

HANS PLIENINGER und KURT SCHNEIDER

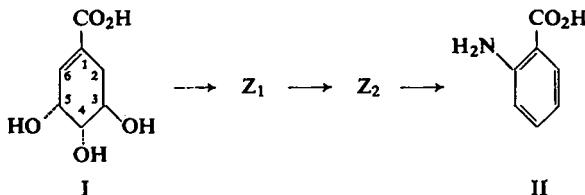
Die Anlagerung von Ammoniak an Shikimisäure

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 5. März 1959)

Bei der Anlagerung von Ammoniak an Shikimisäure (I) entstehen vorwiegend zwei stereoisomere Aminosäuren der Konstitution III und IV.

Die Reaktionskette der Biosynthese der Anthranilsäure und damit des Indols und Tryptophans in *Escherichia coli* und *Neurospora* ist im wesentlichen durch Mutantenversuche aufgeklärt^{1,2)}. Unklar ist vorläufig, wie aus Shikimisäure (I) biochemisch Anthranilsäure (II) entsteht.



Es ist möglich, daß durch Anlagerung von Ammoniak an die Doppelbindung der Shikimisäure eine 6-Amino-dihydroshikimisäure entsteht, ein Vorgang, der in der Bildung von Asparaginsäure aus Fumarsäure unter dem Einfluß der Aspartase eine Parallelie hätte. Diese Aminosäure könnte sich durch Austritt von drei Molekülen Wasser zu Anthranilsäure aromatisieren. Diese Vorstellung steht allerdings nicht im Einklang mit Mutantenversuchen, die es wahrscheinlich machen, daß 5-Phosphoshikimisäure (Z_1) und eine, ebenfalls stickstofffreie, labile Verbindung aus Shikimisäure und Brenztraubensäure (Z_2) in der biologischen Reaktionskette der Shikimisäure folgen^{3,4)}.

Es schien dennoch lohnend, Ammoniak an Shikimisäure anzulagern und die Reaktionsprodukte chemisch und biochemisch auf ihre Fähigkeit zu prüfen, in Anthranilsäure überzugehen. Bei der Einwirkung von konz. wäßrigem Ammoniak auf Shikimisäure im Einschlußrohr bei 150° entsteht in etwa 50% Ausbeute ein Gemisch von Aminosäuren, die über einen stark sauren Ionenaustauscher (Dowex 50) vom Ausgangsmaterial abgetrennt werden können. Beim Eluieren mit verdünnter Ammoniumhydroxydlösung kann man die am Austauscher gebundenen Aminosäuren auswaschen. Im Papierchromatogramm lassen sich drei Aminosäuren nachweisen.

Aus der ersten Fraktion des Eluats erhält man in sehr geringer Menge eine schwach sauer reagierende Aminosäure vom Schmp. 236–238° (Zers.). Die Analyse deutet

¹⁾ B. D. DAVIS, in „A Symposium on Amino Acid Metabolism“, S. 799, W. D. McELROY and H. B. GLASS, Editors, Hopkins Press, Baltimore 1955.

²⁾ A. MEISTER, in „Biochemistry of The Amino Acids“, S. 346, Academic Press Inc., Publishers, New York 1957.

³⁾ B. D. DAVIS und E. S. MINGNIOLI, J. Bacteriol. 66, 129 [1953].

⁴⁾ C. GILVARG und B. D. DAVIS, Federation Proc. 14, 691 [1955].

auf eine Verbindung der Formel $C_7H_{11}NO_4$, d. h., eine Hydroxylgruppe ist durch die Aminogruppe ersetzt worden. Ein *N*-Benzoylderivat stützt diese Formulierung. Wegen des sauren Charakters dieser ungesättigten Aminosäure nehmen wir an, daß die allylständige Hydroxylgruppe der Shikimisäure durch den NH_2 -Rest ersetzt wurde (vinylhomologe Glycinanordnung), obwohl sich bei der Aromatisierung mit konz. Salzsäure bei 120° papierchromatographisch keine *m*-Aminobenzoësäure nachweisen läßt.

