

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES ÉPAISSES NON LIÉES DES CONSTITUANTS DU RHIZOME DE *PIPER METHYSTICUM*: ISOLEMENT DE DEUX NOUVELLES CÉTONES, CINNAMALACÉTONE ET METHYLÈNE DIOXY-3,4 CINNAMALACÉTONE

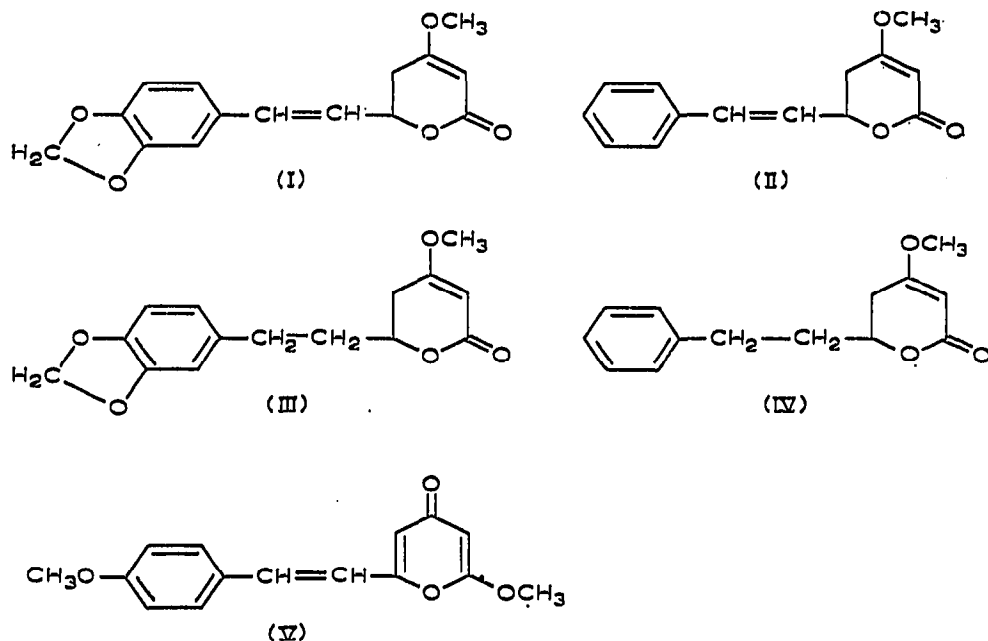
PER JÖSSANG ET DARIUS MOLHO

Laboratoire de Phytochimie du Muséum National d'Histoire Naturelle associé au C.N.R.S.,
63 rue Buffon, Paris V^o (France)

(Reçu le 21 juin 1967)

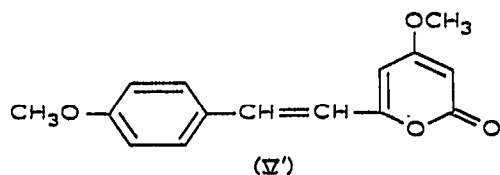
INTRODUCTION

De très nombreux travaux ont été consacrés à la composition du rhizome de *Piper methysticum* Forst, depuis plus d'un siècle. Le travail fondamental est dû à BORSCHÉ et coll.¹ qui, dans une série de treize mémoires, décrivent l'isolement, par distillation et cristallisation fractionnée, d'une série de pyrones: la méthysticine (I), la kawaïne (II), la dihydrométhysticine (III), la dihydrokawaïne (IV) et la yangonine (V) et proposent les formules suivantes:



Ces structures sont encore admises actuellement, exception faite pour la yangonine (V), en 1954, CHMIELEWSKA ET CIEŚLAK² démontrent qu'il s'agit d'une α -pyrone (V').

