

Ruppersberg, Klaus

Nachweis von Lactose (und Maltose) im Kontext Schule. Wöhlk-Probe, Fearon-Test und 1,6-Diaminohexan-Verfahren im kontextorientierten experimentellen Chemieunterricht: Aminbasierte Farbreaktionen als Kohlenhydratnachweise

Flensburg : Zentrale Hochschulbibliothek Flensburg 2021, XVII, 254 S. - (Dissertation, Europa-Universität Flensburg, 2021)



Quellenangabe/ Reference:

Ruppersberg, Klaus: Nachweis von Lactose (und Maltose) im Kontext Schule. Wöhlk-Probe, Fearon-Test und 1,6-Diaminohexan-Verfahren im kontextorientierten experimentellen Chemieunterricht: Aminbasierte Farbreaktionen als Kohlenhydratnachweise. Flensburg : Zentrale Hochschulbibliothek Flensburg 2021, XVII, 254 S. - (Dissertation, Europa-Universität Flensburg, 2021) - URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-284466 - DOI: 10.25656/01:28446

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0111-pedocs-284466>

<https://doi.org/10.25656/01:28446>

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
Internet: www.pedocs.de

Mitglied der


Leibniz-Gemeinschaft

Nachweis von Lactose (und Maltose) im Kontext Schule

**Wöhlk-Probe, Fearon-Test und 1,6-Diaminohexan-Verfahren im
kontextorientierten experimentellen Chemieunterricht:
Aminbasierte Farbreaktionen als Kohlenhydratnachweise**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Titels
Doktor der Philosophie (Dr. phil.),

vorgelegt von
Oberstudienrat
Klaus Martin Ruppertsberg,
geboren in Köln-Lindenthal

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Maike Busker

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h. c. Ilka Parchmann

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit ist ein Kooperationsprojekt, das sowohl am Leibniz-Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften und Mathematik an der Universität Kiel (IPN) als auch an der Europa Universität Flensburg (EUF) entstanden ist. Für die Arbeitsmöglichkeiten bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. h. c. Parchmann und Frau Prof. Dr. Busker, sowie bei allen Kolleginnen und Kollegen der EUF und des IPN, die meine Arbeit unterstützt haben.

Für die komplexen Fragestellungen, die in dieser Dissertation bearbeitet werden, wurden verschiedene fachliche Expertisen benötigt, z. B. aus dem Bereich der Organischen Chemie, der Lebensmittelchemie und der chemischen Analytik. Deswegen danke ich Expertinnen und Experten aus anderen Fachbereichen, die mir mit Rat, Tat und Materialien geholfen haben. Hier sind zuallererst Frau Prof. Dr. Lindhorst, Herr Prof. Dr. Sönnichsen (NMR) und das Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel zu nennen, sowie Frau Dr. Julia Hain, mit der ich die ersten umfangreicheren Experimente durchgeführt habe. Weiterhin waren Frau Prof. Dr. Mischnick und das Agnes-Pockels-SchülerInnen-Labor an der TU Braunschweig wichtige Mitstreiter. Herrn Dr. Kussler aus Waldshut-Tiengen, Seniorexperte der GDCh, verdanke ich wertvolle Hinweise für die Entwicklung von begründeten Hypothesen für die Entstehung und die Struktur des roten Farbstoffs aus den im Titel genannten Nachweisreaktionen. Für die Möglichkeit weiterer Recherchen habe ich der Professur für Lebensmittelchemie an der TU Dresden, namentlich Herrn Prof. Dr. Henle, Herrn Prof. Dr. Hellwig (inzwischen TU Braunschweig), Frau Dr. Hellwig sowie dem Institut für Organische Chemie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, namentlich Herrn Prof. Dr. Göttlich und Herrn Dr. Wende, zu danken.

Zusammenfassung

Kohlenhydrate sind eine sehr bekannte chemische Stoffgruppe, für die es zahlreiche Nachweisreaktionen gibt. Innerhalb der Stoffgruppe der Kohlenhydrate sind Lactose und Maltose zwei sehr wichtige Verbindungen. Da sie auf natürliche Weise in Milch und Milchprodukten bzw. beim Abbau von Stärke auftreten, sind sie in Lebensmitteln aller Art vertreten und besitzen somit eine hohe Alltagsrelevanz. Weiterhin sind viele Schülerinnen und Schüler von dem Phänomen der Lactoseintoleranz betroffen und wissen aus eigener Lebenserfahrung, wie wichtig die Kenntnis über den Milchzuckergehalt verschiedener Lebensmittel bei der Zubereitung der eigenen Nahrung ist.

Diese Fakten werden von den Lernenden als sehr interessant empfunden und tragen durch ihre Aussagekraft und Anschaulichkeit zur Lebendigkeit des experimentellen Chemieunterrichts bei.

