

**Dosage de l'acide ascorbique
et déhydroascorbique
dans les sucs de fruits
et de verdure**

par

Mireille RIEHL
Laboratoire de Chimie

R É S U M É

La connaissance de la teneur en vitamine C des jus naturels présente un haut intérêt hygiénique, thérapeutique et commercial. Les principales méthodes de dosage sont examinées. La méthode de M. R. CHARONNAT et L. BÉRANGER-BEAUQUESNE, qui apparaît comme la plus sûre a été examinée et expérimentée :

- a) pour le dosage d'agrumes et de légumes frais ;
- b) pour l'étude cinétique de la conservation de l'acide déhydroascorbique en milieu « biologique reconstitué ».

Le présent travail est ainsi présenté :

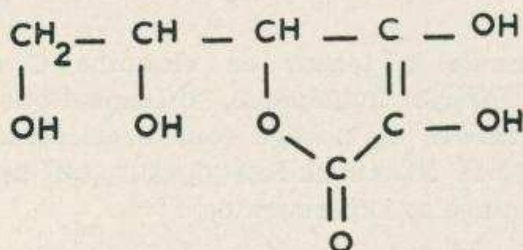
- I. — Introduction.
- II. — Exposition des différentes méthodes de dosage ;
- III. — Choix de l'une d'entre-elles. Critiques. Adaptation.
- IV. — Détermination de la teneur de quelques agrumes et légumes.
- V. — Annexe : Essais de localisation d'un facteur protecteur de l'acide déhydroascorbique dans les jus naturels.
 - a) préparation de solutions d'acide déhydroascorbique ;
 - b) réduction de ces solutions ;
 - c) conservation de ces solutions ;
 - d) constitution de solutions modèles ;
 - e) résultats expérimentaux.

I. — INTRODUCTION

L'histoire de l'acide ascorbique, appelé encore vitamine C ou vitamine anti-scorbutique, remonte au XV^e siècle, sans que toutefois à cette époque quelqu'un se soit douté de son existence. C'est à cette époque que l'on observa pour la première fois les graves symptômes du scorbut principalement sur des marins et des soldats, dont l'alimentation ne comportait ni fruits ni légumes frais.

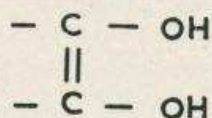
Depuis, de nombreuses études ont été faites et ont permis l'isolement et l'élucidation d'une substance très répandue dans le règne végétal, et indispensable au bon développement du squelette humain.

On lui donna d'abord le nom d'acide hexuronique, de formule brute $C_6H_8O_6$ puis celui définitif d'acide ascorbique :

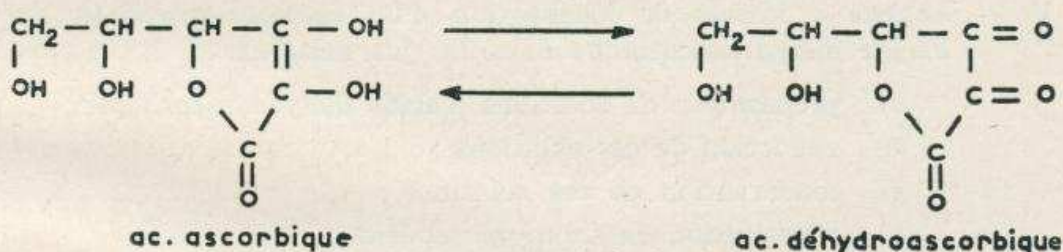


La détermination définitive de sa constitution est due au Hongrois SZENT-GYORYI.

Par son groupement di-énolique :

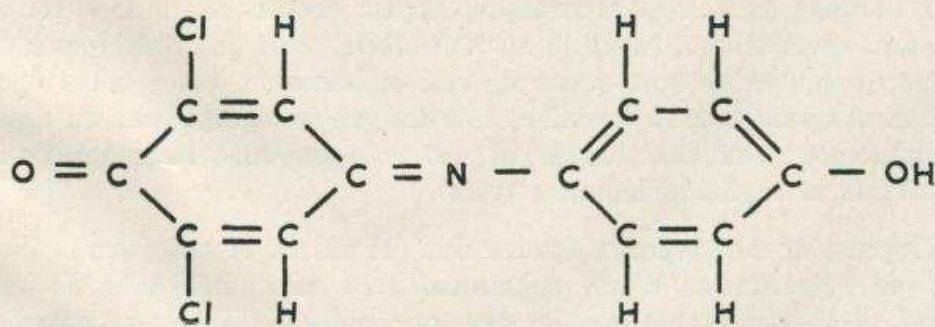


il possède un pouvoir réducteur exceptionnellement grand, d'où une grande tendance à l'oxydation :



Cette réaction se produit très facilement en solution aqueuse notamment par insufflation d'air. L'acide déhydroascorbique obtenu peut-être réduit par l'hydrogène sulfuré ou le glutathion réduit.

