

Bestimmung der Ascorbinsäure in Lebensmitteln und biologischem Material

Autor(en): **Moor, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **47 (1956)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983949>

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.

Bestimmung der Ascorbinsäure in Lebensmitteln und biologischem Material

Von *H. Moor*

(Aus den Laboratorien der Vitamin-Abteilung der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel)

Zur Bestimmung der Ascorbinsäure sind in der Literatur eine Reihe von Methoden beschrieben worden, welche sich ganz allgemein in zwei verschiedene Gruppen aufteilen lassen. Die eine Gruppe umfasst die oxydimetrischen Titrations, wozu in erster Linie die häufig angewandte Titration mit Dichlorophenol-Indophenol gehört. Ebenfalls sind hier die Titrations mit Jod²⁾ und Methylenblau³⁾ zu erwähnen. Diese Methoden, welche sich schnell und einfach durchführen lassen, besitzen allgemein den Nachteil, dass sie wenig spezifisch sind. Dieser Mangel an Spezifität macht sich ganz besonders bei Ascorbinsäurebestimmungen in Lebensmitteln bemerkbar. Dieses Untersuchungsmaterial enthält neben der Ascorbinsäure meistens noch andere reduzierende Verbindungen, welche bei der Titration zum Teil miterfasst werden und damit zu hohe Ascorbinsäurewerte vortäuschen.

Zu der zweiten Gruppe gehören die kolorimetrischen Bestimmungen von Ascorbinsäure. Hier ist einmal die von *Roe* und *Kuether*⁴⁾ ausgearbeitete Methode zu erwähnen, bei welcher die Ascorbinsäure zu ihrer Dehydroform oxydiert und anschliessend mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin kondensiert wird. Auch dieses Verfahren vermag, obgleich es spezifischer ist als die oben angeführten Titrations, im allgemeinen nicht restlos zu befriedigen, weil einerseits biologisch unwirksame Oxydationsprodukte der Ascorbinsäure miterfasst werden können, und weil andererseits das 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit andern Begleitstoffen gefärbte Reaktionsprodukte bilden kann.

Eine wesentliche Verbesserung brachte die von *Schmall*, *Pifer* und *Wollish*⁵⁾ entwickelte Methode, welche ebenfalls bei den kolorimetrischen Bestimmungen eingereicht werden muss. Bei dieser Methode wird die Ascorbinsäure mit diazotiertem 4-Methoxy-2-Nitroanilin gekuppelt. In alkalischer Lösung entsteht dabei ein blauer Farbstoff, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt wird. In der Arbeit von *Schmall*, *Pifer*, *Wollish*, *Duschinsky* und *Gainer*⁶⁾ wird der Mechanismus dieser Farbreaktion eingehend diskutiert. Demnach bildet sich bei der Reaktion von Ascorbinsäure mit diazotiertem 4-Methoxy-2-Nitroanilin das 4-Methoxy-2-Nitro-Phenylhydrazid der Oxalsäure, welches in alkalischer Lösung ein blau gefärbtes Salz liefert.

Die Spezifität der Methode von *Schmall* et al. ist wesentlich grösser als diejenige der übrigen bekannten Ascorbinsäurebestimmungsmethoden. Zur Bestimmung der Ascorbinsäure in Lebensmitteln hingegen ist, wie wir feststellen mussten, die Empfindlichkeit des Verfahrens nicht in allen Fällen ausreichend.

Lösungen bzw. Extrakte von festem Untersuchungsmaterial mit einer Ascorbinsäurekonzentration unterhalb 100 γ/cm^3 lassen sich auf diesem Wege nicht mehr bestimmen. Da aber in Lebensmitteln und in biologischem Material der Ascorbinsäuregehalt vielfach unter diesem Wert liegt, ist der Anwendungsbereich dieser Methode beschränkt.

Auf Grund dieser Feststellung haben wir versucht, die Methode, welche uns noch entwicklungsfähig schien, weiter zu verbessern und insbesondere empfindlicher zu gestalten. Wir haben dabei das Verfahren weitgehend abgeändert, wobei in erster Linie die Salzbildung nicht mehr direkt in einer wässrigen Lösung unter Zusatz von Natronlauge und Alkohol erfolgt, sondern indem das Reaktionsprodukt der Ascorbinsäure mit dem Diazoniumsalz aus der wässrigen Lösung mit Isobutanol extrahiert wird. Hierauf erfolgt die Bildung und Extraktion des rotblauen Salzes durch Ausschütteln der Isobutanollösung mit 2 %iger wässriger Natronlauge.

