

Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

von Antal Bognár*

Bundforschungsanstalt für Ernährung, Garbenstraße 13, 7000 Stuttgart 70

Einleitung

Vitamin C kommt in natürlichen und bearbeiteten Lebensmitteln als L-Ascorbinsäure (ASC) und Dehydro-L-Ascorbinsäure (DHA) vor. Für die Vitamin C-Wirksamkeit ist die Summe der beiden Verbindungen maßgebend. ASC- und DHA-Gehalte werden wegen ihrer Instabilität häufig auch als Indikatoren für die Messung von Verarbeitungs- und Lagerungseinflüssen bei der Lebensmittelproduktion herangezogen. Eine exakte und schnelle Bestimmung von ASC und DHA in Lebensmitteln ist daher für die Lebensmittelüberwachung und -industrie von großer Bedeutung. Für die quantitative Analyse von Vitamin C in Lebensmitteln wurden bisher schon zahlreiche Verfahren entwickelt¹⁻⁷). Die klassischen Analysenmethoden basieren auf der oxidimetrischen, kolorimetrischen, fluorometrischen und enzymatischen Bestimmung von ASC bzw. DHA¹⁻⁷). Diese Methoden sind entweder zu unspezifisch¹⁻²) oder recht zeitaufwendig³⁻⁷). In den letzten Jahren wurden mehrere Analysenverfahren beschrieben, mit denen durch Einsatz der HPLC unter Verwendung von UV- und Fluoreszenzdetektoren der ASC und/oder DHA im biologischen Material relativ einfach und exakt bestimmt werden können⁸⁻¹³). Auf der Grundlage der Erfahrungen, die wir bei der Erprobung der bereits veröffentlichten Methoden^{4-6, 9-12}) gesammelt haben, wurde ein für die Routinebestimmung von Vitamin C (ASC - DHA) in Lebensmitteln geeignetes HPLC-Analysenverfahren ausgearbeitet. Im folgenden wird die Methode beschrieben und anhand von Analyseergebnissen diskutiert.

Methode

Chemikalien (C)

Hinweis: Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Unter Lösung ist eine wäßrige Lösung zu verstehen. Das Wasser muß entweder destilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

1. meta-Phosphorsäure, Stücke $\zeta = 40-44\%$ ** (HPO₃)_n (z. B. Merck)
2. Essigsäure (Eisessig) $\zeta = 99,8\%$ ** (z. B. Merck)
3. m-Phosphor-, Essigsäurelösung (pH $\cong 0,9$)
75 g m-Phosphorsäure (C.1) mit 200 ml Essigsäure (C.2) und 500 ml Wasser in einem Becherglas (G.4) unter Rühren (G.5) lösen und in einem 1000 ml Meßkolben (G.3) mit Wasser bis zur Marke auffüllen (im Kühlschrank ca. 1 Monat haltbar).
4. Natriumacetat · 3 H₂O (z. B. Merck)
5. Natriumacetatlösung $\zeta = 301,3 \text{ g}^{**}$
500 g Na-Acetat (C.4) in Wasser lösen und in einem 1000 ml Meßkolben (G.3) zur Marke auffüllen.