L'acide ascorbique se dose par divers procédés basés pour la plupart, sur des réactions colorées dont le plus employé est certainement celui qui utilise le 2,6 dichlorophénol-indophénol, de formule :



L'importance de la vitamine C, sur laquelle se sont penchés chimistes et biochimistes n'est plus à démontrer dans le domaine médical. La carence en vitamine C dans l'alimentation conduit au scorbut caractérisé principalement par un état hémorragique, un saignement au niveau des gencives et un mauvais état des cheveux. Les plaies guérissent lentement, tandis que le développement général et la dentition des enfants se font mal.

Les végétaux synthétisent eux-mêmes la vitamine C. Il en est de même de certains animaux comme le chien, la poule, le rat, etc... L'homme n'en est pas capable.

Aussi ne faut-il pas s'étonner que cette vitamine ait été parmi les plus étudiées. KING (1), REICHSTEIN (2), HAWORTH (3) trouvèrent les premiers des méthodes de synthèses.

Il restait à considérer le domaine de l'analyse quantitative ; depuis, de nombreuses méthodes de dosage ont été proposées, mais aussi souvent critiquées.

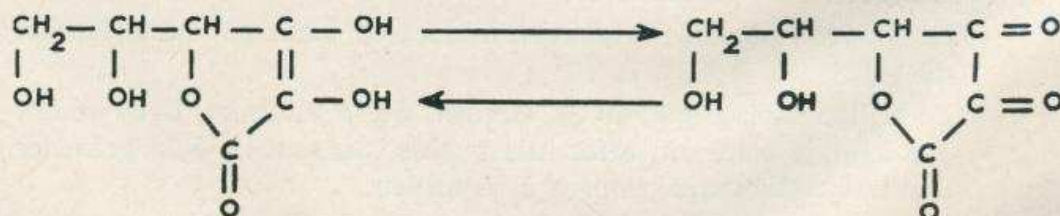
Du domaine médical où elle est un facteur contre le rachitisme au monde du commerce, il n'y avait qu'un pas que les ingénieurs des laboratoires de l'industrie alimentaire : jus de fruits, conserves de toutes sortes, chocolats... ont franchi.

On connaît aujourd'hui un grand nombre de produits survitaminés, très à la mode dans certains pays comme les Etats-Unis, la Suisse... dans lesquels la teneur en vitamine C a été largement accrue, quand ce n'est pas la totalité qui a origine synthétique.



II. — EXPOSITION DE DIFFÉRENTES MÉTHODES — CRITIQUES.

La réaction d'oxydo-réduction :



a fait l'objet de nombreuses études et, est le point de départ de réactions colorées sur lesquelles sont basées la plupart des méthodes de dosage.

Parmi les plus utilisées, on trouve :

- a) La méthode de MARTINI et BONSIGNORE (4) qui repose sur le fait que l'acide ascorbique, exposé à une lumière intense voit son potentiel d'oxydo-réduction se déplacer vers les valeurs négatives, en particulier en présence de substances photochimiques. Elle fut revue et améliorée par MENTZER et VIALARD-GOUDOU (5).
- b) La méthode de MEUNIER (6) consiste à suivre en fonction du temps la décoloration du dichlorophénol-indophénol par l'acide ascorbique ; plus tard, M. VINET (7) a repris ce procédé pour le dosage de l'acide ascorbique dans le sang.
- c) DE LOUREIRO (8) utilise le spectre d'absorption U-V.
- d) CHEVALLIER et CHORON (9) préconisent une méthode spectrophotochimique.
- e) Un des plus récents procédés est celui mis au point par M.R. CHARONNAT et L. BÉRANGER-DUQUESNE qui utilise la décoloration photochimique du rouge de thionine, dont on trouvera un exposé plus loin.

