

TENEUR EN ACIDE ASCORBIQUE DES FRUITS TROPICAUX EN COCHINCHINE

par **A. VIALARD-GOUDOU**

ANCIEN CHEF DE LABORATOIRE

A L'INSTITUT PASTEUR DE SAIGON

L'importance du problème alimentaire dans les pays souvent surpeuplés de l'Orient et de l'Extrême-Orient a attiré depuis déjà longtemps l'attention des autorités responsables. En Extrême-Orient, des recherches très poussées avaient été menées plus spécialement aux Indes Néerlandaises par l'Institut Eijkman, dans l'Inde, par le laboratoire des recherches alimentaires de Conoor, au Japon par l'Institut d'alimentation de Tokio. Une documentation importante et de nombreuses données analytiques portant sur des aliments propres à l'Orient et l'Extrême-Orient s'est donc accumulée ces dernières années.

La conférence intergouvernementale des pays d'Orient sur l'hygiène rurale tenue en 1937 à Batavia avait mis à son ordre du jour le problème de la nutrition. Il avait été recommandé aux différents pays participants, dont l'Indochine, de coordonner et d'accélérer leurs recherches et enquêtes dans le domaine de la nutrition.

En 1942 malgré les difficultés de l'heure, l'Inspection générale du Service de Santé de l'Indochine créait à l'Institut Pasteur de Saïgon un laboratoire d'hygiène alimentaire spécialement chargé des recherches sur la nutrition.

En Cochinchine un travail analytique d'ensemble était mis en chantier avec la collaboration de C. LATASTE et P. DOROLLE, il devait en outre faire la somme de tous les travaux parus en Extrême-Orient sur la question, mais les circonstances ultérieures n'en permirent pas la parution.

En 1944 M. AUTRET publiait au Tonkin une importante notice en collaboration avec BOUVIER sur l'alimentation rationnelle des militaires indochinois.

Or, précédemment en France avec C. MENTZER (1937) nous avions prêté une attention particulière

aux méthodes de dosage de l'acide ascorbique et l'étude des végétaux alimentaires en Cochinchine nous permit d'obtenir un certain nombre de résultats sur leur teneur en acide ascorbique.

Sur les conseils du Professeur J. LAVOLLAY qui voulut bien s'intéresser à nos travaux, nous avons pensé que la partie ayant trait aux fruits tropicaux pouvait intéresser les lecteurs de cette revue.

La place des fruits dans la ration alimentaire devient de jour en jour plus importante, et, dans le passé les fruits de la famille des Aurantiacées, citrons et oranges furent liés à l'histoire de la prophylaxie d'une maladie alimentaire par carence, le scorbut qui a fait autrefois de grands ravages parmi les marins, les armées et même les populations.

Après la découverte du scorbut expérimental des cobayes par HOLST et FRÖLICH en 1907, on put travailler à la concentration et à l'isolement de la vitamine C à partir des jus d'orange et de citron qui passaient, d'après la tradition et l'expérience, comme les productions végétales les plus actives sur le scorbut.

En 1930 TILLMANS et ses collaborateurs firent l'importante observation que la capacité des aliments à réduire un colorant le 2-6 dichlorophénol indophénol était parallèle à leur pouvoir antiscorbutique.

Après l'identification de la vitamine C avec l'acide ascorbique par SVIRBELY et SZENT GYÖRGY de nombreux auteurs ont employé les méthodes chimiques de titrimétrie pour doser la vitamine C dans les produits naturels et notamment les fruits.

Ces méthodes de dosage offrent le grand avantage de la rapidité et permettent l'étude de très nombreux produits, ce que la méthode biologique longue, coûteuse et compliquée ne pouvait faire.

MÉTHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Nous n'avons pas l'ambition de passer en revue dans ce court article toutes les méthodes de dosage utilisées et dont la majorité est fondée sur les propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique.

Au cours de l'étude sur les produits alimentaires végétaux de la Cochinchine, deux de ces méthodes ont été retenues ; nous y ajouterons pour mémoire une troisième méthode récente qui fournit de bons résultats et qui mérite d'être signalée à l'attention des chercheurs, ne serait-ce que dans un but de comparaison.