Wie eine Auswertung aktueller, gängiger Schulbücher im Rahmen dieser Arbeit zeigt, mangelt es derzeit jedoch sowohl an schulisch geeigneten Experimenten als auch an Unterrichtskonzepten für den Nachweis und die Verwendung von Lactose und Maltose im Unterricht.

Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit, sowohl schulische geeignete Experimente als auch anwendbare Kontexte zu finden, um das von Lactose und Maltose ausgehende Potential für schülerorientierte Lernvorgänge zu nutzen.

Um dieser Zielvorstellung näher zu kommen, wird zunächst die Herkunft der bislang bekannten nasschemischen Nachweismethoden für Lactose und Maltose in einem **chemiegeschichtlichen Schwerpunkt** der Arbeit hinterfragt. Hierzu zählen die Wöhllk-Probe (Wöhllk 1904) und der Fearon-Test (Fearon 1942), die aus einem pharmazeutischen bzw. biochemischen Labor stammen. Angewendet wurden die Methoden jedoch vor allem in der physiologischen Chemie, insbesondere im urologischen Labor zur Bestimmung des Zuckergehalts von Urin, sowie im lebensmittelchemischen Bereich (Malfatti 1905; Teichmann 1980; Ahrens 1966; Nickerson et al. 1976; Nötzold, H., Raddatz, H., Hellwig, A. et al. 2018).

Um die Entwicklung dieser Nachweismethoden genauer beschreiben zu können, werden in dieser Dissertation die Arbeiten verschiedener Forscherinnen und Forscher über den Nachweis von Lactose und Maltose umfassend recherchiert und genau untersucht.

Das Ergebnis ist eine chemische Laborgeschichte, in der sich seit der Fehling-Probe aus dem Jahr 1848 Arbeiten aus ganz Europa und USA fortschreitend aneinanderreihen. Neben den

bekannten Publikationen von Nersess Umikoff (1896), Nadine Sieber (1900), Alfred Wöhlk (1904), William Robert Fearon (1942) und Thomas A. Nickerson (1976) wurden mit Frederik Hendrik van Leent (1894), Friedrich Karl von Krüger (1907), Albert Morel und Claude Gautier (1906) und Renée Rochat (1934) auch bislang unbekannte Quellen aus den Niederlanden, Sibirien und Südfrankreich entdeckt und ausgewertet.

Dabei zeigt sich, dass alle Verfahren auf dem Prinzip der Umsetzung von Lactose und Maltose mit *Ammoniak oder Aminen* im *stark alkalischen* Bereich und *unter Erhitzen* auf mindestens 60 °C beruhen.

Für die zugrunde liegende Reaktion gibt es bisher nur wenige Publikationen (Grob 2000; Fleiss 2013). Demnach soll der Farbstoff durch die Hydrolyse von Lactose zu Glucose und Galactose initiiert werden; letztere soll zu Galactarsäure (Schleimsäure) oxidiert werden. Durch die Zugabe von Ammoniak soll das Salz der Schleimsäure, Ammoniummucat, entstehen, welches in der Hitze zu Pyrrolrot reagiert. Die vorliegenden Arbeiten werfen allerdings die Frage auf, ob der dort vorgeschlagene Reaktionsmechanismus die Reaktion der Wöhlk-Probe korrekt abbildet.

Um dieser Frage nachzugehen, werden in einem **chemiefachlichen Kapitel** die Lactose- und Maltose-Nachweise genauer untersucht. Hierzu wird vor allem mit der UV-Vis-Spektroskopie gearbeitet.

Im Rahmen dieser Dissertation kann gezeigt werden, dass die Wöhlk-Probe und der Fearon-Test nicht nur Lactose und Maltose nachweisen, sondern auch weitere Verbindungen, die aus zwei Zuckerkomponenten zusammengesetzt sind und sich systematisch als 1,4-verknüpfte reduzierende Disaccharide bezeichnen lassen. Anstelle des zweiten Zuckeranteils führt auch eine Schutzgruppe in Position 4 eines Glucose-Moleküls zu einem positiven Ergebnis.

Bezüglich der Amin-Komponenten kann mit Hilfe der experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine der Aminogruppe benachbarte CH₂-Gruppe nötig ist, um den Nachweis gelingen zu lassen. Durch den Besitz dieser Gruppe, die auch als "Spacer" bezeichnet wird, lässt sich erklären, warum bestimmte Amine einen roten Farbstoff erzeugen und andere nicht.

Zum Reaktionsmechanismus und zur Struktur der in diesem Zusammenhang erzeugten roten Farbstoffe konnten begründete Hypothesen erstellt werden, die eine „chemische Weichenstellung“ beim alkalischen Zuckerabbau zugrunde legen. Diese chemische Weichenstellung wurde schon in den 1990er Jahren im Bereich der Lebensmittelchemie von

Kramhöller, Pischetsrieder und Severin beschrieben (Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M., Severin, Th. 1993; Pischetsrieder und Severin 1994, 2007).

