

# Zur Bestimmung des Vitamins C in pflanzlichem Material mittels Dichlorphenol-indophenol

Autor(en): **Müller, P.B.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **36 (1945)**

Heft 2-3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982818>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Zur Bestimmung des Vitamins C in pflanzlichem Material mittels Dichlorphenol-indophenol

Von *P. B. Müller*

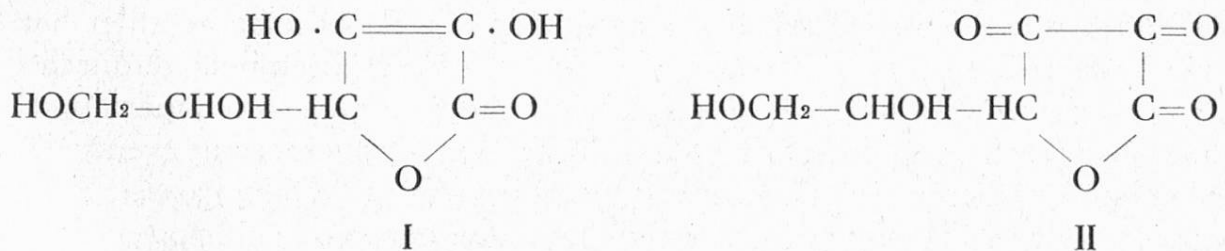
(Mitteilungen aus den wissenschaftlich-analytischen Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.)

## Allgemeiner Teil

Die chemische Bestimmung des Vitamins C erfolgt heute fast ausschliesslich mit oxydimetrischen Methoden<sup>1)2)</sup>. Am häufigsten angewendet wird die Titration mit Jod, mit Dichlorphenol-indophenol<sup>3)</sup> und das Methylenblauverfahren<sup>4)</sup>.

Die Titration mit Jod kommt wegen der zu grossen Unspezifität nur für reine Ascobinsäurelösungen in Frage. Das Methylenblauverfahren, dem von allen oxydimetrischen Methoden die grösste Spezifität zugesprochen wird, erfordert eine spezielle Beleuchtungs- und Kühleinrichtung und das Einhalten von nicht sehr leicht reproduzierbaren Versuchsbedingungen. Aus diesem Grunde wird heute das äusserst einfache Dichlorphenol-indophenol-Verfahren weitaus am meisten angewandt.

Die Bestimmung des Vitamins C mittelst Dichlorphenol-indophenol beruht auf der Fähigkeit dieses Chinonimidfarbstoffes, die reduzierte Form des Vitamins C, d. h. die l-Ascorbinsäure (I) zu Dehydroascorbinsäure (II) zu oxydieren, wobei das Dichlorphenol-indophenol selbst in die farblose Leukoverbindung übergeht.



Bei der quantitativen Ermittlung des Vitamins C in pflanzlichen Extrakten wird dieser Vorgang durch die Anwesenheit verschiedener reduzierender Substanzen — Gerbstoffe und andere phenolische Substanzen, Sulfhydrylderivate (Cystein, Glutathion) und andere Schwefelverbindungen (Sulfite, Thiosulfat), Ferrosalze — beeinträchtigt. Auch Zersetzungsprodukte, die sich beim Erhitzen und scharfen Trocknen von Kohlehydraten bilden (Redukton, Reduktinsäure, Caramelstoffe), können störend wirken. Zur Ausschaltung dieser unspezifischen reduzierenden Stoffe (im Folgenden als RS bezeichnet) sind verschiedene Verfahren in Vorschlag gebracht worden.

## 1. Die fraktionierte Titration

Sie gründet sich auf die Beobachtung, dass ein Teil der RS (vor allem Schwefelverbindungen und Ferrosalze)<sup>5)</sup> in saurer Lösung nicht oder dann wesentlich langsamer mit Dichlorphenol-indophenol in Reaktion treten als die Ascorbinsäure. Durch rasches Titrieren kann der störende Einfluss dieser Verbindungen weitgehend ausgeschaltet werden. Man kann auch eine abgemessene Menge Dichlorphenol-indophenol im Überschuss zugeben und den nicht reduzierten Farbstoff nach 10 Sekunden mit Äther extrahieren und bestimmen.

Der Endpunkt der Ascorbinsäureoxydation kann auch durch potentiometrische<sup>6)</sup>, konduktometrische, polarimetrische<sup>7)</sup> oder photometrische<sup>8)</sup> Verfolgung der Titrationskurve ermittelt werden. Eine grössere Genauigkeit gegenüber dem zuvor beschriebenen Titrationsverfahren kann dadurch aber kaum erreicht werden, da die Redoxpotentiale der verschiedenen Verbindungen zu nahe beieinander liegen. Zudem verlangen diese physiko-chemischen Verfahren besondere Apparaturen und eine besondere Messtechnik, die nicht in jedem Laboratorium zugänglich sind. Des weiteren wird durch diese direkte Titration Dehydroascorbinsäure, die im pflanzlichen Untersuchungsmaterial und den daraus hergestellten Extrakten in wechselnder Menge vorhanden sein kann, nicht miterfasst.

## 2. Die Entfernung der unspezifischen Reduktionsstoffe mit Mercuriacetat

*Van Eckelen* und *Emmerie*<sup>9)</sup> fanden, dass sich die wesentlichen RS, insbesondere Sulfhydrylverbindungen und Gerbstoffe, vor der Titration mit Mercuriacetat ausfällen lassen, während die Ascorbinsäure in Lösung bleibt. Das in der Lösung verbliebene überschüssige Hg wird mit H<sub>2</sub>S als HgS abgeschieden, wobei gleichzeitig Dehydroascorbinsäure, welche in den pflanzlichen Extrakten vorgebildet war oder sich bei der Behandlung mit Hg-Acetat gebildet hat, in Ascorbinsäure übergeht. *v. Fellenberg*<sup>10)</sup> hat dieses Verfahren noch dadurch verbessert, dass er das pflanzliche Material in saurer Lösung zerkleinert und extrahiert, wodurch vermieden wird, dass die bei der Zerkleinerung eventuell frei werdenden oxydierenden Fermente, Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oder sogar über diese Stufe hinaus oxydieren. Von den sub. 1 erörterten direkten Titrationsverfahren unterscheidet sich diese Methode dadurch, dass sie die vorgebildete Ascorbinsäure zusammen mit der Dehydroascorbinsäure, die ebenfalls biologisch wirksam ist, erfasst.

Durch das Verfahren mit Quecksilberacetat können aber immer noch nicht alle RS ausgeschaltet werden. Insbesondere werden Redukton und Reduktinsäure<sup>10)11)</sup> nicht ausgefällt. Ferner ist es möglich, dass bei der Behandlung mit Schwefelwasserstoff neben der Dehydroascorbinsäure auch andere Stoffe (z. B. Disulfide) reduziert werden, was bedingt, dass neben Ascorbinsäure und den vorgebildeten RS noch sekundäre unspezifische reduzierende Stoffe RS' entstehen, welche bei der Titration zu hohe Werte vortäuschen<sup>12)</sup>.