III. — CHOIX D'UNE MÉTHODE — ADAPTATION.

Nous avons d'abord fait une adaptation de la méthode proposée par M. VINET (7), basée sur la décoloration du dichlorophénol. Mais la littérature souligne un grand nombre de critiques tant sur la précision que sur la spécificité de ce procédé.

En particulier, N. BEZSSONOFF et M. WOLOSZYN (10 et 11) dénie toute valeur précise à ce procédé :

- le défaut principal qui compromet le principe même de la méthode est la variation du pouvoir décolorant de l'acide ascorbique en fonction de sa concentration. Ils insistent tout particulièrement sur ce point. A force d'expérience, ils aboutirent à la conclusion un peu effrayante, que l'erreur du dosage peut alors dépasser 100 % et que le titre calculé augmente presque toujours avec la dilution ;
- en solution aqueuse le pouvoir réducteur varie par modification du pH.
- en milieu biologique, 40 % environ de la vitamine C ne réagit pas avec le colorant, effet attribuable, pensent-ils à la présence d'autres réducteurs propres à ce milieu.

MENTZER et VIALARD-GOUDOU (5) attribuent le succès de la méthode à sa simplicité technique, mais signalent qu'en milieu biologique il existe bon nombre de substances comportant le groupement réducteur-SH : cystéine, glutathion réduit..., capables d'exercer une action déco-

lorante sur le dichlorophénol aussi rapidement que le fait l'acide ascorbique lui-même. Ils estiment à 30 % les erreurs possibles pour un temps total de dosage de 10 minutes.

Nous l'avons abandonnée au profit de celle de MENTZER et VIALARD-GOUDOU (5) qui utilise le bleu de méthylène.

Expérimentée, cette méthode se révéla très délicate pour une étude cinétique :

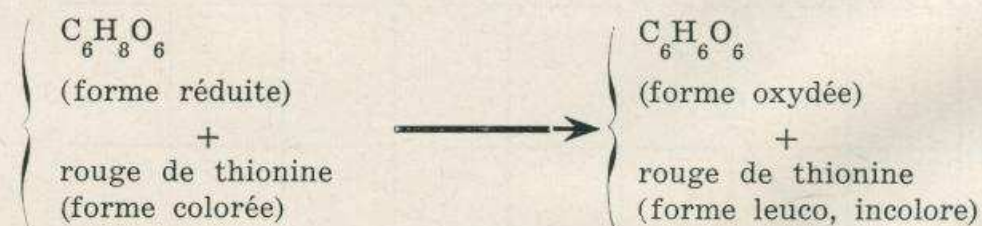
- la décoloration nécessite une grande quantité de photons ;
- la décoloration est réversible dans un très bref délai de temps : 15 secondes, si bien qu'il est difficile de stabiliser la décoloration. Nous avons dû également renoncer à l'appliquer ici.

Nous avons alors reporté notre attention sur la méthode plus récente proposée par M. R. CHARONNAT et L. BÉRANGER-BEAUQUESNE :

- le colorant est ici le rouge de thionine ;
- la réaction est également photochimique, mais demande beaucoup moins de photons ;
- la décoloration est plus stable ;
- l'acide déhydroascorbique, le glutathion, la cystéine et les produits de clivage n'interviennent pas.

Cette méthode présente un autre avantage : il est possible de procéder à une vérification en ajoutant une goutte de ferricyanure de potassium à la solution décolorée, on oxyde alors tout l'acide ascorbique et il y a recoloration du réactif. La comparaison avec un tube témoin, permet de s'assurer que la réduction a été faite par l'acide ascorbique, puisque les auteurs disent que cette réversibilité n'est possible qu'avec l'acide ascorbique.

On peut schématiser comme suit le principe de la méthode au rouge de thionine :



a) On trace la courbe d'étalonnage donnant la densité optique (DO) du mélange réactionnel pour une irradiation de 7 minutes avec une lampe de 75 watts, en fonction de la quantité d'acide ascorbique contenue dans la prise d'essai.

La courbe est presque rectiligne jusqu'à une teneur de 80 μg (fig. 1). Mais dans le milieu fortement acide adopté pour le dosage, les nuances les plus pâles varient en un temps relativement court, si bien que les meilleures évaluations se font entre 25 et 45 μg d'acide ascorbique.

b) — *Technique*

b1 — *Réactifs*

- solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ cristallisé, exempt de fer ;
- solution d'acide ascorbique à 0,50 g/l, stabilisé par quelques cristaux de SCNK ;
- solution de thionine à 0,05 g/l (facilement obtenue à chaud) ;
- H_2SO_4 10 N.

