

Spezifische Vitamin-C-Bestimmung

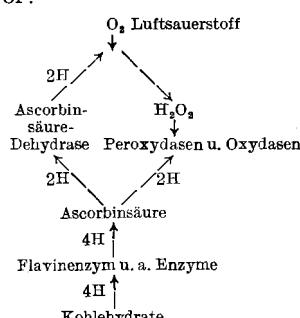
Von Dr. M. OTT, Darmstadt

Aus der Abteilung für Biochem. Qualitätsforschung der Landw. Versuchsstation Darmstadt

A. Theoretische Grundlagen.

Seitdem bekannt ist, daß das Vitamin C außer als Ascorbinsäure auch in Form von deren Dehydroderivat wirksam ist, besteht in der Literatur eine Unklarheit der Bezeichnungsweise, damit „Vitamin C“ einmal nur die Ascorbinsäure, im anderen Falle dagegen die Summe von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, also das sog. „Gesamtvitamin C“, gemeint ist; denn ein Teil der Analytiker lehnt die Miterfassung der Dehydroascorbinsäure ab aus Besorgnis, daß durch die dazu notwendige Behandlung mit Schwefelwasserstoff noch andere reduzierende Verbindungen gebildet und schließlich als Vitamin C miterfaßt werden könnten; eine andere Gruppe von Analytikern dagegen rechnet nur mit den Gesamtvitamin-C-Werten, während eine dritte Gruppe, zu der sich bislang der Verfasser zählte, beide Formen bewertet wissen wollte. Daß die alleinige Bestimmung der Ascorbinsäure in sehr vielen Fällen nur einen Teil der Vitamin-C-Wirksamkeit erfaßt, geht schon aus einer kurzen Betrachtung des biologischen und chemischen Verhaltens der Ascorbinsäure hervor.

Die Hauptrolle der Ascorbinsäure im Stoffwechsel der Pflanze besteht wahrscheinlich in ihrer Wirkung als Wasserstoffüberträger bei der Atmung und vielleicht auch bei der Assimilation. Dabei gibt ein Mol Ascorbinsäure in ständigem Wechsel je 2 Atome Wasserstoff an Fermentsysteme mit höherem Redoxpotential, wie Peroxydase, Polyphenoloxidase und Ascorbinsäuredehydase, ab, um wiederum 2 Atome Wasserstoff von Systemen niedrigeren Redoxpotentials, wie z. B. dem Flavinenzym, zu erhalten. Th. Bersin¹⁾ stellt sich die Beteiligung der Ascorbinsäure bei der Pflanzenatmung etwa nach folgendem Schema vor:



Nach dieser Vorstellung nimmt also die Ascorbinsäure bei der Atmung derjenigen Pflanzen, die außer den gewöhnlich vorhandenen Peroxydases und Oxydasen noch über eine spezifische Ascorbinsäuredehydase verfügen sollen, in zweierlei Weise am Wasserstofftransport teil. Der molekulare Sauerstoff tritt zuerst mit der Ascorbinsäuredehydase in Reaktion und übernimmt deren leicht beweglichen Wasserstoff, der über die Vermittlung der Ascorbinsäure und verschiedener Fermente letzten Endes von den zu veratmenden Kohlenhydraten stammt. Dabei entsteht Wasserstoffperoxyd. Von diesem

übernehmen dann die Peroxydases und Oxydasen die Hälfte des Sauerstoffs, um ihn erneut mit dem über die Ascorbinsäure und die betreffenden Fermentsysteme herangeschafften Wasserstoff der Kohlehydrate zu vereinigen. Wenn nun auch diese hypothetische Darstellungsweise die Möglichkeit offen läßt, daß bei dem niederen Redoxpotential der lebenden Pflanze das Vitamin C praktisch meist als Ascorbinsäure in Erscheinung tritt, so ist doch zu bedenken, daß in dem Augenblick, da die Pflanze für die Analyse geerntet wird, die Bedingungen für die allmähliche Oxydation der Ascorbinsäure gegeben sind, und tatsächlich tritt dann auch, wie von verschiedenen Forschern festgestellt wurde, besonders bei den Blattpflanzen die Überführung der Ascorbinsäure in die Dehydroascorbinsäure ein. Die Überachtlassung der letzteren Form muß also bei nicht mehr ganz frischen Ernteprodukten zu niedrige Vitamin-C-Werte ergeben. Wird weiterhin im Gange der Analyse bei der Zerkleinerung und Extraktion der Zellverband zerissen und dem freien Spiel aller Komponenten Raum gegeben, so sind noch die verschiedenartigsten Reaktionen in Betracht zu ziehen. Von diesen soll hier jedoch nur die wichtigste Erwähnung finden, die bislang außer acht gelassen wurde:

Wenn man den Eisengehalt zahlreicher Pflanzen, besonders der grünen Organe, mit deren Ascorbinsäuregehalt vergleicht, so ergibt sich, daß die Konzentration des Eisens die der Ascorbinsäure oft wesentlich übertrifft. Dieses Eisen bleibt nun im Laufe der Vitamin-C-Bestimmung bei der heute gebräuchlichen Extraktion mit Metaphosphorsäure nicht etwa im Rückstand, sondern geht zum großen oder sogar größten Teil in Lösung. Da das Eisen von der Pflanze praktisch fast ausschließlich in der Ferriform aufgenommen wird, erscheint es primär also auch als solches im Pflanzengewebe, was jederzeit festzustellen ist. Wenn aber dreiwertiges Eisen und Ascorbinsäure zusammentreffen, so reagieren sie augenblicklich miteinander unter Bildung von zweiwertigem Eisen und Dehydroascorbinsäure. Diese Feststellung wurde vom Verfasser bereits vor Veröffentlichung der Arbeit von Schulek-Flodever²⁾, die auf dieser Tatsache eine neue Ascorbinsäurebestimmung aufbauen wollen, gemacht. Es ist nun fraglich und auch nicht leicht festzustellen, ob und wo das dreiwertige Eisen und die Ascorbinsäure in der lebenden Pflanze zusammentreffen und miteinander reagieren, obschon beide Stoffe im Chloroplasten vorkommen sollen; aber während der Zerkleinerung und Extraktion müssen sie miteinander reagieren, so daß also, wenn die Konzentration des Ferrieisens die der Ascorbinsäure übertrifft, bei der Titration mit Dichlorphenolindophenol oder anderen oxydierenden Lösungen nicht die Ascorbinsäure als solche, sondern die ihr äquivalente Menge zweiwertigen Eisens titriert wird; genau genommen etwas weniger, weil die Metaphosphorsäure zwar die Ascorbinsäure, nicht aber das zweiwertige Eisen vor der Oxydation durch den Luftsauerstoff schützt. Wird dagegen in einer eisenreichen Pflanze das „Gesamtvitamin C“ durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff

¹⁾ Kurzes Lehrbuch d. Enzymologie, Leipzig 1938, S. 144.