6. Methanol für die Chromatographie
7. Methanol w = 70%**), 700 ml Methanol (C.6) mit Wasser zu 1000 ml auffüllen.
8. 1,2-Phenylendiamin-dihydrochlorid (z. B. Fluka)
9. 1,2-Phenylendiamin-Lösung, $\zeta = 0,12 \text{ g/l}^{**}$): 20 mg 1,2-Phenylendiamin (C.6) mit 70%igem Methanol (C.7) lösen und in einem 100 ml Kolben (G.3) bis zur Marke einfüllen. Vor Gebrauch jeweils frisch herstellen.
10. Aktivkohle, mit Salzsäure gewaschen (z. B. Sigma)
11. L(+)-Ascorbinsäure (z. B. Merck). Über P₂O₅, lichtgeschützt aufbewahren!
12. L(+)-Ascorbinsäure-Vergleichslösungen
- 12.1 L(+)-Ascorbinsäure-Stammlösung, $\zeta = 1 \text{ mg/ml}^{**}$): 100 mg Ascorbinsäure (C.11) in einem 100 ml Meßkolben (G.3) mit m-Phosphor-, Essigsäurelösung (G.3) lösen und zur Marke auffüllen. Im Kühlschrank 1 Tag haltbar.
- 12.2 L(+)-Ascorbinsäure-Standardlösung I, $\zeta = 0,100 \text{ mg/ml}^{**}$): (pH $\cong 1,4$): 10 ml Stammlösung (C.12.1) und 30 ml m-Phosphor-, Essigsäurelösung (C.3) in einem 100 ml Meßkolben (G.3) mit dest. Wasser zur Marke auffüllen. Vor Gebrauch jeweils frisch herstellen.
- 12.3 L-Ascorbinsäure-Standardlösung II, $\zeta = 0,010 \text{ mg/ml}^{**}$): (pH $\cong 1,4$): 10 ml Standardlösung I (C.12.1) + 30 ml m-Phosphor-, Essigsäurelösung (C.3) in einen 100 ml Meßkolben (G.3) mit Wasser zur Marke auffüllen. Vor Gebrauch jeweils frisch herstellen (andere Verdünnungen analog herstellen!).
13. Natriumacetatpufferlösung für die HPLC (pH $\cong 5,2$): 25 ml Natriumacetatlösung (C.5) und 6 ml m-Phosphor-, Essigsäurelösung (C.3) in einem 1000 ml Meßkolben (G.3) mit Wasser zur Marke auffüllen.
14. Elutionslösung für die HPLC (pH $\cong 6,1$): 1 l Methanol (C.6) und 1 l Natriumacetatpufferlösung (C.13) mischen, mit Ultraschall entgasen.
15. HPLC-Säulenfüllmaterial: Spherisorb ODS 1, Korngröße 10 μm (Phase Sep, England).

Geräte und Hilfsmittel (G)

1. Mixgerät, z. B. Waring Blendor, Fleischwolf, Kutter
2. Ultra-Turrax
3. Glasgeräte: Meßkolben enghalsig 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml. Glastrichter $\varnothing 18,5 \text{ cm}$, 50 ml Braunglaserlenmeyerkolben mit Schliff, 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff
4. Polyethylenbecher, 250 ml
5. Magnetrührer, heizbar und/oder Schüttelmaschine
6. Laborzentrifuge mit 100 ml Zentrifugengläser
7. pH-Meter
8. Faltenfilter, Durchmesser 18,5 cm (z. B. Macherey Nagel 615 1/4)
9. Hochleistungs-Flüssigchromatograph (z. B. Waters 590)
- 9.1 Probenaufgebergerät (z. B. Wisp 712)
10. Spektralfluorometer (z. B. Kontron SFM 23)
11. Rechenintegrator (z. B. Hewlett-Packard)

*) Herrn S. Dieterich danke ich für die zuverlässige Durchführung der Versuche.

**) w = Massenanteil
 ζ = Massenkonzentration

12. Trennsäule für die HPLC (z. B. Knauer) 25 cm lang, 4 mm Ø, gepackt mit Shperisorb ODS (C.15).

Analysengang

Hinweis: Vitamin C ist unbeständig, die Analysenarbeiten sind daher zügig durchzuführen. Der Probenextrakt (Abschnitt 4.) kann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren und bis ca. eine Woche aufbewahrt werden.

1. Probennahme:

Die zu entnehmende Probe sollte in Anteiligkeit und Zusammensetzung repräsentativ für das Untersuchungsmaterial sein. Es ist in jedem Fall von einer reichlich groß bemessenen Menge auszugehen (bei heterogener Zusammensetzung des Lebensmittels ca. das 5- bis 10fache der Einwaage).