### 3. Die Bestimmung der unspezifischen Reduktionsstoffe nach Oxydation der Ascorbinsäure durch Ascorbinsäureoxydase

Nach dem Verfahren von *Tauber* und *Kleiner*<sup>13)</sup> wird zunächst die Gesamtheit der das Dichlorphenol-indophenol entfärbenden Substanzen, also die Summe von Ascorbinsäure A + RS bestimmt. In einer besonderen Probe wird die Ascorbinsäure durch die sogenannte Ascorbinsäureoxydase zu Dehydroascorbinsäure oxydiert, worauf sich die verbleibenden RS mit Dichlorphenol-indophenol getrennt ermitteln lassen. Die Differenz der beiden Titrationswerte ergibt die Menge der im Pflanzenextrakt vorgebildeten Ascorbinsäure A, lässt aber die allfällig vorhandene Dehydroascorbinsäure D unberücksichtigt. Das Verfahren kann zu hohe Ascorbinsäurewerte liefern, wenn die Pflanzenextrakte Redukton und Reduktinsäure enthalten, welche von der Ascorbinsäureoxydase ebenfalls oxydiert werden<sup>11)14)15)</sup>. Die Oxydation dieser Verbindungen durch Ascorbinsäureoxydase setzt aber erst ein, wenn keine unveränderte Ascorbinsäure mehr vorhanden ist und verläuft dann weniger rasch als die von Ascorbinsäure. Auf dieser Feststellung entwickelten *Diemair* und *Zerban*<sup>15)</sup> ein Verfahren zur Bestimmung der Ascorbinsäure neben Redukton und Reduktinsäure.

Solange es sich nicht um die Bestimmung des Vitamins C in gedörrtem oder durch Hitze verändertem pflanzlichem Material<sup>16)17)</sup> handelt, treten übrigens Redukton und Reduktinsäure oder Caramelsubstanzen kaum störend in Erscheinung, da diese Substanzen nach verschiedenen Feststellungen<sup>11)18)</sup> in frischem Material nicht vorhanden sind.

Ich habe mir nun die Aufgabe gestellt, unter Berücksichtigung der erörterten Erkenntnisse zu einem oxydimetrischen Verfahren zu gelangen, welches gestattet, durch Titration mittelst Dichlorphenol-indophenol in Pflanzenmaterial sowohl das in Form von Ascorbinsäure wie Dehydroascorbinsäure vorliegende Vitamin C ohne die unspezifischen reduzierenden Stoffe zu erfassen. Sie lässt sich in relativ einfacher Weise folgendermassen lösen:

#### *Analysengang*

In einem aliquoten Teil a der Extraktprobe wird durch direkte Titration mit Dichlorphenol-indophenol der gesamte Reduktionswert ermittelt, welcher sowohl die *vorgebildete Ascorbinsäure A* wie die *unspezifischen reduzierenden Stoffe RS* umfasst. In einem aliquoten Teil b wird die Ascorbinsäure durch Behandlung mit Ascorbinsäureoxydase oxydiert, worauf mit Dichlorphenol-indophenol die verbleibenden *unspezifischen reduzierenden Substanzen RS* titriert werden. a — b ergibt die *vorgebildete Ascorbinsäure A*.

Eine weitere Extraktmenge wird mit H<sub>2</sub>S behandelt, wodurch *vorgebildete Dehydroascorbinsäure D* in Ascorbinsäure übergeht. Nach dem Verjagen des H<sub>2</sub>S wird in einem Teil (c) direkt mit Dichlorphenol-indophenol titriert, wodurch *vorgebildete Ascorbinsäure A + vorgebildete Dehydroascorbinsäure D + unspezifische reduzierende Stoffe RS + RS'* erfasst werden. In dem anderen Teil

der Lösung (d) erfolgt die Titration mittelst Dichlorphenol-indophenol erst nach vorgängiger Oxydation mit Ascorbinsäureoxydase. Der sodann ermittelte Reduktionswert umfasst sowohl die vorgebildeten unspezifischen reduzierenden Stoffe RS wie diejenigen von RS', welche sich unter der Einwirkung des H<sub>2</sub>S nachträglich eventuell gebildet haben. Die Differenz c—d ergibt *die Summe der präformierten Ascorbinsäure A + präformierte Dehydroascorbinsäure D* (= Gesamt-Ascorbinsäurewert).

Um zu möglichst gleichmässigen Extraktproben zu gelangen, bediente ich mich mit Vorteil der unter der Bezeichnung «Turmix» von der Electro-Norm AG. Murten eingeführten Zerkleinerungs- und Mischmaschine. Mit Hilfe dieses Apparates ist es möglich, grössere Mengen Pflanzenmaterial in saurem Milieu und in wenigen Minuten so weitgehend zu zerkleinern, dass gleichzeitig auch eine vollständige Extraktion des Materials gewährleistet ist. Bei der Verarbeitung grösserer Pflanzenproben werden naturgemäss die verschiedenen Pflanzenteile (Wurzeln, Blätter, Stengel, Fruchtfleisch, Schale, Kerngehäuse usw.), welche unter sich einen oft recht unterschiedlichen Vitamin C-Gehalt aufweisen<sup>10</sup>), gleichmässiger erfasst. Die rasche Zerkleinerung, welche die Verarbeitung von 100—200 g innerhalb 3 Minuten gestattet, schliesst eine Zersetzung von Vitamin C praktisch aus. Indem man für stark saure Reaktion sorgt, lässt sich auch vermeiden, dass Ascorbinsäure durch die beim Zerkleinern des Pflanzenmaterials frei werdenden Oxydasen zu Dehydroascorbinsäure oxydiert wird.

Sind die erhaltenen sauren Extrakte stark gefärbt, so ist eine direkte Titration mit Dichlorphenol-indophenol nicht möglich. In solchen Fällen ermittelt man den Reduktionswert, indem man den Extrakten einen Überschuss an Dichlorphenol-indophenollösung zusetzt, das überschüssige Dichlorphenol-indophenol mit peroxydfreiem Äther\*) extrahiert und die im Äther aufgenommene Menge Dichlorphenol-indophenol colorimetriert.

## Experimenteller Teil

### Materialien

*Geräte und Apparate:* Bürette 25 ccm,  $\frac{1}{20}$  ccm geteilt; Vollpipetten: 3 à 1 ccm, 1 à 2 ccm; Stabpipette: 1 à 5 ccm ( $\frac{1}{10}$  ccm geteilt); Messzylinder: 2 à 100 ccm, 2 à 200 ccm, 1 à 500 ccm; Messkolben: 2 à 500 ccm; Erlenmeyer: 3 à 300 ccm, 2 à 100 ccm, 2 à 25 ccm; Glastrichter: 2 à 10—12 cm  $\varnothing$ , 1 à 3 cm  $\varnothing$ ; Faltenfilter: 24 cm  $\varnothing$ ; Reagensgläser: 10 genau gleiche (Jenaer); Schütteltrichter: 3 à 250 ccm; Glasrohre; Schlauch; 1 Kipp'scher Apparat; 1 doppelt durchbohrter Gummistopfen mit Einleitungsrohr mit Hahn und mit einem Glühröhrchen zum Verschliessen der 2. Bohrung, passend auf 300 ccm Erlenmeyer; 1 Reagensglasgestell; 2 Wasserbäder; 2 Dreifüsse; 1 Brenner; 2 Stative

\*) Bei Verwendung eines spezifisch schwereren Lösungsmittels als Wasser, z. B. CHCl<sub>3</sub>, könnte eine eventuelle Nachtitration noch etwas praktischer durchgeführt werden. Die Farbtiefe von Dichlorphenol-indophenol ist aber in Äther wesentlich grösser als in CHCl<sub>3</sub> (sie ist auch ca. doppelt so gross wie in Wasser), wodurch die Genauigkeit der Colorimetrierung erhöht wird.

