

**Dosage des kawalactones totales  
et des dihydro-5,6 kawalactones dans les préparations de kawa  
(*Piper methysticum* Forst., Pipéracées),**

par

**M. KOCH, M. PLAT, H. MEHRI, J.-P. SAILLANT  
et H. KORNOWSKI (\*)**

*Laboratoire de Pharmacie galénique, U. E. R. de Chimie thérapeutique,  
Université Paris-XI, 4, avenue de l'Observatoire, F 75006 Paris.  
Laboratoires MERRELL-TORAUDE, 2, place de la Sorbonne, F 75005 Paris.*

---

**RÉSUMÉ.** — *La méthode décrite comprend d'une part le dosage gravimétrique des kawalactones totales et d'autre part le dosage par résonance magnétique nucléaire des dihydro-5,6 kawalactones physiologiquement actives.*

Le rhizome de kawa, *Piper methysticum* Forst. (Pipéracées), et les préparations qui en sont issues (extrait mou hydroalcoolique principalement) présentent un ensemble de propriétés pharmacologiques intéressantes : neurosédative, spasmolytique, anticonvulsivante, myorelaxante, anti-inflammatoire, analgésique et fongistatique. Les principes actifs, appelés « kawalactones », possèdent tous le même squelette de phényl éthyl-6- $\alpha$  pyrone (tableau I), et ont été principalement étudiés par HÄNSEL et ses collaborateurs [5].

Bien que différents facteurs interviennent dans les principaux types d'action cités (notamment : nature des substituants en 11 et 12, présence ou non d'une double liaison en 7-8), ceux-ci sont principalement liés à l'existence d'une saturation en 5-6 : c'est, d'une manière générale, le groupe des dihydro-5,6 kawalactones qui est pharmacologiquement actif. C'est pourquoi nous nous sommes proposé de mettre au point une méthode qui en permette le dosage.

---

(\*) Manuscrit reçu le 3 mars 1972.

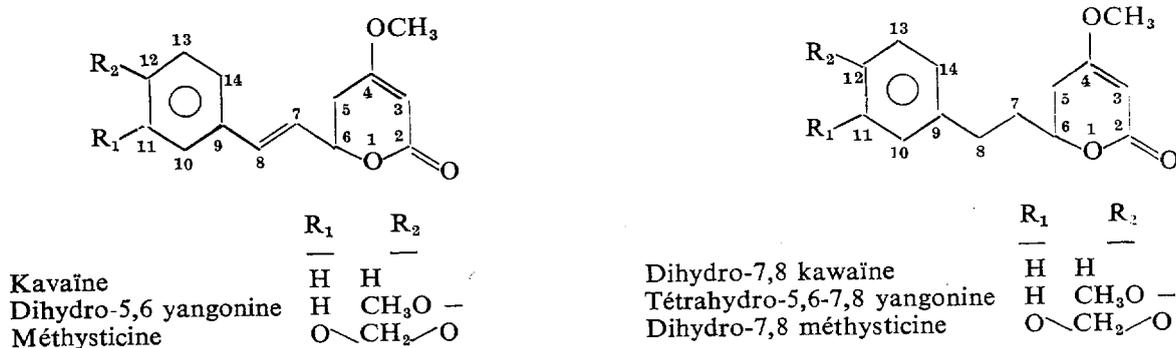
*Tirés à part* : M. KOCH (à l'adresse ci-dessus).

Plusieurs méthodes ont été décrites récemment. COCLERS et ses collaborateurs [3] pratiquent le dosage des kawalactones totales par spectrophotométrie dans l'infra-rouge, ainsi que le dosage de la kawaïne par spectrophotométrie dans l'ultra-violet après isolement par chromatographie préparative sur plaque du mélange kawaïne-yangonine. CSUPOR [4] dose la kawaïne, la méthysticine et la yangonine en utilisant conjointement

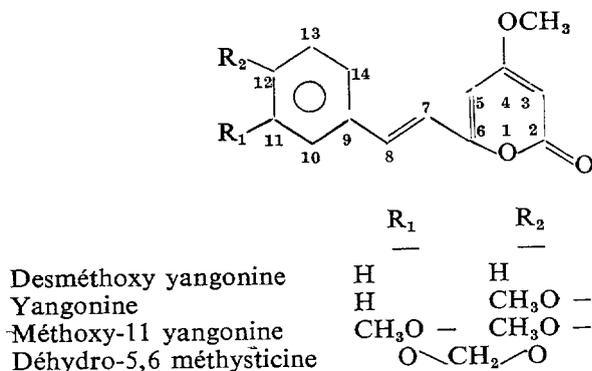
TABLEAU I.

