

stoff. Die Gewebe werden in bohnen- bis kirschengroßen Stücken eingebracht. Durch die sofortige Zerkleinerung wird das Einfrieren wesentlich beschleunigt. Es resultiert ein für die Gefriertrocknung sehr geeignetes pulverförmiges Material von großer Oberfläche. Auf den Mahlbecher einer hochtourigen Laboratoriumsschlagmühle (IKA)<sup>3</sup> wird statt des Deckels ein Plastikgefäß mit quadratischem Querschnitt (von ca. 750 cm<sup>3</sup> Inhalt) montiert. Der Plastikbecher hat abgerundete Kanten und eine Höhe von ca. 150 mm. Das untere Ende geht in einen Zylinder von 30 mm Höhe und 50 mm Durchmesser über. Das Gefäß hat oben eine runde Öffnung von ca. 50 mm Durchmesser. Das Schlagmesser hat rechteckige Form (Länge 55 mm, Breite 10 mm, Dicke 1,5 mm). Die Enden des Rechteckes sind leicht verjüngt und hochgebogen. Das Messer ist dem Mahlbecher so angepaßt, daß zwischen der Wandung und dem Messerende ca. 1 mm Zwischenraum bleibt.

Die Apparatur wird mit wenig flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Nach Anstellen der Mühle wird Stickstoff nachgefüllt. Die Gewebestücke werden einzeln eingeworfen und der verdampfte Stickstoff durch Nachgießen ersetzt. Die Menge des Stickstoffs ist so zu wählen, daß der zentrale Wirbel bis zum Messer herunter reicht. Befindet sich zuviel Stickstoff in dem Mahlbecher, schwimmen die eingeworfenen Gewebestücke im Stickstoff, ohne von dem Messer erfaßt zu werden. Die richtige Dosierung des Stickstoffs bildet keine besondere Schwierigkeit, da

durch die obere Öffnung der Mahlvorgang leicht zu beobachten ist. Die Gefahr des Herausspritzens des Stickstoffs besteht nur beim Anlaufen der Mühle. Es läßt sich durch Auflegen eines Mulltupfers auf die obere Öffnung leicht verhindern. Ist der Mahlvorgang beendet, gießt man den Inhalt des Mahlbeckers unter Nachspülen mit frischem Stickstoff quantitativ in ein kleines Dewargefäß. Nach Absitzen des gefrorenen Gewebepulvers dekantiert man den überstehenden klaren Stickstoff und bringt das Pulver mit dem Dewargefäß in die Gefriertrocknungsanlage<sup>4</sup>.

*Summary.* A new unit for the rapid freezing of tissues in liquid nitrogen is described.

M. BEHRENS, H. HAHN und W. NEU

Abteilung für Zell- und Gewebechemie am Physiologisch-chemischen Institut der Justus Liebig-Universität, Giessen (Deutschland), 28. Juni 1966.

<sup>3</sup> Janke und Kunkel K.G., 7813 Staufen i.Br., Deutschland.

<sup>4</sup> Dem Verband der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung der Mittel.

## Über die Spezifität der «TEE-Methode» zur quantitativen Bestimmung von Ascorbinsäure und Gesamt-Vitamin-C im frischen Pflanzenmaterial<sup>1</sup>

Für pflanzen- sowie ernährungsphysiologische Untersuchungen über das System Ascorbinsäure (AS) und Dehydroascorbinsäure (DAS) oder über den Vitamin-C-Wert (Vitamin C = AS + DAS) des frischen Pflanzenmaterials muss die angewendete Bestimmungsmethode (1) eine gute Stabilisierungsmöglichkeit erlauben, so dass die Gefahr der Oxydation von AS zu DAS während der Aufarbeitung und der Bestimmung weitgehend ausgeschaltet werden kann, (2) eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität aufweisen, (3) für Routine- und Serienbestimmungen geeignet sein. Im Rahmen früherer Untersuchungen über die AS und das Vitamin C<sup>2,3</sup> haben wir mehrere Methoden studiert und einige experimentell überprüft. Die sogenannte «TEE-Methode» nach TILLMANS<sup>4</sup> und EMMERIE und VAN ECKELEN<sup>5</sup>, die von FRANKE<sup>6</sup> beschrieben wurde, erwies sich für unsere Zwecke als besonders geeignet (Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol [DIP]). Es wurde vielfach behauptet, dass die Bestimmung von AS mittels DIP unspezifisch wäre, da andere reduzierende Stoffe, deren Redoxpotentiale innerhalb des Bereiches von AS (-0,081 V) und DIP (+0,217 V) liegen, miterfasst werden könnten. Zu diesen Stoffen, die im frischen Pflanzenmaterial vorkommen können, gehören Redukton, Glutathion, Cystein, Pyrogallol, Brenzatechin, Hydrochinon, Gerbstoffe (Tannin) und reduzierende Zucker. Obwohl SEYBOLD und MEHNER<sup>7</sup> und andere (Literatur bei FRANKE<sup>6</sup>) die Spezifität der Methode wiederholt geprüft haben, führten wir erneut eine Prüfung durch, um die Einwände