mit 5 mittelgrossen Klammern mit Muffen; 1 *Filtertuch*; 1 *Hackmaschine*; 1 *Zurüstungsmesser*, rostfrei; 1 *Zentrifuge* (3500 U/Min.) mit Einsatzbechern (je ca. 100—150 ccm);

1 *Turmix-Maschine*: Modell C, hergestellt durch die Electro-Norm AG., Murten. Sie besteht im wesentlichen aus einem Elektromotor von 240 Watt für 8000 — 14 000 U/Min. und einem abnehmbaren Glasbecher von 1 Liter Inhalt. Mittels eines rost- und fettfreien Speziallagers, das im Boden des Becherglases eingelassen ist, kann ein messerartiges, rostfreies Einsatzstück über eine elastische Kupplung angetrieben werden. Bei der Tourenzahl der Maschine wird das Untersuchungsmaterial vollständig zertrümmert und die Membranen der Zellen zerstört. Da die Zerkleinerung stets in Gegenwart von Flüssigkeit erfolgen muss, wird das Untersuchungsmaterial dabei gleichzeitig auch extrahiert und homogenisiert.

Um das Zerkleinerungsgefäss begasen zu können, wurde der obere Rand plan geschliffen und das Gefäss mit einer aufgeschliffenen kleinen Glasglocke, die mit 2 Einführungsschliffen von 1 bzw. 4 cm  $\varnothing$  versehen ist, bedeckt. Durch den 1 cm-Schliff wird ein Begasungsrohr mit Hahn eingeführt, während der 4 cm-Schliff zur Beschickung des Gefässes dient. Er wird mittels eines Schliffstopfens, der ein kurzes, 8 mm-Ableitungsrohr trägt, verschlossen. Der ganze Deckelaufbau ist so gehalten, dass keine toten Räume entstehen.

*Chemikalien und Reagenzien*: *Eisessig*; ev. 1n-HCl; 25 %ige NaOH; 5 %ige Pb-Acetatlösung mit 0,25 % *Eisessig*; *Äther*, peroxydfrei; *HCl conc. techn.* (1 : 1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt); *Oktylalkohol*; *Calciumcarbonat* (pulv.); *Schwefeleisen*; *Lyphanreagenspapier* (pH 5—6); *Filterpapierstreifen*; CO<sub>2</sub> (aus Bombe).

*Ascorbinsäureoxydaselösung*: Zur Herstellung einer gut wirksamen Lösung werden junge Gurken ca. 1/2 cm dick, Kürbisse 1—2 cm dick abgeschält und zerschnitten, die Gurken bzw. Kürbisschalenschnitzel in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mittels *Filtertuch* von Hand oder in der Filterpresse ausgepresst und der Pressaft zentrifugiert oder filtriert. Klare Pressäfte können auch so gewonnen werden, dass man die Schnitzel gefriert (z. B. im CO<sub>2</sub>-Schnee) und dann 24 Stunden im Kühlschrank auftauen lässt. In Ermangelung frischer Gurken und Kürbisse kann durch Auftauenlassen von Birds-eye-Gefriersalatgurken während 24 Stunden im Kühlschrank und Dekantierung des ausgetriebenen Saftes eine hinreichend wirksame Ascorbinsäureoxydaselösung gewonnen werden. Es ist vorteilhaft, sich von der Wirksamkeit des Pressaftes in einem Versuch mit reiner Ascorbinsäure (nach der genauen Versuchsvorschrift, siehe weiter unten) zu überzeugen. 1 ccm Pressaft soll mindestens 1 mg Ascorbinsäure in 100 ccm wässriger Acetatpufferlösung vom pH 5,2—5,5 (aus 2,5 ccm *Eisessig* + 25 %iger NaOH) beim ruhigen Stehen in einem 250 ccm Erlenmeyer an der Luft und bei Zimmertemperatur in 15 Minuten quantitativ oxydieren.

*0,1 %ige Ascorbinsäure-Testlösung*: 10 mg Ascorbinsäure «Roche» werden in ca. 50 ccm dest. Wasser, das mit 1 ccm *Eisessig* angesäuert wurde, gelöst und ad 100 ccm verdünnt. Das Wasser ist in einer Glasapparatur zu destillieren und kurz vor Gebrauch noch einmal auszukochen. — Die Ascorbinsäure-Testlösung dient zur Titerstellung der Dichlorphenol-indophenollösung und ist jeweils kurz vor Gebrauch herzustellen.

*0,2 %ige Dichlorphenol-indophenollösung*: 0,2 g Dichlorphenol-indophenol werden mit 100 ccm siedendem Wasser gelöst, im Messkolben auf 1000 ccm aufgefüllt und filtriert.

Zur *Titerstellung* werden 50 ccm dest. Wasser mit 1 ccm *Eisessig* angesäuert und mit 0,2 ccm der 0,2 %igen Dichlorphenol-indophenollösung versetzt (Vergleichslösung). Nun werden 10 ccm der 0,1 %igen Ascorbinsäure-Testlösung mit 1 ccm *Eisessig* versetzt, mit 40 ccm dest. Wasser verdünnt und mit der Dichlorphenol-indophenollösung so lange titriert, bis die Färbung der Vergleichslösung erreicht ist. Aus dem Ergebnis dieser Titration minus 0,2 ccm errechnet sich der Faktor der Dichlorphenol-indophenollösung auf bekannte Weise.

## Beschreibung des Bestimmungsverfahrens

### 1. Zerkleinerung und Extraktion des Untersuchungsmaterials

100—200 g des in Stücke zerschnittenen Untersuchungsmaterials werden in den zuvor mit 200 ccm 30 %iger Essigsäure + 5 Tropfen Oktylalkohol beschickten und mit CO<sub>2</sub> begasten Turmixbecher eingetragen und bei Zimmertemperatur und unter Fortsetzung der Begasung während 3 Minuten zerkleinert und extrahiert. Eine eventuelle Schaumbildung wird mit 2 Tropfen Oktylalkohol zerstört, der Extrakt quantitativ in einen 500 ccm-Messkolben übergeführt, mit Wasser ad 500 ccm aufgefüllt, gemischt und filtriert oder zentrifugiert (= Lösung 1). Von diesem Filtrat bzw. Zentrifugat wird im allgemeinen eine 20 g Untersuchungsmaterial aliquote Menge Lösung nochmals mit Wasser ad 500 ccm verdünnt (= Lösung 2).

Wie in einer späteren Publikation gezeigt wird, kann die Zerkleinerung und Extraktion an Stelle der 30 %igen Essigsäure auch mit 1n-HCl ausgeführt werden. In diesem Falle wird die Lösung 2 vor dem Auffüllen auf 500 cm<sup>3</sup> noch mit 12,5 cm<sup>3</sup> Eisessig versetzt und die Salzsäure mit (einer aliquoten Menge) 25 %iger NaOH bis zur leicht kongosauren Reaktion der Lösung abgestumpft.

### 2. Die Bestimmung der vorgebildeten Ascorbinsäure und der Gesamtascorbinsäure

#### a) Bestimmung der vorgebildeten Ascorbinsäure A

*Bestimmung von A + RS:* 100 ccm der Lösung 2 werden, wie sub c beschrieben wird, direkt mit Dichlorphenol-indophenol titriert.

