

Kussler, Manfred W.; Ruppersberg, Klaus

## Neues von der Wöhlk-Probe: Eine Schutzgruppe in Position 4 reicht aus, um einen positiven Wöhlk- bzw. Fearon-Test mit Glucose hervorzurufen

*formal überarbeitete Version der Originalveröffentlichung in:*

*formally revised edition of the original source in:*

*Nachrichten aus der Chemie 67 (2019) 2, S. 63-65*



Bitte verwenden Sie in der Quellenangabe folgende URN oder DOI /  
Please use the following URN or DOI for reference:

urn:nbn:de:0111-pedocs-193267

10.25656/01:19326

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0111-pedocs-193267>

<https://doi.org/10.25656/01:19326>

### Nutzungsbedingungen

Gewährt wird ein nicht exklusives, nicht übertragbares, persönliches und beschränktes Recht auf Nutzung dieses Dokuments. Dieses Dokument ist ausschließlich für den persönlichen, nicht-kommerziellen Gebrauch bestimmt. Die Nutzung stellt keine Übertragung des Eigentumsrechts an diesem Dokument dar und gilt vorbehaltlich der folgenden Einschränkungen: Auf sämtlichen Kopien dieses Dokuments müssen alle Urheberrechtshinweise und sonstigen Hinweise auf gesetzlichen Schutz beibehalten werden. Sie dürfen dieses Dokument nicht in irgendeiner Weise abändern, noch dürfen Sie dieses Dokument für öffentliche oder kommerzielle Zwecke vervielfältigen, öffentlich ausstellen, aufführen, vertreiben oder anderweitig nutzen.

Mit der Verwendung dieses Dokuments erkennen Sie die Nutzungsbedingungen an.

### Terms of use

We grant a non-exclusive, non-transferable, individual and limited right to using this document.

This document is solely intended for your personal, non-commercial use. Use of this document does not include any transfer of property rights and it is conditional to the following limitations: All of the copies of this documents must retain all copyright information and other information regarding legal protection. You are not allowed to alter this document in any way, to copy it for public or commercial purposes, to exhibit the document in public, to perform, distribute or otherwise use the document in public.

By using this particular document, you accept the above-stated conditions of use.

### Kontakt / Contact:

peDOCS  
DIPF | Leibniz-Institut für Bildungsforschung und Bildungsinformation  
Informationszentrum (IZ) Bildung  
E-Mail: [pedocs@dipf.de](mailto:pedocs@dipf.de)  
Internet: [www.pedocs.de](http://www.pedocs.de)

Mitglied der

  
Leibniz-Gemeinschaft

# Neues von der Wöhlk-Probe:

Eine Schutzgruppe in Position 4 reicht aus, um  
einen positiven Wöhlk- bzw. Fearon-Test  
mit Glucose hervorzurufen

Klaus Ruppertsberg (IPN Kiel) und Manfred W. Kussler (Waldshut-Tiengen)

**Schlüsselbegriffe:** Lactose, Maltose, Nachweisreaktion, Wöhlk, Ammoniak, Fearon, Methylamin, Chemieunterricht

**Key words:** Lactose, maltose, detection reaction, Woehlk, ammonia, Fearon, methylamine, chemistry education

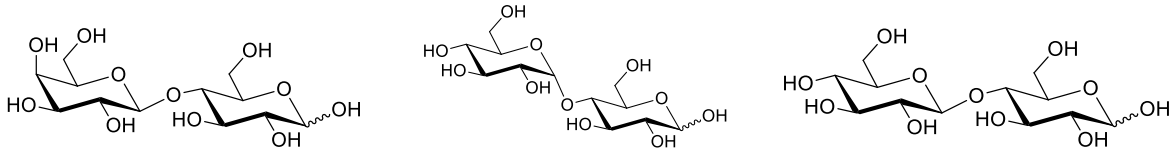
**Zusammenfassung:** Nicht nur Lactose und Maltose, sondern auch andere 1,4-verknüpfte Disaccharide und sogar geschützte Glucosen ergeben mit der Wöhlk-Probe und dem Fearon-Test einen roten Farbstoff, zu dessen Formel es nun begründete Hypothesen gibt.

**Abstract:** Not only lactose and maltose, but also other 1,4-linked disaccharides and even protected glucose result in a red dye with the Woehlk sample and Fearon's test. There are now well-founded hypotheses about the formula for the red dye.

