

LUDWIK CZERWIECKI, GRAŻYNA WILCZYŃSKA

## OZNACZANIE WITAMINY C W WYBRANYCH PRODUKTACH OWOCOWO-WARZYWNYCH

### DETERMINATION OF VITAMIN C IN SELECTED FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

Zakład Analizy Żywności  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36  
Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke

*Witaminę C jako kwas L-askorbinowy w sokach, nektarach owocowych i owocowo-warzywnych oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Średni odzysk witaminy C z badanych produktów wahał się w granicach od 92 do 103%. Oszacowane metodami statystycznymi granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio: 0,003 i 0,009 mg witaminy C w ml produktu.*

#### WSTĘP

Witaminy stanowią niezbędne składniki prawidłowej diety człowieka, bowiem pełnią one ważne funkcje biologiczne. Niektóre z nich działają jako przeciwutleniacze, wchodzi w skład licznych koenzymów, biorą udział w różnorodnych reakcjach, takich jak hydroksylacja i wywierają wpływ na syntezę wielu substancji mających ważne znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Niezmiernie istotne jest zatem systematyczne dostarczanie witamin w pożywieniu, co jest możliwe pod warunkiem odpowiednio zestawionego jadłospisu.

Owoce, warzywa i ich przetwory, w tym w dużej mierze soki, są bogatym źródłem m.in. witamin, np. witaminy A, beta-karotenu, witamin z grupy B, a w szczególności witaminy C. Nazwą tą określa się kwas askorbinowy (AA) i produkt jego utlenienia – kwas dehydroaskorbinowy (DHAA) [2]. Obie formy wykazują wieloraką aktywność biologiczną; witamina C bierze udział w licznych reakcjach metabolicznych aminokwasów, np. w procesie przemiany proliny do hydroksyproliny, co ma podstawowe znaczenie m.in. w budowie tkanki łącznej. Witamina ta odgrywa również istotną rolę w tworzeniu się przeciwciał decydujących o odporności organizmu na infekcję, jest wreszcie reduktorem chroniącym struktury komórkowe przed oksydacją, podobnie jak witaminy A i E [2, 4, 14].

Dla oceny wartości żywieniowej produktów wchodzących w skład diety człowieka konieczna jest znajomość zawartości w niej m.in. witamin, także witaminy C. Dotyczy to szczególnie produktów poddawanych mniej lub bardziej zaawansowanej obróbce

technologicznej, kiedy istnieje niebezpieczeństwo ubytku, niekiedy bardzo znacznego, naturalnej witaminy C. Dlatego też niezbędne są metody analityczne umożliwiające oznaczenie jej zawartości w produktach spożywczych. Niektóre z metod pozwalają oznaczyć kwas L-askorbinowy, inne natomiast łączną zawartość kwasów L-askorbinowego (AA) i dehydroaskorbinowego (DHAA). Klasykna metoda miareczkowa wg *Tillmansa* [19] polega na utlenieniu kwasu askorbinowego za pomocą 2,6-dichlorofenolindofenolu; metodę tę wykorzystano też w Polskiej Normie [17]. W przypadku oznaczania całkowitej zawartości witaminy C, kwas dehydroaskorbinowy redukuje się najpierw do kwasu L-askorbinowego. Siarkowódz jako reduktor w oryginalnej wersji tego postępowania [19] stwarzał wiele niedogodności; jedna z podstawowych wad tego odczynnika, to jego mała wybiórczość jako reduktora, co stanowi przyczynę błędów podczas oznaczania.

Do innych, bardziej nowoczesnych metod oznaczania witaminy C należą metody elektrochemiczne [6], spektrofotometryczne [1, 16, 18], fluorymetryczne [5], wreszcie metody z zastosowaniem testów enzymatycznych [3] oraz metody połączonych technik przepływowej analizy nastrzykowej i spektrofotometrii [12].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [7, 8, 9, 11, 13, 20], należy bez wątpienia do coraz częściej wykorzystywanych technik analitycznych stosowanych do oznaczania witaminy C w różnych produktach spożywczych. Do jej zalet należą: wysoka specyficzność, czułość i łatwość wykonania analizy. Korzystając z tej techniki analitycznej można stosować różne detektory np.: fluorymetryczny, elektrochemiczny, amperometryczny oraz detektor UV [8].