*Bestimmung der RS:* 100 ccm der Lösung 2 werden in einem 300 ccm-Erlenmeyer mit 25 %iger NaOH-Lösung auf pH 5,2—5,5 eingestellt (Prüfung mit Lyphanreagenspapier), mit (in der Regel) 1 ccm Ascorbinsäureoxydase-Lösung aus frischen Gurken oder Kürbissen versetzt (von Lösungen aus Gefriergurken werden in der Regel 1 ccm Pressaft pro 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> A + RS benötigt), kurz geschwenkt, 15 Minuten bei Zimmertemperatur an der Luft stehen gelassen und nach erneutem Ansäuern mit 2 ccm Eisessig, wie sub c beschrieben wird, titriert.

*Auswertung der Titrationsergebnisse:*  $(A + RS) - RS = A$  (Berechnung siehe sub 3).

#### b) Bestimmung der vorgebildeten Ascorbinsäure A + vorgebildete Dehydroascorbinsäure D («Gesamtascorbinsäure»)

*Bestimmung von A + D + RS + RS':* 220—230 ccm Lösung 2 werden mit 4 Tropfen Oktylalkohol versetzt, mit ca. 4,5 g (entspr. ca. 2 ccm) festem Calciumcarbonat auf pH 5,2—5,5 gebracht, filtriert oder zentrifugiert und 202 ccm Filtrat in einen 300 ccm-Erlenmeyer mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen und Einleitungsrohr mit Hahn gegeben. Der Erlenmeyer wird 1 Minute mit H<sub>2</sub>S ge-

spült, mit einem Glasstab oder Glühröhrchen verschlossen und, immer in Verbindung mit dem H<sub>2</sub>S-Kipp-Apparat, 1 Minute energisch geschüttelt. Dann wird der Hahn des Einleitungsrohres geschlossen, der Ansatz 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, der Schwefelwasserstoff im siedenden Wasserbad und unter energischer CO<sub>2</sub>-Spülung ausgetrieben (Prüfung mit Pb-Acetatpapier), die Lösung unter CO<sub>2</sub>-Spülung im kalten Wasserbad gekühlt und mit Wasser ad 200 ccm ergänzt. Nun wird die Lösung in 2 gleiche Teile geteilt, die eine Hälfte unter CO<sub>2</sub> ca. 15 Minuten stehen gelassen, mit 2 ccm Eisessig angesäuert und, wie sub c beschrieben wird, titriert.

Die Ansäuerung mit Eisessig hat in dieser Probe im gleichen Moment wie bei der Bestimmung der RS + RS' zu erfolgen, so dass beide Lösungen zwischen Teilung und Ansäuerung genau gleich lang stehen.

*Bestimmung von RS + RS'*: Die zweiten 100 ccm Lösung dieses Ansatzes werden, wie sub a beschrieben wurde, nocheinmal auf das vorgeschriebene pH von 5,2—5,5 geprüft (dieses soll jetzt stimmen und darf nicht mehr geändert werden), mit Ascorbinsäureoxydase versetzt, 15 Minuten stehen gelassen, mit 2 ccm Eisessig angesäuert und, wie sub c beschrieben wird, titriert.

*Auswertung der Titrationsergebnisse:*

$$(A + D + RS + RS') - (RS + RS') = A + D \text{ (Berechnung s. sub 3)}$$

$$(A + D) - A = D$$

### c) Die Titration der Ansätze

Liegen *wenig gefärbte*, vor allem nicht stark rot gefärbte *Lösungen* vor, so werden die nach den zuvor beschriebenen Verfahren erhaltenen Ansätze direkt mit der 0,2 %igen Dichlorphenol-indophenollösung titriert. Dazu wird die Versuchslösung zu zwei gleichen Teilen (ca. 50 ccm) in zwei 100 ccm-Erlenmeyer gegeben und die eine Hälfte so lange titriert, bis gegenüber der nicht titrierten Lösung bei Zugabe von 0,20 ccm Dichlorphenol-indophenollösung eine deutliche Farbvertiefung nach Rot eben noch 10 Sekunden bestehen bleibt. Dann wird die zweite Hälfte in einem Male mit 0,5 ccm weniger Lösung titriert und, wenn notwendig, wie zuvor bis zur Farbtiefe des 1. Teils, mit je 0,20 ccm nachtitriert. Hat sich inzwischen die 1. Lösung wieder entfärbt, so soll nun die 2. Lösung eine mindestens 10 Sekunden bestehende, leichte Farbvertiefung gegenüber der entfärbten Lösung aufweisen. Der verdoppelte Wert dieser 2. Titration liefert das richtige Ergebnis.

Liegen *stark rot gefärbte* oder sehr *dunkle Lösungen* vor, so wird die gesamte Menge der essigsauen Lösung eines Versuchsansatzes in einen 250 ccm-Schütteltrichter gegeben, zur Entfernung von ätherlöslichen Farbstoffen 1—2 mal mit peroxydfreiem Äther extrahiert (der letzte Ätherauszug soll farblos sein), dann mit der mutmasslichen Menge Dichlorphenol-indophenollösung in einem



Male versetzt und sofort kurz, aber energisch geschwenkt. Sofort nach dem Umschwenken wird vorsichtig mit 40 ccm peroxydfreiem Äther überschichtet, die Versuchslösung damit zwischen der 10. und 20. Sekunde nach dem Reagenszusatz ausgeschüttelt und zur Abtrennung des Äthers stehen gelassen. Dadurch wird überschüssiges, nicht reduziertes Dichlorphenol-indophenol aus der wässrigen Lösung extrahiert, so dass der zugefügte Überschuss dann im Vergleich mit einer Testverdünnungsreihe ermittelt werden kann (s. weiter unten).

Bleibt der abgetrennte Äther farblos, so wurde die Titration nicht zu Ende geführt. In diesem Falle werden mit einer Pipette 2 ccm Dichlorphenol-indophenollösung aufgenommen, die Pipette aussen abgerieben, rasch durch die Ätherschicht hindurchgestossen und dem wässrigen Versuchsanteil abermals in einem Male eine gewisse Menge Dichlorphenol-indophenollösung zugefügt. Nach dem Schwenken wird wie zuvor, zwischen der 10. und 20. Sekunde, ausgeschüttelt. Dies wird so oft wiederholt, bis sich der Äther leicht rot gefärbt abtrennt. Nach ca. 2—5 Minuten Stehen wird der wässrige Anteil bis zur Grenze der eventuellen leichten Emulsion abgelassen, zur Trennung der Emulsion einige Tropfen Äthanol zugefügt, geschwenkt, 1—2 Minuten stehen gelassen, möglichst scharf abgetrennt, der Äther in einen 50 ccm Messzylinder übergeführt, auf 50 ccm mit Äther aufgefüllt, in einem 100 ccm-Erlenmeyer gemischt, 10 ccm davon in ein Reagensglas gefüllt und der Überschuss an Dichlorphenol-indophenol durch Vergleich mit Testlösungen ermittelt.