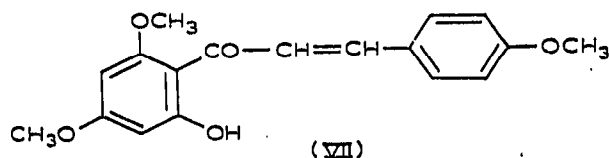
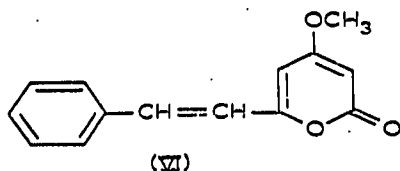
En 1959, KLOHS, KELLER, WILLIAMS, TOEKES ET CRONHEIM³ tentent d'utiliser la chromatographie sur colonne d'alumine pour l'isolement des kawapyrones du



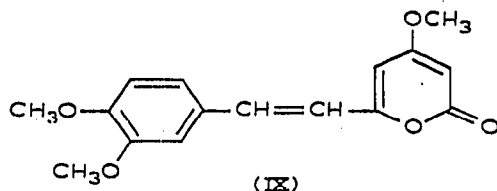
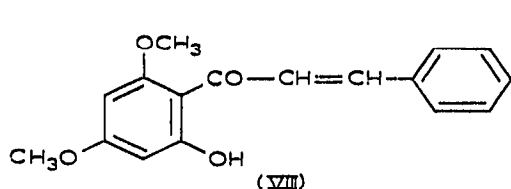
rhizome et parviennent à une séparation qui doit être complétée par cristallisation fractionnée; au cours de ce travail ils isolent un composé nouveau, GOTTLIB ET MORS⁴ montrent peu après l'identité de ce produit avec un échantillon de déhydrokawaine (VI), isolée d'une Lauracée, *Aniba firmula*.

En 1959 également, SCHEUER ET HORIZAN⁵ isolent par distillation une huile jaune à caractère cétonique et affirment la présence dans le rhizome d'un alcaloïde.

Par chromatographie sur colonne de silice, HÄNSEL, BÄHR ET ELICH⁶ isolent en 1961 deux pigments jaunes, les flavokawines (A) et (B); HÄNSEL, RANFT ET BÄHR⁷ déterminent les structures de ces composés qui ne sont pas des pyrones, mais des *ortho*-hydroxychalcones méthoxylées, les flavokawines (A) et (B) correspondent respectivement aux formules (VII) et VIII).



Enfin de faibles quantités de méthoxy-II yangonine (IX) sont isolées du rhizome en 1966 par HÄNSEL ET KLAPROTH⁸.



La même année YOUNG, HYLIN, PLUCKNETT, KAWANO ET NAKAYAMA⁹ décrivent une technique—essentiellement analytique—de dosage des constituants du rhizome de *Piper methysticum* par chromatographie sur couches minces et dosage spectrophotométrique des éluats, mais ils ne mettent en évidence que six des pyrones précédemment signalées sans noter la présence des flavokawines.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chromatographie analytique sur couches minces

Les pyrones sont chromatographiées sur Alumine G Merck activée à 115° pendant 30 min. On développe deux fois avec du toluène-formiate d'éthyle (100:6, vol.), puis deux fois avec hexane-éther éthylique-formiate d'éthyle (60:40:20). La révélation se fait à l'acide sulfurique concentré froid qui donne des colorations caractéristiques et sensibles, ou à la vapeur d'iode, réactif sensible mais non caractéristique.

Les R_F donnés—à titre indicatif—sont des R_F apparents après quatre développements (Tableau I).

TABLEAU I
CHROMATOGRAPHIE DES PYRONES

<i>Pyrones</i>	R_F	<i>Couleur à l'acide sulfurique froid</i>
Dehydrokawaine (VI)	0.7	jaune gris
Dihydrokawaine (IV)	0.59	rose
Yangonine (V)	0.56	jaune citron
Kawaine (II)	0.51	orange
Dihydrométhysticine (III)	0.44	bleu gris
Méthysticine (I)	0.38	violet

Les cétones (Tableau II) sont chromatographiées sur Alumine G activée à 103° pendant 1 h. Solvant: toluène-formiate d'éthyle (100:6).