²⁾ Diese Ztschr. 52, 615 [1939].

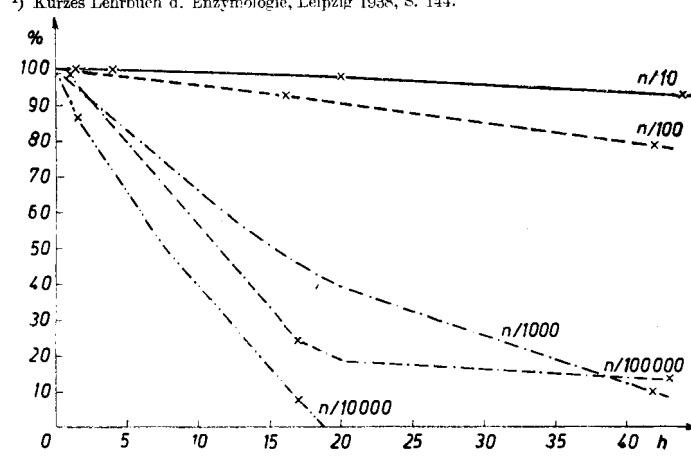


Abb. 1. Wässrige Ascorbinsäurelösung, pH ~ 5.

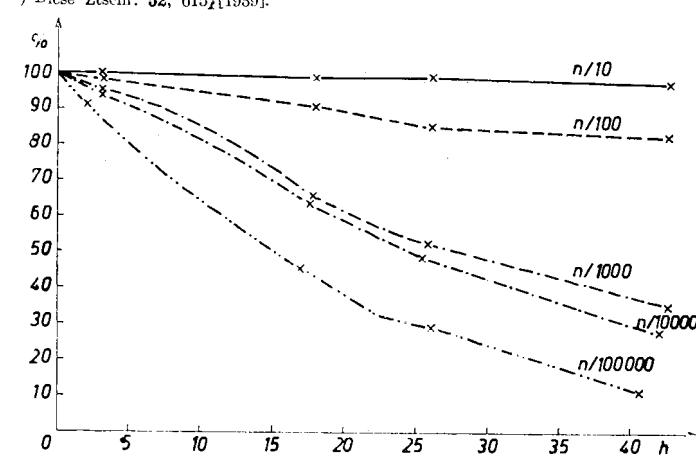
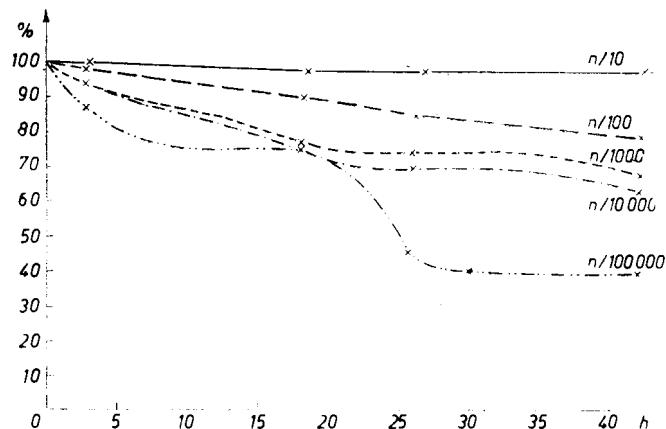


Abb. 2. Citratpuffer, pH ~ 3.

Abb. 3. Citratpuffer. $\text{pH} \sim 7$.

bestimmt, so fallen die Werte durch das mitreduzierte Eisen zu hoch aus, sofern nicht dafür Sorge getragen wird, daß das Eisen als Sulfid quantitativ abgetrennt wird.

Die Feststellung der Störung der Ascorbinsäure- und Gesamtvitamin-C-Bestimmung durch das Eisen gibt der ganzen eingangs erwähnten Frage ein neues Gesicht. Es ist leicht einzusehen, daß wir uns zur Ermittlung der Vitamin-C-Wirksamkeit von Ernteprodukten nicht mit der bisherigen Ascorbinsäurebestimmung begnügen dürfen, die nur den bis zur Aufarbeitung als Ascorbinsäure bestehen gebliebenen Anteil des gesamten C-Vitamins einigermaßen genau angibt, unter der vielleicht nicht immer zutreffenden Voraussetzung, daß das 3wertige Eisen allein durch die Ascorbinsäure reduziert wurde. Möglicherweise ist es doch noch anders, was die etwas höheren Zahlen der neuen Ascorbinsäurebestimmungsmethode nach Schulek-Floderer²⁾ im Citronensaft erklären könnte. Somit kommt also für die Beurteilung des Vitamin-C-Wertes irgendwelcher Ernteprodukte nur der Gesamtvitamin-C-Bestimmung ein praktischer Wert zu. Bei dieser aber sind alle bisherigen Erfahrungen über die Möglichkeit der Stabilisierung der Ascorbinsäure und deren Störung zu beachten, denn jede Stabilisierung der Ascorbinsäure bedeutet zugleich eine Erhaltung des Gesamtvitamin C.

B. Die Haltbarkeit von Ascorbinsäurelösungen.

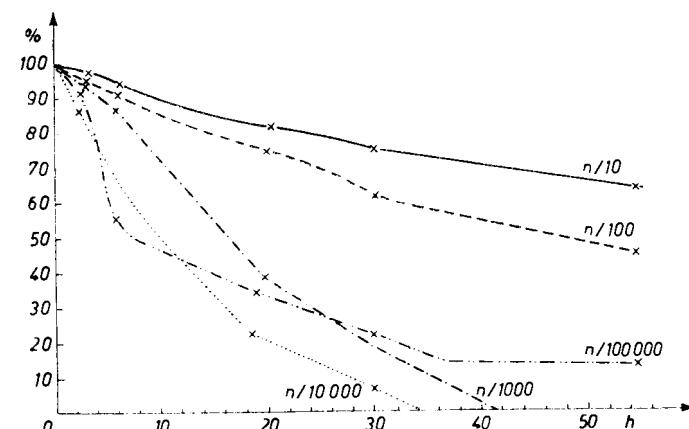
An Hand eingehender Versuchsreihen wurde mit K. O. Ganguin die Haltbarkeit von Ascorbinsäurelösungen bei verschiedener Konzentration, verschiedenem p_H , bei Anwesenheit von Schwermetallspuren und bei Temperaturerhöhungen geprüft. Das zu diesen Versuchen benutzte Wasser war aus einer Jenaer Glasapparatur destilliert und wurde vor der Verwendung nochmals unter Paraffin ausgekocht, um die Luft daraus zu vertreiben. Bei diesen Versuchen wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

1. Der Einfluß der Konzentration.

Die Haltbarkeit von Ascorbinsäurelösungen nimmt mit zunehmender Verdünnung von $\text{n}/_{10}$ bis $\text{n}/_{10000}$ ab, um bei dieser Konzentration einen tiefsten Wert zu erreichen. Bei $\text{n}/_{10000}$ steigt die Haltbarkeit wieder an. Diese Reihenfolge gilt nicht nur für reine wäßrige Lösungen, sondern auch für gepufferte bei verschiedenstem p_H (Abb. 1—4) und bei verschiedener Temperatur.