Zur Herstellung der *Testverdünnungsreihe* werden 2 ccm Dichlorphenol-indophenollösung zu ca. 10 ccm leicht essigsauerm Wasser gegeben, mit 40 ccm peroxydfreiem Äther extrahiert und der Ätherextrakt ad 50 ccm ergänzt (= Lösung a). Davon werden folgende Testlösungen in gleichartigen Reagensgläsern hergestellt:

		Dichlorphenol- Indophenol	Äther
10 ccm a	entsprechend	= 2 ccm	/ 50 ccm
8 ccm a ad 10 ccm Äther	»	= 1,6 ccm	/ 50 ccm
6 ccm a ad 10 ccm »	»	= 1,2 ccm	/ 50 ccm
4 ccm a ad 10 ccm »	»	= 0,8 ccm	/ 50 ccm
2 ccm a ad 10 ccm »	»	= 0,4 ccm	/ 50 ccm

Diese 5 Reagensgläser werden am zweckmässigsten vor einem durchscheinenden, weissen Schreibmaschinenpapier so in ein Reagensglasgestell eingesetzt, dass das die Untersuchungslösung enthaltende Reagensglas zum Vergleich jeweils zwischen zwei Testgläser gehalten werden kann. Die einfache Vorrichtung wird am besten von hinten beleuchtet (Tageslicht vom Fenster her oder künstliches Licht). Da der zwischen 2 Testwerten liegende Mittelwert noch sicher geschätzt werden kann, erfolgt auch die Auswertung durch dieses Vergleichsverfahren auf 0,2 ccm der 0,2 %igen Dichlorphenol-indophenollösung genau.

### 3. Berechnung der Versuche und Genauigkeit der Bestimmungen

*Berechnung:* Einwage (bei der 2. Verdünnung) = 20 g / 500 ccm Lösung. Davon werden pro Bestimmung 100 ccm, entsprechend 4 g Einwage genommen. Wenn der Verbrauch an 0,2 %oiger Dichlorphenol-indophenollösung vom Faktor = 1 (also 10 ccm Reagens = 1 mg Ascorbinsäure) X ccm beträgt, so errechnet sich das Ergebnis in mg<sup>0</sup>/<sub>o</sub> wie folgt:

$$\frac{X}{10 \cdot 4} \cdot 100 = \frac{X}{4} \cdot 10 = \text{mg}^0/\text{o Ascorbinsäure.}$$

*Beispiel\*):*

Einwage zur Zerkleinerung und Extraktion (= Lösg. 1) = 100 g Unters'material  
 Einwage an Lösg. 1 zur 2. Verdünnung = 100 ccm entspr. = 20 g Unters'material

Verbrauch an 0,2 %oiger Dichlorphenol-indophenollösung vom Faktor = 1:

Vorgebildete Ascorbinsäure A + Verunreinigungen RS	= 4,8 ccm
Verunreinigungen RS dieser Lösung	= 0,8 ccm
Vorgebildete Ascorbinsäure A + vorgebildete Dehydroascorbinsäure D + Verunreinigungen RS + RS'	= 9,2 ccm
Verunreinigungen RS + RS' dieser Lösung	= 1,2 ccm

*Vorgebildete Ascorbinsäure A:*

$$\begin{aligned} A + RS &= 4,8 \text{ ccm} \\ RS &= \underline{0,8 \text{ ccm}} \\ A &= 4,0 \text{ ccm} = (4,0 : 4) \cdot 10 = \underline{10 \text{ mg}^0/\text{o}} \end{aligned}$$

*Vorgebildete Ascorbinsäure A + vorgebildete Dehydroascorbinsäure D*  
 = «Gesamtascorbinsäure»:

$$\begin{aligned} A + D + RS + RS' &= 9,2 \text{ ccm} \\ RS + RS' &= \underline{1,2 \text{ ccm}} \\ A + D &= 8,0 \text{ ccm} = (8,0 : 4) \cdot 10 = \underline{20 \text{ mg}^0/\text{o}} \end{aligned}$$

*Vorgebildete Dehydroascorbinsäure D:*

$$D = (A + D) - A = 20 \text{ mg}^0/\text{o} - 10 \text{ mg}^0/\text{o} = \underline{10 \text{ mg}^0/\text{o}}$$

\*) Die Werte von RS und RS' bedeuten die durch diese Verunreinigungen vorge-täuschte Ascorbinsäure.

Durch die Berechnung der Versuche als Differenz von zwei Titrationsergebnissen: z. B.  $A = (A + RS) - RS$  fällt der durch die Übertitration im Titrationsendpunkt bedingte Fehler weg. Wenn aber der effektive Wert von RS oder RS + RS' ermittelt werden sollte, ist die zur Übertitration benötigte Menge Dichlorphenol-indophenol, wie bei der Titerstellung dieser Lösung beschrieben wurde, zu berücksichtigen und vom experimentell gefundenen Wert RS bzw. RS + RS' abzuziehen. Zur Übertitration von 100 ccm Lösung werden im allgemeinen 0,4—0,6 ccm der 0,2 %oigen Dichlorphenol-indophenollösung benötigt.

### *Genauigkeit der Bestimmungen:*

Aus der in der Vorschrift angegebenen Genauigkeit der Titrationen auf 0,2 ccm der 0,2 %igen Dichlorphenol-indophenollösung errechnet sich die Genauigkeit bzw. Streuung der Einzelbestimmung auf abs.  $\pm 20 \gamma$  Ascorbinsäure. Da die Einzelbestimmung nach der Vorschrift mit 4 g Untersuchungsmaterial gemacht wird, ist die Genauigkeit bzw. Streuung der erzielten Untersuchungsergebnisse abs.  $\pm 0,5 \text{ mg}^0/\text{o}$ . Die untere praktische Erfassbarkeitsgrenze der Methode liegt daher für die vorgeschriebenen Einwägen bei einem Gehalt von 1 mg Vitamin C in 100 g Untersuchungsmaterial.

### *4. Diskussion und Prüfung der Methode*

Im Folgenden werden die wichtigsten Kontrollergebnisse kurz beschrieben und zum Schluss noch einige Test- und Vergleichsversuche zur Überprüfung des gesamten Bestimmungsverfahrens angeführt.

Nach den vorgenommenen *Kontrollversuchen* verlaufen die *Zerkleinerung* im Turmix und die *Reduktion der Dehydroascorbinsäure mit H<sub>2</sub>S* ohne Verlust. In H<sub>2</sub>S-behandelten Extrakten findet aber bisweilen eine schleppende Nachentfärbung der fertig titrierten Lösungen statt. Es ist daher wichtig, dass alle Ansätze (mit und ohne Ascorbinsäureoxydase) auf dieselbe Farbvertiefung hin titriert werden und dass die vorgeschriebene Dauer von 10 Sekunden, während der die Farbvertiefung eben noch erkennbar sein muss, eingehalten wird.

