

of the antibiotics for estimation (Table IV). The use of Ponceau S for quantitative work is limited by the narrow range of compounds giving a stained product. The ninhydrin reaction is more versatile. Whilst it has been widely studied for the estimation of neomycin<sup>7,8</sup>, it can be used to estimate other peptide antibiotics. The elution of the antibiotics was carried out in pH 5 acetate buffer in preference to the normal 0.1 N NaOH<sup>6</sup> because it was found that zinc bacitracin decomposed rapidly in alkaline solution.

The electrophoretic separation allows a rapid and quantitative estimation for routine quality control of the antibiotics present in the aerosol preparation investigated in comparison to the normal microbiological methods of assay.

The authors would like to thank Riker Laboratories, Loughborough, for the gift of the antibiotic samples.

Department of Chemistry,  
Loughborough University of Technology,  
Leics. (Great Britain)

R. J. STRETTON  
J. P. CARR  
J. WATSON-WALKER

- 1 *Extra Pharmacopoeia*, 25th Ed., Martindale, London, 1967, pp. 927, 987-988, 1006.
- 2 V. BETINA, in M. LEDERER (Editor), *Chromatographic Reviews*, Vol. 7, Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 119.
- 3 R. FOPPIANI AND B. B. BROWN, *J. Pharm. Sci.*, 54 (1965) 206.
- 4 K. C. GUVEN AND G. OZSARI, *Eczacilik Bulteni*, 9 (1967) 19.
- 5 K. W. BRAMMER AND L. J. HEMSON, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 456.
- 6 J. LIGHTBOWN AND P. DE RISSI, *Analyst*, 90 (1965) 89.
- 7 H. MAEHR AND C. P. SCHAFFNER, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 104.
- 8 D. THORBURN BURNS, G. M. LLOYD AND J. WATSON-WALKER, *Lab. Pract.*, 17 (1968) 448.
- 9 *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, E. Merck, Darmstadt, p. 30.
- 10 S. JACOBS, *Lab. Pract.*, 12 (1963) 557.

Received August 20th, 1969

*J. Chromatog.*, 45 (1969) 155-158

CHROM. 4356

### Dünnschichtchromatographie von 4-Acetyl-2-nitrophenyl-Derivaten phenolischer Verbindungen

In Analogie zum 2,4-Dinitrofluorbenzol ist 4-Fluor-3-nitroacetophenon zur Abscheidung phenolischer Verbindungen geeignet<sup>1,2</sup>, wobei die Reaktionsfähigkeit durch deren Nucleophilie und sterischen Bau bestimmt wird. Enthält die phenolische Komponente Aminogruppen, so treten auch diese in Reaktion. Im Falle des *o*-Aminophenols erfolgt lediglich Substitution am Stickstoff. Die entstehenden 4-Acetyl-2-nitrophenyl-Derivate (ANP-Derivate) liefern bei der UV-spektroskopischen Charakterisierung im Gegensatz zu den entsprechenden 2,4-Dinitrophenyläthern wertvolle Informationen zur Struktur der ursprünglichen Phenole<sup>3</sup>. Aus diesem Grund ist ihr dünn-schichtchromatographisches Verhalten von Interesse. Von einer Vielzahl an Sorbentien erwies sich Kieselgel am geeignetsten, das als manuell gefertigte Dünnschicht sowie

*J. Chromatog.*, 45 (1969) 158-160

TABELLE I

 $(R_F \times 100)$ -WERTE DER ANP-DERIVATE PHENOLISCHER VERBINDUNGEN

	S1		S2	
	Kieselgel G	Polygram SIL S-HR/ UV <sub>254</sub>	Kieselgel G	Polygram SIL S-HR/ UV <sub>254</sub>
<i>ANP-Äther von</i>				
Phenol	62	60	82	65
<i>o</i> -Kresol	65	65	81	86
<i>m</i> -Kresol	60	52	71	70
<i>p</i> -Kresol	65	65	82	85
2,3-Dimethylphenol	65	46	69	70
2,4-Dimethylphenol	69	62	82	80
2,5-Dimethylphenol	70	65	83	80
3,4-Dimethylphenol	62	64	83	81
Thymol	72	74	76	69
Guajacol	44	34	61	60
3-Methoxyphenol	50	60	73	70
2,3-Dimethoxyphenol	50	28	54	20
2,6-Dimethoxyphenol	46	29	53	25
<i>o</i> -Chlorphenol	53	52	65	49
2,4,6-Trichlorphenol	69	75	70	56
<i>o</i> -Nitrophenol	34	19	45	69
<i>m</i> -Nitrophenol	49	38	50	63
<i>p</i> -Nitrophenol	55	40	53	64
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	32	22	54	51
Vanillin	29	23	65	36
4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon	34	13	41	15
4-Hydroxy-2-methoxyacetophenon	42	21	36	14
2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon	40	19	38	24
$\alpha$ -Naphthol	58	53	73	81
$\beta$ -Naphthol	69	62	65	51
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	0	7	0	0
Vanillinsäure	0	4	0	0
Syringasäure	0	3	0	8
<i>p</i> -Hydroxyzimtsäure	0	4	0	13
Ferulasäure	0	4	5	0
N-ANP- <i>m</i> -Aminophenol	28	27	36	10
N-ANP- <i>p</i> -Aminophenol	45	25	44	44
<i>Bis-ANP-Äther von</i>				
Brenzcatechin	20	10	39	11
Resorcin	16	14	54	29
Hydrochinon	34	20	45	45
Orcin	34	17	48	29
2-Methylresorcin	22	23	49	19
Methylhydrochinon	26	28	45	16
<i>Tris-ANP-Äther von</i>				
Phloroglucin	12	7	22	43
2,4,6-Trihydroxyacetophenon	5	3	13	29
<i>N-ANP-Derivat von</i>				
<i>o</i> -Aminophenol	56	38	11	8