Aus der Hauptfraktion des Ammoniakuats, in dem papierchromatographisch zwei Aminosäuren mit fast gleichem R_F -Wert nachweisbar sind, läßt sich eine der beiden (Aminosäure A mit dem R_F -Wert 0.08 – 0.09) rein und ausgezeichnet kristallisiert erhalten. Sie schmilzt bei 278° (Zers.). Analyse und chemisches Verhalten sprechen eindeutig für eine Aminosäure der Formel $C_7H_{13}NO_5$, die sich durch Anlagerung von Ammoniak an die Doppelbindung der Shikimisäure gebildet hat.

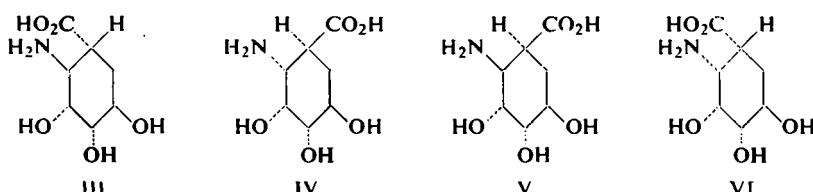
Auch die zweite Aminosäure der Hauptfraktion (Aminosäure B mit dem R_F -Wert 0.12) läßt sich in fester, aber nicht kristallisierter Form erhalten, wenn man die Mutterlauge, aus der die Aminosäure A zum größten Teil ausgefällt wurde, nochmals an einer Cellulosesäule auftrennt. Sie ist stark hygroskopisch, bildet leicht einen Sirup und zersetzt sich langsam schon bei 100° . Nach der Analyse und ihrem chemischen Verhalten ist diese Verbindung mit der Aminosäure A stereoisomer.

Aus beiden Aminosäuren erhält man noch stark wasserlösliche *N*-Benzoylderivate, die man deshalb über einen Ionenaustauscher isoliert.

Bei dem Isomerenpaar (Aminosäure A und B) handelt es sich um β -Aminosäuren (6-Amino-dihydroshikimisäuren), wie aus der Bildungsweise (Anlagerung von Ammoniak an α,β -ungesättigte Säuren) und den Eigenschaften (Aromatisierung zu Anthranilsäure, siehe weiter unten) hervorgeht.

Beide Aminosäuren reagieren nach der üblichen Methode mit wäßriger 1-proz. Ninhydrinlösung nur sehr schwer, und die Blaufärbung tritt erst nach längerem Erhitzen sehr schwach auf. Dieses Verhalten gegenüber Ninhydrin ist nach L. BIRKOFER und I. STORCH⁵⁾ für β -Aminosäuren charakteristisch. Sehr viel schneller erfolgt die Reaktion mit einer 0.2-proz. Lösung von Ninhydrin in 95% n-Butanol und 5% 2*n* Essigsäure⁶⁾, wobei schon nach kurzem Erhitzen eine deutliche blauviolette Färbung auftritt.

Vier stereoisomere Formen lassen sich formal durch Anlagerung von Ammoniak an Shikimisäure konstruieren: zwei, in denen die Aminogruppe (in 6-Stellung) zur Carboxylgruppe in *cis*- und zwei, in denen sie in *trans*-Stellung steht.



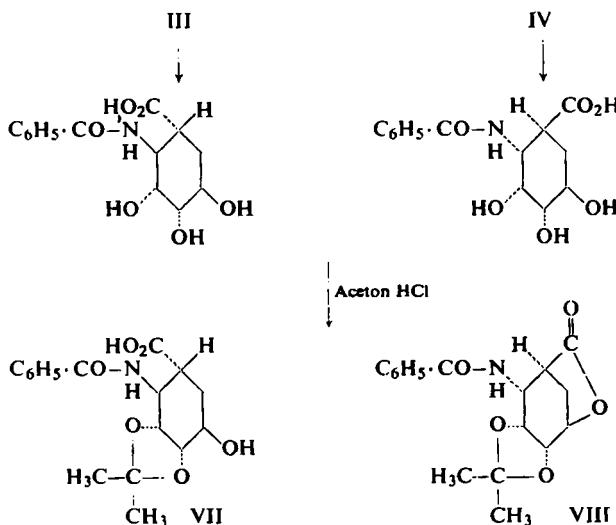
⁵⁾ Chem. Ber. 87, 574 [1954].