Die *Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure mit Ascorbinsäureoxydase* wird stark von der Art und der Menge des vorhandenen Puffergemisches bzw. der zur Extraktion verwendeten Säure beeinflusst und ist weitgehend pH-abhängig. Am geeignetsten erwies sich Acetatpuffer, von dem eine Menge entsprechend 4 ccm Eisessig pro 100 ccm Lösung die Oxydase bereits merkbar hemmt. Immerhin werden bei dieser Pufferkonzentration und bei pH 5,5 5 mg Ascorbinsäure in 100 ccm Lösung (entsprechend 125 mg<sup>0</sup>/o Ascorbinsäure einer nach der Vorschrift gemachten Einwage) von 4 ccm Presssaft aus Gefriergurken («Birds Eye») in 15 Minuten zu 90 % und in 30 Minuten quantitativ oxydiert. Dieselbe Menge Ascorbinsäure wurde mit der halben Puffermenge (entspr. der Versuchsvorschrift) bereits in 15 Minuten quantitativ oxydiert. Hingegen wird in Gegenwart von Trichloressigsäure (z. B. bei der Extraktion mit Trichloressigsäure an Stelle von Essigsäure) unter sonst denselben Bedingungen die doppelte Menge Presssaft benötigt. Das Wirkungsoptimum der Reaktion liegt nach den früher erwähnten Literaturangaben bei ca. pH 6. Bei diesem pH treten aber in Ascorbinsäure-Testlösungen beim Stehen an der Luft auch schon ohne Oxydase gewisse Ascorbinsäureverluste ein, besonders in Gegenwart von Metallspuren. Dasselbe muss auch von leicht oxydierbaren Verunreinigungen angenommen werden. Zur Erhöhung der Spezifität des Verfahrens führe ich daher die Oxydation mit Ascorbinsäureoxydase nicht beim pH-Optimum, sondern bei etwas saurer Reaktion, bei pH 5,2—5,5, durch. Bei diesem pH ist die Ascorbinsäure bereits schon merklich haltbarer, ohne dass die Ascorbinase (z. B. aus Gurken- und Gefriergurken-Presssaft) schon stark gehemmt wird. Für die Oxydation nach der Vorschrift werden für je ca. 25 mg<sup>0</sup>/o Ascorbinsäure in der Regel 1—2 ccm Presssaft von Gefriergurken (Birds Eye) benötigt. Presssaft von frischen Gurken ist wesentlich (ca. 30 mal) aktiver. Aus diesem Grunde genügt 1 ccm Presssaft von Frischgurken selbst in extremen Fällen. In saurerem Milieu — pH 3 und saurer — ist die Ascorbinsäure beim Stehen an der Luft auch in Gegenwart von kleinen Mengen Metallsalzen deutlich haltbarer.

In Tabelle 1—4 werden einige *Versuche zur Kontrolle des gesamten Bestimmungsverfahrens* angeführt. *Tabelle 1* enthält Testversuche mit reinen Ascorbinsäurelösungen und mit 2 verschiedenen Untersuchungsmaterialien, denen bekannte Mengen an Ascorbinsäure zugesetzt wurden. Als Untersuchungsmaterial wurde ein Cu-haltiges Material: gegrünter Spinat, und ein Stärke- und Oxydasen-reiches Material: die Kartoffel, gewählt. *Tabellen 2—4* enthalten einige Serienuntersuchungen mit 2 oxydasenreichen Frisch-

Tabelle 1

Vers. Nr.	Einwage pro 500 ccm (=Lsg. 1)	verw. f. 20 gr. Einw./500ccm (=Lsg. 2) ccm	Ascorbinsäure-zus. mg <sup>0/0</sup>	Ascorbinsäure gefunden			
				Präform. Ascorbinsäure		Total-Ascorbinsäure	
				*) RS mg <sup>0/0</sup>	*) A-RS mg <sup>0/0</sup>	*) RS+ mg <sup>0/0</sup>	*) TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>
Prüfung mit Ascorbinsäure-Testlösungen							
	Einw. an Ascorbs. mg	(Ber. wie Versuche mit 100 gr. Einw.)					
1	5	100	5	0	5	0	5
2	20	100	20	0	20	0	19,5
3	50	100	50	0	50	0	50
Prüfung mit gegrüntem Büchsenpinat							
	Einw. an Spinat g						
4	100	100	—	0	Geh. = 4,3	0	Geh. = 4,3
5	100	100	5	0	9,3	0	9,5
6	100	100	20	0	24,0	0	24,3
7	100	100	50	0	53,0	0	53,0
Prüfung mit Kartoffeln							
	Einw. an Kartoffeln g						
8	100	100	—	0	Geh. = 10,0	0	Geh. = 10,0
	100	100	5	0	15,5	0	15,3
9	100	100	—	0	Geh. = 10	0	Geh. = 10,3
	100	100	20	0	29,5	0	29,3
10	100	100	—	0	Geh. = 9,5	0	Geh. = 11,5
	100	100	50	0	60,3	0	63,0

\*) Zeichenerklärung:

A = vorgebildete Ascorbinsäure.

RS = unspezifische Reduktionsstoffe der Lösungen von A.

TA (Totalascorbinsäure) = A + D + RS + RS' vorgebildete Ascorbinsäure + vorgebildete Dehydroascorbinsäure + unspezifische Reduktionsstoffe.

RS+ = RS + RS' = vorgebildete, unspezifische Reduktionsstoffe der Lösungen von TA + solche, die bei der H<sub>2</sub>S-Behandlung sekundär gebildet worden sind.

Sämtliche Werte von RS und RS+ stellen die effektiven Gehalte an unspezifischen Reduktionsstoffen dar (siehe Anmerkung zum Berechnungsbeispiel im Abschnitt 3).

**Tabelle 2**  
*Zerkleinerung und Extraktion im Turmix*

Methode Fellenberg

1) <i>Aepfel Boscop</i>	Bestimmung nach Müller						Bestimmung nach Fellenberg						(andere Einwagen als Turmix-Versuche)		
	Einwage pro 500 ccm (=Lsg.1) g	verw. f. 20 g Einw./ 500 ccm (=Lsg.2) ccm	RS mg <sup>0/0</sup>	A-RS mg <sup>0/0</sup>	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>	Einwage pro 500 ccm g	verw. f. 20 g Einw./ 200 ccm ccm	RS mg <sup>0/0</sup>	A-RS mg <sup>0/0</sup>	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>	Einw. pro 200 ccm g	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>
	1. Bestimmung	102,7	97	1	8,0	1	12,0							20	1,5
2. »	140,2	71	1	9,0	1	11							20	1,5	10,5
3. »	160,4	62	1	8,0	1	10,5							20	1,5	13,5
4. »	151	66	0,5	7,0	1	13,5							20	1,0	11,5
5. »	116,7	85	1	10,5	1	15,5							20	1,0	14
6. »	172	58	1	13,0	1	15,5							20	0,5	16,0
7. »	160	62	1	6,0	1	8,0							20	0,5	7,5
8. »	160	62	1	6,0	1	8,0							20	0,5	10,5
9. »	160	62	1	8,0	1	9,0							20	0,5	5,0
10. »	160	62	1	6,0	1	8,5							20	0,5	6,0
11. » <sup>2)</sup>	165,9	60	1	8,0	1	10	165,9	60	1	8,0	0,5	10	—	—	—
12. » <sup>2)</sup>	160	62	1	5,5	1	9	160	62	0,5	5,0	0,5	8	—	—	—
13. » <sup>2)</sup>	160	62	1	12,0	1	14	160	62	0,5	11,0	0,5	14	—	—	—
14. » <sup>3)</sup>	20	—	1	13,0	1	15,5	—	—	—	—	—	—	20	1,0	12,5
15. » <sup>3)</sup>	20	—	1	13,5	1	15,5	—	—	—	—	—	—	20	0,5	9
16. » <sup>3)</sup>	20	—	1	10,0	1	13	—	—	—	—	—	—	20	0,5	7
	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:					12,0	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:					10,5			

1) Siehe Zeichenerklärung Tabelle 1.

2) Die Bestimmung erfolgte nach beiden Methoden in derselben Einwage.

3) Untersuchungsmaterial in Viertel geteilt und zur Einwage für beide Methoden je 20 g in Form von je einer Scheibe pro Schnitt verwendet.

Anmerkung: Alle Ergebnisse wurden auf 0,5 mg<sup>0/0</sup> auf- bzw. abgerundet.