Titration verschiedener reduzierender Stoffe mit DIP

	Verbrauchte n/1000 DIP/10 ml (z 4-6 Werte)			
	Konzentration A		Konzentration B	
	10 mg Reinsubstanz/10 ml (10 <sup>-3</sup> )	1 mg Reinsubstanz/10 ml (10 <sup>-4</sup> )	-PE	+ PE
PE (10 ml)		0,59		0,34
Glutathion	0,03	0,58	0,05	0,35
Cystein	-	0,63	0,05	0,35
Pyrogallol	-	0,60	0,32 <sup>b</sup>	0,35
Brenzatechin	0,03	0,58	0,03	0,34
Hydrochinon	1,06	0,78	0,32 <sup>c</sup>	0,35
Tannin	0,03	0,58	0,02	0,34
Glucose	0,02	0,58	0,02	0,34
Fructose	0,01	0,59	0,02	0,34
AS			11,24 <sup>d</sup>	11,70

<sup>a</sup> Mit 2%iger HPO<sub>3</sub> Lösung hergestellt. Titrationswert für die Konzentration 10<sup>-5</sup>: <sup>b</sup> 0,02, <sup>c</sup> 0,03, <sup>d</sup> 1,13.

<sup>1</sup> Ein Teil der vorliegenden Untersuchungen wurde im Rahmen einer grösseren Arbeit<sup>2</sup> durchgeführt.

<sup>2</sup> M. M. EL-FOULY, Dissertation München (1963).

<sup>3</sup> A. AMBERGER und M. M. EL-FOULY, Z. Pfl-Ernähr. Düng., Bodenk. 105, 37 (1964).

<sup>4</sup> J. TILLMANS, Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 54, 33 (1927).

<sup>5</sup> A. EMMERIE und M. VAN ECKELEN, Z. Vitaminforsch. 6, 150 (1937).

<sup>6</sup> W. FRANKE, in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Ed. K. PAECH und M. U. TRACY; Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1965), Bd. II, p. 95.

<sup>7</sup> A. SEYBOLD und H. MEHNER, Sitzungsber. d. Heidelberger Akad. d. Wiss., Math.-Naturw. Kl. (Springer-Verlag, Heidelberg 1948).

zu entkräften. Dabei wurden die in Frage kommenden Störstoffe direkt mit DIP titriert, was in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde. Da Redukton bei raschem Arbeiten nicht miterfasst wird<sup>8</sup> und es ausserdem im Handel schwer zugänglich ist, wurde darauf verzichtet, es in die Untersuchungen aufzunehmen. Die oben genannten Substanzen wurden in reiner Form (gelöst in  $\text{HPO}_3$ ) bzw. als Zusatz zum Pflanzenextrakt (PE) gegen DIP titriert.

Unsere Ergebnisse bestätigen noch einmal eindeutig die Spezifität der Methode (Tabelle). Es muss allerdings wiederholt werden, dass diese Untersuchungen nur an Proben aus frischem Pflanzenmaterial durchgeführt worden sind und die Methode auch nur dafür gilt. Für andere Fälle, zum Beispiel Bestimmung von AS im Pflanzenmaterial aus Konserven oder in gekochten Proben usw., in denen weitere reduzierende Stoffe in grösseren Mengen auftreten können, müsste die Spezifität gesondert geprüft werden<sup>9,10</sup>.

*Summary.* The following substances, which occur naturally in plants, do not interfere with the titration of

ascorbic acid with 2,6-dichlorophenolindophenol (DIP): reduced glutathione, cystein, pyrogallol, brenzcatechin, hydrochinone, tannin, glucose and fructose. This is also true for the titration with DIP of high unphysiological concentrations of these substances dissolved in  $\text{HPO}_3$  solution.

M. M. EL-FOULY<sup>11</sup>

*Landwirtschaftliche Versuchsstation der BASF,  
6703 Limburgerhof (Deutschland), 22. Juni 1966.*

<sup>8</sup> G. WENDLAND, Arch. Pharm. 285/286, 169 (1952/1953).

<sup>9</sup> Herrn Professor Dr. Ed. HOFMANN und Herrn Professor Dr. A. AMBERGER danke ich für ihre Unterstützung sowie die zahlreichen wertvollen Anregungen und Ratschläge.

<sup>10</sup> Herrn Professor Dr. W. FRANKE, Bonn, sei für die kritische Durchsicht des Manuskriptes vielmals gedankt.