⁶⁾ F. CRAMER in „Papierchromatographie“, S. 55, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1953.

Da sich aber nur zwei der vier möglichen Isomeren gebildet haben, muß die Addition in sterisch einheitlicher Reaktion erfolgt sein. Die Frage, ob unter den von uns gewählten Bedingungen der Ammoniakanlagerung an Shikimisäure sich *cis*- oder *trans*-Cyclohexan-aminosäuren bilden, haben wir an einer Modellverbindung zu entscheiden versucht. So addiert die Δ^1 -Tetrahydrobenzoësäure Ammoniak unter ausschließlicher Bildung von *trans*-Hexahydroanthanilsäure⁷⁾.

Überträgt man die an der Δ^1 -Tetrahydrobenzoësäure gewonnenen Ergebnisse auf die Shikimisäure, so kommen jetzt nur noch die Formen III und IV in Betracht, die wir unseren Aminosäuren A und B in folgender Weise zuordnen können:

Die *N*-Benzoylderivate der Aminosäuren A und B wurden mit Aceton, das 1% Chlorwasserstoff enthält, mehrere Tage geschüttelt. Bei dieser Behandlung bilden bekanntlich nur *cis*-ständige Hydroxyle des Cyclohexanrings Isopropylidenverbindungen, und gleichzeitig kann die Carboxylgruppe mit einer noch freien *cis*-ständigen γ - oder δ -Hydroxylgruppe einen Lactonring bilden, wie es bei der protonenkatalysierten Acetonierung der Chinasäure, aus der sich Acetonchinid bildet, der Fall ist. Aus der *N*-Benzoylverbindung der Aminosäure A erhielten wir eine sauer reagierende Verbindung vom Zers.-P. 102–104°, deren Analyse für die freie Säure VII spricht, während die *N*-Benzoylverbindung der Aminosäure B ein neutral reagierendes Lacton (VIII) vom Schmp. 209–210° lieferte. Danach kommt der Aminosäure A die Konfiguration III, der Aminosäure B diejenige von IV zu.



Die chemischen Befunde für die Säure VII lassen sich mit den Daten des IR-Spektrums⁸⁾ gut vereinbaren. Bei 3400/cm tritt die breite Bande der OH-Valenzschwingung der Hydroxylgruppe des freien Carboxyls auf und bei 1050–1090/cm die C—O-Valenzschwingung der freien sekundären Hydroxylgruppe an C-Atom 3 des 6-Rings.

⁷⁾ A. PLIENINGER und K. SCHNEIDER, Chem. Ber. 92, 1594 [1959], nachstehend.

⁸⁾ Die Spektren sollen in der Kartei „Dokumentation der Molekülspektroskopie“, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., veröffentlicht werden.

Auch beim Lacton VIII stimmen die chemischen Ergebnisse mit dem IR-Spektrum gut überein; an Stelle der C=O-Valenzschwingung der freien Carboxylgruppe bei 1665/cm ist die in ihrer kurzweligen Lage sehr charakteristische C=O-Valenzschwingung des Lactonrings bei 1780/cm getreten; entspr. fehlt die starke O—H-Valenzschwingung der freien Carboxylgruppe.

Schließlich haben wir die Aminosäuren III und IV mit konz. Salzsäure im Bombenrohr auf 125—130° erhitzt und im Reaktionsgemisch einwandfrei Anthranilsäure neben Anilin nachweisen können. Beim Erhitzen mit Schwefelsäure und Alkohol auf 120° erhält man Anthranilsäure-äthylester.