1° Méthode au 2-6 dichlorophénolindophénol et ses modifications.

Cette méthode fondée sur la réduction et la décoloration des indophénols par l'acide ascorbique fut décrite pour la première fois en 1930 par TILLMANS et ses collaborateurs.

HARRIS et RAY (1933), BIRCH et *alia* (1933) firent de cette réaction une méthode spécifique et précise pour le dosage de la vitamine C.

Cette méthode a été employée par de nombreux chercheurs, mais on lui a reproché :

a) De ne pas doser l'hypothétique acide ascorbique combiné.

b) De ne pas évaluer l'acide déhydroascorbique actif biologiquement.

c) L'action de certaines substances non spécifiques distinctes de la vitamine C et qui réduisent l'indicateur.

HARRIS et OLLIVER (1942) dans un article très complet démontrent que l'application correcte de leur technique supprime ces objections.

A. Procédé de EMMERIE et de VAN EEKELLEN modifié par MANCEAU et *alia*.

En 1934 EMMERIE et VAN EEKELLEN et en 1936 MANCEAU, A. POLICARD et FERRAND ont modifié la méthode au 2-6 dichlorophénol indophénol en éliminant les substances interférentes par une précipitation mercurique.

Les résultats sont plus exacts, mais la technique est longue et les risques de perte par oxydation sont augmentés.

B. — En 1935 TAUBER et KLEINER cherchant à doser l'acide ascorbique seul, préconisent l'emploi d'une oxydase isolée à partir du péricarpe de courge et d'autres plantes.

Un dosage à l'indophénol avant et après action de l'oxydase permet par différence entre les deux résultats de calculer la quantité d'acide ascorbique. Malheureusement la spécificité de l'oxydase n'est pas absolue, d'autres substances réductrices tel que le glutathion, peuvent également être oxydées.

C. — En 1937 P. MEUNIER a transformé la technique de TILLMANS en méthode cinétique grâce à l'emploi

de l'électrophotomètre. La vitesse de décoloration de l'indophénol permet une différenciation entre l'acide ascorbique et les autres substances réductrices.

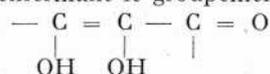
D. — En 1943 MAPSON reprend pour l'élimination des substances réductrices parasites, l'emploi de la formaldéhyde suggéré par LUGG. Sa méthode est fondée sur le fait que à pH 2 et en présence de 8 % de formaldéhyde, l'acide ascorbique est promptement éliminé de la réaction par condensation, et les réductones le sont seulement lentement.

Cette technique est surtout intéressante pour le dosage de l'acide ascorbique dans les milieux pouvant contenir des réductones (conserves à haute teneur en sucre, confitures).

2° Méthode fondée sur la réduction photochimique du Bleu de méthylène.

Le bleu de méthylène est un indicateur employé dans les mesures colorimétriques de potentiel d'oxydo-réduction. Aux pH supérieurs à 7 il joue le rôle d'accepteur d'hydrogène, mais à un pH inférieur à 6, cette décoloration n'a pas été observée avec des substances biologiques, seuls des réducteurs énergiques Cl₂, Sn, hydrosulfites, SO₂, provoquent cette décoloration.

Or, en 1934, MARTINI et BONSIGNORE publiaient une note sur la réduction à une lumière intense et à un pH voisin de 5 du bleu de méthylène par les substances renfermant le groupement éne-diol



l'acide ascorbique étant jusque là le seul représentant de ce groupe, rencontré dans la nature, les auteurs italiens ont appliqué cette propriété photochimique au dosage de l'acide ascorbique.

De nombreux auteurs K. WACHHOLDER et H.-H. PODESTA (1936), AMMON et HINSBERG (1936), E. GABBE (1936), W. NEUWEILER (1937), C. MENTZER et A. VIALARD GOUDOU (1937), A. POLICARD, M. FERRAND et E. ARNOLD (1937), ont reconnu ce procédé comme plus spécifique que celui à l'indophénol.

Cependant en 1942 SABALITSCHKA et PRIEM démontrent que la méthode au bleu de méthylène donne de mauvais résultats en présence de tanin et d'acide gallique. A la même date, nous avons fait en Indochine, une constatation semblable lors de l'étude sur la teneur en acide ascorbique de *Phyllanthus Emblica*.