2. Vorbereitung der Probe:

Das Probenmaterial ist, falls erforderlich, im Mixer oder Fleischkutter (G.1) unter Stickstoffbegasung zu zerkleinern und danach unverzüglich der Untersuchung zuzuführen. Zu hohe Sauerstoffbelastung und Temperaturerhöhung ist zu vermeiden.

3. Probeneinwaage:

Die Probeneinwaagen liegen je nach dem zu erwartenden Vitamin C-Gehalt zwischen 5 und 50 g. Der Gehalt an Vitamin C sollte zwischen 0,002 und 0,100 mg pro ml Aufschlußlösung liegen.

4. Aufschluß und Extraktion der Probe:

Die nach Abschnitt 2. vorbereiteten, auf 0,1 g genau eingewogenen Analysenproben in einen Polyethylenbecher (G.4) mit 100 ml m-Phosphor-, Essigsäurelösung (C.3) versetzen, mit dem Ultra-Turrax 1 min homogenisieren und das Homogenat in einen 250-ml-Meßkolben (G.3) überführen. Ultraturax und Polyethylenbecher mit ca. 100 ml Wasser nachspülen und mit Wasser zur Marke auffüllen (pH \cong 1,4). Die Aufschlußlösung umschütteln, ggf. 3 min lang rühren (G.5), anschließend etwa 100 ml der Lösung in ein Zentrifugenglas füllen und bei 3500 U/min zentrifugieren (ca. 3 min). Zentrifugat abdekantieren und durch einen Faltenfilter (G.8) unter Verwerfen der ersten Filtratanteile filtrieren (Probenlösung).

5. Herstellung der Meßlösungen:

5.1 Bestimmung von Vitamin C (ASC + DHA)

5.1.1 Oxidation von ASC zu DHA

50 ml der Probenlösung in einem 300 ml Erlenmeyerkolben (G.3) mit 1 g säuregewaschener Aktivkohle (C.10) versetzen, nach 15 sec kräftigem Schütteln durch einen trockenen Faltenfilter unter Verwerfen der ersten Filtratanteile filtrieren (Vit. C-Probenlösung).

5.1.2. Derivatisierung von DHA zu fluoreszierendem 3-(1,2-Dihydroxyethyl) furo (3,4-b) -chinoxalin 1-on (DFC)

10 ml der Vit. C-Probenlösung in einem 100-ml-Meßkolben (G.3) mit 10 ml Natriumacetatlösung (C.5) abpuffern und mit dest. Wasser zur Marke auffüllen (pH \cong 5,0). 2 ml der gepufferten Lösung in einem Braunglaserlenmeyerkolben (G.3) mit 5 ml 1,2-Phenylendiamin-Lösung (C.9) versetzen und bei Zimmertemperatur 60 min langsam rühren oder schütteln. Die Reaktionslösungen ggf. durch einen Ultrafilter reinigen (Vitamin C-Meßlösung).

5.2 Bestimmung von DHA

10 ml der Probenlösung in einem 100 ml Meßkolben mit 10 ml Natriumacetatlösung (C. 5) abpuffern, mit dest. Wasser zur Marke auffüllen und filtrieren. Die Derivatisierung zur DFC-Verbindung erfolgt dann wie in Abschnitt 5.1.2 angegeben (DHA-Meßlösung).

5.3 Externer Standard von L-Ascorbinsäure

50 ml einer ASC-Standardlösung (2 bis 100 µg ASC pro ml m-Phosphor-, Essigsäurelösung s. C.12.2 und C.12.3) mit 1 g säuregewaschener Aktivkohle zu DHA oxidieren und weiter wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben behandeln (Standardmeßlösung).

6. Bestimmung

6.1 HPLC-Messung

Die Proben- und Standardmeßlösungen in gleicher Volumina mit Hilfe eines Probengebers auf die HPLC-Säule geben und bei Zimmertemperatur isokratisch eluieren. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt nach fluorometrischer Detektion durch Integration der Peakfläche nach der externen Standardmethode.