TABLEAU II
CHROMATOGRAPHIE DES CÉTONES

<i>Cétones</i>	R_F	<i>Couleur à l'acide sulfurique froid</i>
Cinnamalacétone (X)	0.53	orange
Méthylènedioxy-3,4 cinnamalacétone (XI)	0.40	rouge

Les flavokawines sont chromatographiées sur Kieselgel G activé 30 min à 103°. Solvant: tétrachlorure de carbone—hexane—formiate d'éthyle (50:50:20).

Flavokawine B (VIII)	0.47
Flavokawine A (VII)	0.33

Les flavokawines sont repérées dans le visible (jaunes) ou l'U.V. long (spots bleu foncés).

L'acide cinnamalacétique est chromatographié sur Silice HF 254 366 Merck, préparée non pas avec de l'eau mais avec de l'acide sulfurique dilué (au 1:70); on laisse sécher 6 h à l'air sans activer au four. Solvant: chloroforme—ether éthylique (100:7). Révélation: inhibition de fluorescence en U.V. court, puis autorévélation au four à 110° (l'acide incorporé suffit).

Chromatographie préparative sur couches sans liant

Technique générale

Nous avons utilisé la chromatographie préparative ascendante sur couches non liées.

L'alumine ou la silice—pour colonnes—est répartie à l'état sec, sur des plaques rectangulaires de verre au moyen d'une baguette de verre portant à ses extrémités deux fourreaux de caoutchouc dont l'épaisseur règle celle de la couche d'adsorbant.

Les produits à chromatographier, en solution dans un solvant si possible volatil et relativement peu polaire (ether, benzène, chloroforme), sont déposés goutte à

goutte, au moyen d'une pipette, sans toucher l'adsorbant, en s'y reprenant plusieurs fois de façon à créer une zone initiale continue. Entre chaque dépôt, on laisse évaporer le solvant quelques minutes. L'analyse chromatographique s'effectue selon un mode ascendant, la plaque, inclinée d'environ 8° sur l'horizontale, étant placée dans une cuve rectangulaire type "Pyrex" 235 X, munie d'un couvercle, le solvant étant déposé dans le fond de la cuve juste avant l'expérience (Fig. 1).

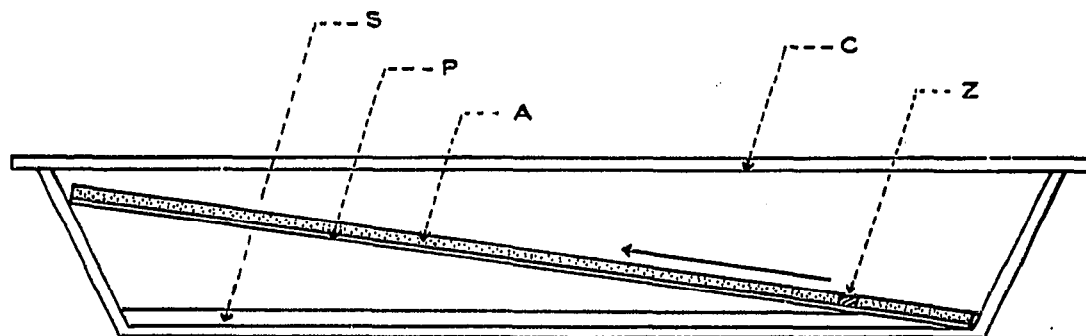


Fig. 1. Schéma de principe. S = solvant; P = plaque; A = adsorbant; C = couvercle; Z = zone initiale.

On utilise généralement 36 g de silice ou 70 g d'alumine par plaque de 23×12.2 cm. La zone initiale est à 3 cm au dessus du bord inférieur de la plaque; on applique 0.5 à 1 g de mélange à analyser en solution dans 2-3 cm³ de solvant.