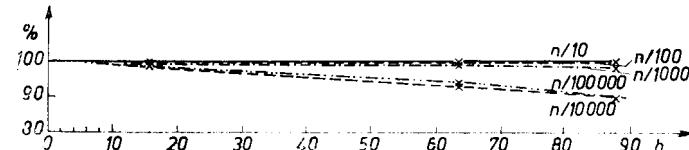
2. Der Einfluß des p_H .

Bei steigenden p_H -Werten nimmt die Haltbarkeit der Ascorbinsäurelösungen ab. Diese Gesetzmäßigkeit zeigt sich in Abb. 2—4 streng nur bei den geringeren Verdünnungen. Zur Einstellung des p_H wurde Citratpuffer benutzt. Wie der Vergleich mit der Oxydation der reinen Ascorbinsäurelösung in Abb. 1 deutlich macht, kommt dem Citratpuffer bei den hier untersuchten p_H (3,7 u. 10) offenbar eine, wenn auch geringe stabilisierende Wirkung zu. Das ist um so bemerkenswerter, als K. O. Ganguin bei Redoxpotentialmessungen die interessante Feststellung machte, daß bei Anwesenheit von Citratpuffer vom p_H 5—6 die Mischung gleicher Teile Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure eine spontane Zersetzung unter Dunkelfärbung erleidet. Weder bei darüber und darunter liegenden p_H -Werten noch bei Anwendung von Phosphatpuffer des kritischen p_H konnte diese Erscheinung festgestellt werden.

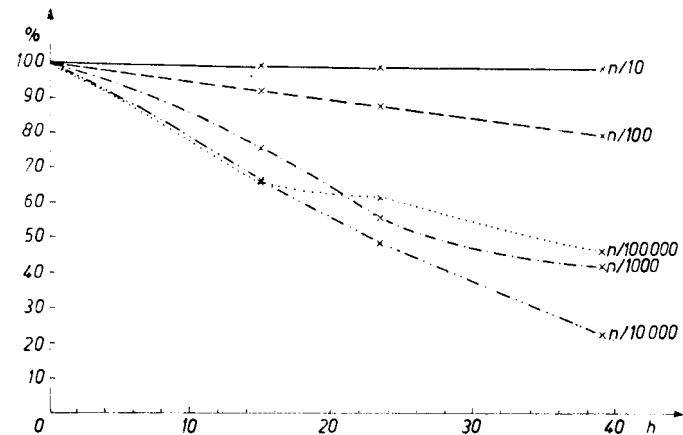
Abb. 4. Citratpuffer. $\text{pH} 10$ in $\text{n}/_{10}$ -Lösung.

3. Der Einfluß von Metaphosphorsäure.

Die Metaphosphorsäure findet wegen ihrer stabilisierenden Wirkung auf Ascorbinsäure häufige Anwendung zur Extraktion des Vitamin C. Diese Wirkung wird durch den Vergleich von Abb. 5 mit den vorhergehenden Abbildungen in einer Weise

Abb. 5. In 2%iger HPO_4 , $\text{pH} \sim 1.5$.

veranschaulicht, die keiner weiteren Worte bedarf. Daß das wirksame Agens dabei jedoch nicht das sehr niedrige p_H (etwa 1,5) an sich ist, geht aus Abb. 6 hervor, die die Abnahme

Abb. 6. In 2%iger Trichloressigsäure. $\text{pH} \sim 1.5$.

der Ascorbinsäure in Trichloressigsäure von annähernd gleichem p_H zeigt. Andererseits jedoch scheint die Wirkung an die freie Metaphosphorsäure gebunden zu sein, weil ein entsprechender Einfluß der Metaphosphate von uns u. a. Autoren nicht festgestellt werden konnte.

Die stabilisierende Wirkung der Metaphosphorsäure beschränkt sich nicht auf die Oxydation reiner Ascorbinsäurelösungen bei möglichstem Luftabschluß in der Kälte. Sie tritt ebenso in Erscheinung beim Erhitzen, bei Zusatz von Metallsalzen, beim Schütteln mit Luft und bei Zugabe von Oxydationsmitteln. Der Einfluß dieser Faktoren wurde daher jeweils in wäßriger und in 2%iger metaphosphorsaurer Lösung untersucht.

4. Der Einfluß der Temperatur.

a) Erhitzung auf 50° während mehrerer Stunden.

Ascorbinsäurelösungen geringerer Verdünnung ($\text{n}/_{10}$ und $\text{n}/_{100}$) sind bei Luftabschluß auch gegenüber mehrstündiger Erhitzung auf 50° sehr stabil (Abb. 7). Stärker verdünnte Lösungen $\text{n}/_{1000}$ bis $\text{n}/_{100000}$ dagegen sind bereits nach 2—5 h zum größten Teil oxydiert. Auch zeigt sich wieder die $\text{n}/_{10000}$ -Lösung

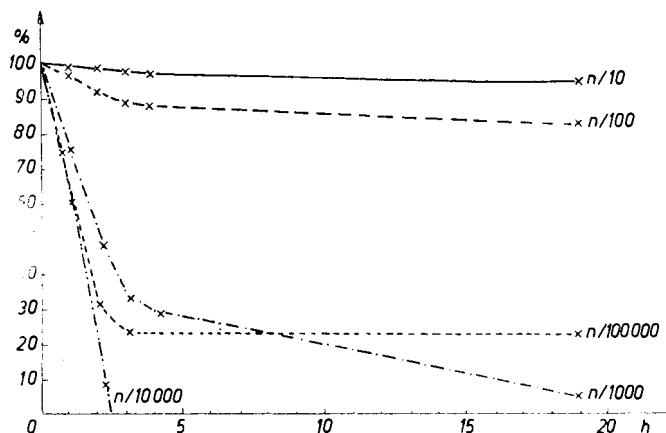


Abb. 7. Wässrige Lösung bei 50°. pH ~ 3—5.

stabilier als die $n/10000$ - und schließlich als die $n/1000$ -Lösung. In 2%iger Metaphosphorsäure findet auch bei den stärkeren Verdünnungen in den ersten 8—10 h keine wesentliche Oxydation statt (Abb. 8).

b) Kurze Erhitzung auf 80°.