6.2 HPLC-Arbeitsbedingungen (G.9)

Geräte: HPLC-Gerät (G.9), Probenaufgeber (G.9.1), Trennsäule (G.12)

Elutionslösung: Methanol:Acetatpufferlösung 1:1 (C.14)
Temperatur \sim 20°C

Flußrate: 1 ml/min

Retentionszeit: ca. 2,6 min

Auftragsvolumen: 50 µl Meßlösung (\cong 5 bis 100 ng Vit. C)

Detektion: Fluoreszenzdetektor (G.10), Anregungswellenlänge: 350 nm, Emissionswellenlänge: 430 nm

Messung der Peakfläche: Integrator (G.11)

7. Auswertung

Der Gehalt W an Gesamt-Vitamin C in mg pro 100 g der Probe wird nach folgender Gleichung berechnet (Methode des externen Standards, s. auch Ergebnisse und Diskussion):

$$W = \frac{A_1 \cdot C \cdot V}{A_2 \cdot m} \cdot 100$$

A_1 = Peakfläche des DFC in der Problemmeßlösung

A_2 = Peakfläche des DFC in der Standardmeßlösung

C = L-Ascorbinsäure-Gehalt der externen Standardmeßlösung in mg/ml (Abschnitt 5.3)

V = Gesamtvolumen der Probenlösung in ml (Abschnitt 4)

m = Probeneinwaage in g

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die typischen Chromatogramme von ASC-, DHA-Standardlösungen und von einigen ausgewählten Lebensmitteln. Unter den angegebenen HPLC-Bedingungen wurden bei der Mehrzahl von Lebensmitteln außer DFC-Peak keine anderen Peaks festgestellt. Lediglich bei der Bestimmung des DHA-Gehaltes in Gemüse und Obstsaften sowie des Vitamin C-Gehaltes in Leberzubereitungen erschien ein kleiner Peak vor dem DFC-Peak. Der Vergleich mit fluorometrischen Analysenverfahren nach *Deutsch* und *Weeks*⁴⁾ ergab, daß eine Blindwertbestimmung bei der HPLC-Methode nicht erforderlich ist. Die Derivatisierung von DHA mit o-Phenylendiamin zu DFC ist bei Zimmertemperatur nach 60 min Rühren abgeschlossen (Abb. 2). Sie ist außerdem unabhängig von der DHA-Konzentration in der Reaktionslösung (0,01 bis 2,5 µg/ml). Unter Licht-

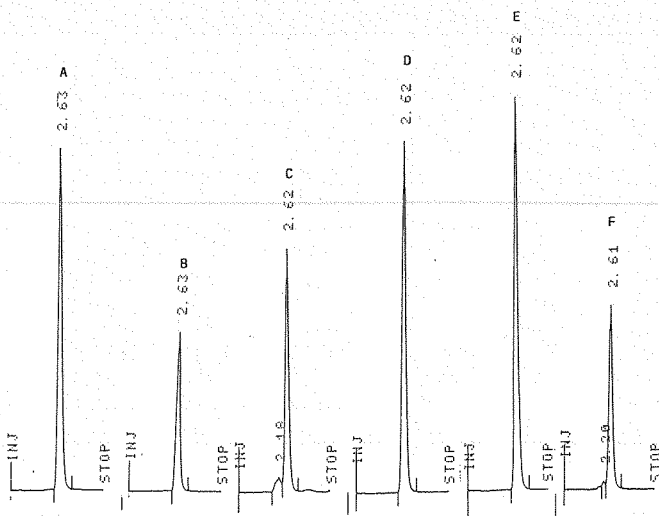


Abb. 1. HPLC-Chromatogramme von ASC-Standard (A), Bis-DHA-Standard (B) DHA in Kartoffeln (C), Vit. C in Kartoffeln (D), Vit. C in Holunderbeersaft (E), Vit. C in Leber (F).