On peut favoriser la pénétration des produits dans la masse de l'adsorbant en traçant préalablement un sillon dans ce dernier avec une spatule. Le temps de développement est de l'ordre de 20-30 min. La plaque, développée jusqu'à son extrémité supérieure, est séchée à l'air ou sur une plaque métallique tiède (étuve, etc.).

Les zones contenant les produits intéressants sont enlevés au moyen d'une spatule, les restes de solvant chassés sous vide, au bain marie. L'adsorbant est ensuite introduit dans une petite colonne à chromatographier d'environ 1×17 cm; on élue avec 2-3 cm³ de méthanol ou méthanol-chloroforme, dans le cas des produits peu solubles. Les produits élués sont concentrés dans les premières gouttes et cristallisent fréquemment dès la sortie du tube à élution.

La détection de produits colorés ou fluorescents en lumière U.V. ne pose évidemment aucun problème. Une technique simple et générale de révélation consiste à appuyer la face collante d'un ruban adhésif (type "Scotch") contre la plaque, après séchage partiel. On enlève ainsi une mince couche superficielle d'adsorbant sur laquelle on peut utiliser les révélateurs habituels (vapeur d'iode, acide sulfurique).

On peut également appuyer fortement contre la plaque encore humide un chromatostrip de Kieselgel HF 254 366 (activé 30 min à 100°): les produits à révéler passent superficiellement dans la couche mince et on révèle en U.V. court et long, par inhibition de fluorescence, ou par la vapeur d'iode, l'acide sulfurique, etc. On peut enfin, sans détériorer la plaque, pulvériser d'une distance d'environ 1 m, une solution alcoolique d'un indicateur fluorescent (Morin, par ex.), puis examiner en U.V. court et long.

Application au Kawa-Kawa

Isolement des flavokawines. Pour concentrer ces composés, présents en faible quantité, on met à profit la propriété que possèdent ces produits de présenter de très

faibles R_F sur alumine et des R_F très grands sur silice, dans des solvants moyennement polaires.

30 g de résine de Kawa-Kawa, en solution dans du toluène, sont fixés sur 100 g d'alumine Merck ("alumine standardisée"), puis on déplace les chalcones (couleur jaune vif) par du toluène à 10 % de formiate d'éthyle. La solution éluée est évaporée sous vide et chromatographiée sur deux plaques de silice Merck (0.05–0.2 mm) les plaques étant préparées comme ci-dessus. Solvant: toluène–formiate d'éthyle (100:10); triple développement. Les zones jaune vif, facilement détectables à l'œil nu, sont éluées au méthanol, la zone la plus rapide fournit 45 mg de flavokawine B, $F = 90^\circ$, la zone la plus lente 49 mg de flavokawine A, $F = 116^\circ$.

Isolement des cétones éthyléniques. 1.1 g de résine de Kawa-Kawa en solution dans du benzène sont transférés dans un appareil à distiller sous pression réduite, le benzène est chassé sous vide; on distille ensuite sous 1 mm de mercure; la fraction qui passe sous 110° est recueillie et chromatographiée sur une plaque de silice; on développe deux fois avec du toluène–formiate d'éthyle (100:10), puis deux fois avec du toluène–formiate d'éthyle (100:20).

La ligne de départ étant prise pour origine, la fraction 8.5–10 cm (orange en U.V. long) fournit 28 mg de méthylènedioxy-3,4 cinnamylidène acétone, $F = 89^\circ$, la fraction 11–12.5 cm (bleu foncé en U.V. long) fournit 71 mg de cinnamalacétone, $F = 64^\circ$.

Isolement de la déhydrokawaïne, de la méthysticine et de la yangonine. 450 mg de résine Kawa-Kawa, en solution dans du benzène, sont appliquées à une plaque d'alumine Merck (Aktiv Sauer). On développe successivement deux fois avec du toluène–formiate d'éthyle (100:6), puis une fois avec du toluène–formiate d'éthyle (100:10) et cinq fois avec de l'hexane–éther éthylique–formiate d'éthyle (60:40:20). La zone 7.7–9.2 cm fournit 10 mg de méthysticine, $F = 132^\circ$ ($\lambda_m = 305$), la zone 11–12.5 cm donne 19.5 mg de yangonine; $F = 152^\circ$ ($\lambda_m = 357$) et la zone 12.5–15 cm fournit 5 mg de déhydrokawaïne, $F = 136^\circ$ ($\lambda_m = 343$).