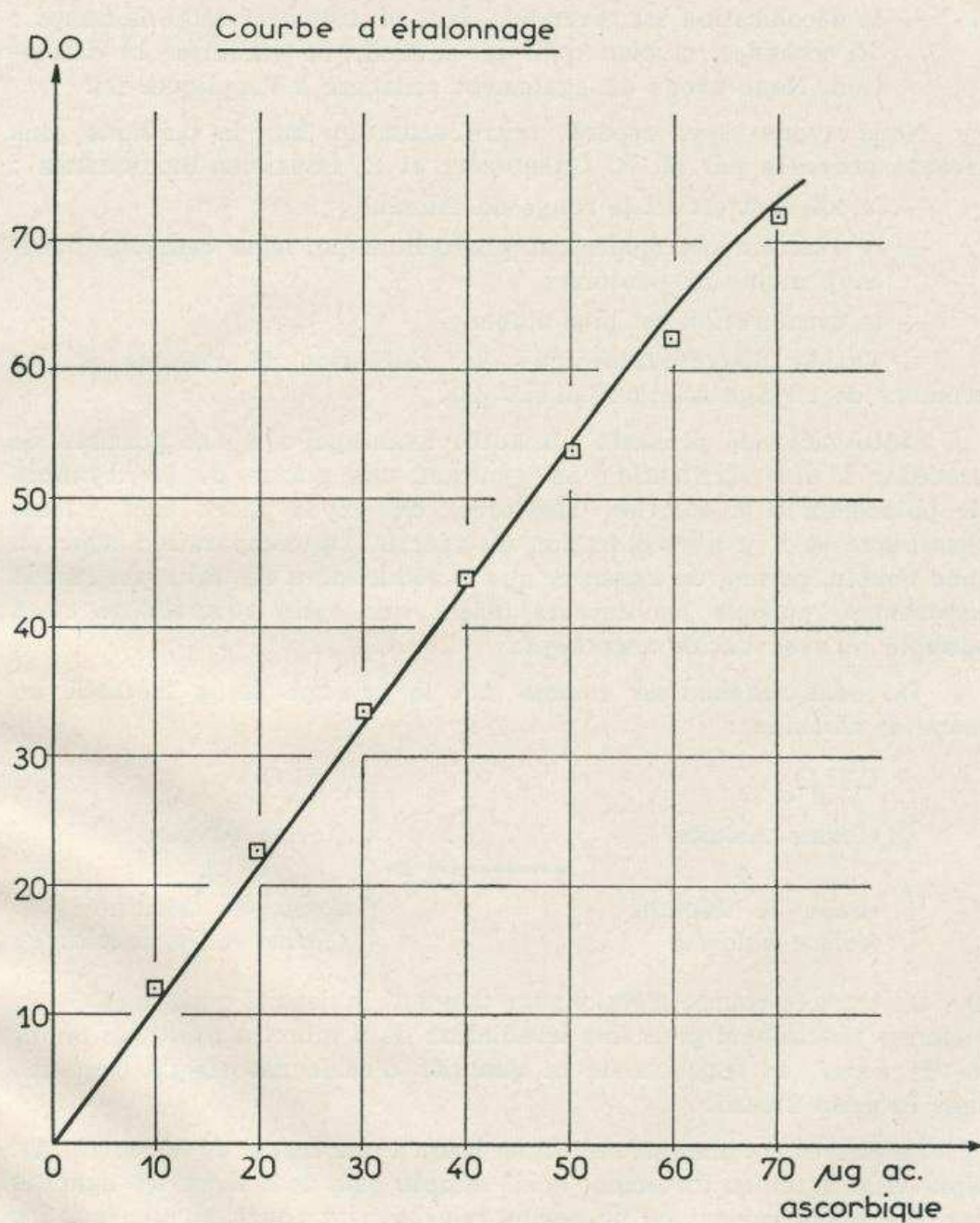


Figure 1

b— 2. *Préparation de l'extrait désalbuminé*

S'il s'agit d'une substance solide, on la triture au mortier avec un poids égal de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (en s'aidant de sable au besoin) et on épuise le mélange avec la solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par additions et décantations fractionnées. Les liquides d'extraction sont réunis et amenés à un volume convenable et filtrés.

