-8 were fully characterized through spectroscopic and other analytical techniques, details of which are given separately in Section

## 3. Biological activity

Synthesized compounds were tested for their antibacterial activity by adopting agar well diffusion [23, 25] method. The following bacterial cultures were used

(i) *Escherichia coli* (ii) *Staphylococcus aureus* (iii) *Pseudomonas aeruginosa* (iv) *Listeria monocytogenes* (v) *Bacillus subtilis*.

The disc-diffusion method was used as a screening test for antibacterial activity. Filter paper discs impregnated with sample solutions were placed on Mueller Hinton agar plates, which have been inoculated with test organisms according to the standard protocol. The flavanone and all compounds, dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO), Test samples of 100  $\mu$ L (1 mg of test compounds) were poured into each well and the plates were incubated at 37°C for 24 h. The diameters of the inhibition zones were measured after 24 h. Filter paper discs containing DMSO without any test compound served as control and no inhibition was observed. The results of the antibacterial screening were compared with the standard antibacterial drug Ampicillin. The results of these experiments are summarized in Table 1.

## 4. Results and discussion

At the present work, we have employed flavanone as a naturally occurring skeleton for the synthesis of 4-iminoflavanes then screen them against representative panel of Gram-positive and Gram –



negative bacteria. The in vitro bioactivities of the synthesized compounds have shown encouraging results against various classes of bacteria as mentioned above.

The results of the screening test for the eight different flavanones derivatives against five bacteria using the disc-diffusion method are shown in Table 1.

Antibacterial activity analysis of 4-iminoflavane **2-8** showed moderate activity against *Staphi* and *L.monocytogenes* but exhibited very low activity against *E.coli* and *B.cereus*. However, flavanone which are the starting materials significant of synthesized, did not show significant activity against tree bacteria. Only one product **3** showed activity against *E.coli*, while all compounds **2-8** showed height antibacterial activity against *L.monocytogenes*. None of the eight flavanones derivatives showed activity against *P.aeruginosa*. Among the products tested, only tree **2, 3, 5** exhibited activity against the gram-positive bacteria *Staphi*.

The product **8** showed serious antibacterial activity with value ranging between (15.6-23.3) against tree different gram-positive bacterial.

In most cases, the presence or introduction of various functional groups in a compound does not allow to accurately explain the kind and intensity of its biological activity.<sup>23</sup> It is clear that antibacterial activity of flavanones derivatives increases accordingly on replacing oxygen atom with nitrogen atom at 4-position.

All 4-iminoflavanes **2-8** have more antibacterial activity as compared to flavanones. Furthermore, when 4-iminoflavanes **4, 5, 7** have methoxy, hydroxyl group and Cl atom in the amine-ring at position 4'', the linear growth inhibition against *L.monocytogenes* and *Staphi*. However, 4-iminoflavanes **4** are much more active against bacteria than **6**. Thus increase in activity is probably due to the resonance effect of aliphatic group that is more prominent than aromatic amine with give more activity against *L.monocytogenes*, Moreover, product **8** showed a very significant inhibition against 23.3.

The results show that electron-donating and electronegative groups are responsible for the antibacterial activity of flavanone and 4-iminoflavanes provided these groups are at 4''-position in amine-ring rather than any other position.

The N-(2-naphtyl) 4-iminoflavan (**8**) showed linear growth inhibition of 16.3 and 15,6 against *Staphi* and *B.cereus* respectively, whereas standard drug ampicillin showed 28 and 25, respectively.