HPLC w odwróconym układzie faz, także z zastosowaniem par jonowych lub na kolumnach aminowych z detektorem UV, umożliwia bezpośrednio łatwe i szybkie oznaczenie całkowitej zawartości kwasu L-askorbinowego po odpowiednio przeprowadzonej redukcji jego formy dehydro za pomocą np. ditiotreitolu [8, 9] czy DL-homocysteiny [11]. Możliwe jest również równoczesne oznaczenie zarówno kwasu askorbinowego (AA) jak i dehydroaskorbinowego (DHAA) po przekształceniu tego ostatniego za pomocą dichlorowodoru fenylendiaminy w pochodną silniej absorbującą UV (3-(1,2-dihydroksyetylo)furo[3,4-b]chinoksalino-1-on) [7].

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowoczesnej metody oznaczania witaminy C w przetworach owocowych i warzywnych takich jak soki, napoje i nektary, na które systematycznie rośnie popyt w kraju. Wymóg deklarowania przez producenta na opakowaniach wymienionych produktów zawartości tej witaminy przemawia dodatkowo za podjęciem tej tematyki.

Na podstawie przeglądu literatury i własnych badań wstępnych za najodpowiedniejszą uznano metodę oznaczania całkowitej zawartości witaminy C jako kwasu askorbinowego techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconym układzie faz, z detekcją w UV i dodatkiem DTT (ditiotreitól) jako czynnika redukującego.

## MATERIAŁY I METODYKA

### Wyposażenie

Wykorzystano chromatograf cieczowy firmy Milton-Roy/LDC Analytical złożony z następujących elementów: pompy izokratycznej Constametric III, detektora UV Spectro-Moni-

tor 3100, zaworu dozującego Rheodyne 731 z pętlą o pojemności 20  $\mu$ l, kolumny chromatograficznej Nova Pak RP-C18, Waters z przedkolumną o analogicznych właściwościach. Pracę zestawu kontrolowano za pomocą komputera z programem sterującym i integracyjnym Axxiom727. Do rejestracji chromatogramów wykorzystano drukarkę Epson LX-400.

Stosowano ponadto: generator ultradźwięków *Büchler*, wagę analityczną WA34, wytrząsarke laboratoryjną Lab-line Instruments Inc, mikrostrzykawkę *Hamilton* poj. 100  $\mu$ l, saszki *Schotta* G-2 z zestawem do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem oraz typowe szkło laboratoryjne takie jak: kolby miarowe, pipety, cylindry miarowe, kolby *Erlenmayera*, lejki szklane.

#### Odczynniki i materiały pomocnicze

1. Woda redestylowana z nad 0,5 g  $\text{KMnO}_4$  i 5 g  $\text{NaOH}$  (na każde 2 litry wody destylowanej), 2. roztwór *Carreza* I:  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 2 \text{H}_2\text{O}$  o stężeniu 3,6g/100 ml wody, 3. Roztwór *Carreza* II:  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  o stężeniu 7,2g/100ml wody, 4. Fosforan potasowy I zasadowy ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) cz.d.a., POCh Gliwice, 5. 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) 99%, Lancaster, 6. Wzorzec kwasu L-askorbinowego, Analar BDH, 7. Roztwory robocze kwasu L-askorbinowego w zakresie stężeń 0,005–0,020 mg/ml z dodatkiem 0,1% DTT.

#### Zasada metody

Zasada metody polega na oznaczeniu łącznej zawartości kwasów: L-askorbinowego i dehydroaskorbinowego w badanej próbce [8, 9]. Kwas dehydroaskorbinowy redukowany jest do kwasu L-askorbinowego za pomocą ditiotreitolu. Witamina C oznaczana jest techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem kolumny RP-C18 i detektora UV ( $\lambda$  254 nm).

#### Obróbka wstępna badanego materiału

Soki: 1 ml soku (bezpośrednio po otwarciu opakowania) pobierano do kolby miarowej poj. 25 ml, do której uprzednio odważano 25 mg DTT i rozpuszczano w 10 ml wody. Zawartość kolby mieszano w łaźni ultradźwiękowej w czasie 15–20 sekund. Próbkę klarowano dodając po 0,1 ml roztworów *Carreza* I, II, następnie uzupełniano wodą do kreski i ponownie mieszano w łaźni ultradźwiękowej. Tak przygotowaną próbkę przechowywano przez 2 godziny bez dostępu światła w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed wykonaniem analizy chromatograficznej próbkę przesączano przez bibułę.