Le volume est fixé de telle sorte que la prise d'essai ultérieure ne dépasse pas 5 cc, et compte-tenu que les meilleures évaluations se font pour une teneur voisine de 25 μg .

Pour un extrait de plante, on traite 3 à 6 g de matière et on complète à 25 ou 30 cc. Pour un liquide, on sature avec $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et on filtre.

b— 3. — *Dosage de l'acide ascorbique*

On utilise une série de tubes calibrés.

Dans un tube X, on met :

— portion aliquote de l'extrait	5 cc
— eau distillée	Q.S.P. 5 cc
— sol. de thionine	3 cc

Dans chacun des autres tubes, on met :

— 25 à 250 mg d'acide ascorbique, soit 0,05 à 0,5 cc de solution suivant la richesse présumée de l'extrait dont la teneur sera facilement évaluée avec un peu d'habitude par un essai qualitatif préalable ;	
— eau distillée	Q.S.P. 5 cc
— sol. de thionine	3 cc

Dans chaque tube, on ajoute :

— H_2SO_4	1 cc
---------------------------------	------

On agite plusieurs fois par retournement de préférence dans un endroit sombre, et on expose aussitôt à la lumière naturelle (ou celle d'une lampe de 75 watts) dont les radiations tombent perpendiculairement à l'axe des tubes placés côte à côte sur un rayon de 25 cm de la lampe. On suit alors les progrès de la décoloration ce qui permet de faire la comparaison au moment le plus favorable.

Ayant repéré l'ordre de grandeur en acide ascorbique du tube X par rapport au tube étalon, on renouvelle le dosage en le comparant cette fois à plusieurs tubes de teneur plus voisines de celle cherchée, on peut améliorer éventuellement la précision par un troisième dosage.

N.B. — Si l'extrait est fortement coloré, et si l'addition de H_2SO_4 n'atténue pas sa teinte on ajoute au moment de la comparaison le même volume de cet extrait dans les tubes étalons et la même quantité d'eau dans le tube X, bien entendu très rapidement.

b— 4. — *Dosage de l'acide déhydroascorbique*

- solution tampon pH 4
 - HCl N/10 45 cc
 - citrate trisodique (ac. citrique 21 g,
soude N 200 cc, eau Q.S.P. 1000) 55 cc
- SNa_2 à 10 %
- $(\text{CN})_2\text{Hg}$ à 10 %

On met en contact :

- extrait 7,5 cc
- sol. tampon pH 4 2,5 cc
- sol. de Na_2S 0,5 cc

On agite et on laisse au repos 1/2 heure.

On ajoute alors :

- H_2SO_4 10 N 0,5 cc
- sol. de $(\text{CN})_2\text{Hg}$ 1 cc

On agite et on abandonne 10 minutes.

On filtre. On dose l'acide ascorbique dans le filtrat limpide.

On a ainsi la teneur en acide ascorbique et acide déhydroascorbique. Par différence avec le premier dosage, on obtient la teneur en acide déhydroascorbique (il faut multiplier le résultat par 1,6 à cause des dilutions).

b,5) *Adaptation.*

Nous avons apporté un certain nombre de modifications :

- irradiation par une lampe de 150 watts et un temps d'exposition de 15 minutes ;
- les densités optiques (notées dans le texte D.O.) ont été évaluées au photomètre ;
- sur la courbe d'étalonnage figurent les D.O. corrigées suivant la formule :

$$n_0 + \frac{(n'' - n') \cdot 6}{9} = n$$

ou :

9/6 est un terme correctif.

n_0 = D.O. de (5 cc eau + 1 cc H_2SO_4 + 3 cc thionine)

n' = D.O. de (5 cc eau + 1 cc H_2SO_4)

n'' = D.O. de [(5-X) cc eau + 1 cc extrait + 1 cc H_2SO_4]

n = D.O. de la solution irradiée.

- La préparation de l'extrait a été faite suivant la technique décrite plus loin
- La réduction a été faite par Na_2S et par H_2S

IV. — RÉSULTATS

La méthode ainsi mise au point, nous a permis de déterminer la teneur en acide ascorbique de quelques agrumes et légumes.

1) **Agrumes :**

La technique d'extraction employée est la suivante :

a) *Préparation du fruit.*

- le fruit est pelé en prenant soin de ne pas écorcher la pulpe ;
- il est ensuite découpé en tranches ;
- puis « stérilisé » : chaque tranche est plongée dans un récipient contenant de l'eau bouillante pendant quelques secondes, de là il est jeté dans une cuve d'eau froide ;

Il faut veiller à faire cette opération rapidement de façon à ne pas détruire l'acide ascorbique qui est stable tant que l'on ne touche pas au milieu biologique.

