

Zur polarographischen Bestimmung der Ascorbinsäure und ihrer Umwandlungsprodukte

Autor(en): **Woggon, H. / Köhler, Ursula / Täufel, K.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **54 (1963)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982726>

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 polarographischen Bestimmung der Ascorbinsäure und ihrer Umwandlungsprodukte

H. Woggon und Ursula Köhler

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

Institut für Ernährung, Potsdam-Rehbrücke
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Täufel)

Als Hauptprobleme bei der Bestimmung von Vitamin C in pflanzlichen Extrakten können folgende Aufgaben angesehen werden: Die Extraktion, die Stabilisierung und die Wahl der Bestimmungsmethode. Von diesen drei Faktoren hängt im wesentlichen die Spezifität einer Vitamin-C-Bestimmung ab. Bei der polarographischen Bestimmung kommt als vierter Faktor noch die richtige Wahl des Puffers hinzu, der zusammen mit dem Extraktions- bzw. Stabilisierungsmittel den eigentlichen Grundelektrolyten darstellt. Die Methode selbst war bei diesen Versuchen von untergeordneter Bedeutung. Wir konnten uns in dieser Hinsicht auf die Forschungsergebnisse einer Reihe von Autoren¹⁻⁹ stützen, die sich eingehend mit der polarographischen Vitamin-C-Bestimmung beschäftigt haben. Das trifft jedoch nicht auf die quantitative Bestimmung der Dehydroascorbinsäure (DAS) zu, über deren Stabilität im Zusammenhang mit Extraktbereitung und Reduktion zu Ascorbinsäure (AS) noch viele unklare Vorstellungen bestehen.

Die experimentelle Überprüfung einer Reihe von Faktoren, die mit die Voraussetzung für eine exakte Gesamtvitamin-C-Bestimmung bilden, erschien daher dringend geboten und gab den Anlaß zu den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen. Diese sollten sich auf die Verfolgung der Mutarotationsgeschwindigkeit der DAS in solchen Extraktionsmitteln erstrecken (Oxalsäure, Metaphosphorsäure), die gleichzeitig eine Stabilisierung der AS bewirken. Außerdem war der Temperatureinfluß in Abhängigkeit von der Zeit zu studieren, woraus sich evtl. Hinweise für die Extraktbereitung in der Wärme ergaben.

In den Kreis der Untersuchungen waren auch in gewissem Sinne die Zersetzungsprodukte der DAS, nämlich die 2,3-Diketo-L-gulonsäure und evtl. deren Folgeprodukte einzubeziehen. Um ein Optimum an Vollständigkeit der Reaktion mit H_2S zu erhalten, war außerdem die Kenntnis der Reduktionsbedingungen der DAS von größter Wichtigkeit für ihre quantitative Bestimmung. Gerade in diesem Punkt bestehen in der Literatur sehr unterschiedliche Auffassungen, so daß eine Nachprüfung im Interesse einer genauen Analyse notwendig war. Dem Einfluß des pH-Wertes und der zeitlichen Dauer der H_2S -Einwirkung mußte hierbei die größte Aufmerksamkeit gewidmet werden. Unter denselben Bedingungen war auch das Verhalten der mitanwesenden AS zu prüfen.

* Für die zuverlässige Durchführung der zahlreichen Analysen danken wir Frl. U. Raguse.

Unserem Mitarbeiter, Herrn Dipl.-Chem. H. Säuberlich, danken wir für die Hilfe bei der Auswertung der Versuchsergebnisse.

Zur Durchführung der vorgesehenen Arbeiten stand ein Heyrovský-Polarograph Modell LP 55 mit einer Galvanometerempfindlichkeit $3 \cdot 10^{-9}$ A/mm zur Verfügung.

Tropfzeit der Kallipare: $t = 2,5$ s in entlüfteter 1n-Kaliumchloridlösung, $m = 3,19$ mg/s.

Acetatpuffer A (2 m Essigsäure: 2 m Natriumacetat = 2 : 1, pH 4,3)

Acetatpuffer B (2 m Essigsäure: 2 m Natriumacetat = 1 : 5, pH 5,3)

Auf die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung kann hier verzichtet werden, da diese aus den Fußnoten der Tabellen ersichtlich ist. Sämtliche Polarogramme wurden in sauerstofffreier Lösung registriert. Die Berechnung erfolgte nach der Eichzusatzmethode.

Untersuchung über die Stabilität der Dehydroascorbinsäure

Bei der Extraktbereitung wird im allgemeinen wenig Rücksicht auf die Stabilität der DAS genommen. Temperatur und pH-Wert sind Faktoren, die darauf einen entscheidenden Einfluß haben. Während eine frisch hergestellte, auf 50° C erhitzte wäßrige DAS-Lösung (pH 3,8) selbst nach 10 min. noch keine Abnahme im Gehalt zeigt, beträgt diese in 2 ‰iger Oxalsäure zur gleichen Zeit 10,2 ‰ (*Abbildung 1*), nach 40 min. sogar schon 20 ‰. Bei Zimmertemperatur durchgeführte Versuche zeigen, daß mit Oxalsäure (4 ‰ig) bzw. Metaphosphorsäure (10 ‰ig) hergestellte DAS-Lösungen innerhalb der ersten 20 min. so wenig mutarotieren, daß dadurch das Analysenergebnis nicht beeinträchtigt wird (*Abbildung 2*). Dabei unterscheiden sich Oxalsäure und Metaphosphorsäure hinsichtlich ihres Einflusses auf die Mutarotationsgeschwindigkeit nur sehr unwesentlich. Die von *S. Krause* und *Z. Bozyk*¹⁰ beobachtete Abnahme im Gehalt an DAS bei einem pH-Wert von 1,6 um 1 ‰ nach 30 min. wurde ebenfalls beobachtet und betrug 1,2 ‰ bei pH 1,4.

Daraus läßt sich schließen, daß selbst eine sehr hohe Wasserstoffionen-Konzentration die Mutarotation der DAS nicht verhindert. Diesen Tatsachen sollte man einmal bei der Extrakterstellung und zum andern bei der Verwendung von DAS-Standardlösungen Rechnung tragen, wobei in Extrakten mit größerem Gehalt an DAS die Analyse innerhalb von 20 min., von der Herstellung an gerechnet, zu erfolgen hat, will man nicht größere Fehler bei der Bestimmung in Kauf nehmen. Hierbei wurde der Temperatureinfluß noch nicht einmal berücksichtigt.

Umwandlungen der Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure in neutralen, wäßrigen und sauren Lösungen

Der Einfluß der Temperatur

Aus älteren Versuchen von *R. W. Herbert* und Mitarbeitern¹¹, sowie *J. R. Penney* und *S. S. Zilva*¹² ist bekannt, daß wäßrige Lösungen von DAS beim Stehen bei