Anm. b. d. Korr.: D. B. SPRINSON und P. R. SRINIVASAN von der Columbia University New York haben die Aminosäuren III und IV in Fütterungsversuchen und im enzymatischen Test bei Coli Mangelmutanten auf ihre Fähigkeit untersucht, Anthranilsäure zu ersetzen bzw. zu bilden. Die Resultate waren negativ. Eine Veröffentlichung über die Versuche ist in J. Amer. chem. Soc. im Druck.

Die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT hat diese Arbeit wesentlich unterstützt; der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK danken wir für Chemikalien.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Anlagerung von Ammoniak an Shikimisäure: 17.4 g Shikimisäure werden mit 150 ccm (ca. 25-proz.) währ. Ammoniak 50—60 Std. im Bombenrohr auf 150—155° erhitzt. Nach Öffnen des Bombenrohres wird die braune Reaktionslösung i. Vak. eingedampft, wobei 19.1 g eines braunen, glasartigen Produktes zurückbleiben. Diesen Rückstand löst man in 50 ccm Wasser und kocht ihn zur Entfärbung (am besten unter Durchperlen eines Stickstoffstromes) zweimal mit Aktivkohle. Das erhaltene klare Filtrat wird mit Wasser auf ein Gesamtvolume von 1 l verdünnt und über einen stark sauren Kationenaustauscher*) gegeben.

Der Austauscher wird vorher in der üblichen Weise mit 2 n NaOH, 2 n HCl und dest. Wasser abwechselnd behandelt, dann in Wasser aufgeschlämmt und in eine Glassäule von ca. 10 mm Durchmesser und 75 cm Länge eingefüllt. Die Durchlaufgeschwindigkeit der zur Trennung aufgegebenen Lösung soll dabei 60 ccm Flüssigkeit/Stde. nicht überschreiten. Man wäscht mit 200 ccm Wasser nach und erhält nach dem Eindampfen der durchgelaufenen Flüssigkeit und des Waschwassers 4.3 g (25%) nicht umgesetzte Shikimisäure zurück, die als sauer reagierende Verbindung vom Austauscher nicht gebunden wird.

Die an den Austauscher gebundenen Aminosäuren werden mit 0.1 n NH₄OH aus der Säule verdrängt (Durchflußgeschwindigkeit auch hier 60 ccm Flüssigkeit/Stde.), das Eluat wird fraktioniert aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen chromatographiert man in der später angegebenen Weise an Papier und kann so die Bildung von drei Aminosäuren feststellen.

Isolierung einer Aminosäure unbekannter Struktur: Die ersten 40—50 ccm des Eluats reagieren schwach sauer (*p*_H 4—5) und ergeben beim Einengen und Zugabe von Alkohol 200 mg farblose Kristalle. Nadelchen (aus 50-proz. Alkohol), Schmp. 236—238° (Zers.).



N-Benzoylverbindung: 180 mg der Aminosäure, gelöst in 4 ccm 1 n NaOH, werden mit 200 mg Natriumacetat und 175 mg frisch destilliertem Benzoylchlorid 20 Min. unter Kühlung

*) Als Austauscher diente in diesem und den folgenden Versuchen Dowex 50, 200 bis 400 mesh, der Dow CHEM. COMP., Midland, Michigan.

geschüttelt. Nach Ansäuern mit 2 n HCl scheiden sich weiße Kristalle ab; Schmp. 128–130° (aus verdünntem Alkohol). Ausb. 150 mg (52% d. Th.).