Im Gegensatz zu der Methode von *Schmall* et al. verwenden wir an Stelle von 4-Methoxy-2-Nitroanilin diazotiertes 2-Nitroanilin als Reaktionskomponente. Im weiteren haben wir auch die Bestimmung des Blindwertes verfeinert, indem in einer zweiten Probe die anwesende Ascorbinsäure mit Dichlorphenol-Indophenol oxydiert wird.

Durch alle diese Massnahmen ist es uns gelungen, die Empfindlichkeit sowie die Spezifität der Methode wesentlich zu erhöhen, wie die folgende Tabelle zeigt:

| Analysenmaterial*) | Ascorbinsäure-zusatz | Bestimmung nach: | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|--|-------------|
| | | neuer Methode | | Methode von <i>Schmall</i> und al. | | Titration mit Dichlorphenol-Indophenol | |
| | | | Fehler % | | Fehler % | | Fehler % |
| Gerösteter Bohnenkaffee | 30 mg/10 g | 32 | +6,6 | 38,5 | +28 | 47,3 | +58 |
| Magermilchpulver geröstet | 7,5 mg/100 g | 8,1 | +8 | nicht mehr gut erfassbar ca. 10—15 | +33 | 28 | +270 |
| Rotwein | 20 mg/Liter | 22 | +10 | nicht erfassbar; Farbe stört | | 24 | +20 |
| Tonikum (Poly-Vitamin-Präparat) | 380 mg ^{0/0} | 375 | -1,3 | 390 | +2,6 | 428 | +12 |
| Mehl | 10 mg/kg | 8,9 | -11 | nicht erfassbar | | nicht erfassbar | |

*) Bei dem untersuchten Analysenmaterial handelt es sich durchwegs um Lebensmittel, bei welchen eventuell vorhandene natürliche Ascorbinsäure durch die Vorbehandlung (Rösten) bereits zerstört worden war, oder um Material, welches kein natürliches Vitamin C enthält.

Aus diesen Beispielen, bei welchen es sich ausnahmslos um recht schwierige Bestimmungen handelt, ergibt sich, dass das neue Verfahren in bezug auf Spezifität und Empfindlichkeit den beiden anderen Methoden überlegen ist. Bei der Titration mit Dichlorphenol-Indophenol liegen die gefundenen Resultate ausnahmslos, und zwar zum Teil ganz beträchtlich über dem Theoriewert. Auch die Methode von *Schmall* et al. liefert beim untersuchten Analysenmaterial im allgemeinen noch zu hohe Werte. Bei der neuen Methode sind die Abweichungen vom Theoriewert durchwegs kleiner als bei den anderen beiden Verfahren, und selbst dort, wo die beiden letzteren nicht mehr anwendbar sind, lässt sich mit dem neuen Verfahren der Ascorbinsäuregehalt noch auf $\pm 10\%$ genau bestimmen.

Prinzip

Das Prinzip des Verfahrens lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Zubereitung des Analysenmaterials durch Pulverisieren, Mahlen, Homogenisieren, Mischen, Lösen usw.
2. Extraktion der Ascorbinsäure aus pulverförmigen Substanzen oder Verdünnen bzw. Ansäuern von flüssigen oder halbfesten Stoffen mit Metaphosphorsäurelösung.
3. Entfernen von störenden Begleitstoffen durch Ausschütteln der Extraktionslösung mit Isobutanol und Petroläther.
4. Reaktion der Ascorbinsäure mit diazotiertem o-Nitroanilin.
5. Extrahieren der gebildeten, gelben Reaktionsverbindung aus der wässrigen Lösung mit Isobutanol.
6. Bilden des rot-blau gefärbten Natriumsalzes der Reaktionsverbindung und gleichzeitiges Extrahieren dieses Farbstoffes aus der Isobutanollösung mit 2 %iger wässriger Natronlauge.
7. Messen der Extinktion bei 540 m μ im Vergleich zu einem Blindwert, in welchem die Ascorbinsäure vorher oxydiert worden war.
8. Berechnen des Ascorbinsäuregehaltes mit Hilfe eines Zusatzversuches.