ausschluß bleibt die Fluoreszenzintensität der Meßlösung bei 20°C bis zu 5 Std. nahezu konstant. Somit können auch Serienbestimmungen ohne Fehler durchgeführt werden. Modellversuche zeigten weiterhin, daß die Oxidation von ASC zu DHA unter den angegebenen Bedingungen im Bereich von 0,1 bis 120 µg ASC pro ml Probenlösung quantitativ erfolgt. Zwischen der Fluoreszenzintensität (Peakfläche) von DFC und der Vitamin C-Konzentra-

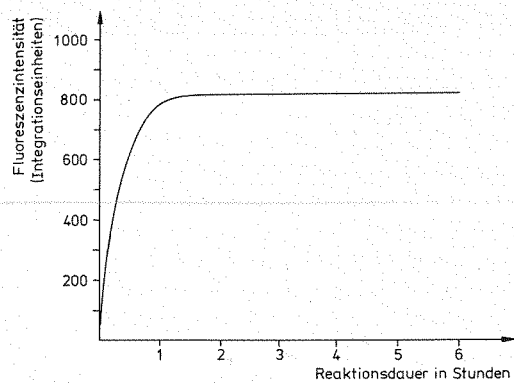


Abb. 2. Bildung und Stabilität der DFC-Verbindung bei der Reaktion von DHA mit o-Phenylendiamin bei 20°C in Abhängigkeit von der Zeit.

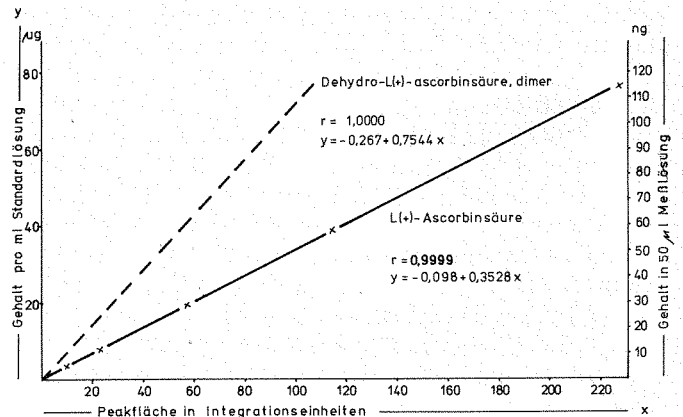


Abb. 3. Eichkurven für ASC und DHA nach der HPLC-Methode.

Tab. 1. Vitamin-C-Gehalt (ASC + DHA) in ausgewählten Lebensmitteln und Wiederfindungsrate von zugesetzter L-Ascorbinsäure bei der HPLC-Analyse.

Lebensmittel ¹⁾	Gehalt mg/100 g			Wiederfindungsrate ³⁾ in %	n	
	HPLC-analysiert	nach SFK ²⁾				
	\bar{x}	s	von - bis	\bar{x}	s	
Blumenkohl, frisch, roh	64,2	1,0	57 - 124	97	2	3
Erbsen/Möhren, tiefgefroren	10,4	0,3	-	98	2	3
Erbsen/Möhren, sterilisiert	1,7	0,1	-	98	2	3
Grüne Bohnen, frisch, roh	9,4	0,3	10 - 27,4	99	3	5
Grüne-Bohnen-Eintopf	5,4	0,2	-	99	-	3
Kartoffeln, roh	17,6 ⁴⁾	0,5	10 - 40	97	2	3
Pommes frites	30,8	1,5	28	99	-	1
Kartoffelpuffer, Trockenprodukt	12,9	0,6	-	98	-	1
Rotkohl, frisch, roh	75,3	1,0	40 - 72	99	1	3
Rotkohl, frisch, gegart	23,1	0,5	-	n.b.		
Spinat, frisch, roh	30,7	1,2	15 - 120	98	2	3
Spinat, zubereitet, tiefgefroren	0,1	0,0	-	98	1	6
Kopfsalat, frisch, roh	8,3	0,3	8 - 22	102	1	4
Petersilie, frisch roh	96,2	2,8	150 - 182	98	1	3
Johannisbeere, rot	35,6	0,4	27 - 47	99	-	1
Orangensaft	39,2	0,1	32 - 53	99	1	3
Holunderbeersaft	67,2 ⁵⁾	0,1	26	99	-	1
Schwarzer Johannisbeersaft	29,0	0,2	20 - 48	99	1	3
Trinkmilch (3,5% Fett)	1,1 ⁶⁾	0,0	1,4 - 2,4	100	-	1
Rinderleber, roh	37,8	0,9	20 - 35	n.b.		
Rinderleber, gegart	20,2	0,8	-	100	3	3
Rinderleber, gegart, tiefgefroren	14,4	0,5	-	102	4	6