Tous ces produits cristallisent spontanément, du méthanol ayant servi à l'élué, au bout de quelques minutes.

Isolement de la kawaïne. 650 mg de résine en solution dans du benzène sont chromatographiées sur une plaque d'alumine, on développe successivement une fois avec du toluène–formiate d'éthyle (100:10), puis trois fois avec de l'hexane–éther éthylique–formiate d'éthyle (50:50:7); puis une fois avec du toluène–chloroforme (100:30).

On élue la bande 11.5–14.5 cm avec du méthanol, on filtre de traces de yangonine, on évapore à sec, on reprend dans 2 cm³ d'éther éthylique et on met la solution une nuit à -20° .

Il cristallise 22 mg de kawaïne en aiguilles blanches, $F = 106^\circ$ ($\lambda_m = 244$).

RÉSULTATS

Ayant mis au point une méthode synthétique permettant d'accéder aux α -pyrones du groupe de la déhydrokawaïne (qui fera l'objet d'une publication ultérieure) nous avons été amenés à comparer les produits synthétisés à ceux présents dans le rhizome de *Piper methysticum*.

Par chromatographie analytique sur couches minces, on devait s'attendre à

trouver sept spots correspondant aux pyrones et deux spots correspondant aux flavokawines, soit neuf produits. Nous avons toutefois noté la présence de dix spots révélables à l'acide sulfurique concentré froid. Pour savoir à quels produits correspondaient les différents spots, nous avons été conduits à chercher une méthode de chromatographie préparative rapide des constituants du Kawa-Kawa. La chromatographie préparative ascendante sur plaques épaisses non liées (granulométrie type colonnes) s'est révélée adaptée au but poursuivi.

E. A. MISTRYUKOV¹⁰ avait utilisé la chromatographie préparative sur couches non liées, selon un procédé descendant. Par rapport à la chromatographie préparative sur plaques liées, telle qu'elle a été codifiée par HONEGGER¹¹ et plus récemment par HALPAAP¹² la chromatographie préparative sur couches non liées présente de nombreux avantages: charge élevée (du même ordre de grandeur que sur colonnes), simplicité extrême, bas prix et faible encombrement de l'appareillage; plaques très rapides à préparer (quelques minutes au lieu de plusieurs heures); facilité d'éluion des produits séparés par suite de l'absence de liant et de la relative grosseur des grains; notons enfin que l'on peut utiliser une vaste gamme d'absorbants (en principe tous ceux utilisés en chromatographie sur colonne) y compris ceux qui ne se prêteraient pas à la préparation de couches liées (notamment les adsorbants organiques, tels le saccharose).

Ajoutons que la fragilité mécanique ne pose aucun problème au cours de la manipulation, au point que l'on peut faire subir à une même plaque une dizaine de développements successifs sans détérioration notable de la couche d'absorbant.

Nous avons ainsi utilisé cette technique sur couches d'alumine pour l'isolement pondéral rapide de la déhydrokawaine, de la yangonine, de la méthysticine et de la kawaine (par contre le procédé s'est révélé peu adapté à l'isolement de la dihydrokawaine et de la dihydrométhysticine, que nous avons isolées par le procédé décrit par BORSCHÉ). Grâce aux échantillons ainsi obtenus nous avons pu identifier sans ambiguïté six spots sur les chromatogrammes analytiques. Par chromatographie préparative sur couches épaisses non liées de silice, nous avons pu isoler deux pigments jaunes P₁ et P₂, bien cristallisés, fondant respectivement à 116° et 92°.