## PRINCIPALES KAWALACTONES

## 1. Dihydro-5,6 kawalactones :



## 2. Déhydro-5,6 kawalactones :



une réaction colorée à l'acide sulfurique et la spectrophotométrie dans l'ultra-violet. YOUNG et ses collaborateurs [6] dosent par spectrophotométrie dans l'ultra-violet plusieurs kawalactones préalablement isolées par chromatographie bidimensionnelle sur plaque.

Ces méthodes présentent les mêmes inconvénients : complexité, difficulté d'isoler quantitativement les kawalactones dosées, dosage arbitraire de telle ou telle kawalactone, alors que c'est l'ensemble des dihydro-5,6 kawalactones qui est actif. Nous avons donc recherché une nouvelle méthode qui comprenne les deux temps suivants : extraction

des kawalactones totales dans un état de pureté suffisant pour permettre un simple dosage gravimétrique ; dosage global des dihydro-5,6 kawalactones.

Tout d'abord nous avons entrepris une étude en RMN de plusieurs kawalactones pures afin de pouvoir ultérieurement apprécier le degré de pureté des kawalactones totales extraites et dégager des particularités spectrales, permettant le dosage des dihydro-5,6 kawalactones ; puis les conditions d'extraction des kawalactones totales ont été déterminées.

### 1) ÉTUDE DES KAWALACTONES PAR RMN

Dans un travail antérieur BEAK et ABELSON [2] ont établi la configuration « trans » du système styryle des kawalactones, déduite de la constante de couplage  $J_{7-8} = 16$  Hz. Nous avons analysé les spectres de RMN de sept kawalactones. Les résultats sont reportés dans le tableau II.

### 2) CHOIX DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES KAWALACTONES TOTALES

Une prise d'essai d'extrait mou hydroalcoolique de kawa est dissoute dans un alcool aqueux, et des extractions sont effectuées, comparativement, avec des solvants organiques non miscibles usuels. Les meilleurs résultats sont obtenus en dissolvant à chaud la prise d'essai dans le méthanol aqueux (méthanol-2, eau 8) et en épuisant cette solution par de l'éther qui dissout la totalité des kawalactones, accompagnées du minimum d'impuretés. Après distillation de l'éther, la fraction volatile du résidu obtenu est éliminée par distillation sous pression réduite (15 torr), à la température de  $100^{\circ}$  : on obtient ainsi les kawalactones totales avec un bon degré de pureté qui peut être évalué par examen du spectre de RMN du résidu obtenu. On peut en effet observer sur ce spectre un ensemble de signaux correspondant aux protons des différentes kawalactones constitutives du mélange, à l'exclusion d'autres signaux dus à des substances étrangères.

La seule exception concerne un signal centré sur 1,20 ppm, et qui correspond aux groupements  $\text{CH}_2$  des graisses entraînées en faible quantité avec les kawalactones. La hauteur de la vague d'intégration correspondant à ce signal ne dépasse jamais celle des vagues à 5,20-5,40 ppm correspondant au seul proton  $\text{H}_3$  des kawalactones. Cela signifie que pour des esters d'acides gras en  $\text{C}_{16}$ - $\text{C}_{18}$  qui sont les plus fréquents et dont le poids moléculaire est voisin de celui des kawalactones, le taux de ces esters ne doit pas dépasser une valeur voisine de 3 %. D'autre part, les acides en  $\text{C}_9$  et inférieurs, qui ont été isolés du rhizome de kawa et étudiés par ACHENBACH et KARL, ne représentent qu'environ 0,6 % du poids des kawalactones totales [1]. En d'autres termes, les conditions d'extraction proposées permettent d'obtenir les kawalactones totales avec un degré de pureté de l'ordre de 96 %.

### 3) DOSAGE DES DIHYDRO-5,6 KAWALACTONES

L'examen du spectre de RMN des kawalactones totales montre que les signaux correspondant au proton  $\text{H}_3$  pour les dihydro-5,6 kawalactones d'une part (à 5,20-5,25 ppm) et pour les déhydro-5,6 kawalactones d'autre part (à 5,40-5,50 ppm) sont parfaitement distincts entre eux et non confondus avec des signaux voisins, ce qui autorise une lecture facile et précise de la hauteur des vagues d'intégration correspondantes (soit  $a$  pour les dihydro-5,6 kawalactones,  $b$  pour les déhydro-5,6 kawalactones). Le rapport  $\frac{a}{a+b} \times 100$  représente le pourcentage de dihydro-5,6 kawalactones dans les kawalactones totales (fig. 1).

TABLEAU II.