Tabelle 1.

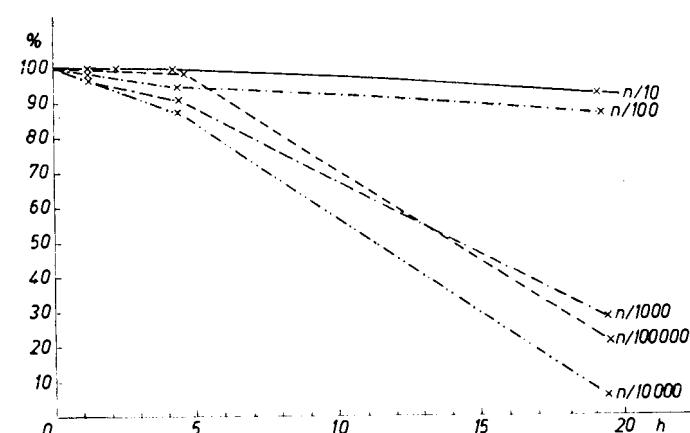
Konzentration	Art der Lösung	Noch vorhandene Ascorbinsäure nach		
		5 min	10 min	120 min
$n/1000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	100 % 100 %	100 % 92,3%	37,5%
$n/10000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	96,8% 95,4%	89,8% 89,1%	28,0%
$n/100000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	98,2%	85,3% 90,0%	50,8%

Bei nur 5—10 min langer Erhitzung der Ascorbinsäurelösung auf 80° bei Luftabschluß ist auch bei größeren Verdünnungen noch kein wesentlicher Abfall festzustellen, so daß hier auch die Wirkung der Metaphosphorsäure nicht zum Ausdruck kommt.

c) Kurze Erhitzung auf 98°.

Tabelle 2.

Konzentration	Art der Lösung	Nach 5 min noch vorhandene Ascorbinsäure	
		93,6%	98,3%
$n/1000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	93,6%	98,3%
$n/10000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	73,8%	84,7%
$n/100000$	wässrige Lösung in 2% HPO ₃	29,7%	66,6%

Abb. 8. In 2%iger HPO₃ bei 50°. pH ~ 1,5.

Die Erhitzung von Ascorbinsäurelösungen auf den Siedepunkt bei Luftabschluß bewirkt nach 5 min besonders bei den niedrigsten Konzentrationen eine starke Senkung. Hier wird der hemmende Einfluß der Metaphosphorsäure wieder deutlich.

5. Der Einfluß von Schwermetallsalzen.

Bei dieser Versuchsreihe erfolgte ein Zusatz von Eisen- und Kupfersalzen in verschiedener Konzentration zu $n/10000$ -Ascorbinsäurelösungen, da sich die Ascorbinsäure bei dieser Verdünnung als besonders instabil erwies (Tabelle 3).

Wenn man berücksichtigt, daß bei den gewählten Konzentrationen durch direkte Reaktion des 3wertigen Eisens mit der Ascorbinsäure etwa 20% sofort oxydiert werden, erscheint es zunächst durchaus glaubhaft, daß bei Zugabe entsprechender Mengen 2wertigen Eisens ein Restwert von rd. 20% des anfänglichen Titrationswertes erhalten bleibt (s. Abb. 9). Die Frage, ob dieser Restwert jedoch dem zweiwertigen Eisen oder der Ascorbinsäure zukommt, dürfte experimentell zu beantworten sein, wie weiter unten ausgeführt wird. Damit ist aber keine Erklärung dafür gegeben, daß bei Verwendung äquivalenter Mengen 3wertigen Eisens kein Restwert erhalten wird; denn das 3wertige Eisen wird aller Wahrscheinlichkeit nach sofort reduziert, und damit ist praktisch der nämliche Zustand gegeben wie im anderen Falle. Wie dem auch sei, die katalytische Wirkung der beiden Eisenformen auf die Oxydation der Ascorbinsäure steht außer allein Zweifel. Sie wird jedoch noch wesentlich durch die des Kupfers übertroffen, das sogar noch in einer Konzentration von $n/40000$ in 9 h eine fast vollständige Oxydation herbeiführt. Diese Feststellung ist nichts grundsätzlich Neues, sie fügt nur den Ergebnissen anderer Forscher, wie C. M. Lyman, M. O. Schultz u. C. G. King³⁾ in Amerika

³⁾ J. biol. Chemistry 118, 757 [1937].

Tabelle 3.

Art der Lösung	Zusatz	Metall	Konzentration	Noch vorhandene Ascorbinsäure nach min																
				10	15	20	25	30	45	60	90	120	150	180	300	360	420	530	1020	1260
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeII (FeSO ₄ · 7 H ₂ O)	$n/50000$.	87	64	.	40	.	25	.	.	.	16	.	.
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeIII (FeCl ₃)	$n/50000$.	86,7	49	.	87	.	83	.	.	.	78	.	.
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeII + FeIII	$n/50000$.	100	97	.	.	6,3
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	Cu (CuSO ₄)	$n/40000$	0,0	96	96	.	92	.	92	.	.	.	92	.	.
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	Cu	$n/800000$.	21	.	0,0	.	.	.	99,5	94,3	.	.
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	Cu	$n/160000$	67,5	.	100	.	.	25	5,5	.	.	.	99,5
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	Cu	$n/400000$	87	70,5	68	.	.	54,5	.	.	17	.	5	.	.	
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeII + Cu	$n/50000$	13,7	.	99	5,5	94,6
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeIII + Cu	$n/40000$	29	.	5	98	.	.	.	88	.	.	.	67	.	.
Wässrige Lösung 2% Metaphosphorsäure	FeII + FeIII + Cu	je $n/50000$	45	.	.	30	.	29	.	27	.	.	27	69	.	.
		$n/40000$	100	95	.	95	69	.	.

und Reisner⁴⁾ u. a. in Deutschland, neue Zahlenwerte hinzu⁵⁾. Ähnlich wie Kupfer allein verhält sich Kupfer mit 2- oder 3wertigem Eisen. Es überrascht daher, daß Kupfer in Zusammenwirkung mit 2- und 3wertigem Eisen einen Reduktionswert von 20—30% des Ursprünglichen bestehen läßt, ähnlich wie 2wertiges Eisen allein oder 2- und 3wertiges Eisen zusammen. Auf diese Erscheinung soll unten noch eingegangen werden.