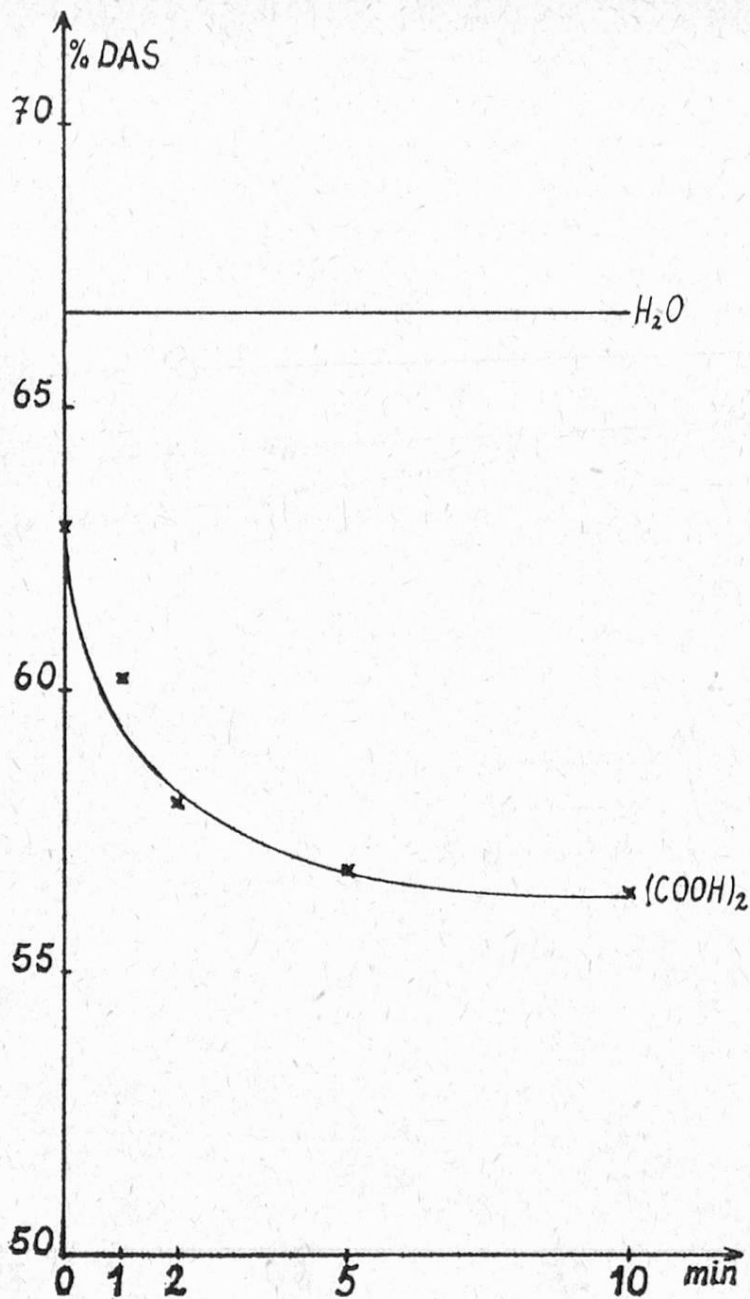


Abbildung 1

Einfluß von Zeit und Milieu auf die Stabilität von Dehydroascorbinsäure nach Erwärmen auf 50 ° C

Zimmertemperatur weitgehende Veränderungen erleiden. Während eine frisch hergestellte wäßrige Lösung mittels H₂S nahezu quantitativ wieder zu AS reduziert werden kann, nimmt die Ausbeute an letzterer immer mehr ab, je länger die Lösung gestanden hat. Dabei entsteht über noch nicht bekannte Umwandlungsprodukte die 2,3-Diketo-L-gulonsäure, die sich mit Schwefelwasserstoff nicht mehr zu AS reduzieren läßt. Nach 18 Tagen lassen sich nur noch 10 bis 15 % der ursprünglichen Konzentration an DAS nachweisen. Dieser Wert soll wenigstens noch 10 Tage bestehen bleiben. Hierbei ist zu bemerken, daß *Penney* und *Zilva* nicht von vorher isolierter DAS ausgingen. Ihre Lösungen enthielten noch

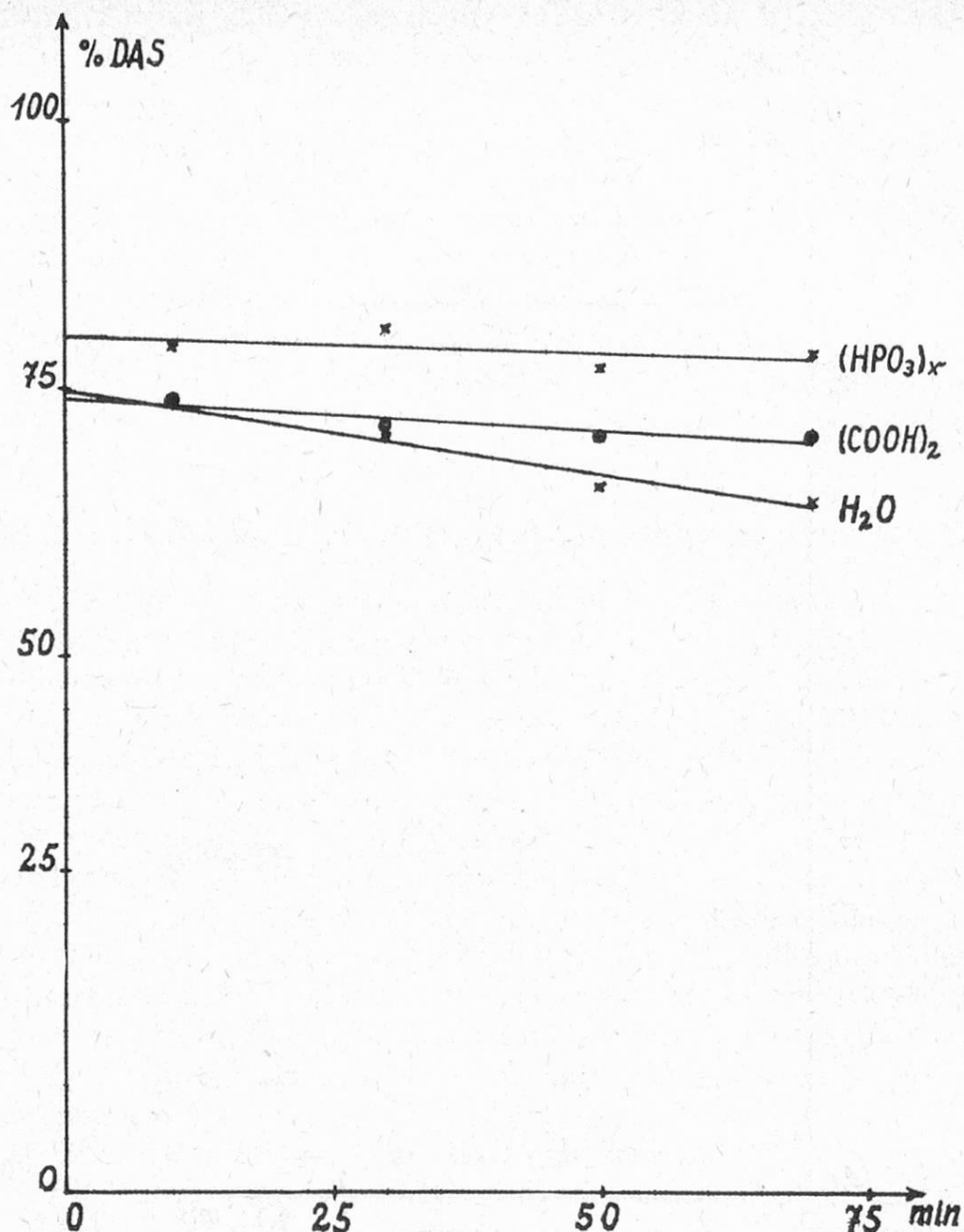


Abbildung 2

Mutarotationsgeschwindigkeit von Dehydroascorbinsäure in
 a) Oxalsäure (4 0/0ig), b) Metaphosphorsäure (10 0/0ig), c) Wasser

Nebenprodukte aus der DAS-Darstellung und die von ihnen bei der Verfolgung der Mutarotation erhaltenen Werte beziehen sich meist auf Lösungen, die noch freie Jodwasserstoffsäure enthalten.

Die Versuche, die hier mit vorher isolierter DAS durchgeführt wurden, zeigen, daß, ebenso wie von *Penney* und *Zilva* schon gefunden, die Mutarotationsgeschwindigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängt. Ein Vergleich der Spalten 1 und 3 der *Tabelle 1* zeigt deutlich, daß sich mit zunehmender Säurestärke auch die Mutarotationsgeschwindigkeit der DAS erhöht. Den gleichen Effekt ruft Temperaturerhöhung hervor (Spalte 1 und 2), wobei in stärker sauren

Lösungen (Spalte 2 und 4) noch eine andere sehr interessante Erscheinung zu beobachten ist. Trotz des niedrigen pH-Wertes der Reaktionslösung und anfänglich erhöhter Mutarotationsgeschwindigkeit (Spalte 4), ist nach etwa 6 Tagen die Mutarotation anscheinend zum Stillstand gekommen, denn vom 10. bis 21. Tag bleibt die nach H₂S-Reduktion polarographisch noch bestimmbare DAS-Menge konstant. Aufklärung darüber gaben die entsprechenden Kontrollösungen, die vorher nicht mit H₂S reduziert worden waren. Es konnte polarographisch nachgewiesen werden, daß in solchen Lösungen mit zunehmender Mutarotationsdauer ein starkes Reduktionsmittel entsteht (Spalte 6). Die Werte in Spalte 4 setzen sich daher vom 10. Tag an additiv zusammen aus noch vorhandener DAS und der durch Temperatureinwirkung neu entstandenen reduzierenden Substanz. Bei niedrigen Temperaturen, z. B. beim Aufbewahren solcher Lösungen im Kühlschrank, wurde dagegen kein reduzierender Stoff gefunden (Spalte 5).