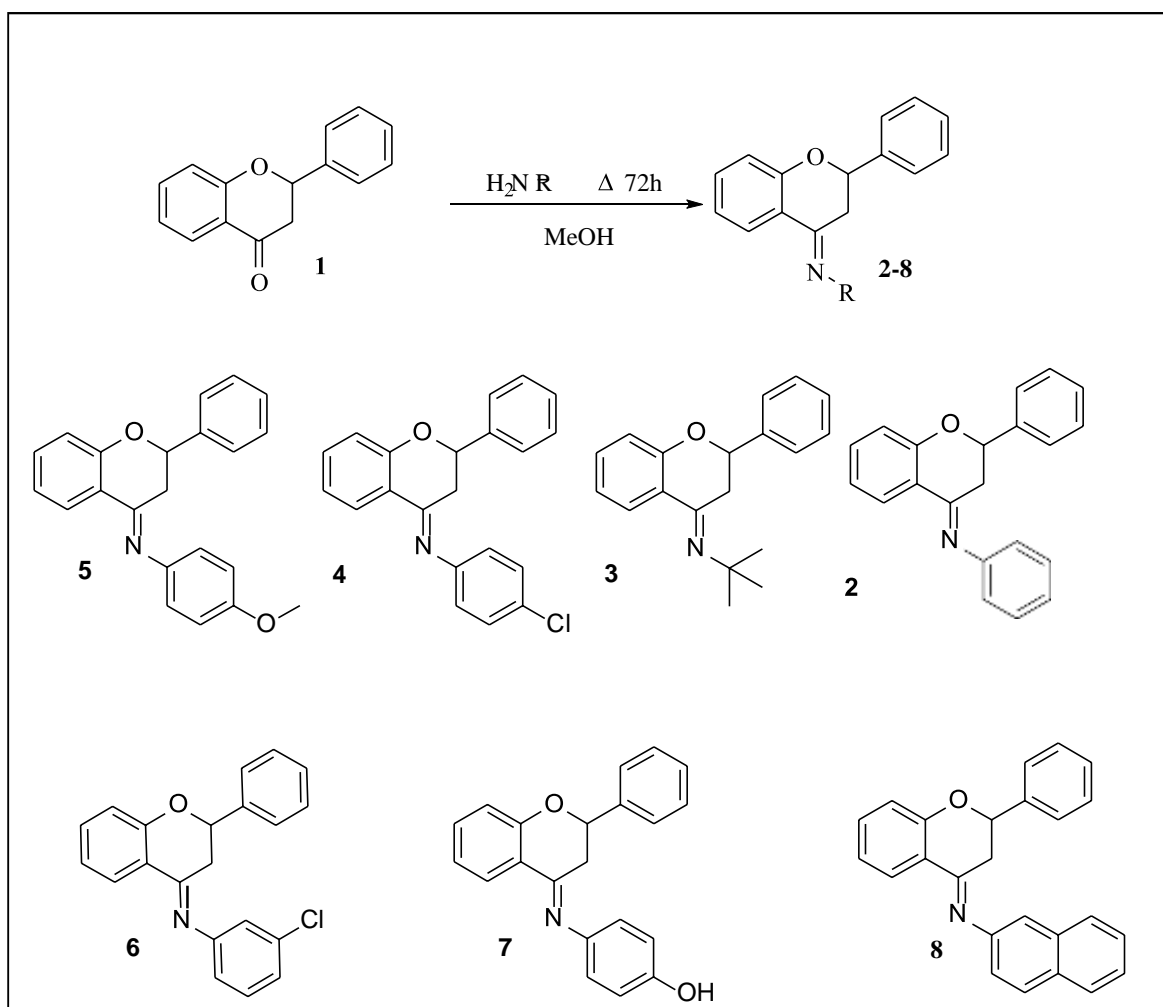
Therefore, it is concluded that a 2-naphtyl moiety in compound **8** is responsible for its enhanced antibacterial activity, while flavanone and the other 4-iminoflavanes remain inactive or less active.

**Table 1. Antibacterial activities of flavanone and 4-imioflavanes compounds, relative to the standard drug Ampicillin**

Compound	Bacteria				
	<i>E.coli</i>	<i>Staphi</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>B.cereus</i>
<b>1</b>	-	8.0	-	-	7.3
<b>2</b>	-	-	-	7.3	-
<b>3</b>	7.0	-	-	15.0	-

4	-	7.0	-	14.0	-
5	-	-	-	7.3	7.3
6	-	7.0	-	7.3	8.3
7	-	18.0	-	20.0	18.0
8	-	16.3	-	23.3	15.6
<b>Ampicillin</b>	25	25	-	-	28

Inhibition zones are given in millimeter



**Scheme 1:**

**Synthesis of 4-iminoflavanes compounds 2-8**

## 5. Conclusion

Different compounds of flavanones derivatives have been synthesized and evaluated for their biological activities. The chemical structures of the newly synthesized compounds were verified on the basis of spectral and elemental methods of analysis. Investigation, of antibacterial activity of these compounds was determined by measuring inhibition zones for Gram-positive and Gram-negative bacteria, among the various synthesized compounds. It can further be concluded that the percentage inhibition increases as the electronegativity of the halogen atom on amine-ring increases.

