

PHYTON

ANNALES REI BOTANICAE

VOL. 2. FASC. 1—3 PAG. 1—246

3. VII. 1950

Contribution à la phytochimie du péricarpe de *Juglans regia* L.

Par

R. STADELMANN et A. MIRIMANOFF

Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université, Genève.

Reçu le 18 octobre 1949.

Depuis des temps très anciens, le péricarpe immature du noyer a été utilisé en médecine populaire comme astringent et „dépuratif“; son emploi pour la teinture de divers objets est également bien connu.

Les renseignements d'ordre chimique qu'on rencontre dans les traités de chimie végétale et de pharmacognosie, dont la plupart sont antérieurs à 1939, font état de la présence, dans ce péricarpe, de tanins, de juglone, d'hydrojuglones, d'acides organiques, comme l'acide citrique et l'acide malique; certains auteurs mentionnent des phénol-oxydases.

La découverte par GUGATH et RUDOLPH, en 1937, confirmée en 1940 par MIRIMANOFF et MORI, puis en 1942, par BREINLICH *) d'une très forte teneur en acide ascorbique dans ce fruit, contribue à éclairer d'un jour nouveau l'intérêt biologique de ce végétal et nous oblige, en même temps, à reviser nos notions sur les autres constituants accompagnant cette vitamine, dont le chimisme se trouve intimement lié à celui de l'acide ascorbique comme à celui des enzymes également présents.

A vrai dire, notre intention, en étudiant le péricarpe de *Juglans regia*, était de déterminer avant tout la teneur réelle de ce tissu en vitamine C, certaines substances fortement réductrices faussant les dosages colorimétriques usuels (méthode au dichlorophénol-indophénol).

Un récent mémoire de DAGLISH et WOKES, parvenu à notre connaissance peu avant la rédaction de ce travail, en a confirmé cer-

*) Ces auteurs semblent, en raison de la guerre, ne pas avoir eu toujours connaissance des travaux de leurs devanciers.

tains aspects, soulignant en particulier la part qu'il convient de faire à la „pseudo vitamine C“ du noyer.

Pour éviter de trop longs développements, nous résumerons successivement le résultat de nos investigations concernant la teneur réelle en vitamine C du péricarpe immature, puis nous aborderons les autres constituants décelés ou dosés au cours de nos recherches.

I. Acide ascorbique

Le dosage de cette substance dans des végétaux contenant des tanins, à l'aide de la méthode colorimétrique de TILLMANS, est entaché d'erreur, les tanins réagissant avec le dichlorophénolindophénol. On obtient des résultats trop élevés (cas paradoxal de l'écorce de chêne, des feuilles de maté, etc.). Dans ce cas, il convient d'avoir recours à une défécation. L'un de nous a établi, à la suite de longues séries d'expériences, que la méthode la plus sûre était celle de EMMERIE et van ECKELEN, légèrement modifiée. Voici le mode opératoire:

Râper rapidement 10,0 g de péricarpe dans 20 cm³ d'acide acétique à 5% contenant 1‰ de thiourée. Verser quantitativement le broyat dans une éprouvette graduée de 250 cm³, et compléter à 100 cm³ avec le liquide d'extraction. Laisser macérer 1½ à 2 h. en faisant passer un courant de CO₂, en amenant le tube adducteur de gaz au fond de l'éprouvette. Filtrer sur un filtre à plis dans un ballon d'Erlenmeyer de 150 cm³ en couvrant l'entonnoir. Neutraliser le filtrat limpide au rouge Congo par addition de CaCO₃ jusqu'à obtention d'un pH = 5 environ. 50 cm³ de filtrat sont traités (défécation) par 10 cm³ d'acétate de mercure à 20%. Filtrer sur Jena 11 G/4, et traiter avec H₂S pendant 15 minutes. Conserver en atmosphère de H₂S pendant 12 h., puis chasser ce gaz par un courant de CO₂ (15 min. au bain-marie à 40° C, puis 15 min. à température ordinaire) jusqu'à non réaction au nitroprussiate de sodium. Titrer 2 cm³ du filtrat ainsi déféqué, additionné de 5 cm³ de solution-tampon (pH = 4). Le calcul s'établit selon le titre du colorant (dichlorophénol-indophénol) en acide ascorbique.

Ce procédé, établi à la suite de très nombreux essais, a montré qu'il n'influe pas sur la vitamine C présente et qu'il éliminait complètement les tanins.

Comparé à la méthode à l'acétate de plomb, il donne à la fois des résultats reproductibles et toujours plus élevés, et généralement très proches dans le cas présent des valeurs obtenues sans défécation. Enfin, il tient compte de l'acide déhydroascorbique préformé ou se formant éventuellement lors de la macération.