Nektary i soki przecierowe (o zwiększonej zawartości miąższu): Próbkę nektaru (1 ml) wytrząsano przez 30 min na wytrząsarce mechanicznej przy amplitudzie 2,5 x 100 RPM w 25 ml kolbce miarowej z dodatkiem 25 mg DTT i 20 ml wody. Kolbkę zabezpieczano folią aluminiową przed dostępem światła. Dalej postępowano jak z próbkami soków.

#### Przygotowanie krzywej wzorcowej

Odważano 5 mg kwasu L-askorbinowego i rozpuszczano w wodzie w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Następnie pobierano po 1, 2 i 3 ml tak przygotowanego roztworu do kolb miarowych pojemności 10 ml, do których dodawano po 10 mg DTT. Zawartość kolb uzupełniano wodą do kreski i mieszano w łaźni ultradźwiękowej. Stężenie tak przygotowanych wzorców wynosiło: 0,005; 0,10 i 0,015 mg/ml. Roztwory przed wykonaniem analizy chromatograficznej przechowywano przez 2 godziny bez dostępu światła.

#### Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Analizę chromatograficzną próbek wykonywano w temperaturze otoczenia (20–25°C). Fazę rozwijającą stanowił 0,5% roztwór wodny  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  z dodatkiem 0,1% DTT dozowany z prędkością przepływu 0,3 ml/min. Pomiaru absorbancji w UV dokonywano przy długości fali  $\lambda$  254 nm. W analogicznych warunkach chromatografowano roztwory wzorcowe witaminy C.

Zawartość witaminy C w mg/ml próbki obliczano z krzywej wzorcowej za pomocą programu komputerowego wykorzystującego następujący wzór:

$$C = \frac{C_{st} \cdot P}{P_{st}} \cdot \frac{V_k}{V}$$

w którym:

$C_{st}$  – stężenie witaminy C w roztworze wzorcowym (mg/ml)

$P$  – powierzchnia pików witaminy C w próbce badanej

$P_{st}$  – powierzchnia pików witaminy C w roztworze wzorcowym

$V_k$  – końcowa objętość próbki po rozcieńczeniu (ml)

$V$  – objętość próbki pobrana do analizy (ml).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W badaniach wstępnych na roztworach wzorcowych witaminy C określono warunki redukcji kwasu dehydroaskorbinowego oraz warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stwierdzono, że optymalny czas redukcji wynosi 2 godziny.

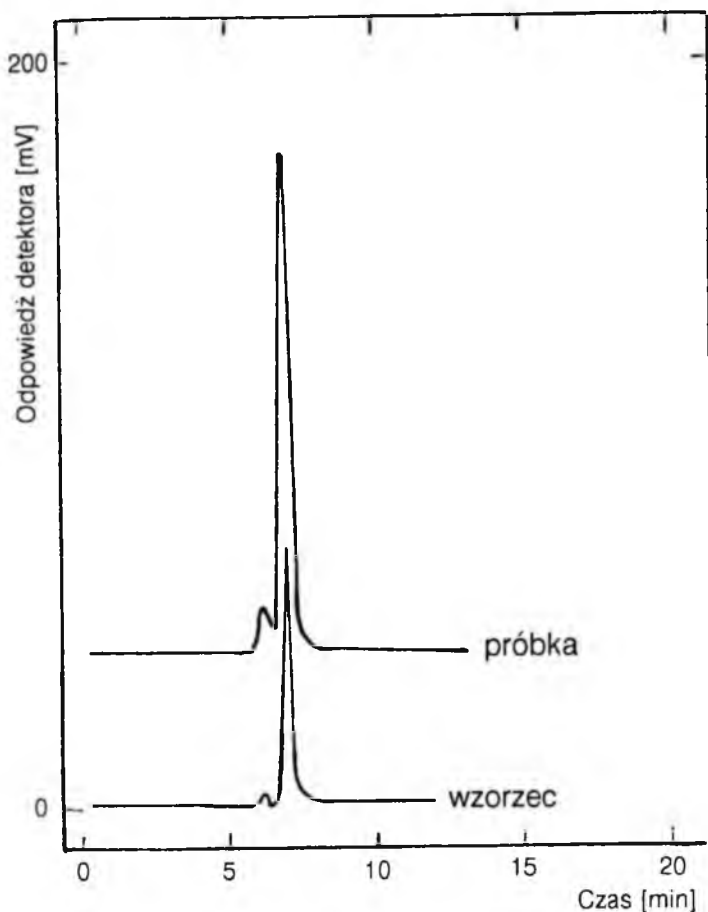
Za najodpowiedniejszy eluent uznano 0,5% roztwór wodny  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  z dodatkiem 0,1% DTT. Przepływ cieczy z prędkością 0,3 ml/min okazał się optymalny, co potwierdzono również w przypadku analizy próbek fortyfikowanych wybranych do badań produktów. Średni czas retencji kwasu askorbinowego wynosił we wspomnianych warunkach 7,7 minuty. Na ryc. 1 przedstawiono przykładowy chromatogram kwasu askorbinowego w badanej próbce.