<sup>11</sup> Present address: National Research Center, Unit of Plant Physiology, Cairo-Dokky, U.A.R.

### A New Method for Assay of Radioactive Dimethyl Sulfoxide and its Metabolite, Dimethyl Sulfone

COTTON and FRANCIS<sup>1</sup> made an extensive study of metal complexes of dimethyl sulfoxide (DMSO). With  $\text{SnCl}_4$  a white insoluble complex is formed having the composition<sup>2</sup>  $\text{DMSO} \cdot \text{SnCl}_4$ . However, LINDQVIST<sup>2</sup> observed no complex formation between  $\text{SnCl}_4$  and dimethyl sulfone ( $\text{DMSO}_2$ ), and we have confirmed this observation. Since  $\text{DMSO}_2$  is a metabolite of DMSO in man and animals<sup>3-5</sup>, it occurred to us that this difference in behavior of DMSO and  $\text{DMSO}_2$  toward  $\text{SnCl}_4$  might be useful as a means of estimating each substance in mixtures of the two. Although radioactive DMSO and  $\text{DMSO}_2$  may be separated and estimated by paper or thin-layer chromatography<sup>4,6</sup>, the method described here seemed to possess an inherent advantage in its simplicity. Separation and estimation of the compounds by gas chromatography (HUCKER, MILLER, and HOCHBERG<sup>7</sup>) is less simple but essential for analysis of non-radioactive samples.

The procedure used was as follows. Aliquots of standard solutions of DMSO and  $\text{DMSO}_2$  in chloroform were diluted to 7 ml with chloroform in 1.5-ml glass-stoppered centrifuge tubes. Radioactivity in a 0.2 ml aliquot was measured by liquid scintillation spectrometry. 0.1 ml of non-radioactive DMSO was added, the contents mixed well, followed by addition of 0.1 ml of  $\text{SnCl}_4$ . After thorough mixing, the tube was centrifuged, and the radioactivity in 0.2 ml was measured. The results are shown in Table I. Recovery of DMSO was represented by the difference in c/min before and after precipitation.  $\text{DMSO}_2$  remains virtually unaffected by  $\text{SnCl}_4$  and hence the c/min before and after precipitation were nearly the same.

The DMSO and  $\text{DMSO}_2$  content of mixtures was similarly calculated. Results of these analyses are shown in Table II. If mixtures of radioactive DMSO and  $\text{DMSO}_2$  having a DMSO content that is appreciably higher than that of  $\text{DMSO}_2$  are used, as was the case here, the counts after precipitation must be corrected for the small % of DMSO remaining in solution.

Table I. Precision and accuracy of determination of DMSO and  $\text{DMSO}_2$

DMSO added, $\mu\text{g}$	DMSO found <sup>a</sup> , $\mu\text{g}$	$\text{DMSO}_2$ added, $\mu\text{g}$	$\text{DMSO}_2$ remaining <sup>a</sup> , $\mu\text{g}$
100	97.9 $\pm$ 2.1	50	44.6 $\pm$ 1.7
75	72.7 $\pm$ 0.5	25	22.6 $\pm$ 1.3
50	48.9 $\pm$ 0.3	10	9.0 $\pm$ 0.8
25	24.6 $\pm$ 0.2	5	4.3 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Average of 5 determinations  $\pm$  standard deviation.

Table II. Precision and accuracy of determination of DMSO and  $\text{DMSO}_2$  in mixtures

Added DMSO, $\mu\text{g}$	Found DMSO, $\mu\text{g}$	Found $\text{DMSO}_2$ , $\mu\text{g}$
100	25	103.0 $\pm$ 1.5
50	10	49.7 $\pm$ 1.7
25	5	25.8 $\pm$ 0.7

<sup>a</sup> Average of 5 determinations  $\pm$  standard deviation.

<sup>1</sup> F. A. COTTON and R. FRANCIS, J. Am. chem. Soc. 82, 2986 (1960).

<sup>2</sup> I. LINDQVIST and M. ZACKRISSON, Acta chem. scand. 14, 453 (1960).

<sup>3</sup> K. I. H. WILLIAMS, K. S. WHITMORE, T. N. MELLIN, and D. S. LAYNE, Science 149, 203 (1965).

<sup>4</sup> E. GERHARDS, H. GIBIAN, and G. RASPE, Arzneimittel-Forsch. 15, 1295 (1965).

<sup>5</sup> H. B. HUCKER, P. M. AHMAD, E. A. MILLER, and R. BROBYN, Nature 209, 619 (1966).

<sup>6</sup> H. B. HUCKER, P. M. AHMAD, and E. A. MILLER, J. Pharmac. exp. Ther., in press.

<sup>7</sup> H. B. HUCKER, J. K. MILLER, and A. HOCHBERG, J. Pharmac. exp. Ther., in press.