La méthode au bleu de méthylène a été adaptée en 1947 par RAOUL au microdosage de la vitamine C dans le sang, et presque simultanément par GERO au dosage de l'acide ascorbique en présence de vitamine P.

3° Méthode à la 2-4 dinitrophénylhydrazone.

En 1943, ROE et KUETHER décrivent une nouvelle réaction colorée utilisable pour le dosage de la vitamine C.

Le dérivé 2-4 dinitrophénylhydrazone de l'acide déhydroascorbique traité par l'acide sulfurique à 85 % donne une coloration rougeâtre dont la proportionnalité est en accord avec la loi de BEER dans certaines limites.

ROE et OESTERLING (1944) appliquent cette méthode au dosage de l'acide ascorbique et déhydroascorbique dans les plantes.

L'estimation de l'acide ascorbique se fait après sa transformation en acide déhydroascorbique par passage à travers du charbon actif (Norit).

EXTRACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Avant d'effectuer le dosage de l'acide ascorbique, il faut l'extraire la plupart du temps du milieu complexe où il se trouve. Il faut donc presque toujours user d'un défécant et si cette opération n'est pas bien conduite elle peut être à l'origine de causes d'erreurs sérieuses.

Le plus important est de protéger la vitamine contre l'oxydation et ses effets destructeurs.

La majorité des auteurs utilisèrent d'abord l'acide trichloracétique pour l'extraction, mais celui-ci est loin d'être un bon défécant. Les filtrats sont peu limpides, souvent colorés et les impuretés métalliques de l'acide trichloracétique catalysent l'oxydation de l'acide ascorbique.

FUJITA et IWATAKE (1935) ont alors préconisé l'acide métaphosphorique pour protéger l'acide ascorbique de l'oxydation. Les mélanges d'acide métaphosphorique et d'acide trichloracétique sont depuis très utilisés, MUSULIN et KING (1936), car ils donnent un extrait stable qui doit cependant être titré assez rapidement, car le pouvoir protecteur de l'acide métaphosphorique pour la vitamine C n'est pas absolu.

Récemment GOCKEL (1943) a préconisé et breveté l'adoption de thiourée dont la forme énolique offre un groupement SH pour augmenter la stabilité des extraits et LAVOLLAY et LABOREY (1947) ont montré que ce corps inhibe la catalyse par le cuivre de l'oxydation de la vitamine et protège efficacement l'acide ascorbique contre l'autoxydation.

MENTZER (1940) enfin a utilisé le sulfate d'ammonium, qui permet d'obtenir à partir de n'importe quel organe ou tissu un filtrat absolument limpide et incolore et de conservation facile.

TECHNIQUES EMPLOYÉES

Nous avons employé comparativement la méthode au 2-6 dichlorophénolindophénol et celle au bleu de méthylène. Les circonstances de temps, de lieu et de matériel ont fait obstacle à l'emploi de méthodes photométriques.

A. Préparation des solutions de colorant.

1° 2-6 dichlorophénol indophénol.

Environ 0,15 g de colorant est dissout dans 500 cm³

d'eau bidistillée en triturant soigneusement au début le colorant avec l'eau dans un mortier en verre. La solution filtrée est standardisée chaque jour avec l'acide ascorbique en solution qui sera lui-même contrôlé avec l'iode N/100.

La solution de colorant doit être conservée dans une bouteille en verre coloré et au frigorigène. Elle doit être renouvelée tous les dix jours pour que son virage reste franc.

2° Bleu de méthylène.

Solution à 1 p. 10.000 dans l'eau bidistillée, en suivant la même technique que pour le 2-6 dichlorophénol. L'étalonnage se fait avec la solution de titre connu l'acide ascorbique. La conservation de la solution est très longue dans des flacons en verre neutre et à l'obscurité.

B. Choix de l'échantillon.

Il faut éviter de couper les échantillons en petits morceaux surtout avec des instruments métalliques. La quantité moyenne utile est de 5 à 20 g, il ne faut pas utiliser, en règle générale, moins de 2 g et plus de 20 g d'échantillon. La pesée doit être rapide.