- les tranches sont ensuite essuyées, et sont alors prêtes pour l'extraction ;
- on opère sous atmosphère d'azote et par pression de manière à faire éclater la membrane qui recouvre chaque tranche ;
- le jus est recueilli dans un bécher, après filtration sur une toile de nylon passée à l'eau bouillante.

b) *Préparation de la solution à doser.*

- 2 cc de jus sont portés à 50 cc dans une fiole jaugée par addition de solution A (14 g d'acide trichloroacétique + 2 g d'acide métaphosphorique) ;
- la solution obtenue est filtrée sous vide, pour réduire le temps de manipulation. La centrifugation ayant été abandonnée par suite de la décomposition du jus en deux phases ;
- on double le volume ou plus commodément on l'amène à 100 par de l'eau distillée.

c) *Résultats :*

(Le titre donné est la valeur moyenne de plusieurs mesures sur la même échantillon).

Pamplemousse de JAFFA :

ac. ascorbique	180 mg/l
ac. déhydroascorbique (H ₂ S)	160 mg/l
» (H ₂ S)	130 mg/l

Orange de JAFFA :

ac. ascorbique	475 mg/l
ac. déhydroascorbique (H ₂ S)	190 mg/l

Citron :

ac. ascorbique	350 mg/l
ac. déhydroascorbique (H ₂ S)	190 mg/l

Orange d'Espagne :

ac. ascorbique	450 mg/l
ac. déhydroascorbique (H ₂ S)	105 mg/l
» (Na ₂ S)	150 mg/l

2) Légumes :a) *Extraction :*

Cinq grammes de tissus végétaux sont triturés dans un mortier en présence de sable lavé et d'une solution trichloroacétique à 6,4 % préparée avec de l'eau fraîchement bouillie et saturée d'azote, (exempte de CO₂ et d'air dissous), quand on a un volume total de 20 cc, on filtre.

On ajoute aussi rapidement que possible un volume connu (de 0,1 à 5 cc) de la solution précédente au mélange eau + rouge de thionine + H₂SO₄ dans les proportions déjà citées.

b) *Résultats :**Salade longue, dite salade pascalle.*

ac. ascorbique	9 mg/l
ac. déhydroascorbique (H ₂ S)	3,5 mg/l

Persil

ac. ascorbique	220 mg/100 g
----------------------	--------------

V. — ANNEXE : ESSAIS DE LOCALISATION D'UN FACTEUR
 PROTECTEUR DE L'ACIDE DÉHYDROASCORBIQUE
 DANS LES JUS NATURELS

L'acide déhydroascorbique en solution aqueuse est très instable ; il devient rapidement impossible de le reconvertir en acide ascorbique par H_2S . Au contraire, dans les milieux naturels, l'acide déhydroascorbique est plus stable et reconvertible pendant un temps beaucoup plus long.

Par quelques essais de fractionnement, nous avons essayé de localiser un facteur de protection.

a — PRÉPARATION DE SOLUTION D'ACIDE
 DÉHYDROASCORBIQUE

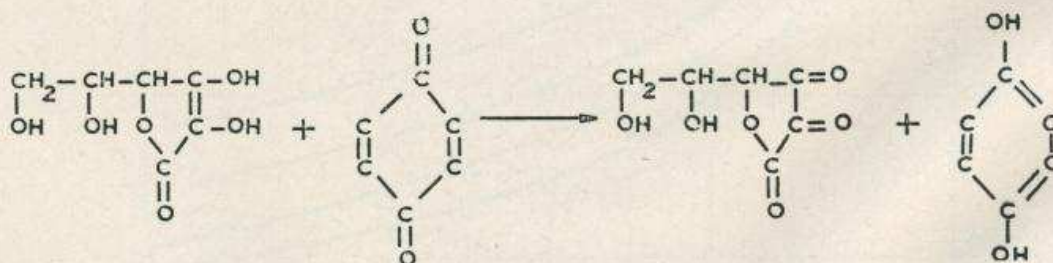
La méthode de MERCK conduit à des résultats satisfaisants :

Une solution de 5,4 g d'acide ascorbique dans 70 cc d'eau bidistillée bouillie est placée dans un récipient d'eau glacée. On ajoute 3,3 g de quinone fraîchement recristallisée à chaud dans l'éther de pétrole ; on agite le mélange pendant 1/4 d'heure.