1) Handelsware; 2) Souci, Fachmann, Kraut, Nährwert-Tabellen 1986/87

3) L-Ascorbinsäurezusatz in der Aufschlußlösung 2 bis 10 mg

4) DHA-Gehalt = 12,4 mg; 5) DHA-Gehalt = 19,1 mg; 6) DHA-Gehalt = 0,7 mg

tion (ASC bzw. DHA) der Proben bzw. Meßlösung besteht eine lineare Regression und eine sehr hohe positive Korrelation (Abb. 3). Der Vitamin C-Gehalt der Analysenproben kann daher mit Hilfe einer Eichkurve bzw. Regressionsgleichung berechnet werden. In der Praxis empfiehlt sich jedoch zur Kontrolle je Analysenserie eine ASC-Standardlösung mit der erwarteten Vitamin C-Konzentration zu analysieren. Die Bis-Dehydro-L (+)-Ascorbinsäure-Handelspräparate (*Serva, Fluka*) ergaben etwa 50% niedrigere Fluoreszenzintensität als die L(+)-Ascorbinsäure-Standardsubstanz (Abb. 3). Anscheinend wird das dimere DHA unter den angewandten Analysen-Bedingungen nicht desmolisiert. Die Anwendbarkeit der HPLC-Methode wurde bei den folgenden Lebensmitteln erprobt: Leber, Fleischprodukten, Milch, Eintopfgerichten, Gemüse, Gemüseprodukten, Obst, Obstsaften, Kartoffeln und Kartoffelprodukten. Wie Tab. 1 zeigt, waren die Analysenergebnisse sehr gut reproduzierbar. Die Variationskoeffizienten der Mittelwerte aus drei- bis fünffachen Wiederholungen betragen, je nach Art der Lebensmittel 1 bis 8%. Die nach dem beschriebenen Verfahren ermittelten Vitamin C-Gehalte stimmen, mit wenigen Ausnahmen, mit den Angaben in den Nährwerttabellen gut überein. Die Wiederfindungsraten der Proben beim Aufschluß zugesetzten L (+)-Ascorbinsäure lagen zwischen 97 und 102%. Die Methode ist wenig störanfällig und relativ einfach zu handhaben. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0,1 mg Vitamin C pro 100 g Lebensmittel.

Zusammenfassung

Ein für Routineuntersuchungen geeignetes HPLC-Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C (L-Ascorbinsäure „ASC“ und Dehydro-L-Ascorbinsäure „DHA“) in Lebensmitteln wird beschrieben.

Das Analysenmaterial wird mit wäßriger m-Phosphor-, Essigsäurelösung aufgeschlossen, ASC mit Aktivkohle zu DHA oxidiert, ein aliquoter Teil der Lösung mit Natriumacetat auf pH 5 angepuffert und mit o-Phenylendiamin zu einer fluoreszierenden Chinoxalinverbindung (DFC) derivatisiert. Falls der DHA-Gehalt der Probe bestimmt werden soll, unterbleibt die Oxidation. Nach der Trennung auf einer Spherisorb ODS 1-Säule (25 cm lang, 4 mm i. D.) mit Methanol: Natriumacetatpuffer (1:1) pH 6,1 als Eluent (1 ml/min) erfolgt der Nachweis der DFC-Verbindung durch einen Fluoreszenzdetektor bei 350 nm Anregungs- und 430 nm Emissionswellenlänge. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0,1 mg Vitamin C/100 g Lebensmitteln. Die Methode wurde bei der Bestimmung von Vitamin C in Milch, Leber, Gemüse, Gemüseprodukten, Obst, Obstsaften, Kartoffeln und Kartoffelprodukten erprobt. Sie ist relativ einfach zu handhaben, wenig störanfällig und liefert sehr gut reproduzierbare Ergebnisse.