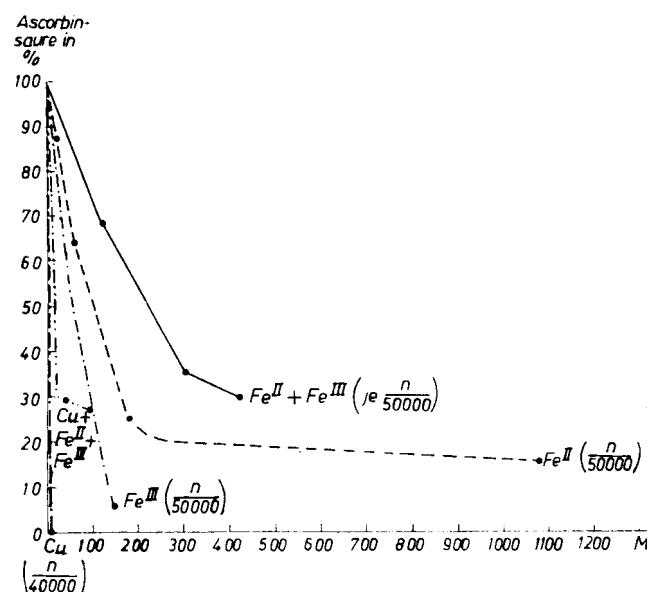


Abb. 9. Autoxydation der Ascorbinsäure ($n/10000$) in Gegenwart von Schwermetallsalzen in wässriger Lösung.

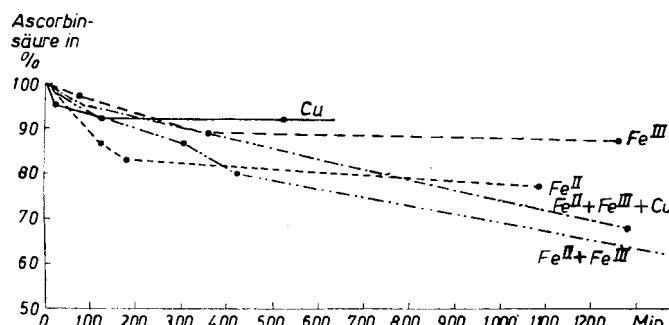


Abb. 10. Erhaltung der Ascorbinsäure ($n/10000$) in Gegenwart von Schwermetallsalzen durch die Einwirkung der Metaphosphorsäure.

Der Vergleich von Abb. 9 und 10 offenbart eindeutig die Oxydationshemmung durch die Metaphosphorsäure. Sie ist beim Kupfer besonders auffallend. Es fällt schwer zu entscheiden, welche Erscheinung erstaunlicher ist, die hormonartige und biologisch hochwichtige Wirkung des Kupfers oder deren Hemmung durch die Metaphosphorsäure, beide hervorgerufen durch altbekannte Stoffe der anorganischen Chemie. Es ist sehr einleuchtend, wenn Lyman u. Mitarb. die beiden Reaktionen kombinieren durch die Auffassung, daß die Wirkung der Metaphosphorsäure hinsichtlich der Erhaltung der Ascorbinsäure überhaupt auf der Ausschaltung der katalytischen Wirkung kleinsten Spuren Kupfer und auch anderer Schwermetalle beruht. Es bestehen keine Bedenken, sich dieser Auffassung anzuschließen.

6. Der Einfluß des Sauerstoffs ohne und mit Schwermetallzusatz.

Wenn man $n/10000$ wässrige Ascorbinsäurelösung im geschlossenen Gefäß in einer Schüttelmaschine mit Luft in Berührung bringt, vollzieht sich die Oxydation, wie vorausgesessen, wesentlich schneller; bereits nach 200 min sind nur noch 35% der Ascorbinsäure festzustellen (Abb. 11). Bei Zu-

gabe von $n/40000$ Kupfersalz (CuSO_4) erfolgt, wie schon gezeigt, die Oxydation der Ascorbinsäure bereits bei möglichstem Luftsauerschluß so augenblicklich, daß hier die Wirkung des Luftsauerstoffs nicht zum Ausdruck kommt. Bei Anwendung von $n/40000$ Kupfersalz dagegen ist sie offenbar. Die augenblickliche Oxydation der Ascorbinsäure erfordert also bei Anwesenheit sehr geringer Mengen Kupfer eine größere Menge Luftsauerstoff, woraus sich schließen läßt, daß die Kupferwirkung tatsächlich nichts anderes darstellt, als eine Beschleunigung der Umsetzung von Ascorbinsäure mit Luftsauerstoff. Dies wird ausdrücklich erwähnt, weil bei eigenen Versuchen eines bisher fragwürdig schien: die Vorstellung nämlich, daß die Ascorbinsäure in einer Konzentration von $n/10000$ in dem unter Paraffin ausgekochten und erkalteten Wasser noch genügend Sauerstoff zu einer augenblicklichen Oxydation vorhanden soll. Es ist jedoch zu erwarten, daß eine Sauerstoffbestimmung dieses Wassers das bestätigen würde.

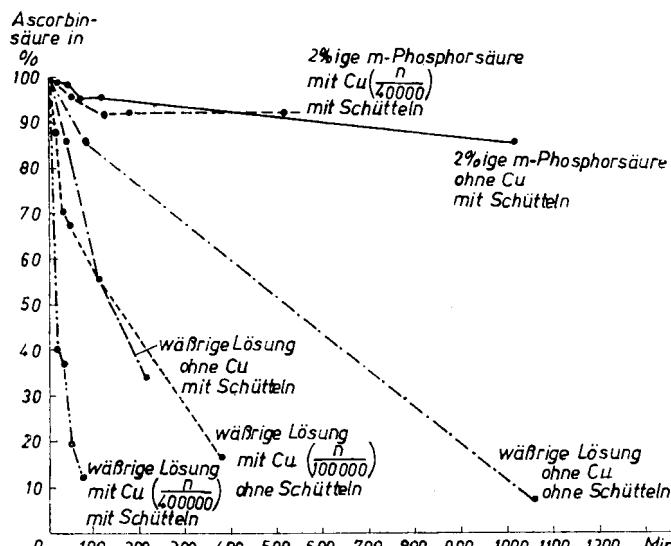


Abb. 11. Oxydation von $n/10000$ -Ascorbinsäurelösung in Anwesenheit von Schwermetallen und beim Schütteln mit Luft.

Die hemmende Wirkung der Metaphosphorsäure (Abb. 11) erwies sich als von der Menge des zur Verfügung stehenden Luftsauerstoffs — wenigstens in gewissen Grenzen — unabhängig. Daraus ist entsprechend der oben anerkannten Auffassung über die Natur dieser Hemmung zu folgern, daß bei völligem Ausschluß von Schwermetallspuren auch stark verdünnte Ascorbinsäurelösungen selbst in Berührung mit Luftsauerstoff oder Wasserstoffperoxyd beständig sind. Lyman u. Mitarb. haben das auch experimentell festgestellt und bauten darauf ihre Ansicht über die Metaphosphorsäurewirkung auf.