Bei diesem Vorgehen kann die Analyse nur noch von Stoffen gestört werden, welche wie die Ascorbinsäure

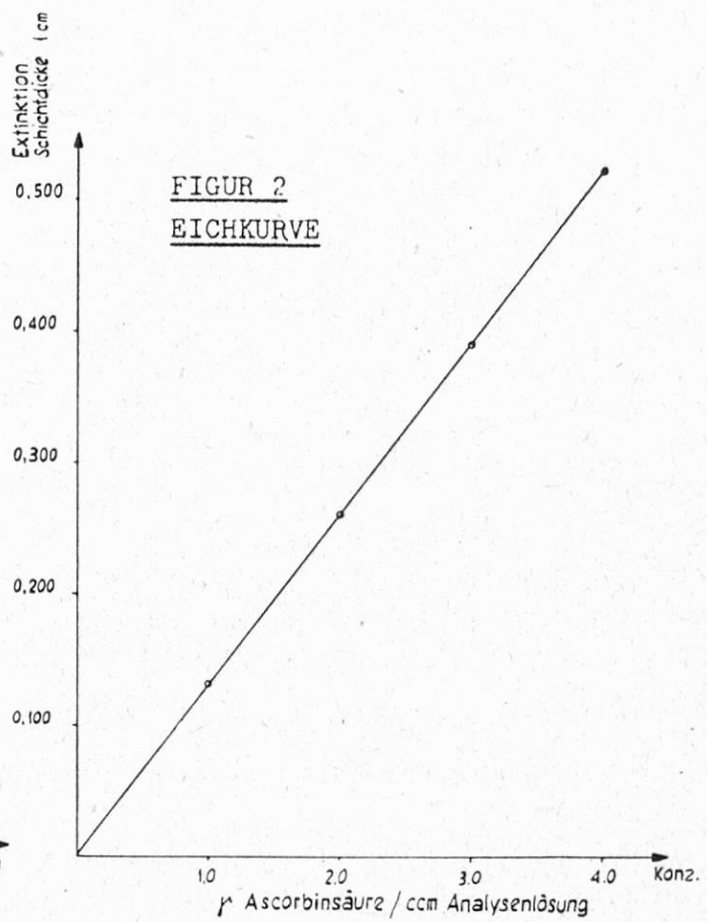
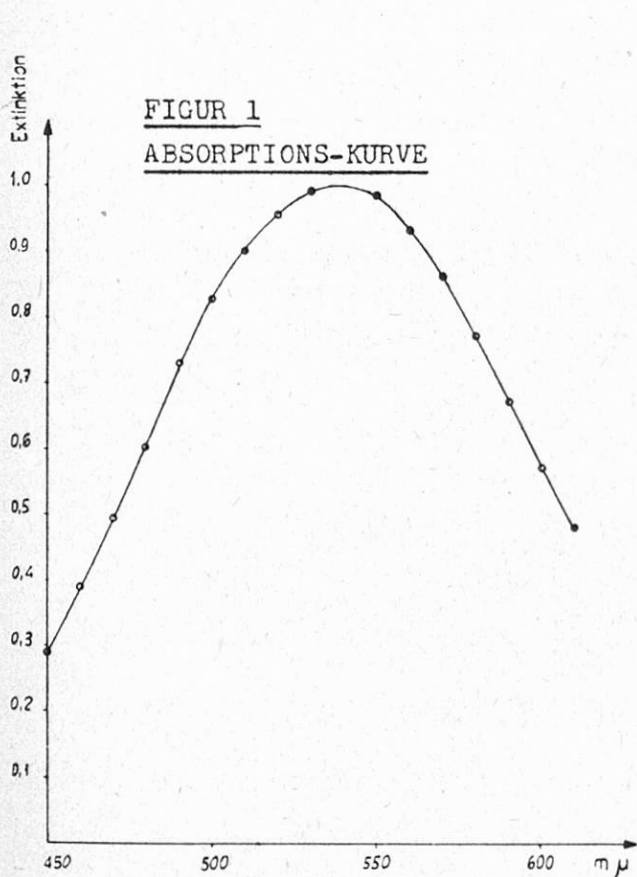
- a) sich nicht mit Isobutanol und Petroläther extrahieren lassen,
- b) sowohl mit diazotiertem Nitroanilin kuppeln, als auch
- c) durch Dichlorphenol-Indophenol diese Reaktionsfähigkeit verlieren,
- d) eine Reaktionsverbindung liefern, die aus saurer Lösung mit Isobutylalkohol extrahierbar ist und in wässriger Lösung ein rot-blaues Na-Salz bildet.