Summary

The paper describes an HPLC method meant for routine checking to

quantitatively determine vitamin C (L-ascorbic acid, „ASC“, and dehydro L-ascorbic acid „DHA“) in foodstuffs.

The sampling material is solubilized with an aqueous m-phosphoric/acetic acid solution; ASC is oxidized with active carbon into DHA; an aliquot portion of the solution is buffered, with sodium acetate, to pH 5 and derivatized with o-phenylene diamine into a fluorescent quinoxaline compound („DFC“). If the DHA content of the sample is to be determined, the oxidation is left out. After separation on a Spherisorb ODS-1 column (25 cm long, 4 mm dia.) with a methanol:sodium acetate buffer (1:1) of pH 6.1 (1 ml/min), the DFC compound is identified by means of a fluorescence detector using wave lengths of 350 nm for excitation and 430 nm for emission. The detection limit is 0.1 mg of vitamin C per 100 g of food. The method was tested in the determination of vitamin C in milk, liver, vegetables and vegetable products, fruit, fruit juices, potatoes and potato products. It is relatively simple to handle and hardly susceptible to disturbances and will furnish well reproducible results.

Literatur

- 1) *Strohecker, R. u. M. Henning*: Vitamin Assay Tested Methods, 2nd ed. Verlag Chemie Weinheim, S. 231-233 (1966).
- 2) *Fujita, A. u. T. Ebihara*: Kolorimetrische Bestimmung von Vitamin C mittels Phosphor-18-Wolframsäure. *Biochem. Zeitschrift* **290**, 182-22 (1937).
- 3) *Bourgeois, C. F. u. P. R. Mainquy*: Determination of Vitamin C in Foods and Feeds. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **45**, 70-84 (1975).
- 4) *Brubacher, G., W. Müller-Mulot u. D. A. T. Southgate*: Methods for the Determination of Vitamin in Food, London, S. 66-96 (1983).
- 5) *Deutsch, M. J. u. C. E. Weeks*: Microfluorometric Assay für Vitamin C. *J. AOAC* **48**, 1248-1256 (1965).
- 6) Association of Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Washington, S. 844-847 (1984).
- 7) *Boehringer Mannheim GmbH*: Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik, S. 17-18 (1983).
- 8) *Augustin, J., C. Beck u. G. I. Marousek*: Quantitative Determination of Ascorbic Acid in Potatoes and Potato Products by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Sci.* **46**, 312-316 (1981).
- 9) *Keating, R. W. u. P. R. Haddad*: Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid by Reversed Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography with precolumn Derivatisation. *J. Chromatogr.* **245**, 249-255 (1982).
- 10) *Vanderlice J. T. u. D. J. Higgs*: HPLC Analysis with Fluorometric Detection of Vitamin C in Food Samples, *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 485-489 (1984).
- 11) *Kneifel, W. u. R. Sommer*: HPLC-Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Milch, Molke und Milchgetränken. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **181**, 107-110 (1985).
- 12) *Speck, A. J., J. Schrijver u. W. H. P. Schreurs*: Fluorometric Determination of Total Vitamin C and Total Isovitamin C in Foodstuffs and Beverages by High-Performance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatisation. *J. Agric. Food. Chem.* **32**, 352-355 (1984).
- 13) *Ziegler, S. J., B. Meier u. O. Sticher*: Rapid and Sensitive Determination of Dehydroascorbic Acid in Addition to Ascorbic Acid by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography using a Post-Column Reduction System *J. Chromatogr.* **391**, 419-426 (1987).