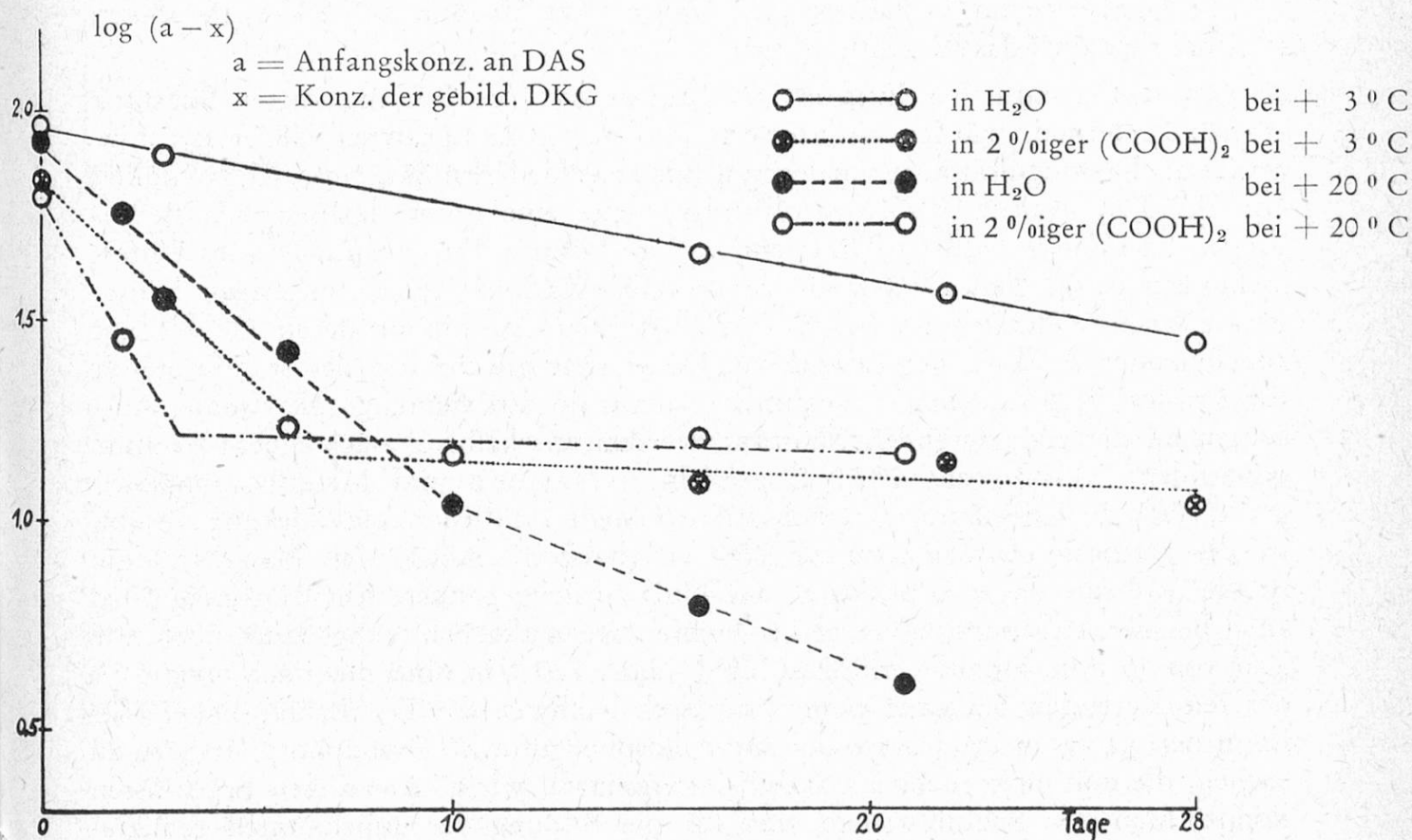


Abbildung 3

Graphische Ermittlung der Reaktionsordnung der Dehydroascorbinsäure-Mutarotation

Abbildung 3, in der der Logarithmus der während der Mutarotation noch vorhandenen DAS-Konzentration gegen die Zeit aufgetragen ist, läßt nur für die Mutarotation in wäßriger Lösung bei + 3 ° C einen Reaktionsverlauf 1. Ordnung

erkennen. In den anderen Fällen setzt sich von einem gewissen Zeitpunkt an die aufgetragene Konzentration aus der Summe DAS plus einer in ihrem polarographischen Verhalten ähnlichen Substanz zusammen. Eine einfache Festlegung der Reaktionsordnung ist daher nicht mehr möglich.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wurde eine 2 %ige oxalsaure DAS-Lösung, die 22 Tage im Kühlschrank ($+ 3^{\circ} \text{C}$) gestanden hatte und in der noch 13,8 % DAS nachweisbar waren, 20 min. auf 100°C erhitzt. Nach Reduktion mit H_2S ließen sich 20,4 % der ursprünglichen Einwaage an reduzierender Substanz bestimmen (*Tabelle 2 A*). Ohne Reduktion waren es 18,4 %. Dies bedeutet, daß durch Erhitzen eine neue reduzierende Substanz entsteht, die nicht mit der durch Reduktion aus DAS entstandenen AS identisch ist. In neutralen wäßrigen Lösungen (ohne Zusatz von Oxalsäure) entsteht unter sonst gleichen Bedingungen dieses Reduktionsmittel nicht. Aus *Tabelle 2 B* ist ersichtlich, daß durch Temperaturerhöhung nur die Mutarotation beschleunigt werden kann. Setzt man dagegen zu solchen neutralen wäßrigen und völlig mutarotierten Lösungen von DAS 4 %ige Oxalsäure im Verhältnis 1 : 1 und erhitzt 20 min. auf Siedetemperatur, so bildet sich auch das Reduktionsmittel.

Um den eventuellen Einfluß des Milieus auf die Bildung dieser Substanz kennen zu lernen, wurden mutarotierte wäßrige DAS-Lösungen (88 % der Einwaage als Diketogulonsäure vorliegend) mit verschiedenen Säuren in Abhängigkeit von der Zeit erhitzt. Als Kontrollprobe diente eine unter den gleichen Bedingungen behandelte wäßrige Diketogulonsäure-Lösung. Das Resultat dieser Untersuchungen ist in *Tabelle 3* zusammengestellt. Während ohne vorherigen Säurezusatz keine reduzierende Substanz nachweisbar ist, nimmt deren Gehalt mit zunehmender Acidität der Lösung zu. Dabei tritt gleichzeitig der stabilisierende Effekt der verschiedenen zugesetzten Säuren in Erscheinung. Maximale Ausbeuten an der reduzierenden Substanz werden anscheinend nach einem 45 min. dauernden Erhitzen auf 100°C erreicht, (Oxalsäure und Metaphosphorsäure je 22,5 %). In Essigsäure, die auch auf AS keine stabilisierende Wirkung ausübt, ist die geringste Ausbeute zu verzeichnen (nach 30 min. 7 %). Nach 45 min. ist die Ausbeute dagegen praktisch auf Null zurückgegangen. Ein Rückgang wird auch bei der Metaphosphorsäure beobachtet, wenn die Erhitzungsdauer über eine Zeit von 45 min. hinaus verlängert wird. Nach 120 min. sind nur noch etwa 5 % der reduzierenden Substanz polarographisch nachweisbar. Die Erklärung hierfür ist in der erfolgten Hydrolyse der Metaphosphorsäure zu Orthophosphorsäure zu suchen, die nun nicht mehr als Stabilisierungsmittel wirkt. Aus diesen Ergebnissen könnte man den Schluß ziehen, daß für die Bildung der unbekannteren reduzierenden Substanz nur die Wasserstoffionen-Konzentration von ausschlaggebender Bedeutung ist und nicht das Reduktionsvermögen einer Säure, wie etwa das der Oxalsäure.