En ce qui concerne l'époque de l'année et le degré de maturation, nos dosages, effectués tous les quinze jours (2 années de suite) sur plusieurs noix provenant de 2 arbres voisins, ont montré, par leurs valeurs moyennes, que la teneur fluctue, entre la seconde quinzaine de juin et la première semaine de septembre, autour de 1000 à 1300 mg d'acide ascorbique dans 100 gr. de matière fraîche. Au cours de septembre, la teneur baisse, et tombe très rapidement dès que le péricarpe commence à brunir. Calculée sur la matière sèche, cette teneur atteint jusqu'à 8 et 9 grammes d'acide ascorbique pour 100 grammes de péricarpe sec.*).

Ces données confirment donc, malgré la technique de défécation, les résultats des auteurs précités. Des analyses complémentaires nous ont en outre démontré que l'acide déhydroascorbique préformé n'existe qu'en très faible proportion dans la plante.

Si l'élimination des tanins, prouvée par les réactions du filtrat après défécation, n'a eu que peu d'influence sur les résultats, est-ce à dire que ces derniers donnent une image réelle de la teneur du péricarpe en acide ascorbique?

Les mémoires de BREINLICH et de DAGLISH-WOKES ont attiré notre attention sur la présence d'hydrojuglones, fortement réductrices. Or, ces substances échappent à la défécation à l'acétate de mercure, comme nous avons pu nous en rendre compte en ajoutant à un macérat végétal de l' α -hydrojuglone obtenue par synthèse. La substance réductrice demeure dans le filtrat, et réduit énergiquement le colorant; son potentiel oxydoréducteur s'avère très voisin de celui de l'acide ascorbique.

Pour éliminer ces hydrojuglones (pseudo vitamine C de WOKES), nous avons, après de nombreux essais, procédé comme suit, en tenant compte de la solubilité de l'isomère α dans l'éther et de la solubilité du dérivé β dans du benzène: 20 cm³ de macérat déféqué exempt de H₂S (voir plus haut) sont épuisés, en présence de CO₂, par extraction fractionnée au moyen de 5 × 10 cm³ d'un mélange en parties égales d'éther pour narcose et de benzène. On chasse le solvant à 40° C en présence de CO₂, on refroidit et on titre**). La perte, qui correspond à la teneur en hydrojuglones, oscille entre 10 et 30% selon les échantillons et l'époque. L'addition d'hydrojuglone de synthèse à des macérats connus a permis de justifier cette méthode.

*) Le péricarpe immature de *J. regia* constituerait donc la source naturelle la plus riche en vitamine C (BREINLICH).

**) La description complète de cette technique est donnée dans la thèse STADELMANN.

En résumé, le dosage direct de la vitamine C, par la méthode de TILLMANS, dans le péricarpe de *Juglans regia*, comporte deux causes d'erreur, car il ne tient pas compte:

a) des tanins, qu'on doit déféquer par de l'acétate de mercure dans des conditions déterminées,

b) des hydrojuglones, qu'on peut éliminer par des solvants appropriés.

Si la première cause d'erreur est faible, la seconde aboutit à des résultats trop élevés, pouvant atteindre jusqu'à 30%.

Nous tenterons, dans la suite de cet exposé, de relier ces résultats analytiques à la biochimie du péricarpe en maturation.

II. Autres substances contenues dans le péricarpe. Leur influence sur la vitamine C

Nous avons vu, confirmant les observations de divers auteurs, que l'acide ascorbique, lui-même instable, est accompagné dans le tissu végétal, de substances très fortement réductrices comme les hydrojuglones.

La baisse très rapide du titre en substances réductrices lors de la maturation du fruit se produit également dans les macérats, malgré les précautions prises contre l'oxydation. Cette baisse de titre dépend de plusieurs causes:

a) présence de catalyseurs d'oxydation, comme le cuivre, par exemple (SIEFFERT),

b) oxydation due à des enzymes,

c) oxydation chimique.