Aufgrund der typischen UV-Vis-Spektren mit einer sehr hohen Absorption im UV-Bereich und einem ca. zwanzigfach geringeren Maximum im sichtbaren Bereich kann auf einen betainartigen Farbstoff geschlossen werden, der über eine intramolekulare Ladungsverteilung verfügt (Kussler und Ruppertsberg 2019; Ruppertsberg et al. 2019).

Experimentelle Annäherungen mit modernen Analysemethoden wie HPLC, DAD-MS und ESI-MS erbringen im Rahmen dieser Dissertation jedoch noch nicht die gewünschte Strukturklarheit, bilden aber geeignete Anknüpfungsmöglichkeiten für weitere Untersuchungen.

In einem **fachdidaktischen Teil** der Dissertation werden für den Einsatz im Chemieunterricht Möglichkeiten zu Optimierungen, Erweiterungen, Kontextualisierungen und Vereinfachungen für den Nachweis von Lactose und Maltose überlegt.

Bei systematischen Überlegungen zur Substitution und Variation von verschiedenen Kohlenhydrat- und Amin-Komponenten kann durch die Dissertation ein neues Verfahren für den Nachweis von Lactose und Maltose entwickelt werden, das schneller, einfacher und aussagekräftiger als die bisherigen Verfahren ist, nämlich das 1,6-Diaminohexan-Verfahren.

1,6-Diaminohexan alias Hexamethyldiamin ist ein an Schulen sehr verbreiteter Stoff, der üblicherweise zur Nylonherstellung verwendet wird. Mit einer einfach zu handhabenden Fertiglösung ist der Nachweis von Lactose und Maltose nun in 60 Sekunden möglich – gegenüber bis zu 30 Minuten bei der klassischen Wöhlk-Probe.

Ebenso zeigt sich in der Gefährdungsbeurteilung dieses Experiments insbesondere gegenüber der klassischen Wöhlk-Probe ein wesentlich günstigeres Ergebnis, da das Ausgasen von Ammoniak vermieden wird.

Insgesamt bietet der Nachweis von Lactose und Maltose vielfältige Anknüpfungspunkte, an denen Schülerinnen und Schüler interessiert sein können:

- Aussagekräftige und anschauliche Experimente
- Historische Personen, die an Lactose- und Maltose-Nachweisen geforscht haben
- Lebensmitteln und (die eigene) Ernährung, lactosefreie Produkte
- Humangenetik und die genetische Ursache für Lactose(in)toleranz
- (Grundlagen-) Forschung

Insgesamt ist es mit dieser Arbeit gelungen, die Schulchemie mit dem 1,6-Diaminohexan-Verfahren um eine neue Methode für den Nachweis von Lactose und Maltose zu bereichern. Es werden Potentiale aufgezeigt, mit denen die Chemie der Kohlenhydrate im Unterricht anschaulicher und attraktiver gestaltet werden kann.

Wenngleich die Struktur des roten Farbstoffs und der Reaktionsmechanismus der Wöhlk-Probe bzw. des Fearon-Tests nicht endgültig aufgeklärt werden können, können nun immerhin wesentliche Hinweise auf den Reaktionsmechanismus beschrieben werden.

Die verbleibende Unsicherheit bezüglich der Struktur und des Mechanismus zu ihrer Entstehung, der durch ein systematisches Vorgehen in den experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit begegnet wird, bietet gemeinsam mit der historischen Entwicklung der Lactose- und Maltose-Nachweise einen weiteren interessanten Ausgangspunkt für den Chemieunterricht, nämlich die Verdeutlichung von Forschungsmethoden und naturwissenschaftlicher Denk- und Arbeitsweise.

Abstract

Carbohydrates are a very well-known chemical group of substances for which numerous detection reactions are available. Within the carbohydrate group, lactose and maltose are two rather important compounds. Since they occur naturally in milk and dairy products and in the degradation of starch, they are present in various foods around the globe and thus have a high relevance for everyday life.

In addition, the phenomenon of lactose intolerance, which also affects many students, demands a high level of attention in the preparation of daily food.

These facts considered to be quite interesting by the learners and add to the liveliness of the experimental chemistry lessons due to their expressiveness and vividness.

However, an analysis of current standard textbooks in the context of this thesis shows that there is currently a lack of teaching concepts and experiments suitable for the school contexts for the detection and the use of lactose and maltose in the classroom.

Therefore, one of the aims of this thesis is to find both suitable experiments for schools and applicable contexts to use the potential of lactose and maltose for student-oriented learning processes.