Vu les variations de la teneur en acide ascorbique, il faut opérer plusieurs dosages sur plusieurs échantillons. L'échantillonnage moyen est une mauvaise technique, car il faut couper et mélanger : les oxydases agissent et les résultats sont entachés d'erreur par défaut.

C. Préparation de l'extrait.

L'emploi de l'eau distillée exempte de cuivre est à recommander, l'échantillon est couvert entièrement avant de le broyer, d'assez de mélange acide pour éviter l'action de l'air.

Nous avons toujours employé, pour l'extraction, une solution d'acide trichloracétique à 5 %, contenant 3 % d'acide métaphosphorique. L'addition de sable blanc, lavé à l'acide, favorise dans bien des cas, la bonne marche de l'extraction.

Après une première extraction, le liquide est séparé par centrifugation, et le culot est extrait par une nouvelle quantité de liqueur acide.

Centrifuger, et réunir les liqueurs et titrer.

TITRAGE

Le titrage avec les deux méthodes doit être rapide, et l'ensemble des opérations, depuis la prise de l'échantillon jusqu'au virage final, ne pas dépasser 15 minutes.

a) Dans le cas de 2-6 dichlorophénol indophénol, la réaction doit être acide pH 3,5 et le titrage ne doit pas demander plus d'une minute, avant l'obtention du virage. Tout virage plus lent est le fait de substances non spécifiques, et n'a pas de signification.

Il nous a semblé plus facile de déterminer le virage en employant la technique de BESSEY et KING (1933) où l'on verse le colorant dans une quantité connue de

Teneur en acide ascorbique des fruits de Cochinchine
Milligrammes pour 100 g

Nom français	Nom botanique	VIALARD-GOUDOU		AYKROYD	LEONG	VAN VEEN
		indophéno A	bleu de méthylène B	Indophéno l	Indophéno l	Indophéno l après défécation à l'acétate mercurique et ascorboxydase
Ananas	Ananas comosus Merr.....	—	—	63	49-11,9	10-40
Banane	Musa paradisiaca L. et Musa sapientum L.....	—	—	1-6,9	5,3-33,8	20-60
Variétés dites						
Chuoi cao.....	—	0,50	0,40	—	—	—
Chuoi cha.....	—	7,7	11,2	—	—	—
Chuoi com.....	—	0,40	0,20	—	—	—
Chuoi la.....	—	3,4	1,70	—	—	—
Chuoi su.....	—	4,70	2	—	—	—
Baccaurée.....	Baccaurea ramiflora Lour.....	35	3	—	6,2	—
Arbre à pain.....	Artocarpus incisa L. f.....	16	14	—	21,2	—
Carambole.....	Averrhoa Carambola L.....	37	20	—	23,8	—
Citron variétés diverses.....	Citrus medica L.....	15-61	16-60	39-63	40,8-29,1	10-30
Corossol.....	Anona muricata L.....	20,6	24	—	—	15
Coco.....	Cocos nucifera L..... N. B. — Chiffres variables suivant l'aspect de l'albumen.	2-11	3,2-8	1-2	24,8	+
Goyave.....	Psidium guayava Radd.....	30-109	4-48	299	196,7	100
Jacquier.....	Artocarpus integrifolia L.....	6,5	3,2	10	15,9	1-10
Jambose.....	Eugenia Jambos L.....	6-14	0,2-1,5	—	32,6	4
Cañite.....	Chrysophyllum Cañito L.....	9,7	8,1	—	—	—
Kaki.....	Diospyros Kaki L.....	18	10	—	16,8	4
Lucuma.....	Lucuma mammosa Gaertner....	27	10	—	—	—
Lansium.....	Lansium domesticum Hiern....	0,3	0,2	—	3,9-7,2	2
Mangoustan.....	Garcinia Mangostana L.....	5,5	4,7	—	4,9	10
Mangue.....	Mangifera indica L.....	25-35	30-40	13-21	29-10	60-90
Longane.....	Euphoria longana Lam.....	41	56	—	—	—
Pamplemousse....	Citrus decumana Willd.....	47	42	31	43,1	30
Papaye.....	Carica papaya L.....	50	60	46	46,2-103	30
Pastèque.....	Citrullus vulgaris Schrad.....	indosable	3,2	1	5,9	—
Pomme cannelle..	Anona squamosa L.....	11,5	9,6	—	9,3	15
Pomme Cythère..	Spondias dulcis Forst.....	22	20	—	—	30
Prunier d'Inde...	Flacourtia cataphracta Rox....	4,1	0,8	—	—	—
Ramboutan.....	Nephelium lappaceum L.....	30-48,5	50-120	—	47,5	10-50
Sapotille.....	Achras Sapota L.....	4,8	2,4	—	3,6	20-30
Tomate.....	Lycopersicum esculentum Mill..	17	20	32	21-29,9	20-60