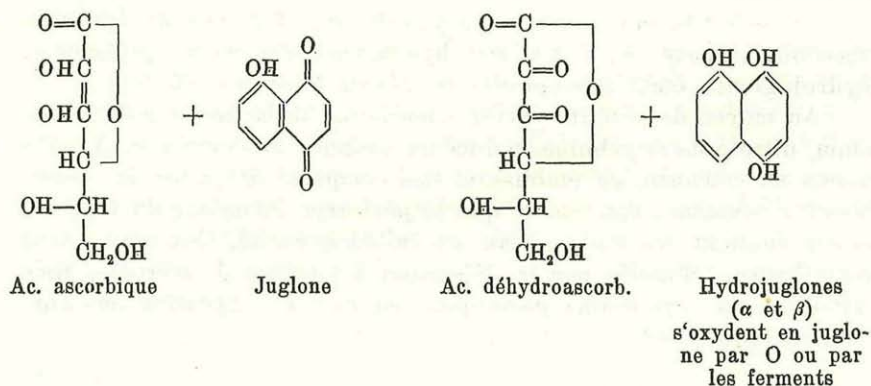
Comme différents auteurs et l'un de nous (STADELMANN) l'ont montré, on peut lutter assez efficacement contre a) par l'addition de diverses substances protectrices: thiourée, thionalide, mercaptoéthanol, sulfodiglycol, etc., etc. Ces stabilisateurs se révèlent peu efficaces vis-à-vis de b). Ceci est d'autant plus digne d'être relevé que l'ascorbinase contient du cuivre dans sa partie prosthétique et que ce métal est responsable de son caractère d'oxydase. Il est vraisemblable que le cuivre est protégé par suite de sa position à l'intérieur de la molécule du ferment.

On peut lutter contre b) par voie physique (stabilisation) ou par des procédés chimiques. Si nos expériences ont prouvé qu'on peut détruire aisément l'ascorbinase, notamment par la chaleur, ce procédé ne s'applique pas plus que les autres procédés physiques au péricarpe de *Juglans regia* si on désire conserver la vitamine C, car celle-ci est oxydée, dans la plante, comme dans les macérats ou extraits, par voie chimique.

Comment s'opère cette dernière réaction? Nous avons vu que les hydrojuglones présentes dans le péricarpe, sont très fortement réduc-

trices. Contrairement à l'acide ascorbique, les hydrojuglones sont autoxydables. Toutes nos tentatives d'en empêcher l'oxydation par des moyens compatibles avec des procédés d'extraction utilisables en pratique se sont avérées impuissantes, les hydrojuglones se transformant en juglone.

Dans le cas du noyer, on peut admettre que la juglone forme l'équilibre chimique suivant avec l'acide l-ascorbique, un équilibre qui fonctionne probablement comme système-redox dans la cellule vivante et qui est continuellement déplacé „in vitro“ vers la droite (voir formule) par suite de la grande autoxydabilité des hydrojuglones:



Ce schéma peut expliquer à la fois ce qui se passe dans la maturation du péricarpe comme dans les extraits et macérats. Il faudrait un traitement à l'hydrogène naissant pour entraver cette réaction qui, de plus, rend vaines les tentatives de stabilisation enzymatique par la dessiccation ou la chaleur. Ajoutons qu'„in vitro“, aucun des stabilisateurs efficaces vis-à-vis de l'oxydation catalytique ne s'est montré capable d'enrayer l'oxydation par la juglone.

Il n'est pas sans intérêt de rappeler que si certains auteurs, comme BREINLICH et JOHN, ont attribué à la juglone une faible action vitaminique en tant que facteur K, les naphthoquinones comptent au nombre des substances antibiotiques appartenant aux phanérogames. La toxicité de la juglone vis-à-vis de la cellule se manifeste, selon GAUMANN et von ARX, à la concentration molaire de 10^{-7} sur *Spirogyra*; il est vraisemblable qu'en altérant la semiperméabilité, cette naphthoquinone accélère le processus de destruction cellulaire qui accompagne la maturation du péricarpe.

Enfin, il convient de relever que nos essais montrent que les substances réductrices du péricarpe immature s'y trouvent à l'état de combinaison; nous ne pouvons toutefois apporter aucune lumière quant à la nature chimique de ces associations: ascorbigène pour la vitamine C,

hydrojuglones estérifiées (DAGLISH et WOKES). Une chose est certaine: l'instabilité très marquée de ces substances hypothétiques. En stockant des noix fraîches à basse température (-20° à -25° C) pendant 16 mois, le taux résiduel de vitamine C ne s'élève qu'à 50% environ des valeurs moyennes initiales.

Tanins

Nous avons vu qu'en déféquant nos macérats de péricarpes à l'acétate de mercure, on ne modifie que légèrement la teneur en substances réductrices. On peut implicitement admettre que ce fait démontre l'absence de tanins ou du moins leur présence en faible proportion.

La recherche des tanins au moyen des sels ferriques est illusoire, histochimiquement, des substances hydroxylées comme les juglones et hydrojuglones étant susceptibles de réagir avec ces sels.

Au moyen de réactifs variés (rhodamine B, bichromate de potassium, nitrate de strychnine, p-diméthylaminobenzaldéhyde, etc.), nous avons pu conclure, en établissant des comparaisons avec des tissus témoins contenant des tanins, que le péricarpe immature du fruit du noyer contient des tanins, mais en faible quantité. Ces tanins sont complètement éliminés par la défécation à l'acétate de mercure. Rien n'indique que ces tanins participent ou non à l'oxydation des substances réductrices.