6-Amino-dihydroshikimisäure A: Zur Isolierung der beiden anderen Aminosäuren wird das Eluat i. Vak. auf 10 ccm eingeengt und bis zur bleibenden Trübung mit Alkohol versetzt. Bei mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank nach vorherigem Anreiben der Gefäßwand kristallisiert die eine der beiden strukturisomeren Aminosäuren in langen, bis zu 1 bis 2 cm langen farblosen Nadeln aus. Aus der Mutterlauge lässt sich beim weiteren Einengen und Zugeben von Alkohol nochmals kristallisierte Aminosäure gewinnen. Gesamtausbeute: 4.8 g (23% d. Th., bez. auf eingesetzte, und 30%, bez. auf umgesetzte Shikimisäure). Zur Analyse wird die Aminosäure in Wasser gelöst und mit Alkohol ausgefällt, wobei sie mit 1 Mol. Wasser auskristallisiert. Schmp. 278° (Zers.).

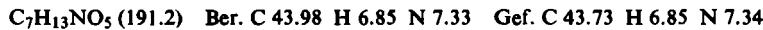


Bei 24 stdg. Trocknen bei 100°/1 Torr über P₂O₅ entweicht das Kristallwasser.



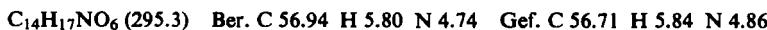
6-Amino-dihydroshikimisäure B: Aus der Mutterlauge der mit Alkohol fast vollständig ausgefällten krist. Aminosäure A lässt sich auch bei weiterer Zugabe von Alkohol kein kristallisiertes Isomeres isolieren. Es scheidet sich lediglich am Boden ein gelblicher Sirup ab, der auch nach längerem Stehenlassen nicht durchkristallisiert. Die Mutterlauge gibt man deshalb in konzentrierter Form auf eine mit Cellulosepulver gefüllte Glassäule von 1 m Länge und 4–5 cm innerem Durchmesser, die folgendermaßen präpariert wurde: Das Cellulosepulver (Whatman Nr. 1) wird mit Aceton angerührt und, wenn es gequollen ist, in die Säule gefüllt, die am unteren Ende mit einer flüssigkeitsdurchlässigen Siebplatte versehen ist. Gleichmäßig feste und fast blasenfreie Füllung ist notwendig. Man verdrängt das Aceton mit einem Gemisch aus n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1), das als Entwicklungsgemisch dient, aus der Säule und kann nun die Mutterlauge aufgeben. Dann lässt man wieder das Lösungsmittelgemisch durchlaufen und hält eine Durchflussgeschwindigkeit von 50 ccm Flüssigkeit/Stde. ein. Das durchlaufende Gemisch wird fraktioniert aufgefangen, und die einzelnen Fraktionen werden papierchromatographiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels identischer Fraktionen i. Vak. bei einer 50° nicht übersteigenden Badtemperatur lässt sich auf diese Weise trotz des geringen Unterschieds im R_f-Wert gegenüber ihrem Isomeren die Aminosäure B in fester, aber nicht kristallisierter Form gewinnen. Die beim Einengen ausfallende Säure wird im Exsikkator von den letzten Spuren Lösungsmittel befreit. Die sehr stark hygrokopische Substanz zersetzt sich oberhalb von 100° und kann beim Umlösen aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht kristallisiert erhalten werden.

Ausb. 4.6 g (22% d. Th. an eingesetzter und 29% an umgesetzter Shikimisäure).



N-Benzoyl-6-amino-dihydroshikimisäure A: 6.9 g Aminosäurehydrat A, gelöst in 40 ccm 10-proz. Natronlauge, werden unter Eiskühlung und Schütteln tropfenweise mit 5.8 g Benzoylchlorid versetzt. Dann schüttelt man noch 1 Stde. bei 5°, säuert mit konz. Salzsäure an und schüttelt die gebildete Benzoesäure mit Äther zweimal aus. Die salzaure wäßrige Lösung wird i. Vak. bei einer Badtemperatur von 40–50° zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 200 ccm Wasser gelöst und zur Entfernung von NaCl und der nicht umgesetzten Ausgangsverbindung über eine mit einem stark sauren Kationenaustauscher gefüllte Säule gegeben. Man wäscht mit Wasser neutral und dampft Filtrat und Waschwasser i. Vak. bei 45° ab. Zurück bleibt die leicht hellbraun gefärbte N-Benzoylaminosäure A, der noch Spuren von

Salzsäure anhaften, die durch Trocknen über Kaliumhydroxyd im Exsikkator entfernt werden. Ausb. 9.1 g (93 % d. Th.). Zweimaliges Umkristallisieren aus wenig Wasser/Alkohol (4:1) ergibt farblose, schwach hygroskopische Blättchen, Schmp. 223°.