**Tabelle 3**  
**Zerkleinerung und Extraktion im Turmix**

Methode Fellenberg

Kabis <sup>1)</sup> (Weisskohl)	Bestimmung nach Müller						Bestimmung nach Fellenberg						(andere Einwägen als Turmix-Versuche)			
	Einwage pro 500 ccm (=Lsg.1) g	verw. f. 20 g Einw./ 500 ccm (=Lsg.2) ccm	RS mg <sup>0/0</sup>	A-RS mg <sup>0/0</sup>	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>	Einwage pro 500 ccm g	verw. f. 20 g Einw./ 200 ccm ccm	RS mg <sup>0/0</sup>	A-RS mg <sup>0/0</sup>	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>	Einw. pro 200 ccm g	RS+ mg <sup>0/0</sup>	TA-RS+ mg <sup>0/0</sup>	
1. Bestimmung	143,0	69	0,5	50	0,5	52,5							20	0,5	57,5	
2. »	140	71	0,5	48,5	0,5	49,5							20	0,5	47,5	
3. »	160	62	0,5	52,5	0,5	55							20	1	54	
4. »	120	83	0,5	50,5	0,5	51							20	0,5	50,5	
5. »	120	83	0,5	27,5	0,5	29							20	0,5	33,5	
6. »	120	83	0,5	31	0,5	32,5							20	0	40,0	
7. »	120	83	0,5	30,5	0,5	31							20	0	37,5	
8. »	120	83	0,5	31	0,5	32							20	0	33,5	
9. »	120	83	0,5	36	0,5	36,5							20	0	36,0	
10. »	120	83	0,5	35,5	0,5	37							20	0	36,5	
11. » <sup>2)</sup>	120	83	0,5	33,5	0,5	34,5	120	83	0,5	30,5	0	34,5	—	—	—	
12. » <sup>2)</sup>	120	83	0,5	35,5	0,5	36	120	83	0,5	32,5	0,5	39,5	—	—	—	
13. » <sup>2)</sup>	120	83	0,5	34,5	0,5	35	120	83	0	31,0	0,5	35	—	—	—	
14. » <sup>3)</sup>	20	—	0,5	36,5	0,5	38,5	—	—	—	—	—	—	20	0,5	33,5	
15. » <sup>3)</sup>	20	—	0,5	37	0,5	38,5	—	—	—	—	—	—	20	0	36,5	
16. » <sup>3)</sup>	20	—	0,5	34,5	0,5	35,5	—	—	—	—	—	—	20	0,5	35,0	
	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:					39,0	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:									40,0

201

<sup>1)</sup> <sup>2)</sup> <sup>3)</sup> und Anmerkung siehe Tabelle 2.

**Tabelle 4**  
**Zerkleinerung und Extraktion im Turmix**

Methode Fellenberg

Kartoffeln Böhms	Bestimmung nach Müller						Bestimmung nach Fellenberg						(andere Einwägen als Turmix-Versuche)		
	Einwage pro 500 ccm (=Lsg.1) g	verw. f. 20 g Einw./ 500 ccm (=Lsg.2) ccm	RS	A-RS	RS+	TA-RS+	Einwage pro 500 ccm g	verw. f. 20 g Einw./ 200 ccm ccm	RS	A-RS	RS+	TA-RS+	Einw. pro 200 ccm g	RS+	TA-RS+
			mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>			mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>		mg <sup>0/0</sup>	mg <sup>0/0</sup>
1. Bestimmung	138,7	72	1	14	1	17,0							20	0	9,5
2. »	124,6	80	0,5	9,5	0,5	10							20	0	9,5
3. »	132,4	75	1	10,5	0,5	11							20	0	10,5
4. »	112,6	88	1	12	0,5	12,5							20	0	9,0
5. »	109,9	91	1	12	0,5	13							20	0	10,5
6. »	106,8	93	1	12,0	0,5	12							20	0	9,5
7. »	131,9	75	1	13	0,5	13,5							20	0	12,0
8. »	118,4	84	1	10,5	0,5	11							20	1	11,5
9. »	138,0	72	1	11,0	0,5	11,5							20	0	9,0
10. »	124,6	80	1	10,0	0,5	10,5							20	0	9,5
11. » <sup>2)</sup>	142,7	70	1	13	0,5	13,5	142,7	70	0,5	12,5	0,5	13,5	—	—	—
12. » <sup>2)</sup>	105,5	94	1	12	0,5	13,0	105,5	94	0	12,0	0	13,0	—	—	—
13. » <sup>2)</sup>	121,2	82	1	13	1	14,0	121,2	82	0	15,0	0	15,0	—	—	—
14. » <sup>3)</sup>	20	—	1	8	1	8,5	—	—	—	—	—	—	20	0	8,5
15. » <sup>3)</sup>	20	—	1	10	1	11,5	—	—	—	—	—	—	20	1	11,0
16. » <sup>3)</sup>	20	—	1	7,5	1	9,0	—	—	—	—	—	—	20	0	8,5
	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:					12,5	Durchschnitt aus 16 Bestimmungen:					10,5			

1) 2) 3) und Anmerkung siehe Tabelle 2.

produkten: Äpfel und Kartoffeln, und eine Serienuntersuchung mit einem möglichst grossen Untersuchungsprojekt: Kabis (Weisskohl). Hier werden die Untersuchungsergebnisse unserer Methode mit denen verglichen, die mit einem Hg-Acetat-Fällungsverfahren erhalten werden (in der Ausführung von *v. Fellenberg*). Die Hg-Acetat-Fällungsverfahren arbeiten ohne Ascorbinsäureoxydase. Um die Ergebnisse sicherer mit den meinen vergleichen zu können, habe ich aber jeweils den Reduktionswert der noch verbliebenen Verunreinigungen bestimmt und von den Auswertungen der Gesamtascorbinsäurebestimmung in Abzug gebracht. Die Ergebnisse der nach der Vorschrift ausgeführten und berechneten Hg-Acetatversuche würden also um den Reduktionswert der Verunreinigungen höher ausfallen.

### 5. Diskussion der Testversuche und der vergleichenden Untersuchungen

Die im Abschnitt 3 errechnete Genauigkeit des Bestimmungsverfahrens wird durch die beschriebenen *Testversuche* weitgehend bestätigt. Danach arbeitet das Verfahren praktisch ohne Verlust mit einer Genauigkeit bzw. Streuung der Versuchsergebnisse von abs.  $\pm 0,5 \text{ mg}^0/\text{o}$ .

Wie die *vergleichenden Untersuchungen* ergeben (und aus der Literatur bekannt ist), können die Vitamin C-Gehalte von verschiedenen Proben eines bestimmten Artikels erhebliche Schwankungen aufweisen. Aus diesem Grund hat es gar keinen Wert, die in  $\text{mg}^0/\text{o}$  ausgedrückten Untersuchungsergebnisse (wie es häufig geschieht) auf 1 oder sogar 2 Stellen nach dem Komma anzugeben. Schon die Titrationsfehler übersteigen bei allen geläufigen Untersuchungsmethoden diese Genauigkeit um ein Vielfaches. Ein Bestimmungsverfahren, das gestattet, den Vitamin C-Gehalt in pflanzlichen Materialien auf 1—2  $\text{mg}^0/\text{o}$  genau anzugeben, ist daher vollständig genügend. Wegen diesen natürlichen Schwankungen des Vitamin C-Gehaltes von Probe zu Probe darf auch eine grössere Übereinstimmung der mit verschiedenen Methoden erzielten Durchschnittswerte nicht erwartet werden. Die nach dem beschriebenen Verfahren und demjenigen von *v. Fellenberg* erhaltenen Durchschnittswerte weisen daher eine sehr gute Übereinstimmung auf.