## 6. Experimental

Chemicals used in the present study were purchased from Merck and Fluka (Germany). All solvents and reagents were obtained from Chemminova (Harboøre, Denmark) and riedel- deHaën (Sleeze, germany). Rf values were calculated by using precoated silica gel aluminium packed plates Kiesel gel 60F254Merck (Germany). Melting points were determined in open capillaries using B-540 Büchi melting point apparatus and are uncorrected. FTIR spectra, spectrophotometer using KBr discs. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on Bruker AC (400 MHz) in MeOD-d4 solution using TMS as internal standard. Purity of each compound was monitored by TLC.

The procedure for the synthesis of a representative 4-iminoflavanones **2-8** is given below. All of the compounds were synthesized according to the procedures<sup>24</sup> as outlined in Scheme 1. Spectroscopic as well as other physical data of the known products are given in the cited literature, while those of the new one **3**, **4**, **5** and **7** are given below.

N-(Tertbutyl) 4-iminoflavan (**3**): green powder, yield 83 %, F 72–74 °C, UVmax (DMF, nm): 265 (band I); 320 (band II), IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3,084 (=CH arom), 2,860–2,960 (CH<sub>3</sub>), 2,919 (CH<sub>2</sub>) 1,606 (C=N), 1,547–1,498 (C=C), 1,153, 1,033 (C–O).

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm, *J*, *J*2Hz): 7.87 (d, 8.02, H-5), 7.83 (m, H-7), 6.96 (d, H-6), 7.57 (d, H-2', H-6'), 7.53 (m, H-4'), 7.31 (d, H-3', H-5'), 6.81 (d, H-8), 5.40 (1H, dd, 3.2, 2.8, H-2), 2.99 (1H, dd, 2.8, 13.6 Hz, H3b), 2.77 (1H, dd, 3.2, 13.6 Hz, H-3a), 1.30(m, 3CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 165.7 (C-4), 163.4 (C-5), 156.7 (C-7), 131.7 (C-6) 131.5 (C-8), 143.0 (C-9), 127.2 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.7 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.4 (C-2), 52.1 (C-1''), 44.6 (C-3), 30.1(3CH<sub>3</sub>).

N-(p-Chloro-Phenyl) 4-iminoflavan (**4**): dark brown powder, yield 85 %, F 72–73 °C, UVmax (DMF, nm): 265 (band I); 320 (band II), IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3,084 (=CH arom), 2,860(CH<sub>2</sub>), 1,606 (C=N), 1,547–1,498 (C=C), 1,153, 1,033 (C–O).

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):7.85 (d, H-5), 7.80 (dd, H-7), 7.58 (dd, 6.1, 2.3, H-2', H-6'), 7.54 (dd, 6.2, 6.3, H-4'), 7.33 (dd, 6.1, 6.2, H-3', H-5'), 7.01 (dd, 5.9, 6.1 H-5''), 6.69 (d, 6.1, H-2''), 6.55 (d, 2.3, H-3''), 6.43 (dd, 6.2, 2.3H-6''), 6.96 (dd, 6.1, 6.4, H-6), 6.81 (d, 6.1, H-8), 5.38 (1H, dd, *J* = 2.8, 3.2, H-2), 2.96 (1H, dd, *J* = 3.2, 13.6 Hz, H3b), 2.76 (1H, dd, *J* = 2.8, 13.6 Hz, H-3a).

<sup>13</sup>C NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 164.6 (C-4), 163.6 (C-5), 156.3 (C-7), 132.01 (C6), 131.7 (C- 8), 143.4 (C-9), 127.6 (C-10), 126.4 (C-1'), 138.5 (C-2'), 138.5 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 129.3 (C-4'), 77.8 (C-2), 44.4 (C-3), 148.17 (C-1''), 102.1 (C-4''), 159.85 (C-3''), 107.6 (C-2''), 130.4 (C-5''), 104.01 (C-6'').

N-(p-Methoxy phenyl) 4-iminoflavan (**5**): yellow powder, yield 98 % F 54-50 °C, UV max(DMF, nm): 270 (band I); 320 (band II), IR(KBr, cm<sup>-1</sup>): 3,067 (=CH ar), 2,853, 2,927 (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1,609 (C=N), 1553, 1,491 (C=C), 1,178, 1,077 (C-O), 697 (CH ar).