Eine weitere Versuchsreihe gab darüber Aufschluß, ob die Bildung auch mit solchen Lösungen möglich ist, die anfänglich nur DAS enthalten. Um die ange deuteten Komplikationen mit Metaphosphorsäure zu vermeiden, wurde nur mit Oxalsäure (4 %ig, Volumenverhältnis 1 : 1) erhitzt. Während bei 50°C der

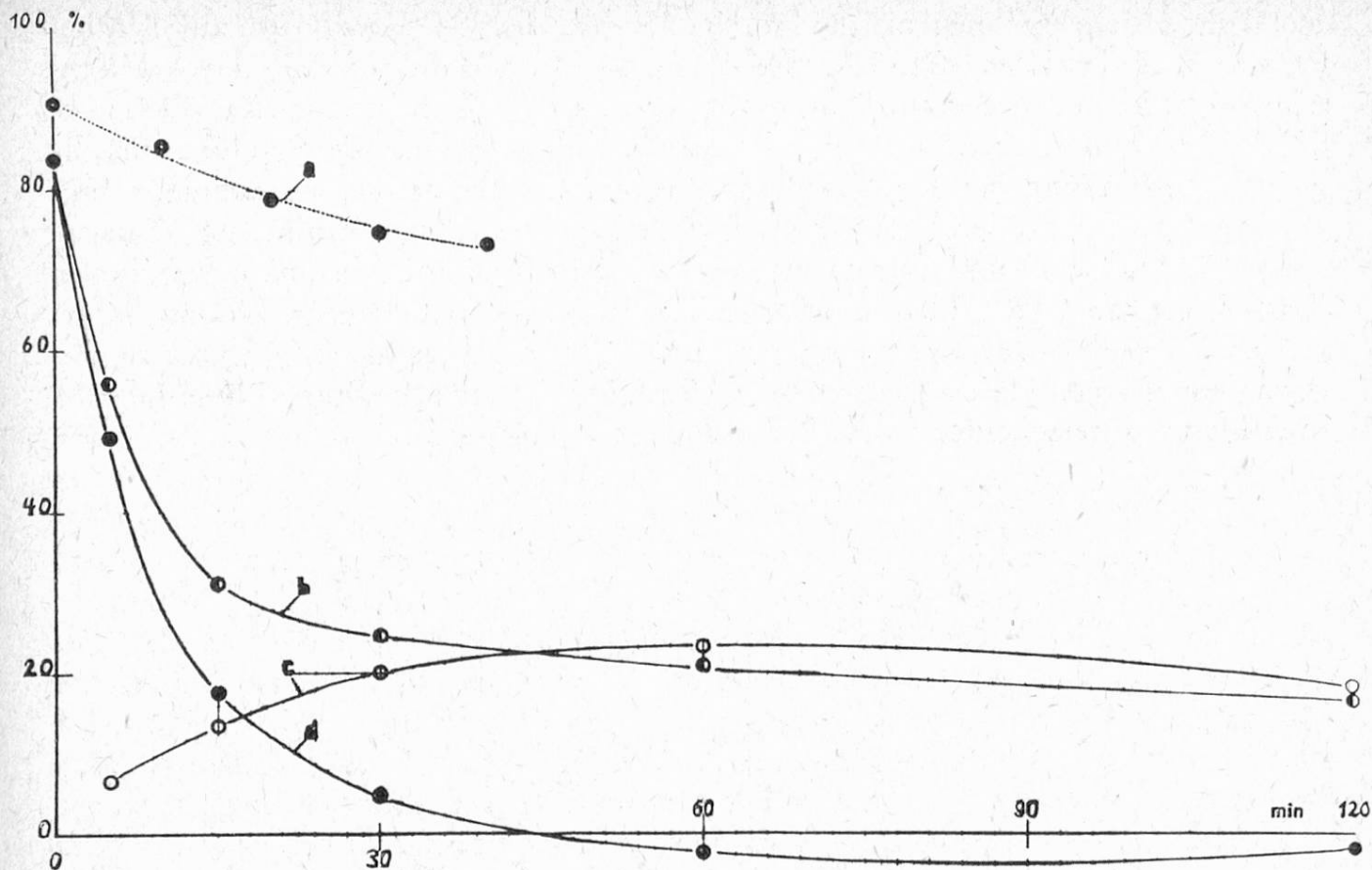


Abbildung 4

Temperatureinfluß auf Dehydroascorbinsäurelösungen in Abhängigkeit von der Zeit

Anteil an mit H_2S reduzierbarer DAS von 0 bis 40 min. sehr langsam abnimmt (Abbildung 4, Kurve a), beobachtet man an der auf $100^\circ C$ erhitzten DAS-Lösung eine außerordentliche Steigerung der Mutarotationsgeschwindigkeit (Kurve b). Dies entspricht jedoch nicht den wahren Verhältnissen, da gleichzeitig eine Neubildung des schon zitierten Reduktionsmittels stattgefunden hat (Kurve c, Werte gefunden vor der Reduktion mit H_2S). Zieht man von Kurve b die erhaltenen Werte ab und zeichnet die daraus resultierende Kurve d, so gibt diese den wirklichen Verlauf der Mutarotation wider. Man bemerkt, daß nach etwa 45 min. Erhitzungsdauer keine DAS mehr vorhanden ist, gleichzeitig aber auch, daß nach etwa 60 min. eine optimale Ausbeute an dem unbekanntem reduzierenden Stoff erhalten wird. Hätte man den Verlauf der Mutarotation nur an Hand des mit H_2S reduzierten DAS-Anteils verfolgt, so wäre man zu völlig falschen Mutarotationsgeschwindigkeiten und damit zu falschen Schlußfolgerungen gelangt.

Daraus resultiert die Frage nach der Konstitution der unbekanntem reduzierenden Verbindung. Hier gibt es einige deutliche Hinweise, daß es sich dabei um ein in der Literatur bekanntes aci-Redukton handelt.

H. Euler und H. Hasselquist¹³ sowie später auch D. Nomura¹⁴ konnten aus einer frisch bereiteten Lösung von DAS beim Erhitzen mit Salz- oder Schwefelsäure auf $90^\circ C$ oder darüber ein aci-Redukton vom Schmp. $177 - 178^\circ C$ isolie-

ren. Es wurde von ihnen als das von *F. Micheel und H. Haarhoff*¹⁵ auf synthetischem Wege erhaltene DL-5-Methyl-tetrandiol (aci-Redukton III) durch Mischschmelzpunkt und papierchromatographische Analyse identifiziert (Rf: 0,87 bzw. 0,84). Es ist als sicher anzunehmen, daß es sich bei unserem Produkt um die gleiche Verbindung handelt. Dafür spricht einmal der gefundene Schmelzpunkt der aus einem größeren Ansatz präparativ erhaltenen Verbindung (Schmp. 163 – 178 ° C Zers.) und zum andern der Rf-Wert der papierchromatographischen Trennung (Rf: 0,92). Ebenso wird *Tillmans*-Reagens in saurer Lösung sofort entfärbt. An der Quecksilbertropfelektrode gibt die gefundene Verbindung bei etwa dem gleichen Halbstufenpotential wie AS eine anodische Stufe (*Abbildung 5*), so daß eine Unterscheidung auf diese Weise nicht möglich ist.

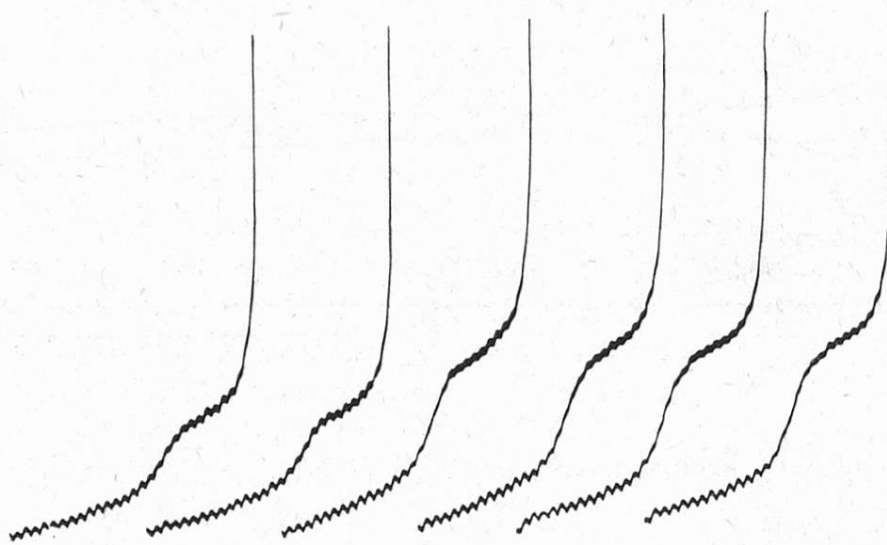


Abbildung 5

Polarogramme einer DAS-Lösung nach Erhitzen mit 4 %iger Oxalsäure von der 12. Drahtwindung anodisch/kathodisch aufgenommen, 100 mV/Absz. $E = 1 : 5$