Przydatność opisaną procedurę analityczną do oznaczania witaminy C w poszczególnych rodzajach próbek sprawdzono fortyfikując próbki soków, przecierów i nektarów określonymi poziomami witaminy C. W przypadku próbek zawierających witaminę C, odzysk metody określano w stosunku do teoretycznie obliczonej zawartości witaminy stanowiącej sumę jej oznaczonego stężenia i poziomu fortyfikacji, przyjmując tę wartość za 100%. Dla określenia średniego odzysku i powtarzalności postępowania analitycznego wykonano serie oznaczeń zawartości witaminy C w próbkach handlowych przetworów owocowych, owocowo-warzywnych i warzywnych. W tabelach I – II zebrano wspomniane parametry. Jak wynika z danych zawartych w tabelach, średni odzysk witaminy C wahał się w granicach od 92 do blisko 103% w zależności od rodzaju próbki i poziomu fortyfikacji. Względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności) wynosiło 0,45–4,32%.

Poziomy fortyfikacji (dla soków owocowych 0,10 mg/ml i 1,00 mg/ml soku oraz dla nektaru i soku pomidorowego 0,05 mg/ml i 0,50 mg/ml soku) dostosowano do ilości witaminy C deklarowanej na opakowaniu przez producenta. Wszystkie oznaczenia wykonywano w 6-ciu powtórzeniach.

Wartości odzysku witaminy C z próbek takich produktów jak m.in.: soki owocowe, lemoniada, uzyskane przez autorów prac, na których opierano się podczas opracowywania metody oznaczania witaminy C [8, 9] wynosiły 90–106%, a więc były porównywalne.

W celu obiektywnego wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności metody zastosowano postępowanie wg *Hadricha* i wsp. [10] stanowiące modyfikację procedury zalecanej przez DIN oraz Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Wykonano więc po 3 równoległe oznaczenia zawartości witaminy C we wzmocnionym soku jabłkowym



Ryc. 1. Chromatogram próbki soku z czarnej porzeczki oraz wzorzec witaminy C o stężeniu 0,005 mg/ml  
 Chromatograms of black currant juice sample and vitamin C standard (C = 0,005 mg/ml)

na poziomie: 0,050; 0,025 oraz 0,005 mg/ml soku. W pierwszym etapie wyznaczono równanie regresji:

$$y = a + bx,$$

w którym:

y – wartość sygnału detektora

x – stężenie witaminy C w 1 ml analizowanego roztworu

a – współczynnik przesunięcia

b – współczynnik nachylenia krzywej.

Ponadto obliczono wg [10]:

Tabela I. Odzyskiwalność i precyzja metody na przykładzie soku pomidorowego i nektaru marchwiowo-pomarańczowego (n = 6 powtórzeń)  
 Recovery and precision of the method for tomato juice and carrot-orange nectar (n = 6 parallel determinations)

Próbka	Oznaczona zawartość wit. C mg/ml przed fortyfikacją	Poziom fortyfikacji 0,05 mg/ml	Poziom fortyfikacji 0,50 mg/ml
		Zawartość witaminy C Oznaczona/obliczona mg/ml	Zawartość witaminy C Oznaczona/obliczona mg/ml
Sok pomidorowy	0,121	0,176/0,171	0,616/0,621
Średni odzysk %	–	102,92	99,19
SD	0,0037	0,0076	0,0110
RSD %	3,06	4,32	1,79
Nektar marchwiowo-pomarańczowy	–	0,046/0,050	0,507/0,500
Średni odzysk %	–	92,00	101,40
SD	–	0,0015	0,0023
RSD %	–	3,26	0,45