Die untere Erfassbarkeitsgrenze der Methode liegt bei einer Konzentration von 0,5 γ Ascorbinsäure pro cm³, d.h. Lösungen bzw. Extrakte von festem Untersuchungsmaterial mit einem Ascorbinsäuregehalt von 0,5 γ /cm³ können noch ohne weiteres bestimmt werden.

Das Absorptionsspektrum des gebildeten Farbstoffes in Isobutanollösung ist in Figur 1 angegeben. Wie man aus der Kurve entnehmen kann, liegt das Absorptionsmaximum bei 540 m μ .

Zwischen der Extinktion bei 540 m μ und der Konzentration herrscht ein linearer Zusammenhang (siehe Figur 2), sofern die Konzentration der zu untersuchenden Lösung zwischen 0,5—4 γ Ascorbinsäure pro cm³ liegt. Bei der Durchführung der Bestimmung muss deshalb darauf geachtet werden, dass dieser Konzentrationsbereich nicht über- bzw. unterschritten wird.

Zur Erhöhung der Genauigkeit der Bestimmung und um unkontrollierbare Einflüsse des Analysenmaterials auszuschalten, empfiehlt es sich, die gesuchte Ascorbinsäurekonzentration nicht nur aus der Eichkurve, sondern auch auf Grund eines Zusatzversuches, welcher parallel zur Hauptbestimmung durchgeführt wird, zu berechnen. Dabei soll die Konzentration des Zusatzversuches ebenfalls in dem oben angegebenen Bereich von 0,5—4 γ /cm³ liegen.



Experimenteller Teil

Material:

1. Zentrifuge mit Glasstopfen-Zentrifugiergläsern von ca. 50 cm³ Inhalt
2. Kolorimeter (Filter 540 m μ)
3. Schüttelzylinder mit Glasstopfen
4. Messkolben und übliches Glasmaterial.

Reagenzien:

1. Metaphosphorsäurelösung 20 Gew./Vol.0/0 in dest.Wasser *)
2. Metaphosphorsäurelösung 1 Gew./Vol.0/0 in dest.Wasser *)
3. Isobutylalkohol rein, wasserfrei
4. Isobutylalkohol mit Metaphosphorsäurelösung (2) gesättigt
(Wird über der Metaphosphorsäurelösung aufbewahrt.)
5. o-Nitroalinreagens
400 mg o-Nitroanilin werden in 20 cm³ Eisessig gelöst und mit Salzsäure 3-n auf 250 cm³ aufgefüllt.
6. Natriumnitritlösung 0,08 Gew./Vol.0/0 in dest.Wasser *)
7. Isobutanol-Äthanol-Mischung, Isobutylalkohol (3), Äthylalkohol abs. im Verhältnis 1:1 (Vol.)
8. Petroläther rein, tiefsiedend
9. Natronlauge wässrig, 2 Gew./Vol.0/0
10. Ascorbinsäure Standardlösung
50 mg Ascorbinsäure in 1 Liter Metaphosphorsäurelösung (2) *)
11. Dichlorphenol-Indophenollösung, ca. 200 mg/l in dest.Wasser
200 mg Dichlorphenol-Indophenol wird in einem 100 cm³Becherglas mit ca. 50 cm³ dest.Wasser zum beginnenden Sieden erhitzt — dann abgekühlt — und mit dest.Wasser auf 1000 cm³ aufgefüllt. Die Lösung wird durch ein Faltenfilter filtriert.
12. Diazoreagens
1 cm³ o-Nitroanilinreagens (5) + 1 cm³ Natriumnitritlösung (6) + 2 cm³ Alkoholmischung (7)
(Diese Lösung darf erst *unmittelbar vor Gebrauch* hergestellt werden.)

Durchführung der Methode (Beschreibung mit Hilfe eines praktischen Beispiels)

Bestimmung der Ascorbinsäure in Vollmilchpulver (Sollgehalt 10—15 mg pro 100 g):

- 6 g Milchpulver werden in einen 500 cm³-Messkolben eingewogen und in 100 cm³ dest.Wasser gelöst. Alsdann werden 15 cm³ Metaphosphorsäurelösung 20 0/0ig (1) zugefügt und mit dest.Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird durch ein Faltenfilter filtriert, wobei die ersten 30 cm³ des Filtrates nochmals zurückgesesn werden.