Kurve (1 + 2) 15 min. erhitzt

Kurve (3 + 4) 30 min. erhitzt

Kurve (5 + 6) 60 min. erhitzt

Außer dem aci-Redukton III enthalten die mit Oxalsäure bzw. Metaphosphorsäure erhitzten DAS-Lösungen noch eine Reihe anderer reduzierender bzw. nicht-reduzierender Spaltprodukte. Im Essigester-Extrakt wurde die Anwesenheit von noch etwa 10 Substanzen papierchromatographisch festgestellt, von denen keine mit AS bzw. DAS identisch war. Auffallend ist, daß bei allen Kochproben (45 min.) die polarographisch ermittelte Ausbeute stets rund 20 % betrug. Schon *Euler und Hasselquist*¹³ weisen auf diese Besonderheit der recht konstanten Gesamtausbeute hin. Der Chemismus der Bildung des DL-5-Methyl-tetrandiols aus DAS ist noch absolut ungeklärt und bedarf daher noch weiterer Untersuchungen. Als erster Reaktionsschritt kann die Aufspaltung des Lactonringes angenommen werden, da die Diketogulonsäure zum gleichen Endprodukt führt.

Für die praktische Extraktbereitung und Vitamin-C-Bestimmung ergeben sich damit einige wichtige Schlußfolgerungen. In Extrakten, die einen größeren Gehalt an DAS enthalten, führt eine Heißbehandlung mit den genannten Säuren (5 min.) durch Mutarotation zur Bildung von Diketogulonsäure und eines sicherlich nicht antiskorbutisch wirksamen aci-Reduktons und damit zu falschen DAS-Werten. Nach verhältnismäßig kurzer Hitzeeinwirkung (100 °C) sind bereits über 40 % der DAS irreversibel in Diketogulonsäure umgewandelt. Da aber gleichzeitig unter diesen Bedingungen die Bildung des aci-Reduktons erfolgt und die üblichen analytischen Methoden zwischen DAS und aci-Redukton im allgemeinen nicht differenzieren können, würde das Endergebnis eine nur etwa 25 %ige Abnahme des DAS-Gehaltes ausmachen. Längere Erhitzungszeiten wirken sich noch ungünstiger aus. Selbst eine Heißextraktion bei wesentlich niedrigeren Temperaturen (50 °C) würde nach 5 min. Dauer einen Verlust von etwa 5 % DAS zur Folge haben. AS ist unter den angegebenen Bedingungen wesentlich beständiger.

Die von einigen Autoren¹⁶ vorgeschlagene und auch durch tschechische Autoren¹⁷ übernommene Extraktionsmethode für Obst und Gemüse, nach der bei Siedetemperatur der Metaphosphorsäurelösung gearbeitet wird, ist nach unseren Erfahrungen entschieden abzulehnen, da die Stufenhöhe nicht mit der Vitamin-C-Konzentration in der Lösung identisch zu sein braucht. Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen weiter den Schluß zu, daß sie auch für die meisten titrimetrischen und kolorimetrischen Methoden zur Bestimmung des Vitamin C gültig und daher bei einer exakten Bestimmung zu berücksichtigen sind.

Die Reduktionsbedingungen für Dehydroascorbinsäure und die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Ascorbinsäure

Die Mehrzahl der bekannten und am häufigsten angewendeten Methoden zur Bestimmung des Gesamtvitamin-C-Gehaltes setzt eine quantitative Reduktion der DAS mit Schwefelwasserstoff zu AS voraus, um diese dann anschließend zusammen mit der schon im pflanzlichen Gewebe vorhandenen AS zu bestimmen. Diese Methode hat allgemeine Anerkennung gefunden und wird bis heute als das sicherste Verfahren bei der Bestimmung der DAS angesehen.

Trotzdem bestehen hinsichtlich des pH-Wertes, der Zeitdauer und der Temperatur, bei der die Reduktion durchgeführt wird, sehr unterschiedliche Auffassungen, wie eine eingehende Literaturdurchsicht^{9, 18–25} ausweist. Eine Nachprüfung der optimalen Reduktionsbedingungen schien daher im Interesse einer genauen DAS-Bestimmung dringend geboten.

Alle Versuche wurden mit kristallisierter, nach der Methode von *J. Kenyon* und *N. Munro*²⁶ erhaltener DAS durchgeführt. Die DAS wurde bei Zimmertemperatur mit H₂S reduziert und anschließend der Überschuß an H₂S durch Kohlendioxyd – ebenfalls bei Zimmertemperatur – entfernt (40 min.). Übereinstimmend mit den Angaben von *Z. Bozyk* und *S. Krauze*²⁵ wird bei einem pH-Wert von 6,5 nach 10 bis 15 min. dauernder H₂S-Behandlung eine sehr hohe Reduktionsausbeute erhalten (*Abbildung 6*).

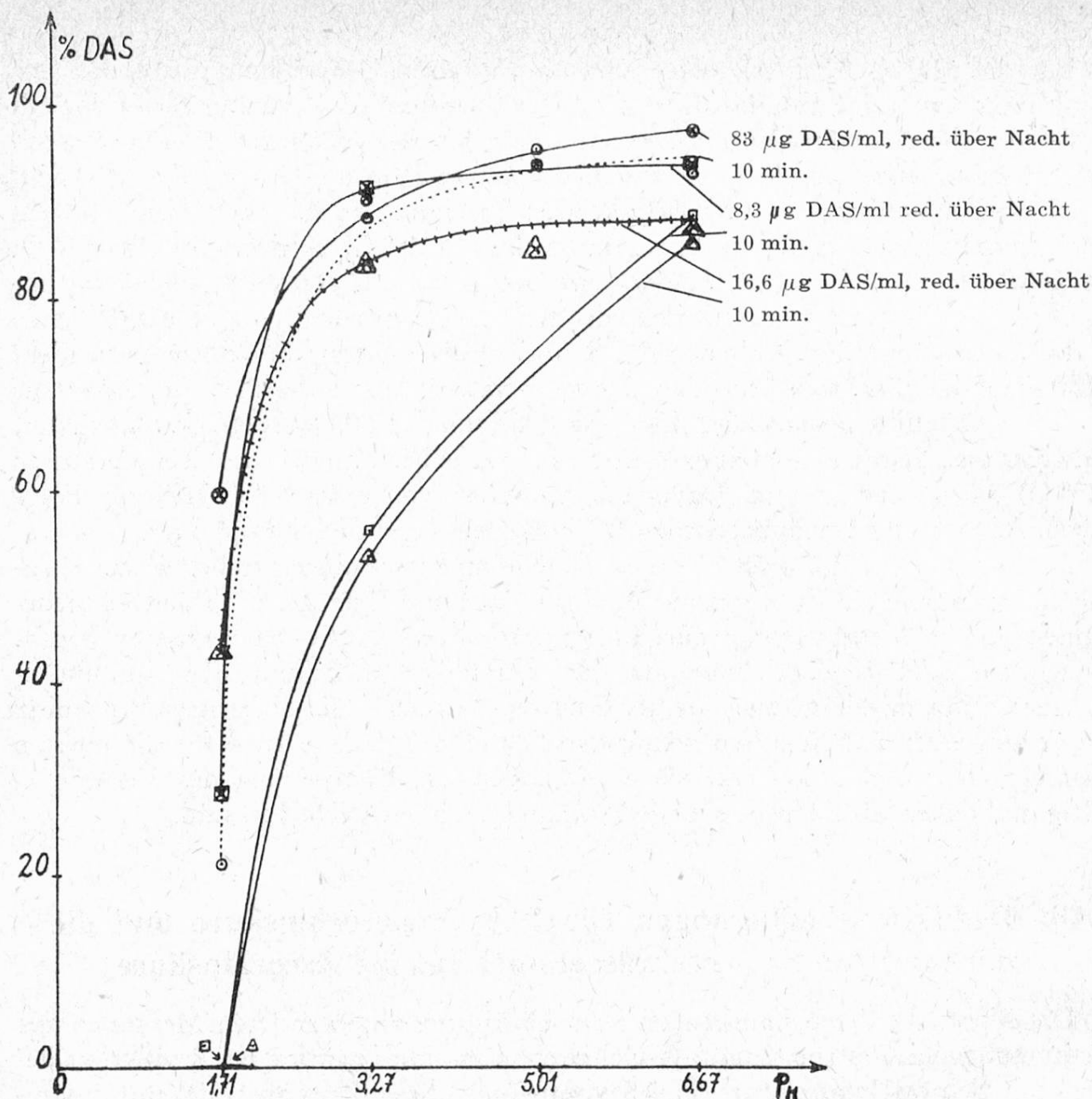


Abbildung 6

Reduktionsgeschwindigkeit von Dehydroascorbinsäure
in Abhängigkeit von pH-Wert und Konzentration