In order to pursue this goal, this thesis first evaluates the origin of previously known wet chemical detection methods for lactose and maltose in a historical perspective on the topic. These methods include the Wöhlk test (1904) and the Fearon test (1942), which originated in a pharmaceutical and biochemical laboratory, respectively. However, the methods were historically mainly applied in physiological chemistry, especially in urological laboratories to determine the sugar content of urine, as well as in food chemistry (Malfatti 1905; Ahrens 1966, Teichmann 1980, Nickerson et al. 1976, Nötzold, H., Raddatz, H., Hellwig, A. et al. 2018).

In order to be able to describe the development of these detection methods in more detail, the works of various researchers on the detection of lactose and maltose are comprehensively researched and closely examined in this thesis.

The result is a chemical laboratory history in which works from all over Europe and the USA have been pieced together since the Fehling test from 1848. In addition to the well-known publications by Nersess Umikoff (1896), Nadine Sieber (1900), Alfred Wöhlk (1904), William Robert Fearon (1942) and Thomas A. Nickerson (1976), also previously unknown sources from the Netherlands, Siberia and southern France (i. e. Frederik Hendrik van Leent (1894), Friedrich Karl von Krüger (1907), Albert Morel and Claude Gautier (1906) and Renée Rochat (1934)) were discovered and evaluated.

It turns out that all detection methods are based on the principle of the reaction of lactose and maltose with ammonia or amines in the strongly alkaline range and under heating to at least 60 °C.

There are only a few publications to date on the underlying mechanism (Grob 2000; Fleiss 2013). Here, the dye is said to be initiated by the hydrolysis of lactose to glucose and galactose; the latter is then proposed to be oxidized to galactaric acid (mucic acid). The addition of ammonia is supposed to produce the salt of mucic acid, ammonium mucate, which reacts to form pyrrole red in the heating step.

Those papers, however, raise the question of whether the reaction mechanism proposed in them correctly represents the reaction of the Wöhlk test. In order to investigate this question, the lactose and maltose detection methods are examined more closely in a subsequent chapter of this thesis focusing on the underlying chemistry. For this purpose, mainly UV-vis spectroscopy is used.

Within the framework of this thesis, it can be shown that apart from detecting lactose and maltose, the Wöhlk test and the Fearon test could also detect other compounds that are

composed of two sugar components which can be systematically described as 1,4-linked reducing disaccharides. Instead of the second sugar component, a protective group in position 4 of a glucose molecule also results in a positive test.

With regard to the amine components, it can be shown with the help of experimental investigations that a CH₂ group adjacent to the amino group is necessary for the detection. The possession of this group, which is also called "spacer", can explain why certain amines produce a red dye and others do not.

Well-founded hypotheses can be made regarding the reaction mechanism and the structure of the red dyes produced in this context, which are based on a "chemical switch" during alkaline sugar degradation. This chemical pathway was already described in the 1990s in the field of food chemistry by Kramhöller, Pischetsrieder and Severin (Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M., Severin, Th. 1993; Pischetsrieder and Severin 1994, 2007).

Based on the typical UV-vis spectra with a very high absorption in the UV range and an approximately twenty-fold lower maximum in the visible range, a betaine-like dye can be inferred that has an intramolecular charge distribution (Kussler and Ruppertsberg 2019; Ruppertsberg et al. 2019).

In the context of this thesis, experimental approaches with modern analytical methods such as HPLC, DAD-MS and ESI-MS have not yet provided the desired structural clarity, but they are suitable starting points for further investigations.

In a didactical part of the dissertation, possibilities for optimizing, extending, contextualising and simplifying the detection of lactose and maltose are considered for use in chemistry lessons.

In systematically substituting and varying different carbohydrate and amine components, a new method for the detection of lactose and maltose can be developed in the dissertation, which is faster, simpler and more meaningful than the previous methods, the new method being the 1,6-diaminohexane method.

1,6-diaminohexane, also known as hexamethylenediamine, is a very common substance in schools, usually used for nylon production. With a simple ready-to-use solution, the detection of lactose and maltose is now possible in 60 seconds - compared to up to 30 minutes with the classic Wöhlk test.

Likewise, the risk assessment of this experiment shows a much more favourable result, especially compared to the classic Wöhlk test, as the emission of ammonia is avoided.

Overall, the detection of lactose and maltose offers a variety of starting points which might interest pupils:

- Meaningful and illustrative experiments
- Historical people who have done research on lactose and maltose detection
- Food and (their own) diet, lactose-free products
- Human genetics and the genetic cause of lactose(in)tolerance
- (Basic) research

Overall, this work has succeeded in enriching school chemistry with the 1,6-diaminohexane method as a new method for the detection of lactose and maltose. Possibilities to make the chemistry of carbohydrates more vivid and attractive in the classroom are shown.

Although the structure of the red dye and the reaction mechanism of the Wöhlk test or the Fearon test cannot be determined for certain, at least essential clues to the reaction mechanism can be described.

Both the remaining uncertainty regarding the structure and its reaction mechanism, which has been dealt with systematically approaching the experimental investigations in this thesis, and the historical development of the lactose and maltose detections, offer interesting starting points for chemistry lessons, i. e. the clarification of research methods and scientific ways of thinking and working.