Le spectre R.M.N. de P₂ présente deux méthoxyles respectivement à 3.85 et 3.95 p.p.m.; deux protons centrés sur 6.05 et 6.2 p.p.m. sous forme de deux doublets avec une constante de couplage de 2 c.p.s. (couplage méta); cinq protons aromatiques donnent un ensemble complexe de pics centré sur 7.5 p.p.m. et deux protons éthyléniques donnent un singulet à 7.93 p.p.m. En outre, un hydroxyle chélaté est observé à 14.3 p.p.m.

Le spectre R.M.N. de P₁ comporte deux méthoxyles à 3.87 p.p.m. (singulet) et un méthoxyle à 3.94 p.p.m.; deux protons centrés à 6.03 et 6.17 p.p.m. sous forme de deux doublets avec une constante de couplage de 2 c.p.s. (couplage méta); quatre protons aromatiques apparaissent sous forme de deux doublets centrés à 7 et 7.6 p.p.m. avec une constante de couplage de 9 c.p.s. (couplage *ortho*), deux protons éthyléniques donnent un singulet à 7.85 p.p.m.; un hydroxyle chélaté donne un pic à 14.4 p.p.m.

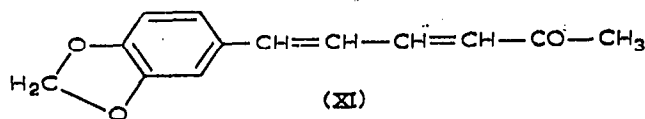
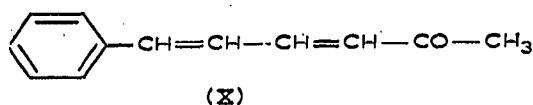
Les spectres R.M.N. montrent ainsi que les pigments P₁ et P₂ sont respectivement identiques aux flavokawines (A) et (B) de HÄNSEL, RANFT ET BÄHR, dont YOUNG, HYLIN, PLUCKNETT, KAWANO ET NAKAYAMA ne mentionnent pas l'existence et dont les structures se trouvent ainsi confirmées.

Nous avons ainsi identifié huit spots sur les dix mentionnés sur les chromatoplaques analytiques; en faisant migrer un échantillon synthétique de méthoxy-11 yangonine, cette dernière s'est révélée différente des deux spots restants qui correspondent par suite à deux constituants inconnus. Ces produits étant présents en faible quantité, pour les concentrer, puis les isoler, nous avons distillé sous vide puis chromatographié sur couches épaisses non liées. Nous avons pu ainsi isoler ces produits: (A) correspondant à un R_F de 0.53 et $F = 64^\circ$, et (B) à un R_F de 0.40 et $F = 89^\circ$.

Le spectre infrarouge de (A) fournit d'emblée quelques indications: une bande à 6.05μ suggère un carbonyle conjugué; en outre deux fortes bandes à 13.5 et 14.45μ semblent indiquer la présence d'un noyau benzénique monosubstitué. En outre, A donne une dinitro-2,4 phénylhydrazone, $F = 218^\circ$. Nous nous trouvons donc en présence d'une cétone conjuguée.

Le spectre R.M.N. confirme ces données. Un pic à 2.3 p.p.m. peut être attribué à un groupement $-\text{CO}-\text{CH}_3$ (trois protons à l'intégration), par ailleurs on observe un ensemble complexe de pics entre 6 et 7.5 p.p.m. correspondant à neuf protons, dont cinq doivent, d'après ce qui précède, être attribués à un noyau benzénique; il reste quatre protons; le spectre U.V. indique une structure fortement conjuguée ($\lambda_{\text{max.}} = 326 \text{ m}\mu$, alors que la benzalacétone présente un $\lambda_{\text{max.}} = 284 \text{ m}\mu$ par conséquent les quatre protons sont probablement éthyléniques (et une des doubles liaisons de structure *trans*, car on observe à 6.2 p.p.m. un doublet isolé correspondant à un proton, avec une constante de couplage de 16 c.p.s.).