N-Benzoyl-6-amino-dihydroshikimisäure B: 1.3 g *Aminosäure B* löst man in 20 ccm 1 n NaOH, gibt 1.1 g *Benzoylchlorid* zu und schüttelt unter Kühlung, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist (30 Min.). Die alkalische Lösung wird mit konz. Salzsäure kongosauer gestellt, zweimal mit je 20 ccm Äther ausgeschüttelt und wie oben aufgearbeitet (der Rückstand der wäßr. Lösung wird in 50 ccm Wasser aufgenommen usw.). Man erhält eine amorphe weiße Substanz, die auch beim Umlösen aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen nicht kristallisiert, obwohl sie keine Ausgangsverbindung mehr enthält. Ausb. 0.78 g (40 % d. Th.).

Durch Verdrängen mit 0.1 n NH₄OH kann man aus der Säule 0.24 g nicht umgesetzte 6-Amino-dihydroshikimisäure B zurückgewinnen.

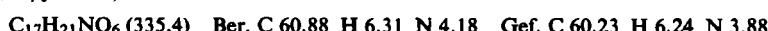
Die papierchromatographische Trennung der Aminosäuren: In Übereinstimmung mit den Befunden von BIRKOFER⁵⁾ reagieren die beiden isomeren Aminosäuren A und B nach der üblichen Methode mit wäßr. 1-proz. Ninhydrinlösung nur sehr schwer, und die Blaufärbung tritt erst nach längerem Erhitzen und nur sehr schwach wahrnehmbar auf; sehr viel schneller erfolgt die Farbreaktion aber mit einer 0.2-proz. Lösung von Ninhydrin in 95 % n-Butanol und 5 % 2 n Essigsäure. Schon nach kurzem Erhitzen tritt eine blaugrüne, bei längerem Erhitzen in Blauviolett umschlagende intensive Färbung auf.

Am vorteilhaftesten arbeitet man wegen des geringen *R_f*-Wert-Unterschiedes der zwei isomeren Aminosäuren nach der absteigenden Methode mit einem Gemisch von n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Die Laufzeit beträgt bei Verwendung von Schleicher & Schüll-Papier 2043 b mgl und einer konstanten Raumtemperatur von 20° 24–30 Stdn.

Die Papierstreifen werden nach 1–2 stdg. Trocknen an der Luft mit der oben angegebenen 0.2-proz. Ninhydrinlösung besprüht und zur Sichtbarmachung der Flecke 12–15 Min. bei 110–115° getrocknet. Die Flecke werden bei den beiden isomeren Aminosäuren nach anfänglicher Blaugrün-Färbung an der Luft blauviolett, während die ungesättigte Aminosäure schon von Beginn an eine blauviolette Farbe zeigt.

	6-Amino-dihydro-shikimisäure A	6-Amino-dihydro-shikimisäure B	ungesättigte Aminosäure
<i>R_f</i> -Wert	0.08–0.09	0.12	0.32