In allen diesen Versuchen wurde die Frage unberührt gelassen, wieweit die Oxydation der Ascorbinsäure unter den verschiedenen Bedingungen geht, ob dabei nur das reversible Oxydationsprodukt Dehydroascorbinsäure oder auch andere Umsetzungsprodukte gebildet werden. Auf diese Frage gab H. Borsook⁶⁾ die Antwort, der fand, daß unterhalb $\text{pH} 4,5$ die Oxydation bei der Stufe der Dehydroascorbinsäure stehen bleibt, während sie bei höherem pH weiter geht, ein sehr bemerkenswertes Ergebnis, sofern es sich voll bestätigen läßt.

C. Eine spezifische Bestimmung des C-Vitamins.

Aus dem bisher Ausgeführten erscheinen die folgenden Einzelfeststellungen zum Aufbau einer spezifischen Vitamin-C-Bestimmungsmethode geeignet, die auch den durch Anwesenheit des Eisens bedingten Fehler ausschließt:

- Um das ganze Vitamin C in einem Extrakt zu ermitteln, ist es notwendig, den Extrakt zu reduzieren, weil damit zu rechnen ist, daß wenigstens ein Teil der Ascorbinsäure zur Dehydroform oxydiert vorliegt.
- Bestimmte kupferhaltige Pflanzenfermente führen die Ascorbinsäure augenblicklich in Dehydroascorbinsäure über.

⁴⁾ Promotionsarbeit, Universität München, 1939.

⁵⁾ Es möge mir von anderen um diese Fragen verdienten Forschern verziehen werden, wenn hier ihre Arbeiten und Namen unerwähnt bleiben, da ich infolge des Krieges keine Möglichkeit zur Benutzung einer Fachbücherei habe.

⁶⁾ H. Borsook, H. W. Davenport, C. E. P. Jeffreys u. Werner, J. biol. Chemistry 117, 237 (1937).

3. Diese Wirkung wird auch durch Kupfersalze noch in Konzentrationen von $n/_{40000}$ und darunter erzielt.
4. Metaphosphorsäure hemmt die katalytische Oxydation der Ascorbinsäure durch Kupfersalze.
5. Unterhalb p_H 4,5 geht die Autoxydation der Ascorbinsäure auch ohne Verwendung von Metaphosphorsäure nicht über die reversible Dehydroascorbinsäure hinaus.

Nachdem bereits auf der Tagung der Reichsarbeitsgemeinschaft „Vorratspflege“ im Forschungsdienst vom 1. und 2. Juli 1940 in Berlin kurz über den Grundgedanken der neuen Bestimmungsmethode berichtet wurde, sei er hier nochmals wiedergegeben⁷⁾:

Die Zerkleinerung erfolgt in einer Porzellankugelmühle mit Lochdeckel (Bloch-Rosetti-Kugelmühlen von Hormuth-Vetter-Heidelberg) unter Zusatz des Extraktionsmittels, Glassand und eines kleinen Stücks fester Kohlensäure zur Tiefhaltung der Temperatur und Vertreibung des Luftsauerstoffs. Die staubfeine Vermahlung von 5 g Blattmaterial dauert in der 250-cm³-Mühle bei 300 bis 400 U/min etwa 15 min. Zur Extraktion wird der Ansatz nach dem Zerkleinern quantitativ in einen Zentrifugenbecher (Glas) übergepült, zentrifugiert (2800 U genügen) und zweimal mit dem Extraktionsmittel in der Zentrifuge nachgewaschen. Die Extrakte werden in einem Meßkolben (200 cm³) vereinigt.

Die Extraktion des Vitamins C erfolgt mit Schwefel- oder reinster Orthophosphorsäure, nicht mit Metaphosphorsäure, u. zw. gerade wegen der Eigenschaft, die sie bisher für diesen Zweck unentbehrlich zu machen schien, der Stabilisierung der Ascorbinsäure in Anwesenheit von Kupfersalzen. Die Konzentration der verwendeten Säure muß so gewählt werden, daß das p_H des Extraktes beträchtlich unter 4,5 bleibt.

Der Extrakt wird sogleich reduziert, wobei es gleichgültig ist, wenn außer der Ascorbinsäure noch andere reduzierende Stoffe gebildet werden. Durch Titration mit Dichlorphenolindophenol wird in gewohnter Weise der Gesamtreduktionswert des reduzierten Extraktes gemessen. Nach Hinzufügung einiger Kristallchen Kupfersulfat zu einem zweiten Anteil der Lösung und kurzem Stehenlassen (höchstens 10 min) wird nochmals titriert und so der Resttitrationswert ermittelt. Der durch die Kupferwirkung verschwundene Titrationswert kommt der Ascorbinsäure und damit dem Gesamt-Vitamin-C-Gehalt zu.

Der wesentlichste praktische Vorzug dieser Methode besteht darin, daß die Reduktion der Dehydroascorbinsäure nicht nach der wenig angenehmen Schwefelwasserstoffmethode durchgeführt werden muß. Zur Reduktion kommen alle diejenigen Verfahren in Frage, die einen möglichst geringen Überschuß des Reduktionsmittels erfordern und das p_H nicht über 4,5 heraufsetzen, z. B. also Cadmiumreduktor, Zink oder Aluminium, Palladiumwasserstoff, Chromo- oder Titanosalze, deren Überschuß rasch verschwindet.

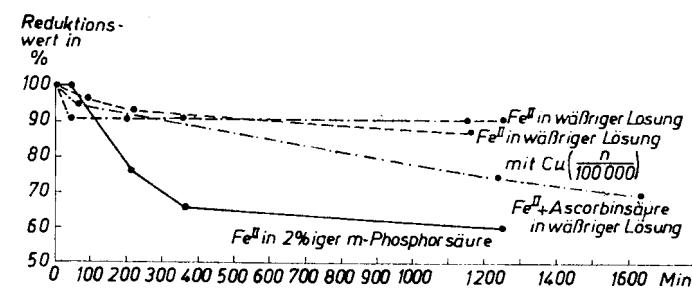
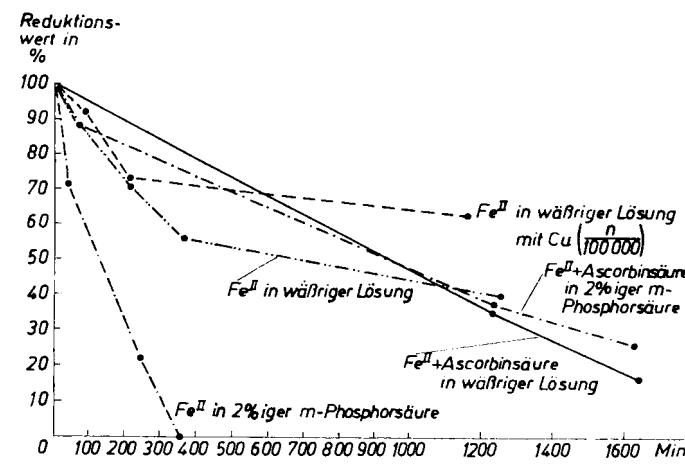
Die Auffindung einer passenden und eleganten Reduktionsmethode wird bestimmt, erheblichen praktischen Schwierigkeiten begegnen, wenn man dabei die in Frage kommenden Vitamin-C-Konzentrationen von $n/_{1000}$ bis $n/_{10000}$ zugrunde legt. Bei diesen Konzentrationen können Methoden versagen, die sonst allgemein und mit Vorteil gebraucht werden.