*) Vor der Analyse frisch herstellen.

Das Filtrat wird wenn nötig mit Metaphosphorsäurelösung (2) weiter verdünnt, so dass in

- 100 cm³ Verdünnung höchstens 200 γ Ascorbinsäure enthalten sind. Aus dem Filtrat bzw. der Verdünnung werden für die Hauptbestimmung (A), Zusatzversuch (ZV) und Blindversuch (BV) je
- 95 cm³ in einen 200 cm³Schüttelzylinder pipettiert. Dem Hauptversuch werden 5 cm³ dest. Wasser zugefügt, um das Volumen auf 100 cm³ zu ergänzen.

Blindversuch und Zusatzversuch werden wie folgt behandelt:

1. *Zusatzversuch*

Von der Ascorbinsäure-Standardlösung (10) wird eine bestimmte Menge der Analysenlösung beigelegt, so dass der Zusatz ungefähr dem zu erwartenden Ascorbinsäuregehalt entspricht. (Im erwähnten Beispiel: Zusatz von 3 cm³ Ascorbinsäure-Standardlösung entsprechend 150 γ Ascorbinsäure. Das Volumen wird mit dest. Wasser ad 100 cm³ ergänzt [im Beispiel mit 2 cm³].)

2. *Blindversuch*

Zusatz von 5 cm³ Dichlorphenol-Indophenol-Lösung (11), wobei eine bleibende, deutliche Rosafärbung entstehen soll. Von hier an werden alle 3 Proben, (A, ZV und BV) genau gleich nach folgender Beschreibung weiterbehandelt:

Jede Probe wird mit

50 cm³ Isobutanol (4) versetzt, kräftig geschüttelt und dann zentrifugiert. Die überstehende Isobutanolschicht wird abgetrennt und verworfen. Nun wird die wässrige Analysenlösung in gleicher Weise zweimal mit je

50 cm³ Petroläther (8) ausgeschüttelt.

Bei der Extraktion mit Isobutanol und Petroläther erhält man oft keine saubere Trennung der Schichten. In solchen Fällen wird die Grenzschicht zusammen mit der organischen Phase verworfen, wobei man lediglich darauf achten muss, dass nach den 3 Extraktionen noch mindestens 50 cm³ der wässrigen Analysenlösung übrig bleiben.

50 cm³ der wässrigen Analysenlösung werden in einen 100 cm³-Schüttelzylinder pipettiert und mit

2 cm³ Diazoreagens (12) versetzt. Die Lösung wird gut durchmischt und genau 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Anschliessend wird die gelbe Reaktionsverbindung mit

30 cm³ Isobutanol (3) extrahiert. Nach Trennung der Schichten werden aus der Isobutanolschicht

25 cm³ in ein Schüttelzentrifugierglas abpipettiert. Durch Zusatz von 5 cm³ Natronlauge (9) und heftiges Schütteln wird das rotblaue Salz des Farbstoffes gebildet und aus der Isobutanolphase extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wird die Isobutanolschicht abgesogen und verworfen,

während die wässrig-alkalische Farblösung in die Messcuvette pipetiert wird *). (Im erwähnten Beispiel beträgt das Volumen der Cuvette ca. 4—5 cm³, die Schichtdicke 1 cm.) Die Extinktion der Hauptbestimmung und des Zusatzversuches werden in einem Kolorimeter gegen den Blindversuch bei 540 m μ gemessen.

Berechnung:

| | | |
|---|---|---|
| Extinktion aus Analyse + Zusatz | = | a |
| Extinktion aus Analyse ohne Zusatz | = | b |
| g Analysenmaterial | = | c |
| (enthalten in dem mit Zusatz d versetzten Volumen Analysenlösung) | | |
| Ascorbinsäurezusatz in Gamma | = | d |

Formel:
$$\frac{d \cdot b}{10 \cdot (a - b) \cdot c} = \text{mg}^0/\text{o Vitamin C}$$

Im erwähnten Beispiel:

| | | | |
|-----------|---|-------------|------------------------------------|
| a = 0,369 | | | |
| b = 0,174 | | 150 · 0,174 | |
| c = 1,14 | $\frac{150 \cdot 0,174}{10 \cdot (0,369 - 0,174) \cdot 1,14}$ | = | 11,75 mg ⁰ /o Vitamin C |
| d = 150 | | | |