l'extrait acide, au lieu de verser l'extrait acide dans une quantité connue de colorant.

Les deux méthodes sont équivalentes, et, l'emploi de l'une ou de l'autre est une question d'appréciation personnelle.

b) Avec le bleu de méthylène, nous avons employé la technique exposée en 1937.

A 6 cm³ du liquide à doser on ajoute 2 cm³ de solution tampon à base de citrate et de bicarbonate de soude (citrate de Na 30 g, Bicarbonate de Na 8 g, Eau distillée q.s.p. 200 cm³). L'addition d'hyposulfite (1 cm³ à 5 %) a été reconnu sans intérêt et supprimé.

Un tube témoin identique à celui qui contient le mélange précédent, est constitué par 8 cm³ d'eau. Dans chacun de ces deux tubes introduire ensuite 0,2 cm³ de solution de bleu de méthylène à 1 p. 10.000 et exposer à la lumière d'une lampe de 300 watts. Le tube renfermant l'acide ascorbique se décolore. Après 10 secondes rajouter une nouvelle quantité de bleu de méthylène, et ainsi de suite jusqu'au moment où, la décoloration n'ayant plus lieu, la coloration reste identique dans les deux tubes.

La quantité de bleu de méthylène utilisée est proportionnelle à la teneur en acide ascorbique. On obtient le nombre de centimètres cubes de bleu décoloré, en déduisant les 0,20 cm³ du témoin du nombre de cm³ de colorant versés. Pour obtenir une précision maxima, la quantité de bleu décoloré doit être comprise entre 0,8 cm³ et 1,4 cm³. S'il n'en est pas ainsi, on modifie le volume de la prise d'essai, de manière à obtenir un chiffre situé dans ces limites. La dilution et l'ajustement au volume donné, se fait avec la solution d'acide trichloracétique acide métaphosphorique.

MENTZER (1940) a apporté des modifications à cette technique. Le dosage est fait à l'électrophotomètre au pH 3,1 (Acide tartrique 0,1 N 3,33 cm³, Tartrate neutre de Sodium 0,1 M 1,66 cm³), en présence d'une quantité connue (1 cm³ de solution à 1 p. 10.000) de bleu de méthylène. Après éclaircissement d'une minute, le bleu de méthylène restant est aussitôt

dosé. Une courbe d'étalonnage préalablement établie permet de déterminer la teneur en acide ascorbique de la prise d'essai en fonction de la différence de lecture avant et après éclaircissement. Au pH 3.1 la recoloration du bleu se fait très lentement de sorte que l'on dispose facilement d'une demi-minute pour effectuer la lecture après l'éclaircissement.

RÉSULTATS

Dans le tableau ci-contre se trouve donnée la moyenne des chiffres obtenus sur un certain nombre de fruits de consommation courante. Comparativement, nous avons cru bon de joindre les résultats des compilations des dosages effectués aux Indes : AYKROYD (1941) : aux Indes Néerlandaises, VAN VEEN et *alia* (1940) et les dosages originaux de LÉONG (1939) en Malaisie.

CONCLUSION

La plupart des valeurs trouvées sont en assez bon accord avec celles des autres auteurs, mais il faut se rappeler que les différences observées peuvent provenir de beaucoup de causes comme : le degré de maturité ; les variétés saisonnières, la nature du sol, sans parler des méthodes de dosages.

Les fruits les plus riches sont le ramboutan, la papaye, le longane, la goyave, la mangue, les fruits des Aurantiacées, citron, pamplemousse. Il est à remarquer que tous ces fruits, à l'exception de la papaye, de la goyave, sont des fruits de prix assez élevés ou peu abondants.