SD – odchylenie standardowe

RSD – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

Tabela II. Kryteria dla metod analitycznych stosowanych w urzędowej kontroli  
Criteria for analytical methods using in official control

Parametr	Zakres stężeń µg/kg	Wartość zalecana	Maksymalna dopuszczalna wartość
Próba ślepa	cały	pomijalnie mała	
Odzysk – aflatoksyna M <sub>1</sub>	0,01–0,05	60–120%	
	> 0,05	70–100%	
Odzysk – aflatoksyny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0	50–120%	
	1–10	70–110%	
	> 10	80–110%	
Precyzja RSD <sub>R</sub>	cały	Wynika z równania <i>Horwita</i>	2 × wartość wynikająca z równania <i>Horwita</i>
Precyzja RSD <sub>t</sub> może być obliczona jako 0,66 wartości RSD <sub>R</sub> dla odpowiedniego stężenia			

Wartości stosują się zarówno do aflatoksyny B<sub>1</sub>, jak do sumy aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>.

Jeżeli będzie podawana suma aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, to odpowiedź każdej z nich w systemie analitycznym musi być znana lub równoważna.

Granica wykrywalności stosowanych metod nie musi być ustalana, jeżeli wartość precyzji jest dana dla odpowiedniego stężenia.

Wartość precyzji jest obliczana z równania *Horwita*:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

gdzie RSD<sub>R</sub> jest względnym odchyleniem standardowym, obliczonym z wyników uzyskanych w warunkach odtwarzalności  $[(S_R/x) \times 100]$ ;  
C jest stężeniem wyrażonym jako stosunek (np. 1 = 100 g/100 g; 0,001 = 1000 mg/kg)

- odchylenie standardowe  $S_y$  krzywej regresji stanowiące miarę rozproszenia sygnału detektora wokół krzywej regresji (średnia odległość punktu od prostej regresji liczona prostopadłe do osi X)
- odchylenie standardowe  $S_x$  dla wszystkich poziomów fortyfikacji ilustrujące rozrzut metody dla zbadanego przedziału stężeń
- maksymalną, graniczną wartość sygnału detektora dla próbki nie zawierającej oznaczanej substancji  $y_{kryt}$  (przy tej wartości sygnału istnieje 50% prawdopodobieństwo wykrycia nieobecnej substancji oznaczanej oraz takie samo prawdopodobieństwo nie wykrycia obecnej substancji oznaczanej),
- granicę wykrywalności  $G_{w1}$  odpowiadającą wartości  $y_{kryt}$ ,
- właściwą granicę wykrywalności  $G_{w2}$ , czyli najniższe stężenie witaminy C, dające się jakościowo wykryć z prawdopodobieństwem 95%,
- granicę oznaczalności,  $G_{o1}$  czyli najniższe stężenie analizowanej substancji, dla którego sygnały będą zawsze wyższe niż w przypadku wartości  $G_{w2}$ , a zatem dające się ilościowo oznaczyć,
- granicę oznaczalności  $G_{o2}$  spełniającą poprzedni warunek dla odzysku pomiędzy 70 a 120%.

Dla określenia tej ostatniej wartości wykreślono krzywą odzysku wyrażającą zależność pomiędzy stężeniem dodanej witaminy C, a stężeniem tej witaminy obliczonym z równania regresji dla krzywej kalibracyjnej. W tym celu najpierw sporządzono krzywą kalibracyjną dla roztworów wzorcowych witaminy C: 0,050; 0,025 oraz 0,005 mg/ml (po 2 równoległe oznaczenia dla każdego z wymienionych stężeń). Następnie wyznaczono równanie regresji i współczynniki  $a_1$  i  $b_2$ . Na podstawie powyższego równania obliczono zawartość witaminy C w fortyfikowanym uprzednio soku jabłkowym. Zależność pomiędzy ilością dodanej witaminy C, a faktycznie wykrytą (obliczoną) obrazuje krzywa odzysku na ryc. 2, opisana kolejnym równaniem:

$$y = a_2 + b_2x,$$

w którym:

$a_2$  – współczynnik przesunięcia (-) 0,00253

$b_2$  – współczynnik nachylenia 0,976

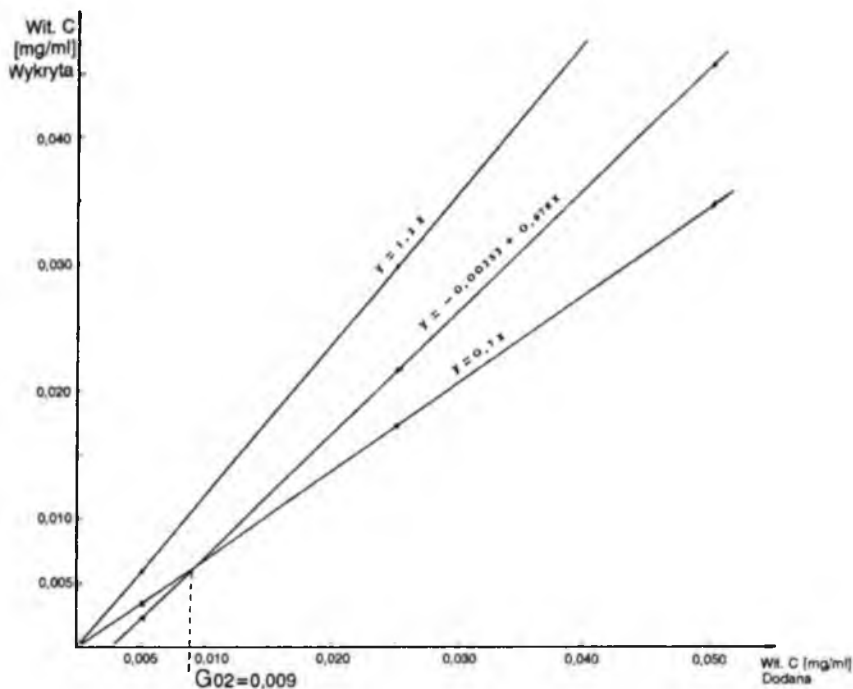
Jak wynika z równania, współczynnik nachylenia krzywej  $b_2$  determinuje odzysk metody, który jest bliski 100%, co jest zgodne z danymi zawartymi w tabelach I, II.

Dwie dodatkowe krzywe na rycinie o współczynnikach  $b_1$  1,2 i 0,7, wyznaczają zakres odzysku metody w granicach, odpowiednio 120 i 70 %. Uwidoczniono również granicę oznaczalności  $G_{o2}$  metody.

Na tej podstawie określono praktyczną granicę oznaczalności  $G_{o2}$  metody wg [10] dla odzysku pomiędzy 70-120%. Parametry oznaczalności i wykrywalności przedstawiono w tabeli III.

Jak wynika z tabeli, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności witaminy C, zgodnie z definicjami podanymi wcześniej, wynoszą odpowiednio: 0,0038 mg/ml i 0,0092 mg/ml badanego produktu.





Ryc. 2. Krzywe odzysku witaminy C z soku jabłkowego

Recovery curves of vitamin C for apple juice

Objaśnienia:  $G_{02}$  graficzne odwzorowanie granicy oznaczalności metodyTabela III. Zestawienie niektórych statystycznych danych metody  
Some statistical data of the method

Parametr	Wartość
$S_x$	0,0007164
$S_y$	62,9034
$Y_{kryt}$	160,2093
$G_{w1}$	0,0018 mg/ml
$G_{w2}$	0,0030 mg/ml
$G_{01}$	0,0038 mg/ml
$G_{02}$	0,0092 mg/ml

 $S_x$  – odchylenie standardowe dla wszystkich poziomów fortyfikacji, $S_y$  – odchylenie standardowe krzywej regresji, $Y_{kryt}$  – maksymalna, graniczna wartość sygnału detektora dla próbki nie zawierającej oznaczanej substancji, $G_{w1}$  – granica wykrywalności odpowiadającą wartości  $y_{kryt}$ , $G_{w2}$  – właściwa granica wykrywalności czyli najniższe stężenie witaminy C, dające się jakościowo wykryć z prawdopodobieństwem 95%, $G_{01}$  – granica oznaczalności czyli najniższe stężenie analizowanej substancji, dla którego sygnały będą zawsze wyższe niż w przypadku wartości  $G_{w2}$ , $G_{02}$  – granica oznaczalności spełniająca poprzedni warunek dla odzysku pomiędzy 70 a 120%.