Aus den Kolonnen von RS\*) bzw. RS + RS'\*) der Tabelle 4 geht hervor, dass die unspezifischen Reduktionsstoffe nach der H<sub>2</sub>S-Behandlung bisweilen auch abnehmen. Es ist möglich, dass gewisse RS durch die Hitzebehandlung beim Austreiben des Schwefelwasserstoffes Veränderungen erleiden. Da die hier angeführten Abnahmen aber eben noch innerhalb der Streuung der Methode liegen, können sie nicht mit Sicherheit gedeutet werden.

Ebenso kann erst dann mit Sicherheit auf vorgebildete Dehydroascorbinsäure geschlossen werden, wenn die Menge, wie bei den Äpfeln, 1—2  $\text{mg}^0/\text{o}$  übersteigt.

Höhere Werte von RS und RS + RS' werden z. B. bei Heidelbeeren (bis 5  $\text{mg}^0/\text{o}$ ) und bei gewissen Konfitüren (bis 4  $\text{mg}^0/\text{o}$ ) erhalten. Hier findet man häufig auch deutliche Unterschiede zwischen den Werten von RS und RS + RS'.

---

\*) Betreffs der Bedeutung dieser Werte siehe die Anmerkung zum «Beispiel» im Abschnitt 3.



## Zusammenfassung

Die wichtigsten oxydimetrischen Verfahren zur Bestimmung des Vitamins C werden im allgemeinen Teil kurz erwähnt. Am meisten angewandt wird heute die Titration mit Dichlorphenol-indophenol. Dieses Verfahren wird aber durch zahlreiche Verunreinigungen beeinflusst. Die verschiedenen Wege zur Ausschaltung der störenden Verunreinigungen, wie z. B. die fraktionierte Titration, die Ausfällung von unspezifischen Verbindungen mit Mercuriacetat, bzw. ihre Bestimmung nach der Oxydation der Ascorbinsäure mit Ascorbinsäureoxydase werden im allgemeinen Teil besprochen.

Das speziell für die Bestimmung des Vitamins C in pflanzlichem Material ausgearbeitete Verfahren mit Ascorbinsäureoxydase wird im experimentellen Teil genau beschrieben. Der auf diesem Verfahren aufgebaute Analysengang gestattet:

1. die Verwendung von grossen Durchschnittsmustern durch Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials im Turmix-Apparat,

2. die weitgehende Ausschaltung der Oxydationsfermente bei der Aufarbeitung von frischem Untersuchungsmaterial durch Zerkleinerung und Extraktion in stark saurer Lösung,

3. die getrennte Bestimmung der präformierten Ascorbinsäure und der präformierten Dehydroascorbinsäure und die Bestimmung der jeweils miterfassten Verunreinigungen nach Oxydation der Ascorbinsäure mit Ascorbinsäureoxydase,

4. das Arbeiten auch in stark gefärbten Lösungen durch Extraktion des im Überschuss zugegebenen Reagenzes und Bestimmung des Überschusses auf kolorimetrischem Wege.

Die Genauigkeit der Methode liegt bei abs.  $\pm 0,5$  mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ascorbinsäure.

Die Methode wird kritisch besprochen und durch zahlreiche Testversuche erhärtet. Zur weiteren Kontrolle werden verschiedene Parallelbestimmungen mit dem Hg-Acetatverfahren angeführt und die einzelnen Versuchsergebnisse diskutiert.

## Résumé

Les plus importants procédés oxydimétriques pour la détermination de la vitamine C sont cités dans la partie générale. Aujourd'hui on a le plus souvent recours à la titration au dichlorphénol-indophénol. Toutefois ce procédé ne va pas sans être influencé par de nombreuses souillures. Les différentes possibilités d'éliminer ces souillures comme p. ex. la titration fractionnée, la précipitation des combinaisons inspécifiques avec de l'acétate mercurique resp. leur détermination après oxydation de l'acide ascorbique par l'oxydase d'acide ascorbique, sont traitées dans la partie générale.

Le procédé spécialement élaboré pour la détermination de la vitamine C dans du matériel d'origine végétale à l'aide d'oxydase d'acide ascorbique est détaillé dans la partie expérimentale. L'analyse pratique se basant sur ce procédé permet:

1<sup>o</sup> d'employer des échantillons-moyens grands en dépeçant le matériel à contrôler dans l'appareil Turmix,

2<sup>o</sup> d'éliminer largement les ferments d'oxydation lors du traitement de matériel frais en le dépeçant et en l'extrayant dans de la solution acide,

3<sup>o</sup> de déterminer séparément l'acide ascorbique préformé et l'acide déshydro-ascorbique préformé et de déterminer les souillures saisies coïncidemment après l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxydase d'acide ascorbique,

4<sup>o</sup> de travailler même dans de solutions fort colorées en extrayant le réactif additionné en surplus, puis en déterminant l'excédent par voie colorimétrique.

L'exactitude de la méthode est près de  $\pm 0,5$  mg<sup>0/0</sup> abs. d'acide ascorbique.

La méthode est discutée en critique ainsi qu'étayée par de nombreux tests. En plus comme contrôle, différentes déterminations parallèles avec le procédé à l'acétate mercurique sont rapportées dont les résultats viennent en discussion.

### Literatur

- 1) G. Lunde: Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln, Verlag Springer, Berlin, 1943
- 2) Fritz Gstirner: Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden, Ferd. Enke-Verlag, Stuttgart, 1940
- 3) J. Tillmans: Z. Unters. Lebensmittel, **54**, 33 (1927)
- 4) Martini und Bonsignore: Biochem. J. **273**, 170 (1934)
- 5) M. Ott: Vorratspflege und Lebensmittelforschung 1939, 10
- 6) L. J. Harris, L. W. Mapson and Y. L. Wang: Biochem. J. **36**, 183 (1942)  
E. Becker und J. di Gleria: Ztschr. f. Vitaminforschung **6**, 86 (1937)
- 7) Th. Osterud: Tekn. Ukebl. **86**, 216 (1939) C 1939 II 1313
- 8) F. Bukatsch: Ztschr. f. physiol. Chem. **262**, 20 (1939/40)  
K. A. Evelyn, H. T. Malloy and C. Rosen: J. Biol. Chem. **126**, 645 (1938)  
E. Uonesch und A. L. Remezzano: Rev. farm. (Buenos Aires) **82**, 431 (1940)
- 9) Biochem. J. **28**, 1151 (1934); **30**, 25 (1936)  
Z. f. Vitaminforschung **6**, 150 (1937); **7**, 254 (1938)
- 10) Diese Mitt. **32**, 135 (1941)
- 11) C. Krijt: Arch. neerl. Physiol. Homme et Animaux, **26**, 457 (1942); C 1943 I 2105
- 12) E. Günther: Vitamine und Hormone **5**, 55 (1944)
- 13) J. Biol. Chem. **110**, 559 (1935)
- 14) A. Kuhn und H. Gerhard: Vitamine und Hormone **3**, 264 (1942)
- 15) Diemair und Zerban: Biochem. Z. **316**, 23 (1944)
- 16) C. Enders: Biochem. Z. **314**, 389 (1943)
- 17) A. Scheunert und J. Reschke: Die Ernährung **7**, 115 (1942)
- 18) L. F. Levy: Nature **152**, 693 (1943)