Par trois fois, on extrait à l'éther pur la quinone n'ayant pas réagi, tandis que l'éther dissous est chassé par distillation sous vide. On ajuste le volume à 80 cc par addition d'eau dans une éprouvette.

La solution obtenue contient environ 5 à 5,2 g d'acide déhydroascorbique, et 100 à 300 mg d'acide ascorbique non oxydé. (On peut de même obtenir une solution alcoolique, en partant d'une solution méthanolique d'acide ascorbique et d'une solution de quinone dans un mélange : éther-alcool).

A mesure que la réaction se fait, la couleur jaune de la quinone disparaît, il se forme de l'hydroquinone et de l'acide déhydroascorbique :



N.B. — S'assurer que la quinone est complètement dissoute avant de faire le mélange. Au contact de l'eau, la partie non dissoute dans l'éther donne de la quinhydrone (mélange équimoléculaire de quinone et d'hydroquinone) qui ne participe pas à la réaction.

b — RÉDUCTION DE CES SOLUTIONS

Nous avons souvent employé deux méthodes :

1) Réduction par H_2S .

C'est celle qui présente le plus de facilités du point de vue opératoire et qui a donné les meilleurs résultats :

- placer dans un barboteur à H_2S une certaine quantité de la solution oxydée ;
- faire passer H_2S pendant 1/4 d'heure ;
- éliminer H_2S dissous sous vide pendant 1/4 d'heure ;
- centrifuger à 10.000 t/mn pendant 1/4 d'heure.

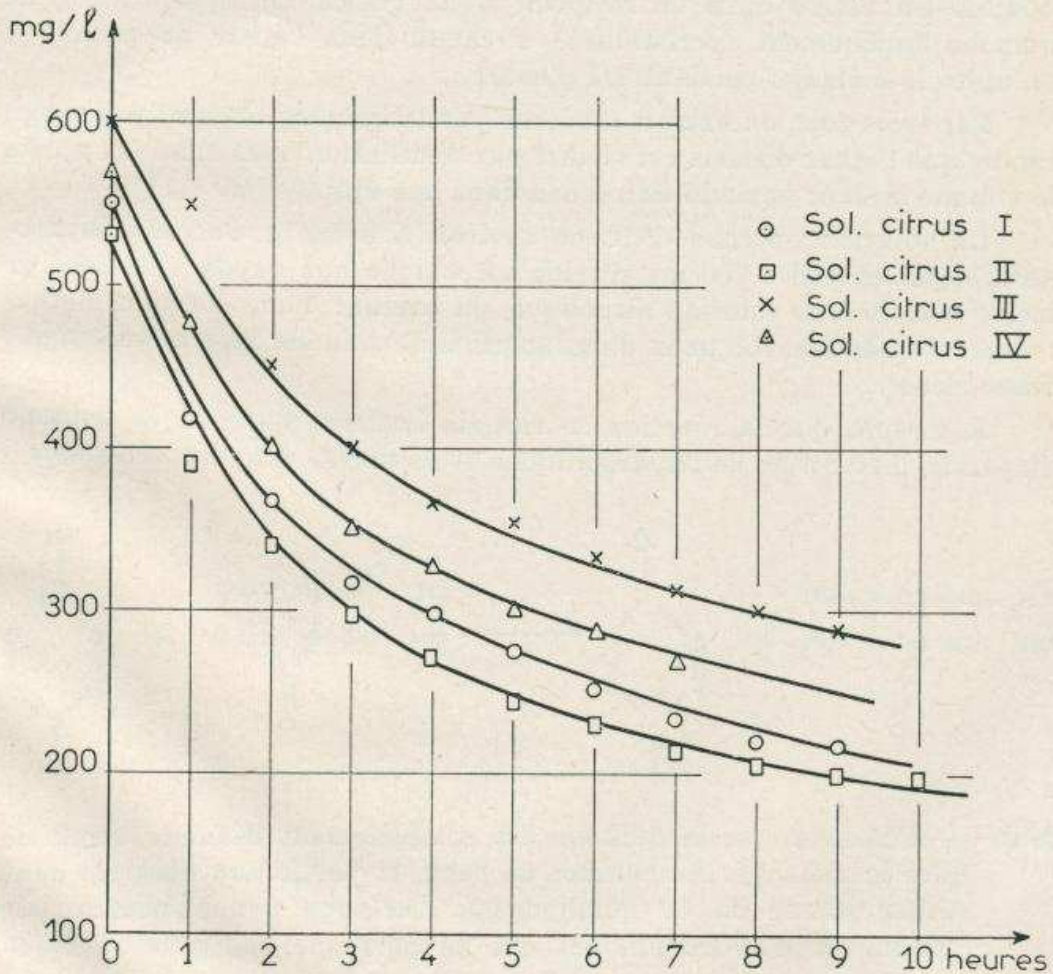
La solution est alors prête pour le dosage.