## WNIOSKI

Opisana metoda oznaczania witaminy C w sokach owocowych i warzywnych oraz w nektarach charakteryzuje się dobrymi parametrami średniego odzysku, precyzji i oznaczalności, co w połączeniu z prostotą wykonania pozwala na jej wykorzystanie w analizie rutynowej.

L. Czerwiecki, G. Wilczyńska

## DETERMINATION OF VITAMIN C IN SELECTED FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

## Summary

A simple method was described to determine vitamin C as L-ascorbic acid (after reduction of dehydroascorbic acid by means of dithiothreitol) in fruit juices, fruit and vegetable-fruit nectars. Ascorbic acid was analyzed by RP-HPLC technique with UV detection (254 nm).

The average recovery of ascorbic acid was 92–103% and limits of identification and detection were 0,003 and 0,009 mg/ml of products respectively.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Anwar J., Farooqi M.I., Nagra S.A.* i wsp.: A new method for spectrofotometric determination of ascorbic acid. *J. Chem. Soc. of Pakistan*, 1990, 12, 75–79.
2. *Belitz H.D., Grosch W.*: Vitamine w : Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1987, 323–338.
3. *Casella L., Gullotti M., Morchesini* i wsp.: Rapid enzymatic method for vitamin C assay in fruits and vegetables using peroxidase. *J. Food Sci.*, 1989, 54, 374–375.
4. *Charleux J.L.*: Beta-carotene, antioxidant vitamins and their role in preventive nutrition. Reprint from FIE Conference Proceedings, 1992, 1.
5. *Chung H.K., Ingle J.D.(Jr)*: Fluorimetric kinetic method for the determination of total ascorbic acid with o-phenylenediamine. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 243, 89–95.
6. *Craston D.H.*: Microband electrodes fabricated by screen printing processes: applications in electroanalysis. *Talanta*, 1991, 38, 17–26.
7. *Dodson K.Y., Young E.R., Soliman A.C.M.*: Determination of total vitamin C in various food matrixes by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. AOAC. Int.*, 1992, 75, 887–891.
8. *Gökmen V., Acar J.*: Determination of total vitamin C as ascorbic acid in foods using HPLC. *Euro Food Chem*, VIII, Vienna, 1995, 2, 345–348.
9. *Gökmen V., Acar J.*: A simple HPLC method for determination of total vitamin C in fruit juices and drinks. *Fruit Process.*, 1996, 6, 198–201.
10. *Hädrich J., Vogelgesang J.*: Konzept 96 zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. *Deutsch. Lebensm. Rdsch.*, 1996, 92, 341–350.
11. *Hoare M., Jones S., Lindsay J.*: Total vitamin C analysis of orange juice. *Food Australia*, 1993, 45, 341–345.
12. *Jain A., Chaurasia A., Verma K.K.*: Determination of ascorbic acid in soft drinks, preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow injection spectrometry: matrix absorbance correction by treatment with sodium hydroxide. *Talanta*, 1995, 42, 779–787.
13. *Khaled M.Y.*: Simultaneous HPLC analysis of L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2-polyphosphate. *J. Liq. Chem. Rel. Technol.*, 1996, 19, 3105–3118.
14. *Nadolna J.*: Witamina C w: Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności, ed. *U. Rutkowska*, PZWŁ, Warszawa, 1981, 291–298.

15. *Nisperos-Carriedo M., Busling B.S., Shaw P.E.*: Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *J. Agr. Food Chem.*, 1992, 40, 1127–1130.
16. *Ózgür M.U., Sungur S.*: Third order derivative spectrophotometric determination of ascorbic acid in fruits and vegetables. *Talanta*, 1995, 42, 1631–1640.
17. Polska Norma PN-90/A-75101/11. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości witaminy C, 1990, 1–5.
18. *Srividya K., Balasubramanin N.*: Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical samples and fruit juices. *Analyst*, 1996, 121, 1635–1655.
19. *Tillmans J., Hirsh P.*: Vitamin C. *Biochem Z.*, 1932, 250, 312.
20. *Vanderslice J.T., Higgs D.J.*: Quantitative determination of ascorbic, dehydroascorbic, isoascorbic, and dehydroisoascorbic acids by HPLC in foods and other matrices. *J. Nutr. Biochem.*, 1993, 4, 184–190.

Otrzymano: 1998.05.15