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):7.88 (d, H-5), 7.84 (m, H-7), 7.56 (d, H-2', H-6'), 7.53 (m, H-4'), 7.33 (d, H-3', H-5'), 6.21 (d, H-2''), 6.35 (d, H-3''), 7.05 (d, H-5''), 6.24d (d, H-6''), 6.96 (t, H-6), 6.83 (d, H-8), 5.33 (1H, dd, *J* = 2.8, 3.2, H-2), 2.91 (1H, dd, *J* = 3.2, 13.6 Hz, H3b), 2.77 (1H, dd, *J* = 2.8, 13.6 Hz, H-3a), 3.71 (3H, s, 4''-O-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):164.8 (C-4), 163.5 (C-5), 156.1 (C-7), 131.7 (C-6) 131.7 (C- 8), 143.7 (C-9),127.6 (C-10), 126.7 (C-1'), 138.9 (C-2'), 138.9 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.3 (C-2), 44.6 (C-3), 148.1 (C-1''), 101.0 (C-2''), 160.7 (C-3''), 107.9 (C-4''),130.0 (C-5''), 103.8 (C-6'').

N-( Hydroxyl-Phenyl) 4-iminoflavan (**7**): brown powder, yield 70 % ,

F 138-139 °C, UV max(DMF, nm): 260 (band I); 314 (band II), IR(KBr, cm<sup>-1</sup>): 3,412(OH), 3,078 (=CH arom), 1,607 (C =N), 1,547-1,498 (C=C), 1,142 (C-O).

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) 12.77(s, 4''-OH), 7.87(d, H-6), 7.64(m, H-6), 7.40(m, H2', H6'), 7.19(d, H2'', H6''), 7.00(d, H8), 6.98(m, H-3'', H-6''), 5.41(1H, dd, *J*=2.5, 13.2Hz, H-2), 3.05(1H, dd, *J*=3.6, 2.8, H-3b), 2.85(1H, dd,*J*=3.6, 2.8, H-3a).

<sup>13</sup>C NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 165.7 (C-4), 163.4 (C-4''), 156.7 (C-7), 131.7 (C-6) 131.5 (C-8), 143.01 (C-9), 127.2 (C-10), 126.6 (C-1'), 138.7 (C-2'), 138.7 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5') 129.6 (C-4'), 77.4 (C-2), 44.6 (C-3), 146.5 (C-1''), 115.0 (C-2''), 115.0 (C-6''), 129.2 (C-3''), 129.2 (C-5'').

## 7. References

- [1] Harborne, J. B.; Williams, C. A, Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry. 2000, 55, 481.
- [2] Robak, J.; Gryglewski, R. J, Bioactivity of flavonoids, Pol. J. Pharmacol. 1996, 48, 555.
- [3]Williams, C. A.; Grayer, R, Anthocyanins and other flavonoids, J. Nat. Prod. Rep. 2004, 21, 539
- [4] Dongamanti, A.; Aamate, V. K.; Devulapally, M. G.; Gundu, S.; Kotni, M. K.; Manga, V.; Balasubramanian, S.; Ernala, P, Synthesis, antimicrobial activity and molecular docking of novel tetracyclic scaffolds incorporating a flavonoid framework with medium sized oxygen heterocycles, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015, 4, 898.
- [5] Ferguson, P. J.; Kurowska, E. M.; Freeman, D. J, In Vivo Inhibition of Growth of Human Tumor Lines by Flavonoid Fractions From Cranberry Extract, Nutr. Cancer. 2006, 56, 86.
- [6] Havsteen, B, Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, Biochem. Pharmacol. 1983, 32, 1141.
- [7] Van Acker, S. A.; Van Balen, G. P.; Van den Berg, D. J.; Bast, A.; Van der Vijgh W. F, Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids, Biochem. Pharmacol. 1998, 56, 935.
- [8] Jodeh, S.; Shawarb, N.; Jaradat, N.; Warad, I.; Hussein, F.; El-Masri, M.; Salghi, R, Synthesis and Biological Activities of a Novel Naringin based Heterocyclic Derivatives, Mor. J. Chem. 2015, 3, 242.
- [9] Lee, J. I.; Jung, M. G.; Jung, H. J, A Novel Synthesis of Flavanones from 2-Hydroxybenzoic Acids, Bull. Korean Chem. Soc. 2007, 28, 859.
- [10] Kabalka, G. W.; Mereddy, A. R, Microwave-assisted synthesis of functionalized flavones and chromones, Tetrahedron Lett. 2005, 46, 6315.