Während die obgenannten Autoren die Reduktion unter diesen Bedingungen bereits als abgeschlossen betrachten und daher die erhaltenen Werte an reduzierter DAS im Vergleich zu anderen Reduktionsbedingungen mit 100 % annehmen und ihre weiteren Berechnungen darauf basieren, konnte hier eindeutig festgestellt werden, daß dies nicht der Fall ist. Eine vollständige Reduktion, und auch dies ist ein sehr relativer Begriff, da präparativ hergestellte DAS nur sehr selten als 100 %ig reines Präparat vorliegt, was sich in sehr unterschiedlichen Reduktionswerten ausdrücken kann, wird auch bei einem pH von 6,5 erst nach 16stündigem Stehen der Lösungen über H_2S erreicht. Zumindest weisen die Tabelle 4 und die Abbildung 6 unter diesen Bedingungen die höchsten reduzierten Werte

auf. Unvollständig verläuft dagegen die Reduktion bei einem pH-Wert von 3,5, wenn man schon nach 10 bis 15 min. dauernder Einleitung den H_2S -Überschuß sofort wieder entfernt (*Tabelle 5*). Um so mehr unterstreicht das die Notwendigkeit längere Reduktionszeiten anzuwenden, wie sie von *K. Scharrer* und *W. Werner*⁹ vorgeschlagen werden. Trotz verlängerter Reduktionszeit (16 Stunden) liegen die erhaltenen Werte an reduzierter DAS um 4 % niedriger als die entsprechenden bei pH 6,5. Für eine schnelle Gesamtvitamin-C-Bestimmung hat die kurze Reduktionsdauer bei einem pH-Wert von 6,5 zweifellos große Bedeutung, erlaubt dieser pH-Wert doch eine schnellere Arbeitsweise, wobei jedoch die große Instabilität der AS und DAS in fast neutraler Lösung einen sehr unsicheren Faktor darstellt. Während *Krauze* und *Bozyk* diesen Faktor bei den von ihnen angewandten Reaktionsbedingungen als vernachlässigbar klein ansehen, mußten wir feststellen, daß unter dem Einfluß von Schwefelwasserstoff – zumindest bei der polarographischen Bestimmung – erhebliche Abweichungen vom tatsächlichen AS-Gehalt auftreten. Wir fanden, daß unter den gleichen Bedingungen mit H_2S behandelte reine AS-Lösungen gegenüber den unbehandelten Lösungen einen über 5 % geringeren AS-Gehalt aufwiesen. Wurde dagegen in den Proben der H_2S -Überschuß erst nach 16 Stunden entfernt, so betrug der AS-Verlust schon fast 10 % (*Tabelle 6*). Trotz der sehr hohen Reduktionsausbeute bei einem pH-Wert von 6,5 muß selbst bei schnellster Arbeitsweise (Entfernung des überschüssigen H_2S sofort nach der 10 min. dauernden Einleitungsperiode) daher mit DAS- bzw. AS-Verlusten gerechnet werden. In dem von *Scharrer* und *Werner* vorgeschlagenen Acetatpuffer (die Probe wird bei einem pH-Wert von etwa 3,5 mit H_2S 15 min. gesättigt und über Nacht verschlossen stehen gelassen) sind dagegen trotz der verlängerten Reduktionszeit die AS-Verluste geringer (4 %). Siehe hierzu die *Tabelle 7*. Die verlängerte Reduktionszeit stellt deshalb bei diesem pH-Wert durchaus keinen Nachteil für die AS dar, sondern hat in arbeitstechnischer Hinsicht eher einen Vorteil, der sich besonders günstig bei der Verarbeitung vieler Extrakte an einem Tage auswirkt. Dieses Ergebnis bestätigt nur die Tatsache, daß sich AS-Lösungen mit zunehmendem pH-Wert außerordentlich labil verhalten, selbst in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie H_2S . Das scheint die Dinge noch mehr zu komplizieren und die Unübersichtlichkeit zu vermehren. Doch läßt ein Vergleich der bei den genannten pH-Werten erfolgten Einwirkung von H_2S auf AS und DAS leicht einsehen, daß die etwas höheren Verluste an AS beim pH 6,5 durch eine bessere Reduktionsausbeute von DAS sich etwa ausgleichen. Erfolgt dagegen die Reduktion bei pH 3,4, so sind zwar die Verluste an AS geringer, jedoch wird auch die DAS unter diesen Bedingungen nicht so vollständig reduziert. In jedem Falle hat man bei der Gesamtvitamin-C-Bestimmung damit zu rechnen, daß durch die H_2S -Behandlung Verluste eintreten (max. bis 5 %). Bei dem meist sehr geringen Anteil an DAS in pflanzlichen Extrakten wird der Hauptverlust die AS betreffen. Von Vorteil ist in jedem Falle dann ein niedriger pH-Wert (pH 3,5), wie ihn *Scharrer* und *Werner* vorschlagen. Die von *Bozyk* und *Krauze* angewandten Arbeitsbedingungen bei einem pH von 6,5 müssen selbst bei nur 15 min. dauernder Einwirkung von H_2S etwas ungünstiger beurteilt werden, da die Verluste höher liegen und sich dementsprechend mehr auf den

wiedergefundenen Gesamtvitamin-C-Gehalt auswirken. Vielleicht liegt hierin auch die Erklärung, weshalb die genannten Autoren in Obst und Gemüse keine DAS fanden, was sie zu der Schlußfolgerung veranlaßte, bei der polarographischen Gesamtvitamin-C-Bestimmung auf die H₂S-Reduktion verzichten zu können. Überwiegt dagegen der DAS-Anteil, so empfiehlt es sich, bei einem pH von 6,5 zu arbeiten, da hierbei die geringsten Reduktionsverluste auftreten. Auch bei der Verarbeitung nur weniger Proben und in den Fällen, wo eine schnelle Gesamtvitamin-C-Bestimmung erwünscht ist, wird man sicher auf das letztere Verfahren zurückgreifen. Ist der Probenanfall dagegen sehr groß, so dürfte die Methode nach *Scharrer* und *Werner* vorzuziehen sein. Einige der hier gemachten Erfahrungen dürften auch für die Titrationsmethoden von Bedeutung sein, insofern Schwefelwasserstoff als Reduktionsmittel für die Gesamtvitamin-C-Bestimmung verwendet wird.

Die Extraktion unter weitgehender Berücksichtigung der erhaltenen Versuchsergebnisse

Für eine optimale polarographische Vitamin-C-Bestimmung (AS + DAS) ergeben sich aus den bisher bekannten Tatsachen folgende Schlußfolgerungen. Bei Verwendung von Oxalsäure (4 0/0ig) bzw. Metaphosphorsäure (10 0/0ig) als Extraktions- und Stabilisierungsmittel kann der Verlust an DAS durch Mutarotation – Zimmertemperatur vorausgesetzt – innerhalb der ersten 20 min. vernachlässigt werden. Übereinstimmend mit den Angaben von *Krauze* und *Bozyk* beträgt der Verlust etwa 1 0/0. Eine Heißbehandlung des Extraktes mit den genannten Säuren führt schon nach wenigen Minuten durch Mutarotation zur Bildung von Diketogulonsäure und einem aci-Redukton. Schon nach 5 min. dauerndem Erhitzen auf 100° C sind 40 0/0 der DAS irreversibel in Diketogulonsäure umgewandelt. Bei der nachfolgenden Reduktion mit Schwefelwasserstoff müßte der Gesamtvitamin-C-Gehalt in jedem Falle zu niedrig ausfallen, auch wenn der Verlust an DAS durch Neubildung des aci-Reduktons etwas geringer erscheint. Da reduzierte DAS und aci-Redukton gleichermaßen reduzierend wirken, dürften diese Erkenntnisse auch für die meisten titrimetrischen Methoden zutreffen. Von einer Heißextraktion sollte man daher nach Möglichkeit absehen.