	H <sub>8</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8</sub>	CH <sub>3</sub> -O <sub>4</sub>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$ 11, 12	CH <sub>3</sub> O <sub>12</sub>	PROTONS AROMATIQUES
Kawaïne	5,25 (s)	H <sub>5</sub> , H <sub>5'</sub> 2,62 (m) 2,53	5,01 (m)	6,28 (d de d) J <sub>7-8</sub> = 16 J <sub>7-6</sub> = 6	6,79 (d de d) J <sub>8-7</sub> = 16 J <sub>9-8</sub> = 1	3,82 (s)			5 p entre 7,29 et 7,49
Méthysticine	5,25 (s)	2,60 (m) 2,51	5,01 (m)	6,06 (d de d) J <sub>7-8</sub> = 16 J <sub>7-6</sub> = 6	6,68 (d de d) J <sub>8-7</sub> = 16 J <sub>8-6</sub> = 1	3,82 (s)	6,00 (s)		3 p entre 6,78 et 7,01
Dihydro-7,8 méthysticine	5,20 (s)	m entre 1,68 et 2,82 (avec H <sub>7</sub> , H <sub>7'</sub> H <sub>8</sub> et H <sub>8'</sub> )	4,40 (m)	H <sub>7</sub> , H <sub>7'</sub> m entre 1,68 et 2,82 (avec H <sub>5</sub> et H <sub>5'</sub> )	H <sub>8</sub> , H <sub>8'</sub>	3,80 (s)	5,96 (s)		3 p centrés sur 6,85
Desméthoxy yangonine	5,50 (d) J <sub>3-5</sub> = 2,5	6,00 (d) J <sub>5-3</sub> = 2,5		Syst. AB(J <sub>7-8</sub> = 16) 6,60 7,54		3,90 (s)			5 p entre 7,30 et 7,60
Yangonine	5,50 (d) J <sub>3-5</sub> = 2,5	5,95 (d) J <sub>5-3</sub> = 2,5		6,49	7,47	3,90 (s)		3,87 (s)	2 m symétriques centrés sur 6,96 et 7,49
Déhydro-(5,6) méthysticine	5,50 (d) J <sub>3-5</sub> = 2,5	5,97 (d) J <sub>5-3</sub> = 2,5		6,43	7,45	3,90 (s)	6,02 (s)		H <sub>13</sub> : 6,85 (d, J <sub>13-14</sub> = 9) H <sub>10</sub> , H <sub>14</sub> : entre 6,89 et 7,09
Dihydro-7,8 yangonine	5,40 (d) J <sub>3-5</sub> = 2,5	5,75 (d) J <sub>5-3</sub> = 2,5		H <sub>7</sub> , H <sub>7'</sub> m centrés sur 2,83	H <sub>8</sub> , H <sub>8'</sub>	3,83 (s) (signal confondu avec CH <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )		3,83 (s) (signal confondu avec CH <sub>3</sub> O <sub>12</sub> )	2 m symétriques centrés sur 6,87 et 7,12

Mesures effectuées en solution dans CDCl<sub>3</sub>, sur un appareil Varian A 60. Les déplacements chimiques, exprimés en unité δ, sont mesurés en ppm (par rapport au signal du TMS), les constantes de couplage en hertz. s = singulet, d = doublet, m = multiplet.

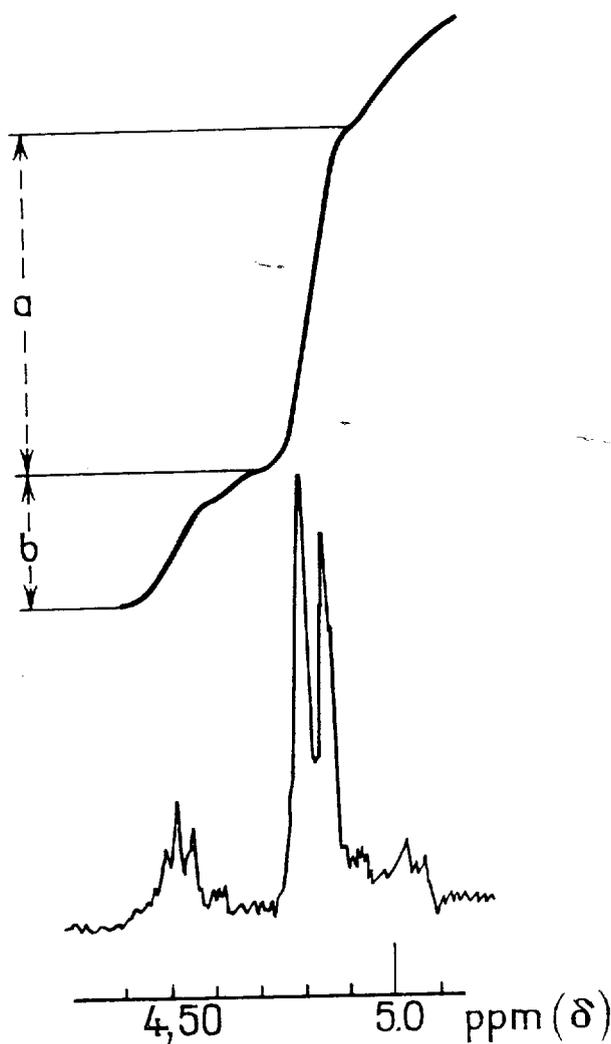


FIG. 1.