- [11] Bennardi, D. O.; Romanelli, G. P.; Autino, J. C.; Pizzio, L. R, Supported trifluoromethanesulfonic acid as catalyst in the synthesis of flavone and chromone derivatives, *Appl. Catal. A: Gen.* 2007, 324, 62.
- [12] Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; López, J., Alvarez, J. A. P, Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly *J. Food Sci.* 2008, 73, 117.
- [13] Yanling, L.; Hao, F.; Wenfang, X, Recent Advance in the Research of Flavonoids as Anticancer Agents, *Mini Rev. Med. Chem.* 2007, 7, 663.
- [12] Alan, L.; Miller, N. D, Natural Treatment of Chronic Rhinosinusitis, *Altern. Med. Rev.* 1996, 1, 103.
- [13] Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J, Antimicrobial activity of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005, 26, 343.
- [14] Young, J.; Park, Y.; Lee, Y. U.; Kim, H.; Shim, Y. H.; Ahn, J. H.; Lim, Y, Antimicrobial effects of flavone analogues and their structure-activity relationships, *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17, 530.
- [15] Pan, M. H.; Lai, C. S.; Ho, C. T, Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids, *Food Funct.* 2010, 1, 15.
- [16] Dar, B. A.; Ahmad, N.; Patial, J.; Sharma, P.; Bindu, K.; Maity, S.; Singh, B, Sulfated zirconia as an efficient heterogeneous and reusable catalyst for one pot synthesis of flavanones, *Journal of Saudi Chemical Society.* 2014, 18, 464.
- [17] Akama, T.; Shida, Y.; Sugaya, T.; Ishida, H.; Gomi, K.; Kasai, M, Novel 5-aminoflavone derivatives as specific antitumor agents in breast cancer, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 3461.
- [18] Ghanwate, N. A.; Raut, A. W.; Doshi, A. G, Synthesis and antimicrobial properties of Flavone imines, *Orient J.Chem.* 2008, 24, 721
- [19] Razdan, R. K.; Bruni, R. J.; Mehta, A. C.; Weinhardt, K. K.; Papanastassiou, Z. B, A new class of antimalarial drugs: derivatives of benzothioopyrans, *J. Med. Chem.* 1978, 21, 643.
- [20] Mehta, A. G.; Patel, A. A, Studies on Novel N4-[4,6-Diaryl-2-pyrimidinyl]- 7-chloro-4-quinolinamine and their Microbicidal Efficacy, *E-Journal of Chemistry.* 2009, 6, S406.
- [21] Ullah Mughal, E. ; Ayaz, M. ; Hussain, Z. ; Hasan, A. ; Sadiq, A. ; Riaz, M. ; Malik, A. ; Hussain, S. ; Choudhary, M. I, Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 4704.
- [22] Rahou, I.; Belboukhari, N.; Sekkoum, K.; Cheriti, A.; Aboul-Enein, H. Y, Chiral Separation of 4-Iminoflavan Derivatives on Several Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases by HPLC, *Chromatographia.* 2014, 2714, 9.
- [23] Waitz, J. A.; Drube, C. G.; Weinstein, M. J, Biological studies with rosamicin, a new Micromonospora-produced macrolide antibiotic, *J. Antibiotics* 1972, 25, 647.

## المخلص

يهدف هذا العمل إلى التركيب العضوي، دراسة الفاعلية البيولوجية وفصل المتماكبات لمشتقات مركب 4-إمينوفلافون. لقد طورنا طريقة تفاعل بسيطة إنطلاقاً من جزئ الفلافانول. تستند هذه التفاعلات على تفاعلي التكثيف والإرجاع باستعمال أمينات أولية والبيردين كمتفاعلات؛ وقد سمح لنا هذا بإعداد واحد وعشرون مشتقاً جديداً لم يأتي على ذكره من قبل. جميع المركبات الناتجة تم تمييزها وتحديدها باستعمال طرق التحليل الطيفية UV، IR،  $RMN^1H$ ،  $RMN^{13}C$ . تم فصل كل مشتقات إمينوفلافون 2-22 بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة ضمن شروط الطور العادي و الطور العضوي القطبي، باستخدام ست أطوار ثابتة متماكبة يدويا من مشتقات السكريات المتعددة، Chiralcel®OD H، Chiralpak®IA، Chiralcel®OD، Chiralpak®AD، Chiralpak®IB، Chiralcel®OJ، مع أطوار سائلة مختلفة التركيب ألكان /كحول، أثبتت الدراسة أن آلية الفصل للمتماكبات تعتمد على طبيعة و بنية الطور الثابت المتماكب يدويا. في الأخير تم دراسة النشاطات البيولوجية لكل مركبات ناتجة متمثلة في مضادات الأكسدة، مضادات الفطرية و بكتيرية؛ بالنسبة للاختبارات التي أجريت ضد البكتريا أعطت نتائج متباينة و معظمها إيجابية بالنسبة لكل المركبات. إلا أن اختبارات ضد الفطريات باستخدام سلالات *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* أعطت نتائج سلبية. بالنسبة لفحص مضادات الأكسدة قد تم إستخدام ثلاث تقنيات التالية: إختبار DPPH، إرجاع الحديد FRAP و تقنية  $\beta$  كاروتين. أغلب المشتقات أظهرت أن لها قدرة تثبيط عالية ضد الجذور بالأخص جزيئات 4-إمينوفلافون