Was die Reduktionsbedingungen eines solchen Extraktes betrifft, so ist für die polarographische Bestimmung ein pH-Wert von 3,5 sicherlich am günstigsten, da er sowohl für AS als auch für DAS die beste Voraussetzung für eine genaue Bestimmung bedeutet. Doch darf das nicht darüber hinwegtäuschen, daß auch hierbei durch die H₂S-Behandlung geringe Gesamtvitamin-C-Verluste in Kauf zu nehmen sind. Dieser Fehler* muß als methodisch bedingt angesehen werden.

* In einer neueren Arbeit von *Z. Bozyk*²⁷, die eingehend die Reduktionsbedingungen für DAS mittels H₂S bei der Pijanowski-Methode untersucht, kommt dieser zu ähnlichen Schlußfolgerungen. *Bozyk* bringt darin zum Ausdruck, daß die Reduktion mit einem schwer zu ermittelnden systematischen Fehler belastet ist, der eine absolut genaue Bestimmung in Frage stellt.

Unberücksichtigt blieb hier die Möglichkeit, daß während der Extraktbereitung AS-Verluste durch Luftsauerstoff und/oder anwesende Oxydasen eintreten können. Auf den Gesamtvitamin-C-Gehalt ist das ohne Einfluß, wenn auch im Verhältnis AS : DAS sich dadurch merkliche Verschiebungen ergeben können und eine exakte DAS-Bestimmung damit in Frage gestellt wird. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, daß der durch Oxydation bedingte Fehler – gleiche Versuchsanordnung und Methode vorausgesetzt – stets von der gleichen relativen Größenordnung ist. Damit ergibt sich die Möglichkeit, AS- und DAS-Werte als relative Angaben direkt miteinander vergleichen zu können, obwohl die aus der Differenz von Gesamtvitamin C und AS erhaltene Menge an DAS keinen Absolutwert darzustellen braucht. Da hier bei vergleichenden Untersuchungen an mehreren Kartoffelsorten über längere Lagerungsperioden und an verschiedenen Obst- und Gemüsearten sehr erhebliche Unterschiede im DAS-Gehalt festgestellt wurden, sind wir der Ansicht, daß im Interesse einer genauen Gesamtvitamin-C-Bestimmung die polarographische Methode auf die Bestimmung der DAS nicht verzichten kann.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die für eine möglichst exakte Gesamtvitamin-C-Bestimmung erforderlichen experimentellen Bedingungen untersucht.

1. Die Extraktion von Vitamin C aus pflanzlichem Gewebe ist nach Möglichkeit mit kalter Oxalsäure bzw. Metaphosphorsäure, den bekanntesten Stabilisierungsmitteln für Ascorbinsäure, vorzunehmen. In der Hitze beginnt sofort die Mutarotation der Dehydroascorbinsäure zu Diketogulonsäure, aus der in weiteren Reaktionen ein aci-Redukton entsteht.

2. Dieses auch in saurer Lösung entstehende aci-Redukton gibt bei der Analyse gleiche Reaktionen wie AS. Dadurch ergeben sich für die Summe Ascorbinsäure + Dehydroascorbinsäure keine sehr großen Fehler, das Verhältnis von Ascorbinsäure : Dehydroascorbinsäure wird dagegen beträchtlich beeinflusst.

3. Die Reduktion der Dehydroascorbinsäure mit Schwefelwasserstoff zu Ascorbinsäure hat möglichst sofort im Anschluß an die Extraktion zu geschehen, da auch in kalter Oxalsäure bzw. Metaphosphorsäure die Mutarotation der Dehydroascorbinsäure nur in den ersten 20 min. vernachlässigbar bleibt.

4. Die besten Ergebnisse — auch hier sind jedoch geringe Gesamtvitamin-C-Verluste unvermeidbar — werden entweder bei hohem pH-Wert (6,5) und sofortiger Entfernung des H_2S nach der Reduktion oder bei niedrigem pH-Wert (3,5) und H_2S -Einwirkung über Nacht (etwa 16 Stunden) gefunden. Für die polarographische Vitamin-C-Bestimmung wird das zweite Verfahren empfohlen.

Résumé

Examen des conditions expérimentales à observer pour arriver à un dosage aussi exact que possible de la vitamine C totale.

Il est recommandé d'extraire la vitamine C des tissus végétaux en présence d'acide oxalique ou d'acide métaphosphorique, à froid, et de procéder à la réduction par l'hydrogène sulfuré aussitôt après l'extraction. Les meilleurs résultats sont obtenus soit en tra-

vaiillant au pH 6,5 et en chassant l'H₂S aussitôt après la réduction, soit au pH 3,5, en laissant agir l'H₂S pendant la nuit (env. 16 heures). C'est la deuxième variante qui est recommandée dans le cas du dosage polarographique de la vitamine C.

Summary

Practical and critical examination of the experimental conditions to be observed for an exact determination of total vitamin C in plant tissues.

Literatur

- 1 Schwarz K.: Z. analyt. Chem. **115**, 161 (1939)
- 2 Cozzi D.: Ann. Chim. anal. **29**, 434, (1939)
- 3 Østerud Th.: Tekn. Ukebl. **86**, 216 (1939)
- 4 Gillam W. S.: Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. **17**, 217 (1945)
- 5 Page J. E. und Waller J. A.: Analyst **71**, 65 (1946)
- 6 Coulson D. M., Crowell W. R. und Fries S. L.: Analytic. Chem. **22**, 525 (1950)
- 7 Günther E.: Pharmazie **6**, 577 (1951)
- 8 Zuman P.: Chem. Listy **48**, 524 (1954); Collect. czechoslov. chem. Gommun. **19**, 1140 (1954)
- 9 Scharrer K. und Werner W.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde **77**, 97 (1957)
- 10 Krauze S. und Bozyk Z.: Diese Mitt. **50**, 228 (1959)
- 11 Herbert R. W., Hirst F. L., Percival E. G. V., Reynolds R. J. W. und Smith F.: J. chem. Soc. (London) 1933, 1270
- 12 Penney J. R. und Zilva S. S.: Biochem. J. **37**, 403 (1943)
- 13 Euler H. und Hasselquist H.: Ark. Kemi **8**, Nr. 8 (1956)
- 14 Nomura D.: Hakko Kogaku Zasshi **36**, 290 (1958); Ref. in: CA. **53**, 10047 d (1959)
- 15 Micheel F. und Haarhoff H.: Liebigs Ann. Chem. **545**, 28 (1940)
- 16 Dewjatmin W. A. und Doroschenko W. M.: Biochem. Z. **280**, 118 (1935)
- 17 Blattná J., Fragnér J., Šanda V., Zuman P. und Zuffova D.: Průmysl Potravin **4**, 402 (1953)
- 18 Roe J. H., Mills M. B., Oesterling M. J. und Damron C. M.: J. biol. Chemistry **174**, 201 (1948)
- 19 Emmerie A. und van Eekelen M.: Biochem. J. **28**, 1153 (1934)
- 20 Pijanowski E.: Przemysł spożywczy **8**, 410 (1954)
- 21 Fellenberg T. von: Diese Mitt. **32**, 135 (1941); zitiert nach Bozyk Z. und Krauze S., Roczniki państwowego Zakładu Hig. **11**, 143 (1960)
- 22 Paech K. und Tracey M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1956
- 23 Glick D.: Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, New York, London 1957
- 24 Sabalitschka T.: Vitamine und Hormone **4**, 376 (1943)
- 25 Bozyk Z. und Krauze S.: Roczniki państwowego Zakładu Hig. **11**, 143 (1960)
- 26 Kenyon J. und Munro N.: J. chem Soc. (London) (1948), 158; vgl. auch Heise E., Diplomarbeit 1957, Inst. für Medizin und Biologie der Dtsch. Akad. der Wiss. in Berlin, Berlin-Buch.
- 27 Bozyk Z.: Roczniki państwowego Zakładu Hig. **12**, 113 (1961)