Die Wöhlk-Probe aus dem Jahr 1904 und der sehr ähnliche Test von Fearon (Dublin 1942) haben seit ihrer Entdeckung den Makel, dass über den roten Farbstoff und den Mechanismus zu seinem Entstehen so gut wie nichts herauszubekommen war: Extraktion mit laborüblichen Lösungsmitteln unmöglich! [1]

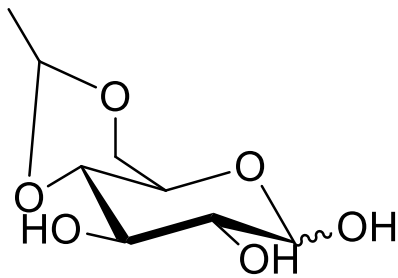
Trotzdem haben vergleichende Untersuchungen nun etwas Licht in die Sache gebracht: wurden anfangs nur Lactose und Maltose als nachweisbare Substanzen für den urologisch und lebensmittelchemisch sehr beliebten Test genannt, so waren es bei näherem Hinsehen auch

Cellulose (Homodimer aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glucosemolekülen) und Maltotriose (Maltose mit einem weiteren Glucosemolekül).



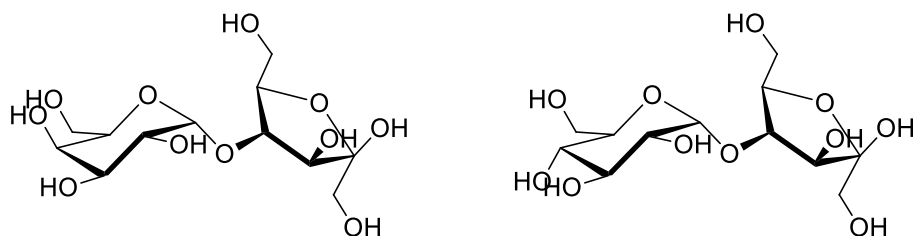
**Abb. 1:** Der rote Farbstoff entsteht (v.l.n.r.) mit Lactose, Maltose und Cellobiose

Alle diese Zucker enthalten in der üblichen Schreibweise rechts ein reduzierendes Zuckermolekül; der linke Teil ist bei den beiden Testreaktionen nach Wöhler und Fehling offensichtlich egal. Die Hypothese, dass ggf. auch eine in der Position 4 geschützte Glucose die gleiche Farbreaktion erbringt, wurde nun in Kiel mit Hilfe von 4,6-O-Ethylidene-D-glucopyranose (Abb.2) verifiziert.



**Abb. 2:** 4,6-O-Ethylidene-D-glucopyranose (Ethyliden-Schutzgruppe an Pos. 4 und 6 der Glucose)

Auch Maltulose und Lactulose (Abb. 3), die im Alkalischen durch eine Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung entstehen, reagieren in der gleichen Weise.



**Abb. 3:** Umlagerungsprodukte Lactulose und Maltulose (v.l.n.r.)

Hierbei verläuft die Farbbildung sowohl bei der Wöhlk-Probe als auch bei dem Fearon-Test mit Lactulose und Maltulose deutlich schneller als mit Lactose und Maltose, und mit geschützter Glucose wiederum schneller als mit Lactulose und Maltulose (Abb. 4).



**Abb.4** : Fearon's Test 70° C-Wasserbad mit jeweils 4 mL Fearon's Test, v.l.n.r. mit 8, 4, 2 mg geschützter Glucose (4,6-O-Ethylidene-D-glucopyranose), sowie 8 mg Lactose, 8 mg Lactulose (Foto: Ruppertsberg)

Weiterhin wurde ermittelt, dass Wöhlk-Reaktion und Fearon's Test mit der frühen und mittleren Maillard-Reaktion sowie mit der Zuckercouleur-Herstellung vergleichbar sind.