**الكلمات المفتاحية:** الفلافانول، فصل المتماكبات، المتماكبة اليدوية، الكروماتوغرافيا السائلة العالية الكفاءة، النشاط البيولوجي، الطور الثابت، DPPH، FRAP.

## Abstract

This work was interested in the synthesis, biological activity and chiral separation of enantiomers and diastereomers of 4-Iminoflavane derivatives. First we synthesized a new molecules from flavanone by a simple and easy methods. These syntheses are based on condensation and reduction reactions using as reagents primary amines and pyridine. This allowed us to prepare twenty-one new Flavanone derivatives, which not described until today. The structures of these compounds have been proved by spectroscopic methods IR, UV,  $RMN^1H$  and  $RMN^{13}C$ . The HPLC enantiomeric separation of all products 2-22 was accomplished in the normal phase and organic polar mode, using six polysaccharides derived chiral stationary phases (Chiralcel®OD-H, Chiralcel®OD, Chiralcel®OJ, Chiralpak®AD, Chiralpak®IA and Chiralpak®IB) and various n-alkane/alcohol mobile phases. The enantioseparation of these new compounds shows that the chiral recognition mechanism of each stationary phase is based on the chemical nature and conformation of the chiral selector. Finally, all the synthesis products undergone varied biological activities (antioxidants, antibacterials and antifungals). For our tests against bacteria, the results were different and mostly positive for all compounds. The antifungal tests against *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* were negative. Used for the antioxidant test, the following three techniques : scavenging of the radical DPPH, ferric reducing-antioxidant power (FRAP) and the  $\beta$ - carotene tested. The results of antioxidant activity showed that most derivatives have a high inhibitory ability against radicals in particular the 4-imnoflavans.

**Keywords:** Flavanones, Chiral separation, HPLC, Diastereomers, Chiral stationary phase, Biological activities, DPPH, FRAP.

## Résumé

Dans ce travail nous nous intéressons à la synthèse, l'activité biologique et la séparation chirale des énantiomères et des diastéréoisomères des dérivés de 4-Iminoflavanes. Nous avons développé une méthode de synthèses simples à partir de la molécule flavanone. Ces synthèses sont basées sur des réactions de condensation et de réduction en utilisant comme réactifs des amines primaires et la pyridine. Ceci nous a permis de préparer Vingt-et-un nouveaux dérivés de flavanone jamais décrits à ce jour. Tous les produits obtenus sont analysés et caractérisés par IR, UV,  $RMN^1H$  et  $RMN^{13}C$ . La séparation chirale par CLHP de tous les produits synthétisés 2-22 a été accomplie en mode de phase normal et en phase organique polaire en utilisant six phases stationnaires chirales dérivées des polysaccharides (Chiralcel®OD-H, Chiralcel®OD, Chiralcel®OJ, Chiralpak®AD, Chiralpak®IA et Chiralpak®IB) et de diverses phases mobiles de n alcane/alcool. Le mécanisme de discrimination chirale de chaque phase stationnaire en se basant sur la nature et la conformation chimique du sélecteur chirale. Finalement, tous les produit obtenues nous a conduits à l'étude de leurs activités biologiques (antioxydantes, antibactériennes et antifongiques). Les résultats nous ont permis d'affirmer que la majorité des produits synthétisés ont un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de tous les microorganismes testés. Les tests antifongiques en utilisant les souches de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* sont négatifs. Trois techniques d'évaluation du pouvoir antioxydant appliquées : piégeage du radical DPPH, réducteur du fer (FRAP) et le test de  $\beta$ -carotène. Les produits synthétisés présentent une activité antioxydante remarquable surtout pour les 4-iminoflavanes.

**Mots clés :** Flavanone, Séparation chirale, Diastéréoisomères, CLHP, Activité biologique, Phases stationnaires, DPPH, FRAP.