Ferments oxydants

Ici également, les méthodes histochimiques classiques sont à utiliser avec précaution, les substances réductrices étant susceptibles de fausser les réactions colorées usuelles, soit sur un tissu lésé par une coupe, soit surtout dans un macérat. En ayant recours à des réactions-témoins, nous avons obtenu, pour les oxydases des résultats toujours négatifs (réactifs: Nadi, α -naphtol de MOLISCH, benzidine); il est possible que ceci soit dû à l'action inhibitrice de l'acide ascorbique (F. CHODAT et WYSS-CHODAT).

En revanche, des peroxydases peuvent être mises en évidence, mais l'intensité des réactions colorées dépend de la quantité d'acide ascorbique présent. On ne peut cependant déceler ni indophénolase ni tyrosinase. Il est vraisemblable que ces enzymes contribuent à l'oxydation des substances réductrices de la noix.

Résumé

Le péricarpe immature de *Juglans regia* contient une proportion exceptionnellement élevée de substances réductrices à l'état de combinaison. La plus grande partie en est formée par de l'acide ascorbique, dont la teneur peut atteindre jusqu'à 1—1,5 gramme dans

100 grammes de matière fraîche. Cette vitamine est accompagnée d'hydrojuglones α et β dont la teneur peut atteindre les 30% de la valeur réductrice exprimée en acide ascorbique. Description est donnée de la méthode de dosage de ces deux principes. Les hydrojuglones s'oxydent très facilement en juglone qui, à son tour, oxyde l'acide ascorbique. Ce processus se produit lors de la maturation du péricarpe, et plus rapidement, dans les macérats et extraits du péricarpe, ce qui explique l'absence de vitamine C dans les produits pharmaceutiques à base de brou de noix. La conservation des deux principes réducteurs se heurte à des difficultés pratiquement insurmontables. Il n'est pas exclu en revanche que la juglone exerce une certaine action comme antibiotique.

En dehors de ces principes, il existe dans le péricarpe immature des tanins, en faible proportion, et des peroxydases. La détection des ferments oxydants par voie histochemique est en partie inhibée par la présence d'acide ascorbique. La conservation des noix fraîches à basse température (-20° à -25° C) permet de retrouver environ les 50% de la vitamine C au bout de 16 mois. Les ferments oxydants contribuent pour leur part à détruire les substances réductrices de la noix. Leur élimination se heurte également à des difficultés qui font l'objet d'une brève discussion.

Bibliographie.

- BREINLICH, J. 1944. Zur Frage des Vitamin C-Gehaltes von Drogen, jahreszeitliche Schwankungen desselben, Versuche für einfache geeignete Trocknungsverfahren. Pharmaz. Zentralhalle 85 n° 10/18: 39.
- DAGLISH C. and WOKES, F. 1948. Hydrojuglone and apparent Vitamin C in walnuts. Nature, 162, 179.
- GÄUMANN, E. und von ARX, A. 1947. Antibiotica als pflanzliche Plasmagifte, II. Ber. Schweiz. bot. Ges. 57: 174.
- GUGATH, E. 1937. Beiträge zur Vitamin C. Bestimmung und Versuche über die Haltbarkeit der Ascorbinsäure. Inauguraldiss. Frankfurt a. M.
- KLEIN, G. 1933. Hdb. der Pflanzenanal. IV, Nr. 2. Wien.
- MIRIMANOFF, A. et MORI, A. 1940. Le dosage de la vitamine C dans les fruits à tanins. J. suisse Pharm. n° 50: 685 et n° 51: 704.
- RUDOLPH, W. 1937. Neue Erkenntnisse über das natürliche Vorkommen von Vitamin C. Inauguraldiss. Frankfurt a. M.
- SIEFFERT, L. 1945. Contribution à l'étude de l'oxydation catalytique de l'acide l. ascorbique. Thèse doct. Fac. Sc. Genève n° 1075.
- STADELMANN, R. 1949. La stabilisation de la Vitamine C dans les préparations galéniques, étude particulière du péricarpe de *Juglans regia*. Thèse doct. Fac. Sc. Genève, n° 1133.
- WOKES, F. Melville, R. ORGAN, J. G. and JAMES, E. M. 1945. Seasonal changes in true and apparent vitamin C in walnuts. Bioch. J. 39: 25.
- WYSS-CHODAT, F. et CHODAT, F. 1939. Action de la Vitamine C sur l'action enzymatique d'un monophénol. C. R. Soc., Phys. Hist. Nat. Genève 56: 53.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: [2_1-3](#)

Autor(en)/Author(s): Stadelmann R., Mirimanoff A.

Artikel/Article: [Contribution à la phytochimie du péricarpe de Juglans regia L.
1-7](#)