La présence d'une méthylcétone conjuguée nous a incité à tenter une oxydation de A à l'hypochlorite de sodium, qui conduit à un acide avec $F = 165^\circ$. Cet acide est plus conjugué que l'acide cinnamique ($\lambda_{\text{max.}} = 300$ au lieu de $272 \text{ m}\mu$) c'est pourquoi nous l'avons comparé, par chromatographie sur gel de silice imprégné d'acide sulfurique, à divers acides diéniques dont nous possédions les échantillons. L'acide inconnu se comporte comme l'acide cinnamalacétique *trans-trans*; une comparaison directe (spectres I.R., point de fusion mixte) permet de conclure à l'identité; par voie de conséquence A doit être identique à la cinnamalacétone (X), ce qui est vérifié par comparaison avec un échantillon de référence de cinnamalacétone (préparé en condensant l'aldéhyde cinnamique sur l'acétone en présence de soude diluée).

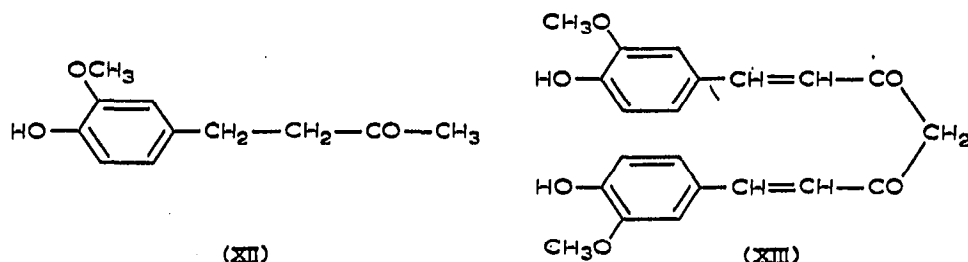


Les propriétés spectrales de B suggèrent une grande analogie avec A: Dans l'infrarouge une bande carbonyle à 6.05μ correspondant comme précédemment à un carbonyle conjugué, toutefois trois fortes bandes à 11.6 , 12 et 12.5μ (au lieu de deux bandes à 13.5 et 14.45μ) indiquent un noyau benzénique présentant une substitution plus compliquée que dans le cas de A. Dans le spectre R.M.N. on note un pic à 2.3 p.p.m. correspondant à un groupement $-\text{CO}-\text{CH}_3$ et un ensemble complexe de pics entre 6 et 7.5 p.p.m. (neuf protons à l'intégration). On constate alors que B présente une réaction positive du groupement méthylènedioxy, selon LABAT¹³. On est ainsi conduit, par analogie, à la formule (XI).

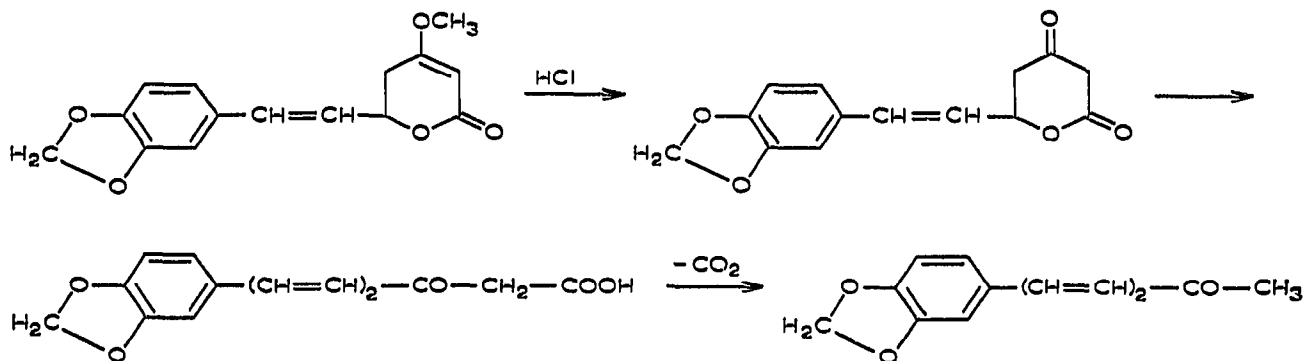
Par comparaison de B avec un échantillon de référence de méthylènedioxy-3,4 cinnamalacétone—préparé en condensant l'aldéhyde méthylènedioxycinnamique sur

l'acétone en présence de soude diluée—on constate l'identité (spectres, point de fusion mixte, chromatoplaques).