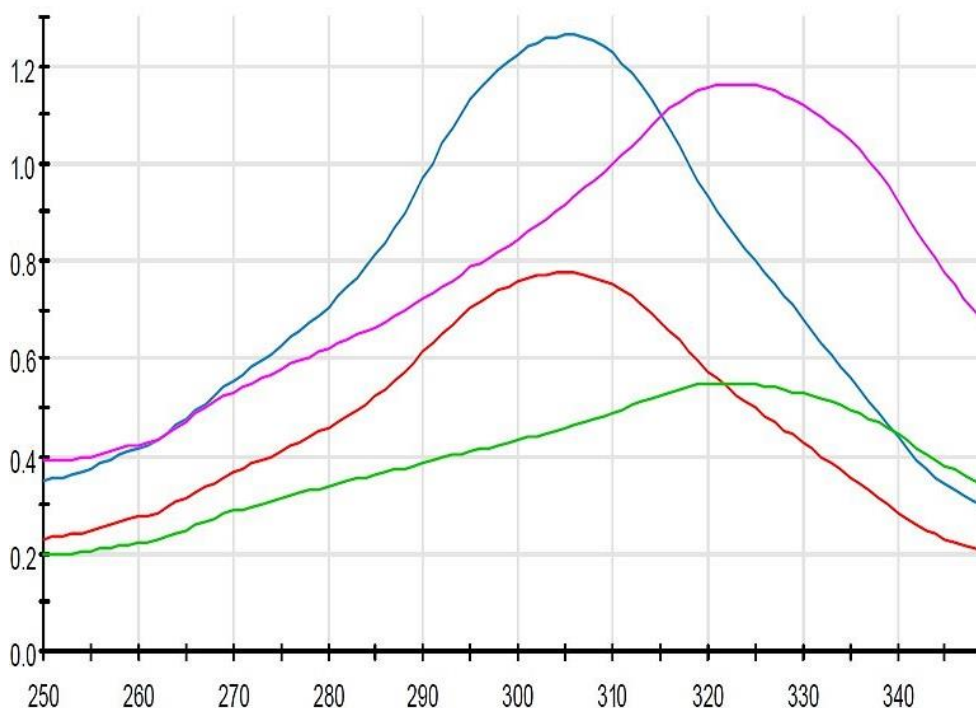
#### Mit UV-Vis-Spektrometrie dem roten Farbstoff näherkommen

Mittlerweile wurden UV-Vis-spektrometrische Untersuchungen durchgeführt, um das Geheimnis des roten Farbstoffs zu lüften. Bei diesen Tests wird anstelle der an jeder Schule verfügbaren Ammoniaklösung Methylammoniumchlorid eingesetzt, wobei im Alkalischen Methylamin freigesetzt wird (Fearon's Test) [2]. Der hierbei entstehende Farbstoff absorbiert im sichtbaren Bereich bei 541 nm und ist leichter zu untersuchen als der instabilere Wöhlk-Farbstoff (527 nm). Derzeit gibt es folgenden Kenntnisstand: Die Differenz der Absorptionsmaxima bei 527 nm (mit Ammoniak) und 541 nm (mit Methylamin) deutet darauf hin, dass es sich um ein Farbstoffmolekül handeln könnte, dessen Absorption durch Austausch von  $-H$  gegen  $-CH_3$  um 14 nm rotverschoben wird. Da die Reaktionen nach Wöhlk und Fearon mit der frühen und mittleren Maillard-Reaktion vergleichbar sind, gibt es nicht nur ein rotes Endprodukt, sondern viele (farblose und/oder UV-absorbierende) Zwischen- und Endprodukte, aber nur jeweils eines ergibt ein Maximum bei 527 nm (mit  $NH_3$ ) bzw. 541 nm (mit Methylamin). Schlüssel zu diesen Zwischenprodukten sind die Betrachtung und

Auswertung der weitaus höheren Maxima im UV-Bereich. Weil Fearon's Test zuverlässiger abläuft als die Wöhlkprobe, wird dieser Methode bei den weiteren Untersuchungen der Vorzug gegeben.