Die zweite Frage ist die zweckmäßigste Kupferkonzentration. Sie muß experimentell bei dem vorliegenden p_H ermittelt werden. Zur praktischen Handhabung soll das Kupfersalz in fester Form nach Augenmaß zugegeben werden können.

Die Spezifität der Kupferreaktion kann leicht durch vergleichende Untersuchungen mit Ascorbinsäuredehydrase kontrolliert werden, die man nach der Vorschrift von H. Tauber⁸⁾ aus Kürbisfrüchten gewinnen kann.

Die dritte Schwierigkeit liegt in der Instabilität des 2wertigen Eisens. Die neue Methode hat nur dann Anspruch auf Richtigkeit, wenn zwischen den beiden Titrationen der Eisen(II)-Wert praktisch unverändert bleibt. Aus diesem Grunde wurden bereits mit Ferrosulfat Versuche über die Erhaltung des 2wertigen Eisens angestellt. Die vorläufigen Ergebnisse sind in Abb. 12 u. 13 dargestellt. Danach wirkt 2%ige Metaphosphorsäure auf das 2wertige Eisen keineswegs stabilisierend, sondern sogar oxydationsbeschleunigend. Überraschenderweise wirkte jedoch Kupfer in einer Konzentration von $n/_{100000}$ sichtlich oxydationshemmend. Wenn die Nach-

prüfung dieses Ergebnis bestätigt, bedeutet dies einen weiteren Vorzug der Verwendung des Kupfers zur Vitamin-C-Bestimmung. Die Mischung von $n/_{20000}$ -FeSO₄ und $n/_{20000}$ -Ascorbinsäure ergab ähnliche Werte wie FeSO₄ allein. In 2%iger Meta-

Abb. 12. $n/_{1000}$ Fe^{II}Abb. 13. $n/_{10000}$ Fe^{II}

phosphorsäure fand eine schnellere Oxydation der Mischung statt. Diese Ergebnisse zwingen zu den folgenden Fragen:

1. Kann man durch Verwendung der Metaphosphorsäure in einem Gemisch von Ferroion und Ascorbinsäure unter Erhaltung der Ascorbinsäure das 2wertige Eisen einer beschleunigten Autoxydation aussetzen? (S. Abb. 13.)

2. Kann man durch Verwendung von Kupfersalzen den entgegengesetzten Effekt erzielen? (S. Abb. 13.) Kann man also nacheinander in einer solchen Mischung durch Kupfersalze die Ascorbinsäure und durch Metaphosphorsäure das 2wertige Eisen oxydieren?

3. Kann man in Gegenwart von Kupfersalzen den Reduktionswert von Ascorbinsäurelösungen durch Zugabe von überschüssigem 3wertigen Eisen vor schnellem Abbau schützen, weil das 3wertige Eisen dabei in 2wertiges übergeht, das in Gegenwart des Kupfers relativ beständig ist, im Gegensatz zu Ascorbinsäure?

4. Oxydiert sich Ascorbinsäure in Gegenwart von 3wertigem Eisen in metaphosphorsaurer Lösung vollständig zu Dehydroascorbinsäure unter Bildung von 2wertigem Eisen oder stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Ascorbinsäure und 2wertigem Eisen ein?

Alle diese Fragen, die im übrigen durch die Kupferreaktion beantwortet werden können, zeigen, welche Probleme so einfache und altbekannte Stoffe wie Kupfer und Eisen in Wechselwirkung miteinander und mit organischen Wasserstoffüberträgern bei biologischen Konzentrationen stellen können.

Zusammenfassung.

In vielen Pflanzen tritt neben Vitamin C auch Eisen in bemerkenswerter Menge auf. Auch in Konserven kann Eisen, u.zw. aus der Dose, in besonders großer Menge anwesend sein. Da sich aber 3wertiges Eisen mit Ascorbinsäure unter Bildung von Dehydroascorbinsäure und 2wertigem Eisen umsetzt, das nicht sehr beständig ist, und da außerdem nach der Reduktion des Extraks mit Schwefelwasserstoff zur Gesamtvitamin-C-Bestimmung der Reduktionswert der Ascorbinsäure hinzutritt,

⁷⁾ Die Aufstellung einer entsprechenden Arbeitsvorschrift wird zurzeit in der Landw. Vers.-Station Darmstadt vorbereitet.

⁸⁾ Fortschritte der Fermentforschung, Bd. VII, S. 301.

ist in allen diesen Fällen mit fehlerhaften Resultaten zu rechnen, wenn zur Bestimmung des Vitamins in üblicher Weise vorgegangen wird.

Deshalb wurde das Verhalten der Ascorbinsäure gegenüber den verschiedensten Einflüssen untersucht. Dabei wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forscher gefunden:

Mit wachsender Verdünnung bis 1/_{10000} , mit wachsendem p_{H} und mit zunehmender Erwärmung wird die Ascorbinsäure immer unbeständiger.

Schwermetallsalze, wie Eisen in 2- und 3wertiger Form und besonders Kupfer, erhöhen die Oxydationsgeschwindig-

keit. Dieses oxydiert die Ascorbinsäure sogar augenblicklich, auch bei möglichstem Luftabschluß.

Metaphosphorsäure stabilisiert die Ascorbinsäure in hervorragender Weise, offenbar indem sie die katalytische Wirkung kleiner Metall-, besonders Kupferspuren hemmt.

Diese Ergebnisse führen zu dem Vorschlag einer spezifischen Vitaminbestimmungsmethode, die darin besteht, daß der Extrakt in der Kälte mit Schwefelsäure oder Orthophosphorsäure vom p_{H} unter 4,5 gewonnen, nach einem möglichst handlichen Verfahren reduziert und schließlich vor und nach der Zugabe von Kupfersulfat titriert wird. Die Differenz der beiden Titrationen entspricht dem Vitamin-C-Gehalt.

Eingeg. 6. Januar 1941. [A. 3.]