als Fertigfolie verwendet wurde. Tabelle I gibt einen Überblick über die Trennung verschiedener ANP-Derivate in den Laufmittelsystemen Cyclohexan-Cyclohexanon (3:1) (S 1) und Methylenchlorid-Cyclohexan (5:1) (S 2).

### Diskussion der $R_F$ -Werte

ANP-*m*-Kresol weist gegenüber ANP-*o*- und ANP-*p*-Kresol eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit auf. 2,3-Dimethylphenol lässt sich nach Verätherung mit S 2 und S 1 (nur auf Polygram SIL S-HR/UV<sub>254</sub>) von den isomeren Dimethylphenolen abtrennen. Methoxylgruppen bewirken in *o*- und *o,o'*-Stellung zur O-ANP-Funktion eine wesentliche Erhöhung der Adsorptionsaffinität. Die Trennung der ANP-Nitrophenole wird auf Kieselgel G mit S 1 ermöglicht. Eine Acylgruppe im Substrat setzt den  $R_F$ -Wert beträchtlich herab. ANP- $\alpha$ - und ANP- $\beta$ -Naphthol können gut differenziert werden. Carbonsäuren laufen nicht oder nur geringfügig. Sie sind somit leicht von den übrigen phenolischen Verbindungen abzutrennen. In polaren Laufmittelsystemen besitzen Carbonsäuren höhere aber wenig unterschiedliche  $R_F$ -Werte. *o*-, *m*- und *p*-Aminophenol lassen sich als ANP-Derivate auf Kieselgel G separieren. Mit zunehmender Zahl an 4-Acetyl-2-nitrophenoxygruppen wird im allgemeinen die Adsorption erhöht. Auf MN-Kieselgel S-HR/UV<sub>254</sub> als Polygram-Fertigfolie erscheinen die Substanzen als punktförmige scharfe Flecken, so dass auch bei geringen  $R_F$ -Wert-Unterschieden gute Trennungen möglich sind.

### Methodik

20 × 20 cm-Platten werden in der üblichen Weise mit je 8 g Kieselgel G (Merck) in 16 ml Wasser beschichtet und an der Luft getrocknet. Als Fertigfolie verwendet man MN-Polygram SIL S-HR/UV<sub>254</sub> (5 × 20 cm). Die ANP-Derivate werden in 0,5%iger acetonischer oder dimethylformamidhaltiger Lösung aufgetragen. Bei Kammer sättigung chromatographiert man bis zu einer Laufhöhe von 13 cm. Zum Nachweis der ANP-Derivate auf Kieselgel G dient Rhodamin B im UV-Licht.

Herrn Dr. P. WOLLENWEBER (Macherey, Nagel & Co., Düren) danken wir für die Überlassung von Polygram-Fertigfolien, Frau S. WILDENHAIN für gewissenhafte experimentelle Mitarbeit.

Sektion Chemie, Lehrstuhl für Organische  
Chemie der Bergakademie Freiberg/Sa. (D.D.R.)

WOLFGANG WILDENHAIN  
GÜNTER HENSEKE  
GERT BIENERT

- 1 H. OELSCHLÄGER, W. TOPORSKI, P. SCHMERSAHL UND C. WELSCH, *Arch. Pharm.*, 296 (1963) 107.
- 2 W. WILDENHAIN, G. HENSEKE UND G. BIENERT, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, im Druck.
- 3 W. WILDENHAIN UND G. HENSEKE, in Vorbereitung.

Eingegangen am 2. September 1969

*J. Chromatog.*, 45 (1969) 158-160