Les cinq variétés de bananes examinées montrent des teneurs en vitamine C peu élevée (11,2 mg %) ou très faible (0,2 mg %), ce qui fait que, bien que bon marché, les bananes sont une source négligeable de vitamine C.

Aussi, les fruits jouent un rôle accessoire comme source de vitamine C dans l'alimentation cochinchinoise par comparaison avec les légumes dont la technique de cuisson protège presque entièrement la vitamine C.

RÉFÉRENCES

- AYKROYD (W.R.) (1946). — Note on food and nutrition policy in India New Delhi The Manager Government of India Press.
- AMMON (R.) et HINSBERG (K.) (1936). — Klin. Woch. **15**, 85.
- BESSEY (O.A.) et KING (C.S.) (1933). — J. biol. Chem. **103**, 687.
- BOUVIER (E.J.) et AUTRET (M.) (1944). — Instruction technique sur l'alimentation rationnelle des militaires indochinois Taupin et Cie éd. Hanoi.
- BIRCH (T.W.), HARRIS (L.J.) et RAY (S.N.) (1933). — Bioch. J. **27**, 590.
- EMMERIE (A.) et VAN EERLELEN (M.) (1934). — Bioch. J. **28**, 1153.
- GABBE (E.) (1936). — Klin. Wochensh. **15**, 292.
- GOCKEL (H.) (1943). — U. S. patent 2.297, 212.29 sept. 1943 in Lavollay (J.) et Patron (A.).
- FUJITA (A.) et IWATAKE (J.) (1935). — Biochem. Zeit. **277**, 293-296.
- HARRIS (L.J.) et OLLIVER (M.) (1942). — Bioch. J. **36**, 155.
- HARRIS (L.J.) et RAY (S.N.) (1933). — Bioch. J. **27**, 303 et 2.016.
- GERO (E.) (1947). — Bull. Soc. Chim. Biol. **29**, 998.
- HESS (A.F.) (1937). — Proc. Soc. Exp. Biol. Méd. **13**, 145.
- LEONG (P.C.) (1939). — J. of Malay. Branch Brit. Med. Ass. **3**, 238.
- LAVOLLAY (J.) et PATRON (A.) (1947). — Ann. Nutr. Alim. **1**, 536.
- MANCEAU (P.), POLICARD (A.) et FERRAND (M.) (1936). — Bull. Soc. Chim. Biol. **18**, 1623.
- MAPSON (L.W.) (1943). — J. Soc. Chim. Ind. London **62**, 225.
- MARTINI (E.) et BONSIGNORE (A.) (1934). — Bioch. Ztsch. **273**, 170.
- MENTZER (C.) et VIALARD-GOUDOU (A.) (1937). — Bull. Soc. Chim. Biol. **19**, 707.
- MENTZER (C.) (1940). — Thèse Pharmacien Sup. Jouve et Cie éd. Paris.
- MEUNIER (P.) (1937). — Bull. Soc. Chim. Biol. **19**, 877.
- MUSULIN (R.K.) et KING (C.G.) (1936). — J. Biol. Chim. **116**, 409.
- PANNEKOEK WESTENBURG (S.J.E.), NIJHOLT (Jr. J. A.) et VAN VEEN (A.G.) (1940). — Geneesk. Tijdsch. v. Nederl. Indie **33**, 80, 1927-1966.
- POLICARD (A.), FERRAND (M.) et ARNOLD (E.) (1938). — Bull. Soc. Chim. Biol. **20**, 155.
- RAOUL (Y.) (1947). — Bull. Soc. Chim. Biol. **29**, 728-732.
- ROE (J.H.) et KUETHER (Carl A.) (1943). — J. Biol. Chim. **147**, 399.
- ROE (J.H.) et OESTERLING (J.) (1944). — J. Biol. Chim. **152**, 511.
- SABALITSCHKA (Th.) et PRIEM (A.) (1942). — Bioch. Zeit. **310**, 281.
- TAUBER (H.) et KLEINER (I.S.) (1935). — J. Biol. Chim. **110**, 559.
- TILLMANS (J.) (1930). — Z. Untersuch. Lebensmit. **60**, 34.