Tabelle 1

Der Einfluß von Temperatur und pH-Wert auf die Mutarotation von Dehydroascorbinsäure

Spalte 1 bis 4 gefundene Menge DAS (in % der Einwaage)
Spalte 5 und 6 neugebildete reduz. Substanz (in % der Einwaage)

Zeitlicher Verlauf nach Tagen	in Wasser (pH 3,8)		in 2 %iger Oxalsäure (pH 1,1)			
	+ 3 ° C	+ 20 ° C	+ 3 ° C	+ 20 ° C	+ 3 ° C	+ 20 ° C
	Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6
0	92,7	84,8	92,7	84,8	—	—
2		57,1		38,2		
3	78,4		47,5		—	1,6
6		26,1		23,2		4,2
7					—	4,3
9					—	5,5
10		11,0		20,0		
11					—	6,6
13					—	7,8
16	44,8	6,2	16,7	22,0	—	7,9
21		4,0		20,2		
22	35,6		18,8			
28	27,0		14,8			
33	22,0		12,9			
82	2,2		6,4			

Tabelle 2

Das Verhalten von Dehydroascorbinsäure- bzw. Diketogulonsäurelösungen in der Kühlzelle und beim Erwärmen auf 100 ° C

A Lösung von 125 mg DAS in 250 ml 2 %iger Oxalsäure

Zeitlicher Verlauf nach Tagen	Wiedergefunden als AS in % der Einwaage		
	Kühlzelle + 3 ° C	20 min. auf 100 ° C erhitzt	
	nach Reduktion	nach Reduktion	vor Reduktion
0	68,2		
16	12,3	19,3	17,7
22	13,8	20,4	18,4
82	3,3		

B Lösung von 125 mg DAS in 250 ml Wasser

0	92,7		
16	44,8	5,0	0
22	35,6	6,8	2,1
82	2,2		{ 14,6 *
			{ 15,8**
86		15,5	{ 0
			{ 14,5**
87			1,9

* Nach Zusatz von Oxalsäure (2 0/0ig) Vol. 1 : 1

** Nach Zusatz von Oxalsäure (4 0/0ig) Vol. 1 : 1

Tabelle 3

Das Verhalten wäßriger Diketogulonsäurelösungen* beim Erhitzen auf 100 ° C in Abhängigkeit von Zeit und Milieu

(Werte: wiedergefunden als AS in 0/0 der Einwaage)

Milieu	pH	Erhitzungsdauer				
		15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	120 min.
Oxalsäure ¹	1,3	14,1	17,9	21,7	21,8	
2 0/0ig		14,1	18,1	21,6	22,3	
Oxalsäure ²	1,3	17,2	19,1	20,4	—	
2 0/0ig		17,3	19,1	20,7	—	
Metaphosphor- säure ¹	1,8	22,8	23,6	23,8	15,9	5,3
5 0/0ig		23,2	24,2	23,6	19,0	5,2
Essigsäure ³	2,7	5,8	6,6	Keine	Keine	
1 0/0ig		5,8	7,7	Stufen	Stufen	
Wasser ⁴	3,0	Keine	Keine	Keine	Keine	
		Stufen	Stufen	Stufen	Stufen	

* DAS (125 mg/500 ml H₂O), 2 Monate nach der Herstellung untersucht.

Blindwert: (AS) keine Stufen. Blindwert nach Reduktion mit H₂S: 12,10 0/0 (DAS).

¹ 2 ml Acetatpuffer 2 : 1

4 ml Probelösung (5 ml DAS-Lösung + 5 ml 4 0/0ige (COOH)₂ bzw. 10 0/0ige HPO₃)

6 ml Acetatpuffer 1 : 5

² 8 ml Phosphatpuffer (pH : 8,1)

4 ml Probelösung (10 ml DAS-Lösung + 10 ml 4 0/0ige Oxalsäure)

Amperometrisch mit rot. Pt.-Elektrode bestimmt

³ 2 ml Acetatpuffer 2 : 1

4 ml Probelösung (5 ml DAS-Lösung + 5 ml 2 0/0ige CH₃COOH)

6 ml Acetatpuffer 1 : 5

⁴ 2 ml Acetatpuffer 2 : 1

2 ml Probelösung (Mutarotierte DAS-Lösung)

2 ml 4 0/0ige Oxalsäure

6 ml Acetatpuffer 1 : 5

Tabelle 4

Reduktionsverlauf der Dehydroascorbinsäure in zwei verschiedenen Puffern

DAS-Lösung	Gefunden (%)		Mittelwerte (%)	
	Acetatpuffer * Red.-pH 3,4	Phosphatpuffer ** Red.-pH 6,5	Acetatpuffer *	Phosphatpuffer **
I	79,5	81,8	80,3	84,15
	79,3	85,3		
	82,1	83,7		
	—	85,3		
II	69,9	72,6	69,6	73,6
	66,2	74,5		
	70,5	73,6		
	73,4	75,9		
	68,2	71,5		
III	84,8	86,7	83,3	86,7
	86,0	86,3		
	81,7	86,3		
	82,5	88,0		
	81,5	86,3		

* 10 ml Acetatpuffer 2 : 1
 10 ml 4 ‰ige Oxalsäure
 10 ml DAS-Lösung (125 mg/500 ml H₂O)
 42 ml Acetatpuffer 1 : 5

** 10 ml 0,66 m Phosphatpuffer pH 8,1
 10 ml 4 ‰ige Oxalsäure
 10 ml DAS-Lösung (125 mg/500ml H₂O)
 42 ml Acetatpuffer 1 : 5

Tabelle 5

Reduktionsverlauf von Dehydroascorbinsäure in Abhängigkeit von der Zeit*
(Werte in % AS)

DAS-Lösung	Einleitungsdauer 10 — 15 min. Red.-pH-Wert 3,5		Mittelwert	
	Sofort untersucht	nach 16 Stunden untersucht	(sofort)	(nach 16 Stunden)
1	73,2	79,0		
	73,9	80,9		
	75,5	78,5		
	75,5	84,5	74,5	80,7
2	83,5	85,9		
	81,0	84,0		
	82,6	88,6	82,4	86,2
3	86,3	91,6		
	86,6	88,5		
	85,4	—	86,1	90,1

- * 2 ml Acetatpuffer 2 : 1
2 ml 4 %ige Oxalsäure
2 ml DAS-Lösung (125 mg/500 ml H₂O)
6 ml Acetatpuffer 1 : 5

Tabelle 6

Stabilität der Ascorbinsäure in Metaphosphorsäure nach H₂S-Behandlung

Phosphatpuffer 2 : 1* Reduktions-pH-Wert 6,5 AS wiedergefunden (%) 10 min. mit H ₂ S reduziert	
Sofort untersucht	Nach 16 Stunden untersucht
92,5	90,8
92,1	88,2
90,6	88,9
96,7	97,1
91,2	92,9
89,4	90,8
94,9	90,8
93,9	90,3
96,0	—
93,1	87,9
95,7	92,7
95,4	89,6
<u>93,5</u>	<u>90,9</u>

- * 8 ml 0,66 m Phosphatpuffer pH = 8,1
3 ml 10 %ige Metaphosphorsäure
1 ml AS-Lösung (125 mg AS/200 ml)

Tabelle 7

Stabilität der Ascorbinsäure in verschiedenen Puffern nach H₂S-Behandlung

Acetatpuffer 1 : 2* Red.-pH-Wert 3,3	Phosphatpuffer 2 : 1** Red.-pH-Wert 6,5
AS nach Reduktion wiedergefunden (%)	
91,9	90,7
98,3	97,4
99,8	94,6
94,1	96,3
100,6	94,0
95,4	91,6
95,2	92,9
93,5	93,6
<hr/>	<hr/>
96,1	93,9

* 2 ml Acetatpuffer 2 : 1
 3 ml 10 %ige HPO₃
 1 ml AS-Lösung (125 mg/200 ml)
 6 ml Acetatpuffer 1 : 5

** 8 ml Phosphatpuffer (0,66 m)
 3 ml 10 %ige HPO₃
 1 ml AS-Lösung (125 mg/200 ml)