Inhalt

Danksagungen	I
Zusammenfassung.....	II
Abstract	V
Inhalt.....	IX
Abkürzungsverzeichnis mit Glossar	XIII
1 Einleitung	1
2 Kohlenhydrate als Gegenstand des Chemieunterrichts.....	3
2.1 Übliche Kohlenhydratnachweise in gängigen Chemiebüchern.....	4
2.1.1 Reaktionen von reduzierenden Zuckern mit Kupfer(II)-Ionen (Fehling u.a.)	6
2.1.2 Nachweis von Cellulose mit der Chlorzinkiodprobe.....	11
2.1.3 Spezifischer Glucose-Nachweis mit dem GOD-Test	12
2.1.4 Nachweis von Stärke durch die Iodprobe	13
2.1.5 Nachweis von Ribose und anderen Monosacchariden (Molisch-Probe)	15
2.1.6 Nachweis von Aldehyden mit Schiffschem Reagenz	18
2.1.7 Nachweis von Fructose nach Seliwanoff	21
2.1.8 Tollens-Probe auf reduzierende Zucker (Silberspiegelprobe).....	22
2.1.9 Wöhlk-Probe auf Lactose und Maltose	23
2.2 Anforderungen an Experimente im Chemieunterricht	25
2.2.1 Fazit aus dem Vergleich der Nachweisverfahren	25
2.2.2 Nachweisreaktionen für Lactose und Maltose im Chemieunterricht	29
3 Entwicklung von Nachweisreaktionen für Lactose und Maltose	30
3.1 Frederik Hendrik van Leent (1894).....	32
3.2 Nersess Sacharewitsch Umikoff (1896).....	33
3.3 N. Sieber alias Nadeschda Olimpijewna Ziber-Schumowa (1900)	35
3.4 Alfred Wöhlk (1904)	37
3.5 Johann (Hans) Baptist Malfatti (1905).....	39
3.6 Claude Gautier und Albert Morel (1906).....	41
3.7 Friedrich Karl von Krüger (1907)	42
3.8 Renée Rochat (1934)	44
3.9 William Robert Fearon (1942)	45
3.10 Thomas Andrew Nickerson (1976)	49
3.11 Fazit der geschichtlichen Entwicklung von Lactose- (und Maltose-) Nachweisen	51
4 Experimentelle Untersuchungen zur Wöhlk-Probe und zum Fearon-Test	53
4.1 Forschungsstand zur Bildung der roten Farbstoffe	54

4.1.1 Um welche Verbindung könnte es sich bei „Pyrrolrot“ handeln?	55
4.1.2 Wird Lactose während der Wöhlk-Reaktion in Galactose und Glucose hydrolysiert?	56
4.1.3 Einfluss von Luftsauerstoff auf die Farbstoffbildung	60
4.1.4 Findet die Wöhlk-Probe auch unter Wasserausschluss statt?	62
4.1.5 Mit welcher Methode lässt sich der rote Farbstoff gut untersuchen?	63
4.1.6 Beobachtung der Farbreifung in Abhängigkeit von der Zeit	68
4.1.7 Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich	72
4.1.8 Die Entstehung des roten Farbstoffs in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	76
4.2 Variationen der Amino-Komponente	80
4.2.1 Farbstoffbildung mit Methylamin in Abhängigkeit von der Zeit	81
4.2.2 Farbstoffbildung mit Ethylamin und Ethanolamin	83
4.2.3 Verhalten sich die beiden isomeren Propylamine gleichermaßen?	87
4.2.4 Wie verhalten sich die vier isomeren Butylamine?	90
4.2.5 Reaktionsverhalten von Amylamin	97
4.2.6 Reaktionsverhalten primärer Diamine	100
4.2.7 Amine mit Carbonsäuregruppe (Aminosäuren)	112
4.2.8 Fazit der Untersuchungen mit anderen Amino-Komponenten	120
4.3 Variationen der Kohlenhydrat-Komponente.....	125
4.3.1 Optimierung der Wöhlk-Probe mit Lactose und Maltose	127
4.3.2 Cellobiose, Lactulose und Maltulose bilden ebenfalls den roten Farbstoff.....	127
4.3.3 Farbreaktion des Trisaccharids Maltotriose	130
4.3.4 Geschützte Glucosen in Wöhlk-Probe und Fearon-Test	133
4.3.5 Fazit der Untersuchungen mit anderen Kohlenhydrat-Komponenten	137
4.4 Fazit des experimentellen Teils	139
5 Welcher Reaktionsmechanismus könnte zum roten Farbstoff führen?	141
5.1 Anomerisierung von Zuckern in wässriger Lösung.....	142
5.2 Isomerisierung durch Umlagerung nach Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein (1895).....	143
5.3 Eliminierungen und Fragmentierungen von Zuckern.....	145
5.4 Benzilsäure-Umlagerungen (Bildung einer verzweigten Kette)	147
5.5 Maillard-Reaktion	147
5.5.1 Amadori-Umlagerungen.....	149
5.5.2 Heyns-Umlagerungen.....	150
5.6 Fazit der Überlegungen zum Reaktionsverlauf	151
5.7 Überlegungen zu möglichen Strukturformeln des roten Farbstoffs	154
6 Lactose und Maltose im Unterricht.....	159

