

16°C zwischen 800 und 1260 Hz; bei 25°C zwischen 1260 und 1420 Hz, also höher. Der Unterschied beruht nicht auf grösserer Lebhaftigkeit oder Reaktionsbereitschaft der Fische bei der höheren Temperatur. Das Ergebnis steht im Einklang mit der Vermutung, dass die Tonfrequenzunterscheidung bei Fischen nach dem «volley principle» (WEVER) erfolgt.

PRO EXPERIMENTIS

Papierchromatographische
Ultramikro-Alkalimetrie

Die von WIELAND und Mitarbeitern¹ ausgearbeitete und zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen (etwa 1,5 γ) von Aminosäuren benützte retentiogra-

¹ TH. WIELAND und E. FISCHER, *Naturwissenschaften* 35, 29 (1948). – TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 60, 313 (1948). – TH. WIELAND und L. WIRTH, *Angew. Chem.* 63, 171 (1951). – TH. WIELAND und U. FELD, *Angew. Chem.* 63, 258 (1951). – Vgl. auch B. ERDEM, B. PRIJS und H. ERLNMEYER, *Helv. chim. Acta* 38, 267 (1955).

phische Methode lässt sich, wie wir fanden, auf die Identifizierung und Bestimmung anorganischer Ionen übertragen. Am Beispiel der Ultramikrobestimmung anorganischer Basen sei die Arbeitsweise beschrieben, mit deren Hilfe es gelingt, noch etwa 2 γ OH-Ionen (das sind ca. 5 γ NaOH) zu erfassen, eine Menge, die auf trimetrischem Weg mit Farbindikatoren nicht mehr bestimmbar ist².

Die auf OH' zu prüfende Lösung wird in einer Reihe mit Kontrollösungen, die bekannte Mengen der Base enthalten, auf der Startlinie aufgetragen. Die Entwicklung des Retentions-Chromatogramms erfolgt mit einem HCl-haltigen Lösungsmittel; 96%iger, mit 1% Benzol denaturierter Alkohol erwies sich als geeigneter als Dioxan oder Tetrahydrofuran. Die verwendete HCl-Konzentration – wir arbeiteten mit HCl-Konzentrationen von 0,1 bis 0,01%, das sind 1,3 bis 0,13 cm³ 2*n* HCl auf 100 cm³ – soll entsprechend der zu messenden OH'-Menge, die in einem orientierenden Vorversuch festgestellt werden kann, gewählt werden, die Laufzeit möglichst kurz (vgl. Tabellen I und II). Wie Versuche zeigten, ist Temperaturkonstanz erforderlich.

² Vgl. P. L. KIRK, *Quantitative Ultramicroanalysis* (J. Wiley & Sons/Chapman & Hall, New York-London 1951).

Tabelle I
NaOH
Lösungsmittel: 98 cm³ 96%iger Alkohol + 2 cm³ Wasser

Chromatogramm Nr.	1	2	3	4	5	6	7
HCl-Konzentration % . . .	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,01	0,01
Temperatur °C.	25	30	30	25	30	25	30
Laufzeit h.	1	½	1	1 ½	1	2 ½	1
Gefunden cm ² je .	<i>a</i> 5 γ			0,68	0,46	0,45	0,71
	<i>b</i> 10 γ	1,05	0,69	1,32		0,93	1,34
	<i>c</i> 15 γ	1,48	1,24	1,09	1,52	1,43	
	<i>d</i> 20 γ	2,07	1,60	1,34	2,77	1,94	
cm ² /ε	<i>a</i> . .			5,44	3,68	3,60	5,68
	<i>b</i> . .	4,20	2,76	5,28		3,72	5,36
	<i>c</i> . .	3,92	3,28	2,88	4,08	3,84	
	<i>d</i> . .	4,14	3,20	2,68	5,54	3,88	

Tabelle II
Na₂CO₃
Lösungsmittel: 98 cm³ 96%iger Alkohol + 2 cm³ Wasser

Chromatogramm Nr.	8	9	10	11	12	13	14
HCl-Konzentration % . . .	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025	0,01	0,01
Temperatur °C.	25	25	30	30	30	25	30
Laufzeit h.	1	1 ½	½	1	1	2 ½	1 ½
Gefunden cm ² je .	<i>a</i> 5 γ	0,54					
	<i>b</i> 10 γ	0,62	1,10	0,54		1,07	1,50
	<i>c</i> 15 γ	1,00	1,64			1,59	2,25
	<i>d</i> 20 γ	1,37		1,13	1,40	2,08	
cm ² /ε	<i>a</i> . .		1,74	1,65	2,06		
	<i>b</i> . .						
	<i>c</i> . .	3,29	5,83	2,86		5,67	7,95
	<i>d</i> . .	3,53	5,83	3,00	3,71	5,62	7,95
cm ² /ε	<i>e</i> . .	3,63	5,80	3,00	3,64	5,51	
			3,07	2,92			

Sprüht man das erhaltene Chromatogramm mit Kongorotlösung, so sind die an den Auftragsstellen in der Salzsäurefront entstandenen Lücken deutlich erkennbar. Es ist auch möglich, durch Betrachten des entwickelten, nicht besprühten Chromatogramms im UV.-Licht sowohl Salzsäure- als Lösungsmittelfront als hellleuchtende Linien zu erkennen, die direkt nachgezeichnet werden können³.