C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on rencontre à l'état naturel des méthylcétones conjuguées par deux doubles liaisons avec un noyau aromatique. Comme corps apparentés, on peut signaler la zingerone (XII)¹⁴ et la curcumine (XIII)¹⁵.



On pouvait craindre que les cétones (X) et (XI) ne fussent que des artefacts d'extraction. En effet la méthysticine est susceptible de s'hydrolyser, mais seulement en milieu fortement acide en donnant la méthylènedioxy-3,4 cinnamalacétone de la façon suivante:



Pour pallier à ces critiques, non seulement la résine de Kawa-Kawa mais également le rhizome, finement divisé, ont été extraits à froid par macération dans l'éthanol ou le benzène, pendant 2 h; on constate alors sans difficulté par chromatographie analytique sur couches minces que A et B sont bien présents dans la solution et ne sont donc pas des artefacts d'extraction.

RÉSUMÉ

La chromatographie préparative sur couches épaisses non liées est utilisée pour l'isolement rapide des constituants du rhizome de *Piper methysticum* (Kawa-Kawa).

Les avantages de cette méthode sont discutés.

Deux cétones inconnues sont isolées et identifiées respectivement à la cinnamalacétone et la méthylènedioxy-3,4 cinnamalacétone.

SUMMARY

Preparative chromatography on non-bound thick layers has been used for the rapid isolation of constituents of the rhizome of *Piper methysticum* (Kawa-Kawa).

The advantages of the method are discussed.

Two unknown ketones were isolated and identified as cinnamylideneacetone and 3,4-methylenedioxcinnamylideneacetone, respectively.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. BORSCHKE ET M. LEWINSOHN, *Chem. Ber.*, 66 (1933) 1792.
- 2 I. CHMIELEWSKA ET J. CIEŚLAK, *Roczniki Chem.*, 28 (1954) 38.
- 3 M. W. KLOHS, F. KELLER, R. E. WILLIAMS, M. I. TOEKES ET G. E. CRONHEIM, *J. Med. Pharm. Chem.*, 1 (1959) 95.
- 4 O. R. GOTTLIEB ET W. B. MORS, *J. Org. Chem.*, 24 (1959) 1614.
- 5 P. J. SCHEUER ET T. J. HORIGAN, *Nature*, 184 (1959) 979.
- 6 R. HÄNSEL, P. BÄHR ET J. ELICH, *Arch. Pharm.*, 294/66 (1961) 739.
- 7 R. HÄNSEL, G. RANFT ET P. BÄHR, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 370.
- 8 R. HÄNSEL ET L. KLAPROTH, *Arch. Pharm.*, 299/6 (1966) 503.
- 9 R. L. YOUNG, J. W. HYLIN, D. L. PLUCKNETT, Y. KAWANO ET R. T. NAKAYAMA, *Phytochemistry*, 5 (1966) 795.
- 10 E. A. MISTRYUKOV, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 311.
- 11 C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962) 1409.
- 12 H. HALPAAP, *Chem. Ing. Techn.*, 35 7 (1963) 488.
- 13 M. A. LABAT, *Bull. Soc. Chim.*, 5, (4) (1909) 745.
- 14 H. NOMURA, *J. Chem. Soc.*, 111 (1917) 769.
- 15 F. W. DAUBE, *Chem. Ber.*, 3 (1870) 609.
- 16 I. GAJEWSKY, *Chem. Ber.*, 3 (1870) 624.

J. Chromatog., 31 (1967) 375-383