6.1 Experimente zum Nachweis von Lactose und Maltose im Chemieunterricht	161
6.1.1 Überlegungen zur Sicherheit am Arbeitsplatz.....	162
6.1.2 Substitution von Ammoniak durch weniger gefährdende Stoffe	163
6.1.3 1,6-Diaminohexan-Verfahren (2019)	164
6.2 Anfertigung von haltbaren Fertiglösungen für den Schul- und Lehrbetrieb.....	166
6.2.1 Verwendete Stoffe und Mengen.....	167
6.2.2 Mengenangaben bei Wöhlk (1904) und Malfatti (1905)	167
6.2.3 Herstellung von Fearon's Reagenz als Fertiglösung	168
6.2.4 Herstellung einer 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung	170
6.3 Experimente zum Lactosegehalt von Milchprodukten	171
6.4 Anwendungen des neuen 1,6-Diaminohexan-Verfahrens im Unterricht	175
6.4.1 Kohlenhydratnachweis mit 1,6-Diaminohexan im Wasserbad	175
6.4.2 Lactosenachweis mit 1,6-Diaminohexan in der Inverter-Mikrowelle	176
6.5 Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau durch Speichelamylase	180
6.5.1 Wie wirkt Speichelamylase?.....	182
6.5.2 Nachweis der Endprodukte des Stärkeabbaus.....	183
6.5.3 Anwendung der Wöhlk-Probe zur Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau	184
6.5.4 Beobachtungen bei den Experimenten.....	184
6.5.5 Überprüfung der Produktlösung mit GOD-Teststäbchen.....	185
6.5.6 Fazit der Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau	186
6.6 Besondere Anknüpfungspunkte für Lactosenachweise im Chemieunterricht.....	188
6.7 Interesse an historischen Personen, die an Lactosenachweisen geforscht haben	188
6.7.1 Interesse an der Person „Professor Umikoff“	189
6.7.2 Interesse an einer Detektivgeschichte um die Person „N. Sieber“	191
6.7.3 Interesse an Alfred Wöhlk und William Robert Fearon	193
6.7.4 Interesse an der Person des Urologen Hans Malfatti	195
6.8 Interesse an Humangenetik	196
6.9 Interesse an Grundlagenforschung	198
6.10 Fazit der unterrichtlichen Behandlung von Lactose und Maltose	199
7 Fazit und Ausblick.....	201
8 Literaturverzeichnis.....	204
9 Weitere Verzeichnisse.....	221
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	221
9.2 Tabellenverzeichnis	225
9.3 Verzeichnis der Experimente.....	226

9.4 Chemikalienverzeichnis	227
9.4.1 Ammoniak und Derivate (Amino-Komponenten)	227
9.4.2 Kohlenhydrate und deren Derivate	228
9.4.3 Sonstige Chemikalien	229
10 Publikationen aus und zu dieser Arbeit.....	230
10.1 Zeitschriftenpublikationen	230
10.2 Poster	232
10.3 Vorträge.....	232
11 Anhang.....	234
11.1 Reaktionen mit weiteren Aminen	234
11.1.1 Reaktion von n-Dodecylamin mit Lactulose.....	234
11.1.2 Reaktionsverhalten aromatischer Amine	235
11.1.3 Reaktion von Taurin	247
11.2 Reaktionen mit weiteren Kohlenhydraten	250
11.2.1 Überprüfung anderer als 1,4-Verknüpfungen.....	250
11.2.2 Experimente mit weiteren Zuckern und Zuckerderivaten	250
11.3 Weitere experimentelle Annäherungen	251
11.3.1 NMR.....	251
11.3.2 HPLC-DAD-MS.....	252
11.3.3 ESI-MS.....	252
Eidesstattliche Versicherung	253
Lebenslauf (Kurzform)	254

Abkürzungsverzeichnis mit Glossar

Vorbemerkungen: In der organischen Chemie, insbesondere in der Lebensmittelchemie, hat jede Verbindung mindestens zwei Namen, wobei die historischen Namen wie z. B. „Lysin“ im fachlichen Kontext oft vorgezogen werden, weil sie sprachlich nicht so sperrig sind wie die systematischen Namen (hier: *2,6-Diaminohexansäure*). Andererseits kann man sich unter den systematischen Namen eher eine Molekülstruktur vorstellen als beim historischen Namen. Daher werden in dieser Arbeit beide Namen angewendet.