2) Réduction par Na_2S .

Cette méthode a été décrite dans la technique de dosage par le rouge de thionine.

c — CONSERVATION DES SOLUTIONS

Nous avons conservé les solutions oxydées et concentrées à une température de -20° dans un congélateur.



d — *CONSTITUTION DE SOLUTIONS MODÈLES*

Nous avons essayé de reproduire le milieu biologique naturel.

- La température est maintenue constante à + 37°C.
- La concentration en acide déhydroascorbique a été fixée à 500 mg environ.
- Addition de solution tampon
 - deux cas : jus de citrus pH 3
 - jus de verdure pH 7
- Addition de glucides
 - jus de citrus 10 à 12 %
 - d'un mélange : glucose-saccharose.
 - jus de verdure 3 à 5 %
 - de glucose.
- Addition de sels minéraux : NaCl
(isotonie physiologique) 8 %
- Atmosphère inerte par barbotage d'azote.

Le tableau ci-dessous résume les différentes solutions à considérer.

N°	Jus de citrus	Jus de verdure
1	acide déhydroascorbique 500 mg/l	acide déhydroascorbique 500 mg/l
2	sol. 1 + 12 g d'acide citrique par litre, ramenée à pH 3 par KOH	sol. 1 + 4,3 g de KOH, par litre, neutralisée à pH 7 par une solution d'acide succinique
3	sol. 2 + 6 % glucose 6 % saccharose	sol. 2 + 3 % glucose
4	sol. 3 + 8 % NaCl	sol. 3 + 8 % NaCl

e — *RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX*

Avant chaque dosage, il est nécessaire de s'assurer de l'absence totale de H₂S par addition d'une goutte d'acétate de plomb. La figure 2 représente l'évolution au cours du temps des différentes solutions modèles jus de citrus.

Il est aisé par l'examen des courbes II, III, IV, dont aucune ne présente une pente nettement différente de la courbe I, de conclure au fait

qu'aucun des agents chimiques considérés à savoir, acide citrique, glucosc, saccharose, NaCl n'exercent un effet protecteur quelconque quant à la stabilité de l'acide déhydroascorbique.

Tout conduit à penser que nous aurions eu les mêmes résultats négatifs avec les solutions-modèles jus de verdure ; il n'était donc pas utile de continuer les expériences dans ce sens.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) KING and W.A. WAUGH : J. Biol. Chem. 97 (1932) 325.
- (2) REICHSTEIN et Al. Helv. Chim. Acta 16 (1933) 1019.
- (3) HAWORTH, E.L. HIRST and S.S. ZILVA : J. chem. (1934) 1155.
- (4) MARTIN et BONSIGNORE : Biochem. Z., t. 273, 1934, p. 170.
- (5) MENTZER et VIALARD-GOUDOU : Bull. Soc. Chim. Biol. t. 19, 1937, p. 707.
- (6) MEUNIER : Bull. Soc. Chim. Biol., t. 19, 1937, p. 113, et Ann. des Fermentations, t. 2, 1936, p. 278.
- (7) M. VINET : Techniques de laboratoire Loiseleur — Dosage de l'acide ascorbique dans le sang, p. 293.
- (8) DE LOUREIRO : Bull. Soc. Chim. Biol., t. 18, 1936, p. 757.
- (9) CHEVALLIER et CHORON : Bull. Soc. Chim. Biol., t. 19, 1937, p. 511, et C.R. Soc. Biol., t. 124, 1937, p. 543.
- (10) N. BEZSSONOFF et M. WOLOSZYN : C.R. Acad. Sc., t. 203, 1936, p. 275.
- (11) N. BEZSSONOFF et M. WOLOSZYN : S.R. Soc. Biol., t. 120, 1935, p. 893.