### Stand der Untersuchungen

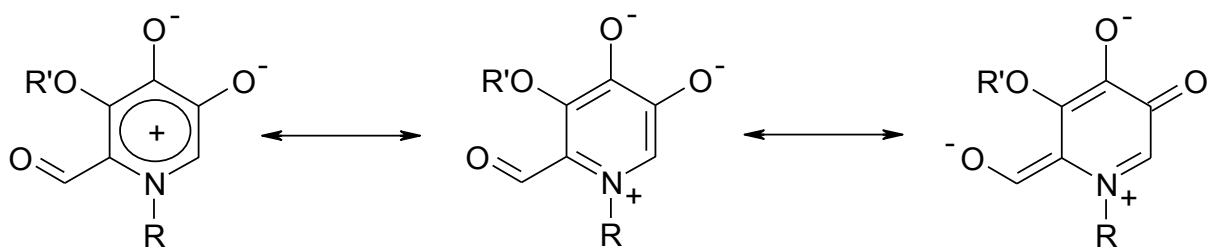
Verschiedene Zuckerlösungen (Lactose, Maltose, Lactulose, Glucose, Fructose) wurden mit Fearon's Test untersucht und UV-Vis-spektrometrisch im Bereich zwischen 250 nm bis 600 nm bestimmt. Dabei ergaben sich auffällige Banden, die schon im Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor [2] bei der Untersuchung von Wöhlkproben beobachtet wurden. Alle lachsrot gefärbten Lösungen zeigten in der Wöhlkprobe sehr intensive Absorptionen bei 306 nm (Abb. 5) sowie ein für den lachsroten Farbeindruck verantwortliches Maximum bei 527 nm mit ca. 1/200 der Intensität von  $E_{306}$ . Bei Fearon's Test liegt die auffällige UV-Bande bei 321 nm sowie bei 541 nm bzgl. des kirschroten Farbeindrucks. Derartige Farbbanden resultieren meist aus einem Charge-Transfer und treten bei betainartigen Verbindungen mit Ladungsseparation auf. Im Habitus und in der Bandenintensität vergleichbare Spektren zeigen auch das Schimmelpilzgift Moniliformin (Natriumsalz der Semiquadratsäure) sowie Azulene.



**Abb. 5:** Intensive Absorptionen bei 306 nm (Wöhlkprobe: Lactulose blau, Lactose rot)), bzw. 321 nm (Fearon's Test: Lactulose violett, Lactose grün).

### Postulierung eines Chromophors

Als gesichert kann angesehen werden, dass bei Einwirkung von Alkalilauge auf reduzierende Zucker zunächst ein Endiolatanion mit Absorption bei 312 nm entsteht, das bei weiterer Einwirkung von Alkali unter Aldolspaltung in Trioseredukton und andere kleine Bruchstücke fragmentiert [3]. Gemäß den Überlegungen der Autoren wird dieses Endiolatanion vor dem weiteren Zerfall durch Ammoniak oder primäre Amine abgefangen und reagiert dann ohne Eliminierungsreaktionen in noch zu klärenden Redoxprozessen weiter zu farbigen Verbindungen. Da Glucose selbst unter diesen Bedingungen gemäß Wöhlk und Fearon nur gelbe Färbungen ergibt, die offenbar auf Zerfallsreaktionen des Endiolatanions zurückzuführen sind, fungiert unserer Meinung nach das zweite Zuckermolekül in den Disacchariden nicht als Abgangsgruppe, sondern es nimmt an der Bildung des Chromophors aktiv teil, indem es als Schutzgruppe den weiteren Zerfall des Endiolatanions verhindert. In der Tat konnte nun gezeigt werden, dass diese Hypothese richtig ist, da 4,6-O-Ethylidene-D-Glucopyranose die gleiche Farbreaktion zeigt wie Lact(ul)ose, Malt(ul)ose und Cellobiose. Da der Farbstoff aber bisher noch nicht isoliert und gereinigt werden konnte, lässt sich nicht ausschließen, dass in der Lösung auch noch weitere nicht zum Chromophor gehörende Endiolate in diesem Bereich absorbieren. Das zweite Maximum bei 362 nm könnte auf ein Derivat von Glutacondialdehyd (Chromophor: O-haltige Anteile in Abb. 3) zurückzuführen sein, der ebenfalls bei dieser Wellenlänge absorbiert. Zur Zeit wird daher von uns das Alkalisalz von *6-Formyl-pyridin-1-ium-3,4-diolat* (Abb. 6) mit einer geschützten 5-Hydroxygruppe als in Frage kommende Struktur diskutiert; R=H für die Wöhlkprobe, R=Me für Fearon's Test; R'=Gal, falls Lact(ul)ose verwendet.



**Abb. 6:** Postuliertes Chromophor: Alkalisalz von *6-Formyl-pyridin-1-ium-3,4-diolat* mit einer geschützten 5-Hydroxygruppe als in Frage kommende Struktur; R=H für die Wöhlkprobe, R=Me für Fearon's Test; R'=Galactose, falls Lact(ul)ose verwendet, bzw. R'=Glucose, falls Malt(ul)ose verwendet.