Bei manchen Verbindungen sind anstelle der historischen oder systematischen Namen (meist englische) **Abkürzungen** üblich, z. B. GABA für γ -Aminobuttersäure bzw. 4-Aminobutansäure.

Weitere Abkürzungen wurden vom Autor gesetzt, um Versuchsreihen kurz und aussagekräftig zu beschriften, z.B. „EGlcDAH“ für die Beobachtung der Reaktion von 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose mit 1,6-Diaminohexan; eventuelle nachfolgende *Ziffern* sind *Uhrzeiten* aus dem Ablauf des Experiments.

D-/L-Spiegelbildisomere: Bei Aminosäuren und Zuckern gibt es optische Isomere, die in der Natur üblicherweise nicht oder nur sehr selten vorkommen, z. B. L-Zucker und D-Aminosäuren. Auf diese wird in dieser Arbeit nicht eingegangen; wenn also von Zuckern und Aminosäuren die Rede ist, sind immer die mehrheitlich vorkommenden D-Zucker und L-Aminosäuren gemeint, ohne dass jedes Mal ausdrücklich darauf hingewiesen wird.

Abkürzung	Beschreibung
0000 ... 2359	Uhrzeiten der Messungen, z. B. 1507: Messung um 15:07 Uhr
Ala	α -Alanin (2-Aminopropansäure), meist nur Alanin genannt
Ama	Amylamin (1-Aminopentan)
bAla	β -Alanin (3-Aminopropansäure)
BG RCI	Berufsgenossenschaften Rohstoffe und Chemische Industrie
BGlc	4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose, geschützte Glucose, siehe auch EGlc
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Cel	Cellobiose (4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose, Homodimer aus zwei β -1,4-verknüpften Glucosemolekülen)
Chemkon	Chemie konkret (Zeitschrift der FGCU)
ChiuZ	Chemie in unserer Zeit (Fachzeitschrift der GDCh)
DAB	1,4-Diaminobutan (Putrescin); hingegen: Diaminobenzol siehe PPDA

DAE	1,2-Diaminoethan (Ethylendiamin)
DAH	1,6-Diaminohexan (Hexamethylendiamin)
DAP	1,5-Diaminopentan (Cadaverin, Zerfallsprodukt von Lysin, „Leichengift“)
DDA	1-Dodecylamin
DeGINTU	Deutsches Gefahrstoff-Informationssystem für den Naturwissenschaftlich-Technischen Unterricht (DGUV)
DGUV	Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung
DIPF	Leibniz-Institut für Bildungsforschung und Bildungsinformation
DOG	2-Desoxyglucose
DOI	Digital Object Identifier, siehe auch URN
EDA	Ethylendiamin (1,2-Diaminoethan)
EGlc	4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose, geschützte Glucose, siehe auch BGlc
EPA	Einheitliche Prüfungsanforderungen
ESI-MS	Elektronensprayionisation mit Massenspektrometrie (Analytische Methode)
ESP	Ersatzstoffprüfung, Teil der Gefährdungsbeurteilung gemäß RiSU
EtA	Ethylamin (Aminoethan)
EtoIA	Ethanolamin (2-Aminoethanol)
EUf	Europa-Universität Flensburg
FGCU	Fachgruppe Chemieunterricht in der GDCh
FT	Feaon's Test, auch: Fearon-Test
Fru	Fructose (D-Fructofuranose), Fruchtzucker, veraltet: Lävulose
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure (4-Aminobutansäure)
Gal	Galactose, Aldohexose, Bestandteil der Lactose
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.
GHS	Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals der Vereinten Nationen, Gefahrstoffpiktogramme
GisChem	Gefahrstoffinformationssystem Chemikalien der BG RCI
GGlc	Geschützte Glucose, z.B. BGlc oder EGlc
Glc	Glucose (D-Glucopyranose), Traubenzucker, veraltet: Dextrose
Glu	Glutaminsäure (proteinogene Aminosäure)