Zusammenfassung

Es wird eine Analysenmethode zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure in Lebensmitteln und biologischem Material beschrieben. Die Bestimmung beruht auf der Farbreaktion von Ascorbinsäure mit diazotiertem 2-Nitroanilin. Gegenüber der bereits bekannten Methode mit 4-Methoxy-2-Nitroanilin ist es gelungen, durch eine Verbesserung des Extraktionsverfahrens die Bestimmung wesentlich empfindlicher und spezifischer zu gestalten. Dabei wird das Reaktionsprodukt der Ascorbinsäure mit dem Diazoniumsalz aus der wässrigen Lösung mit Isobutanol extrahiert. Die Isobutanolphase wird anschliessend mit einer wässrigen Lösung von Natronlauge ausgeschüttelt, wobei sich das rot-blaue Salz des 2-Nitrophenylhydrazids der Oxalsäure bildet. Die untere Erfassbarkeitsgrenze der Methode liegt bei einer Konzentration von 0,5 γ Ascorbinsäure pro cm³, d.h. Lösungen bzw. Extrakte von festem Untersuchungsmaterial mit einem Ascorbinsäuregehalt von 0,5 γ pro cm³ können noch ohne weiteres bestimmt werden.

Résumé

La présente publication décrit une méthode de dosage quantitatif de l'acide ascorbique, dans les produits alimentaires et les matériaux biologiques. Le principe de l'analyse repose sur la réaction colorimétrique de l'acide ascorbique avec la 2-nitroaniline diazotée. Cette méthode permet, grâce à une amélioration de la technique d'extraction, d'obtenir un dosage beaucoup plus spécifique et plus sensible que ce n'était le cas avec

*) Allfällige Trübungen können durch Ausschütteln mit 20 cm³ Petroläther (8) geklärt werden.

la méthode déjà connue utilisant la 4-methoxy-2-nitroaniline. Le produit de réaction formé entre l'acide ascorbique et le diazo-dérivé est extrait de la phase aqueuse au moyen d'isobutanol. Ensuite, la phase d'isobutanol est agitée avec une solution aqueuse de soude caustique, ce qui provoque la formation du sel rouge-bleu de la 2-nitrophenylhydrazide de l'acide oxalique. La limite inférieure de sensibilité de la méthode se situe à 0,5 γ d'acide ascorbique par cm^3 , c'est-à-dire que des solutions ou des extraits de substances solides contenant 0,5 γ d'acide ascorbique par cm^3 peuvent encore être dosés sans autre.

Summary

The author describes a method for the colorimetric determination of ascorbic acid in food and biological material, involving the reaction of ascorbic acid with diazotized 2-nitroaniline. Compared with the known method with 4-methoxy-2-nitroaniline the sensitivity and also the specificity of the determination has been significantly improved by using a better extraction procedure. The product of the reaction between the ascorbic acid and the diazonium salt is extracted from the aqueous solution with isobutanol. The isobutanol-phase is then extracted with an aqueous solution of sodium hydroxide whereby the redblue salt of the 2-nitrophenylhydrazide of the oxalic acid is formed. The sensitivity of the method permits the determination of quantities down to 0,5 γ of ascorbic acid per cm^3 i.e. solutions or extracts of solid materials containing only 0,5 γ per cm^3 can be analysed without difficulty.

Bibliographie

- 1) *Tillmans I.* et al., *Z. Untersuch. Lebensm.* **63**, 276 (1932).
Müller P. B., *diese Mitt.* **40**, 408 (1949).
- 2) *Kolthoff I. M.* et al., *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis.* The Mac Millan Co., New York 1936.
- 3) *Martin E.* et al., *Biochem. Z.* **273**, 170 (1934).
Gál. I. *Nature* **138**, 799 (1936).
- 4) *Roe I. H.* und *Kuether C. A.*, *I. Biol. Chem.* **147**, 399 (1943).
Roe I. H. und *Kuether C. A.*, *Science* **95**, 77 (1942).
- 5) *Schmall M.*, *Pifer C. W.* und *Wollish E. G.*, *Anal. Chem.* **25**, 1486 (1953).
- 6) *Schmall M.*, *Pifer C. W.*, *Wollish E. G.*, *Duschinsky R.* und *Gainer H.*, *Anal. Chem.* **26**, 1521 (1954).