Die durch Sprühen mit Kongorot oder Zeichnen im UV.-Licht sichtbar gemachten Lücken werden mit einem Planimeter⁴ gemessen⁵. Die in einem Chromatogramm erhaltenen Werte sind den aufgetragenen Basenmengen direkt proportional. Bei sorgfältigem Arbeiten

³ Bei allen Versuchen wurde Whatman-Nr.-1-Papier verwendet.

⁴ Firma J. AMSLER, Schaffhausen.

⁵ Die absolute Grösse der erhaltenen Lücken hängt einmal von der OH'-Menge, dann aber auch von der HCl-Konzentration und daneben von Temperatur, Laufzeit und Feuchtigkeit ab, so dass nur gleichzeitig unter gleichen Bedingungen laufende Chromatogramme direkt verglichen werden können.

liegt die Fehlergrenze bei $\pm 5\%$. Es lassen sich so zum Beispiel NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 bestimmen. Die Salzsäure lässt sich durch andere Mineralsäuren ersetzen.

In den Tabellen I und II sind einige Kontrollversuche zusammengestellt, die die Brauchbarkeit der Methode belegen. Die Tabellen enthalten unter cm^2/ϵ die aus den gemessenen Lückengrößen berechnete Fläche, die einem γ -Äquivalent ($= \epsilon$) entspricht.

Über die Bestimmung kleinster Mengen anderer anorganischer Ionen nach dieser Methode wird später berichtet.

B. PRIJS und H. ERLÉNMEYER

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel, den 13. November 1955.

Summary

A new method, based on retention-paperchromatography, is developed for ultramicrodetermination of inorganic bases.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

The Chemical Nature of the Antibacterial Substance Present in *Aucuba japonica* Thunbg.

By J. E. ROMBOUTS and J. LINKS¹

I.—Introduction

Several compounds with antibiotic properties have been demonstrated to occur in green plants. The majority of them has been exclusively tested for growth-inhibiting activity against certain strains of common bacteria in order to detect antibacterial substances which might be effective against zoopathogens. In this respect an impressive amount of work has been done, among others, by OSBORN², CARLSON *et al.*³, and COLLIER and VAN DER PIJL⁴.

Although the occurrence of substances with antibacterial properties in Phanerogams was found to be a common feature, identification of these substances has been carried through in only a small number of cases. This report deals with the identification and biological characterization of the antibacterial compound first demonstrated to be present in leaves of *Aucuba japonica* by OSBORN², who found aqueous extracts of the variety with maculated leaves (var. *variegata* D'Ombr.) to be effective *in vitro* against *Staphylococcus aureus*, but not against *Escherichia coli*; similar extracts of the variety with entirely green leaves (var. *viridis* Hort.) were said to be ineffective to either one of these bacteria.

¹ N. V. Philips-Roxane, Agro-Biological Laboratory "Boeckesteijn", 's-Graveland, and Central Laboratory, Weesp, The Netherlands.

² E. M. OSBORN, Brit. J. exper. Pathol. **24**, 227 (1943).

³ H. J. CARLSON, H. D. BRISSELL, and M. G. MUELLER, J. Bact. **52**, 155 (1946). — H. J. CARLSON and H. DOUGLAS, J. Bact. **55**, 235 (1948). — H. J. CARLSON, H. G. DOUGLAS, and J. ROBERTSON, J. Bact. **55**, 241 (1948).

⁴ W. A. COLLIER and L. VAN DER PIJL, Chron. Naturae **106**, 73 (1950).

WINTER and WILLEKE⁵ stated that juices expressed from leaves and roots of *A. japonica* strongly inhibited the growth of a population of the most different kinds of soil bacteria, and that *Bacillus subtilis* and both *S. aureus* and *E. coli* were very sensitive species. More recently FITZPATRICK⁶ found that aqueous extracts of the leaves of *A. japonica* were effective *in vitro* against a human strain of *Mycobacterium tuberculosis*, activity being greater in autumn than in spring. These investigators do not reveal whether they used a special variety of *Aucuba*.

II.—Experimental

(1)—*Detection of an inactive precursor.* In the ordinary routine screening for the presence of antibiotic activity in crude plant juices, it was found that squeezed leaves of *A. japonica* var. *variegata* showed a marked activity against both the spores of *Bacillus subtilis* and the conidia of *Penicillium italicum*. When the fresh *Aucuba* leaves were immersed in boiling water for a few minutes before squeezing, the activity of leaf extracts against both micro-organisms was entirely destroyed; it could be restored, however, by mixing the inactive leaf juice with a minute amount of crushed fresh *Aucuba* leaves, an amount which was so small that it exerted no noticeable inhibition by itself. This observation led us to the assumption that in *Aucuba* leaves an antimicrobial substance is present in the form of an inactive, thermostable compound which, on mixing with an enzyme, is decomposed and gives rise to components, at least one of which is capable of inhibiting the growth of certain microorganisms. So far it was still uncertain whether one single component accounted for both the antibacterial and the antifungal activity.

(2)—*Isolation from leaves of an activating enzyme preparation.* An active crude enzyme mixture was prepared as follows: From fresh leaves of *A. japonica* var. *variegata* the petioles were removed. The laminae were frozen

⁵ A. G. WINTER and L. WILLEKE, Naturwissenschaften **33**, 262 (1951).

⁶ F. K. FITZPATRICK, Antibiot. Chemother. **4**, 528 (1954).