## TECHNIQUE

## I) DOSAGE DES KAWALACTONES TOTALES

Peser avec précision une prise d'essai voisine de 1 g d'extrait, et la dissoudre à chaud dans 100 ml d'un mélange : eau-méthanol 8-2. Transvaser la solution trouble obtenue dans une ampoule à décantation, et extraire par quatre fois 100 ml d'éther. Sécher les solutions étherées réunies sur sulfate de sodium anhydre (environ 10 g). Après 15 minutes de contact, filtrer la solution étherée ; laver le sulfate de sodium et le filtre avec 20 ml d'éther. Concentrer par petites fractions successives la solution étherée dans un ballon à fond rond de 150 ml environ préalablement taré. Terminer par distillation sous pression réduite (15 torr), au bain-marie bouillant. Après refroidissement, peser le résidu de kawalactones totales. Répéter le chauffage au bain-marie sous pression réduite, jusqu'à poids constant. Exprimer le résultat en pourcentage de kawalactones totales dans l'extrait (soit  $K_t$ ).

## II) DOSAGE DES DIHYDRO-5,6 KAWALACTONES

Dissoudre une prise d'essai d'environ 100 mg de kawalactones totales précédemment extraites dans 0,5 ml de deutériochloroforme.

Enregistrer le spectre RMN des kawalactones totales entre 5 et 5,7 ppm.

Enregistrer au moins 5 courbes d'intégration avec la plus grande amplitude possible.

*Dihydro-5,6 kawalactones* : mesurer avec précision la hauteur moyenne de la vague d'intégration correspondant aux signaux à 5,20-5,25 ppm (= a).

*Déhydro-5,6 kawalactones* : mesurer avec précision la hauteur moyenne de la vague d'intégration correspondant aux signaux à 5,40-5,50 ppm (= b).

Le rapport  $\frac{a}{a+b} \times 100$  indique le pourcentage de dihydro-5,6 kawalactones dans les kawalactones totales. Le résultat est exprimé en pourcentage de dihydro-5,6 kawalactones (Kd) dans l'extrait :  $Kd = Kt \times \frac{a}{a+b}$ .

REMERCIEMENTS. — Nous exprimons nos vifs remerciements à M. le professeur R. HÄNSEL à qui nous sommes redevables des échantillons de kawalactones étudiés, à M<sup>me</sup> Y. RIGAULT pour l'enregistrement des spectres, et à M. le professeur M.-M. JANOT pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

## SUMMARY

Quantitative determination of the total kawalactones and 5,6-dihydro kawalactones from kawa (*Piper methysticum* Forst., Piperaceae) preparations,

by M. Koch, M. Plat, H. Mehri, J.-P. Saillant and H. Kornowski (Paris).

The described method includes the gravimetric determination of the total kawalactones on the one hand and the quantitative analysis of the 5,6-dihydro kawalactones by nuclear magnetic resonance on the other hand.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACHENBACH (H.) et KARL (W.). *Chem. Ber.*, 1971, 104, p. 1468.
- [2] BEAK (P.) et ABELSON (H.). *J. org. Chem.*, 1962, 27, p. 3715.
- [3] COCLERS (L.), MOTTEF (J.), SIOBBEL (J. B. T.) et PARMENTIER (J.). *J. Pharm. Belgique*, 1969, p. 415.
- [4] CSUPOR (L.). *Archiv Pharm.*, 1970, 303, p. 193.
- [5] a) HÄNSEL (R.). *Dische Apoth. Zig.*, 1964, 104, p. 496.  
 b) HÄNSEL (R.), WEISS (D.) et SCHMIDT (B.). *Planta medica*, 1966, 14, p. 1.  
 c) HÄNSEL (R.) et KLAPROTH (L.). *Archiv Pharm.*, 1966, p. 71.  
 d) HÄNSEL (R.) et KLAPROTH (L.). *Archiv Pharm.*, 1966, p. 503.  
 e) HÄNSEL (R.), LANGHAMMER (L.) et RIMPLER (H.). *Archiv Pharm.*, 1967, p. 157.
- [6] YOUNG (R. L.), HYLIN (J. W.), PLUCKNETT (L.), KAWANO (Y.) et NAKAYAMA (T.). *Phytochemistry*, 1966, 5, p. 795.