## Hoher Nutzen für den kontextorientierten experimentellen Chemieunterricht

Ungeachtet dessen rufen Online-Artikel mit Experimentieranleitungen zur Wöhlk-Reaktion hohe Abrufzahlen im Internet hervor, weil auf diese Weise unterschiedliche Milchprodukte mit einfachen schulischen Mitteln anschaulich und schülerorientiert auf ihren Lactosegehalt getestet werden können [1,2,4,5] sowie erstmalig der Endproduktnachweis beim Standardexperiment „Stärkeabbau durch Speichelamylase“ geführt werden kann [6].

### Literatur:

- [1] Ruppertsberg, Klaus: 150 Jahre Alfred Wöhlk. Der Entdecker der Wöhlk-Reaktion würde 150 Jahre alt. Warum ist eine alte chemische Nachweisreaktion heute so interessant für den Chemieunterricht? - In: Nachrichten aus der Chemie 66 (2018) 6, S. 625-628 - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-174608
- [2] Ruppertsberg, Klaus; Hain, Julia; Mischnick, Petra: Auf der Spur der roten Farbe. Ein historischer Lactose-Nachweis wiederentdeckt - In: CHEMKON 24 (2017) 4, S. 302-324 - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-173785
- [3] H. von Euler, B. Eistert: Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate, 1957, F. Enke Verlag Stuttgart; G. Hesse, F. Rämisch, K. Renner: Chem. Ber. 89, 2137 [1956] und darin zitierte Literatur
- [4] Ruppertsberg, Klaus; Hain, Julia: Wie kann der Lactosegehalt von Milchprodukten im Schulexperiment sichtbar gemacht werden? Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Reaktion für den Chemieunterricht - In: ChemKon 23 (2016) 2, S. 90-92 - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-145962
- [5] Ruppertsberg, Klaus: Dem Milchzucker auf der Spur – eine europäische Detektivgeschichte - In: Praxis der Naturwissenschaften - Chemie in der Schule : PdN 65 (2016) 8, S. 30-33 - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-150938
- [6] Ruppertsberg, Klaus: Stärkeverdauung durch Speichel - was kommt eigentlich dabei heraus? Ein einfacher Maltose-Nachweis am Ende der enzymatischen Hydrolyse von Amylose und die überraschende Anwesenheit von Glucose im Verhältnis 1:15 - In: MNU Journal 69 (2016) 5, S. 325-328 - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-150973

### Bezugsquellennachweis:

Hersteller von 4,6-O-Ethylidene-D-Glucopyranose: *Carbosynth, UK*; 10 g kosten ca. 80 Euro.

## Die Autoren:



Dr. Manfred W. Kussler (Jahrgang 1949), Studium der Chemie und Promotion an der Universität Saarbrücken, ist Mitglied der Sektion SEC innerhalb der GDCh. Bisherige Arbeitsgebiete und Interessen galten vornehmlich den Hochleistungstechnologiefarbstoffen (erstmalige Synthese von NIR Cyaninfarbstoffen mit einer Absorption  $>1200$  nm, deren Existenz zuvor bestritten wurde), J-Aggregation, Ladungstransportmaterialien für OLEDs und Solarzellen sowie der Heterocyclenchemie. Durch einen Artikel in den Nachrichten aus der Chemie stieß er im Juni 2018 auf den ungeklärten Farbstoff aus der Wöhlkprobe, für dessen Aufklärung er sich seitdem engagiert.

E-Mail: [manfred.kussler@t-online.de](mailto:manfred.kussler@t-online.de)



OStR Klaus Ruppertsberg (Jahrgang 1959) ist abgeordnete Lehrkraft im IPN, Abt. Chemiedidaktik an der Universität Kiel. Seine Aufgaben betreffen u.a. die Entwicklung und Erprobung von sicheren und ausdrucksstarken Experimenten und Materialien für den kontextorientierten Chemieunterricht. Seit 2016 arbeitet er an der Aufklärung der Wöhlk-Probe von 1904.

E-Mail: [ruppertsberg@ipn.uni-kiel.de](mailto:ruppertsberg@ipn.uni-kiel.de)