4.5-Isopropyliden-6-benzoylamino-dihydroshikimisäure (VII): 6.0 g *N-Benzoylaminosäure A* werden bei 20° in einer Flasche mit 150 ccm trockenem Aceton, das 1% Salzsäure enthält, 5 Tage geschüttelt. Danach wird vom nicht umgesetzten Ausgangsprodukt (3.8 g) abfiltriert und zur Entfernung der Salzsäure mit einem Überschuß gesättigter Natriumhydrogen-carbonatlösung versetzt. Man destilliert das Aceton i. Vak. ab, stellt mit verd. Salzsäure gerade kongosauer und schüttelt mit je 50 ccm Essigester fünfmal aus. Nach Trocknen der vereinigten Essigesterauszüge über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft und der gelbliche Rückstand mit wenig Alkohol gelöst. Die Isopropylidenverbindung wird mit Äther als flockiger weißer Niederschlag ausgefällt. Zers.-P. 102–104°. Ausb. an Rohprodukt: 2.1 g (31 % d. Th.).



Äquivalenztitration: Ber. 10.00 ccm n/10 NaOH, Gef. 10.04 ccm

4,5-Isopropyliden-6-benzoylamino-dihydroshikimisäure-lacton-(3) (VIII): 0.5 g *N*-Benzoylaminosäure **B** werden bei 40° mit 60 ccm trockenem Aceton, das 1% Salzsäure enthält, 5 Tage mit einem Magnetstift gerührt. Zur Neutralisation der Salzsäure schüttelt man die gelbe Lösung 3 Stdn. mit 10 g neutralem Bleicarbonat bei Raumtemperatur und saugt ab. Das Aceton wird i. Vak. abgedampft; der leicht gelb gefärbte Rückstand ergibt, aus Alkohol/Aceton (3:1) umkristallisiert, derbe farblose Nadeln vom Schmp. 209—210°. Ausb. an Rohprodukt: 0.215 g (40% d. Th.).

C₁₇H₁₉NO₅ (317.4) Ber. C 64.36 H 6.03 N 4.42 Gef. C 64.38 H 6.39 N 4.58

Aromatisierung der 6-Amino-dihydroshikimisäuren A und B: 3 g Aminosäure und 40 ccm konz. Salzsäure werden im Bombenrohr 30 Stdn. auf 125—130° erhitzt. Nach Öffnen der Bombe wird die Salzsäure i. Vak. abdestilliert, der braune Rückstand in wenig 2 n NaOH gelöst und dreimal mit je 20 ccm Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge trocknet man über Kaliumcarbonat. Nach Abdestillieren des Äthers bleiben wenige Tröpfchen einer braunen Flüssigkeit zurück, die beim Erwärmen mit 50-proz. Kalilauge und Chloroform stark nach Isonitril riechen.

Die Rungesche Probe mit wäßriger Chlorkalklösung ergibt eine deutliche violette Färbung.

Die oben erhaltene alkalische Lösung wird mit 2 n H₂SO₄ auf *p*_H 5 eingestellt und fünfmal mit je 25 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach Trocknen der vereinigten Ätherextrakte über Magnesiumsulfat und Abdestillieren des Äthers bleiben 55 mg einer gelbbraunen Substanz zurück.

Ein Teil des Rückstandes wird mit Benzoylchlorid nach Schotten-Baumann in alkalischer Lösung benzoyliert; die erhaltene gelbliche Verbindung schmilzt nach dem Umkristallisieren aus wenig verd. Alkohol bei 176—177° (mit Monoskop gemessen) und zeigt, gemischt mit *N*-Benzoyl-antranilsäure, keine Schmp.-Depression.

Beim Diazotieren des gelbbraunen Rückstandes und nachfolgender Kupplung mit β-Naphthol erhält man einen roten Farbstoff vom Schmp. 264—266° (Zers.). Der aus reiner Anthranilsäure dargestellte Farbstoff schmilzt bei 270°, der Misch-Schmelzpunkt beider Verbindungen weist keine Depression auf.

Die verdünnte alkalische Lösung und eine ätherische Lösung des gelbbraunen Rückstandes fluoreszieren intensiv blau.

Auch das Papierchromatogramm (absteigende Methode, Lösungsmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1) ergibt Übereinstimmung mit *Anthranilsäure*, *R*_F-Wert 0.89—0.90.