Analytisch-technische Untersuchungen

Die photometrische Kupferbestimmung in Al-Legierungen der Gattungen Al-Mg-Si, Al-Mg und Al-Si mit Hilfe des Pulfrich-Photometers

Von Dr. E. BISCHOF und G. GEUER

Rheinmetall-Borsig A.-G., Werk Sömmerda (Thür.)

Chemische, metallographische u. physikalische Versuchsanstalt

Am bekanntesten ist und am meisten Eingang gefunden hat die photometrische Bestimmung des Kupfers mit Hilfe des Ammoniakkomplexes. Weit empfindlicher als obiges Verfahren ist die colorimetrische Methode mit Kaliumferrocyanid unter Anwendung eines Schutzkolloids. Diese Methode wird schon seit langem zur halbquantitativen Bestimmung des Kupfers in Lebensmitteln, Wein u. dgl. benutzt¹⁾. Brenner²⁾ hat sie weiter auf die quantitative Bestimmung des Kupfers in Reinaluminium angewandt; als Schutzkolloid diente eine 0,2%ige Gummiarabicumlösung, während Juza³⁾ mit einem Gelatinezusatz (1%ige Gelatinelösung) arbeitete und hiermit auch gute Werte erhalten hat.

Wir haben die Anwendung von Kaliumferrocyanid zur photometrischen Bestimmung der Kupferverunreinigungen in den Al-Legierungen ausgearbeitet und hierbei sehr zufriedenstellende Ergebnisse erhalten.

Arbeitsweise.

1. 1 g Späne der Al-Mg-Si- oder Al-Mg-Legierung werden mit 30 cm³ Salzsäure 1:1 aufgeschlossen und ohne Rücksicht auf eine vollkommene Auflösung des Kupfers 5 cm³ gesättigte Natriumsulfidlösung hinzugegeben.

2. 1 g Späne der Al-Si-Legierung werden mit 30 cm³ Salzsäure 1:1 behandelt und zur restlosen Auflösung des Kupfers mit 3 cm³ H₂O₂ oxydiert; überschüssiges H₂O₂ wird durch Kochen vertrieben, das Silicium durch Filtration abgetrennt und das Filtrat mit 5 cm³ gesättigter Natriumsulfidlösung versetzt.

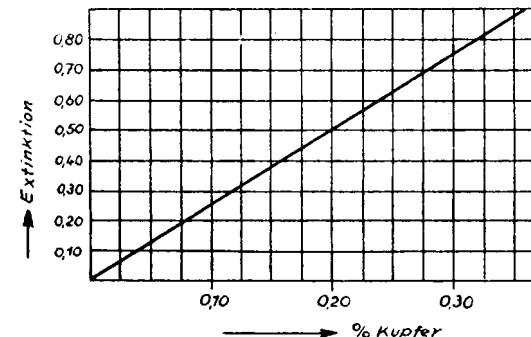
Nach dem Erwärmen wird der Niederschlag abfiltriert, nach kurzem Auswaschen in verd. Königswasserlösung gelöst, auf 10 bis 20 cm³ eingeengt, die klare Lösung in einen 100-cm³-Meßkolben gefüllt, bis zur eben schwach alkalischen Reaktion mit verd. Ammoniaklösung versetzt — bei eintretender Trübung wird eine Filtration eingeschaltet — und dann essigsauer gemacht. Auftreten überschüssiger Ammonsalze ist unbedingt zu vermeiden, da sie die photometrische Kupferbestimmung erheblich beeinträchtigen, die Extinktion wird durch die Ammonsalze erhöht, die Kupferwerte fallen zu hoch aus. Zu der essigsauren Lösung werden 25 cm³ Gummiarabicumlösung und langsam 2 cm³ Kaliumferrocyanidlösung hinzugegeben. Das Ganze wird auf 100 cm³ aufgefüllt. Bei der Ausführung von Serienanalysen geht man am besten so vor, daß alle Proben bis auf die Zugabe von Kaliumferrocyanid gleichzeitig vorbereitet werden; die Lösung soll aber nicht zu lange stehenbleiben, bis sie photometriert wird, da die Beständigkeit schon nach 20 min nachläßt.

Reagentien:

1. Gummiarabicum-Lösung, 15 g/l,
2. Kaliumferrocyanid-Lösung, 10 g/l,
3. Ammoniak, konz.,
4. Essigsäure, konz.,
5. Königswasser-Lösung, 200 cm³ Salzsäure,
100 cm³ Salpetersäure 1:1.
700 cm³ Wasser.

Die Photometrierung wird mit der Hagephotlampe und dem Hg-Filter (436) ausgeführt. Als Kompenstationslösung dient eine wäßrige Gummiarabicumlösung. Zeitdauer: 30 min.

Die Herstellung der Eichkurve erfolgte mit einer reinen Kupfernitratlösung. Hierzu wurden 0,1 g Elektrolytkupfer in Salpetersäure gelöst und die Lösung auf 1000 cm³ aufgefüllt. (1 cm³ der Lösung enthält $1/_{10}$ mg Kupfer.)



In Tabelle 1 sind die gefundenen Werte der Extinktion, der Extinktionskoeffizient und der errechnete Eichfaktor für die verschiedenen Kupfergehalte zusammengestellt.

Tabelle 1.

Gehalt der Kupfernitratlösung an Kupfer %	Extinktion E	Extinktionskoeffizient k	Errechneter Eichfaktor f
0,02	0,05	0,0161	1,20
0,05	0,12	0,04	1,25
0,10	0,26	0,086	1,17
0,20	0,53	0,176	1,14
0,30	0,75	0,25	1,20

Hieraus ergibt sich ein Eichfaktor im Mittel von 1,19. Der Kupfergehalt errechnet sich nach folgender Formel: $c = k \cdot 1,19\% \text{ Kupfer}$.

Die Genauigkeit der vorgeschlagenen Methode zeigen die gefundenen Werte:

Tabelle 2.

Ausgangsmaterial	Einwaage	Cu elektrolytisch gefunden	Cu photometrisch gefunden
Kupfernitratlösung	14 cm ³ = 0,0014 g Cu	0,00135 g	0,00145 g
Legierung Al-Mg	2 g	0,23%	
Legierung Al-Mg	1 g		0,24%
Legierung Al-Mg-Si	2 g	0,12%	
Legierung Al-Mg-Si	1 g		0,11%
Legierung G-Al-Si	2 g	0,13%	
Legierung G-Al-Si	1 g		0,15%

Eingeg. 13. Februar 1941. [A. 12.]

¹⁾ Berl-Lunge, 8. Aufl., 5. Band, S. 289.

²⁾ Chemiker-Ztg. 60, 957 [1936].

³⁾ Diese Ztschr. 50, 255 [1937].