Gly	Glycin (2-Aminoethansäure), einfachste Aminosäure, veraltet: Glykokoll
GOD	Glucose-Oxidase (Enzym, wird u.a. auf Diabetes-Teststäbchen verwendet)
h	Stunde (hora)
hk	heizbarer Küvettenhalter (ermöglicht Messungen während des Reaktionsablaufs bei einer durchgehenden Temperatur von z. B. 65 °C)
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Analytische Methode)
iba	Isobutylamin (1-Amino-2-methylpropan)
IPA	Isopropylamin (2-Aminopropan)
IPN	Leibniz-Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften und Mathematik an der Universität Kiel
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
KMK	Kultusministerkonferenz
KMR-Stoffe	Stoffe, die krebserzeugend , mutagen und reproduktionstoxisch sind
l.	links
L	Liter
Lac	Lactose (Milchzucker), β -D-galactopyranosyl-(1,4)-D-Glucopyranose
Lul	Lactulose (β -D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-Fructofuranose, Umlagerungsprodukt der Lactose)
Lys	Lysin (2,6-Diaminohexansäure)
MA	Methylamin (Gas, feste Handelsform: Methylamin-Hydrochlorid, MAH)
MAH	Methylamin-Hydrochlorid (auch: Methylammoniumchlorid), $\text{NH}_3\text{CH}_3\text{Cl}$
Mal	Maltose (Malzzucker, Homodimer aus zwei α -1,4-verknüpften Glucose-molekülen, α -D-Glucopyranosyl-(1,4)-D-Glucopyranose)
mg	Milligramm
MGO	Methylglyoxal (2-Keto-Propanal, Pyruvaldehyd; Fragment beim Zuckerabbau)
Min.	Minute
MINT	Mathematik, Informatik, Naturwissenschaften, Technik
mL	Milliliter
mmol	Millimol
MNU	Verein zur Förderung des MINT-Unterrichts (urspr. Math.-Nat. Unterricht)

mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
Mul	Maltulose (α -D-Glucopyranosyl-(1,4)-D-Fructofuranose, Umlagerungsprodukt der Maltose)
NadC	Nachrichten aus der Chemie (Mitgliederzeitschrift der GDCh)
nbu	n-Butylamin (1-Aminobutan)
NPA	n-Propylamin (1-Aminopropan)
OA	Open Access
OER	Open Educational Resource
ORCID	Open Researcher Contributor Identification, numerischer Code zur eindeutigen Identifizierung wissenschaftlicher Autoren
Orn	Ornithin (2,5-Diaminopentansäure, Abbauprodukt von Arginin)
PdN-ChidS	Praxis der Naturwissenschaften – Chemie in der Schule (Zeitschrift, oft nur „PdN“, 2017 eingestellt)
peDOCS	pedagogical documents, Open Access-Repository des DIPF
PPDA	p-Phenylendiamin (1,4-Diaminobenzol)
r.	rechts
RAL-Farben	Farbsystem des RAL-Institutes (ehemals „Reichsausschuß für Lieferbedingungen“)
RiSU	Richtlinie zur Sicherheit im Unterricht
rt	Kürzel für Untersuchungen bei Raumtemperatur
s	Sekunde
Sac	Saccharose (engl. Sucrose, α -D-Glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranose)
sba	sec. Butylamin (2-Aminobutan)
Sek.	Sekundarstufe
Sor	Sorbose (Ketohehexose, ähnlich der Fructose, natürliches Vorkommen: Eberesche (<i>Sorbus aucuparia</i>))
SuS	Schülerinnen und Schüler
Tau	Taurin, 2-Aminoethansulfonsäure
tbu	tert. Butylamin (2-Amino-2-methylpropan)
Tr.	Tropfen, altes Apothekermaß, 50 μ L
TU	Technische Universität
URN	Uniform Resource Name, ähnlich wie DOI

v.l.n.r.	von links nach rechts
WP	Wöhlk-Probe, oft auch (genauer) Wöhlk-Malfatti-Probe
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μmol	Mikromol

1 Einleitung

Lactose und Maltose sind zwei besondere Vertreter innerhalb der Stoffgruppe der Kohlenhydrate, welche vielen Schülerinnen und Schülern namentlich bekannt sind. Doch auch, wer diese Namen nicht kennt, hatte im Alltag schon Kontakt mit diesen beiden Zuckern, die in Milch, Milchprodukten oder in Abbauprodukten von Stärke enthalten sind.

Für den Chemieunterricht stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, mit denen Kohlenhydrate experimentell nachgewiesen werden können. Dabei liegt der Focus vor allem auf der Unterscheidung zwischen reduzierenden und nicht-reduzierenden Zuckern.

Für einen konkreten Nachweis von Lactose und Maltose liegen bislang keine allgemein bekannten Experimente vor. Dabei ist insbesondere das Thema Lactose durch den hohen Alltagsbezug sowie durch die Lactoseunverträglichkeit, von der viele Menschen betroffen sind, ein interessantes Thema für den Chemieunterricht.

Auch der Nachweis von Maltose am Ende des Standardexperiments „Stärkeabbau durch Speichelamylase“ verdient Aufmerksamkeit, denn bislang war dieser wichtige Endproduktnachweis im Unterricht nicht möglich.

Die vorliegende Dissertation hat zum Ziel, Nachweise für Lactose und Maltose im Kontext Schule eingehend zu untersuchen und Konzepte für deren Anwendung im Unterricht zu entwickeln.

Den Ausgangspunkt der Überlegungen bildet ein Überblick über die derzeit im Unterricht verwendeten Nachweismethoden für Kohlenhydrate und erläutert deren Vor- und Nachteile (siehe Kapitel 2).

Da es unter den verbreiteten Methoden bezüglich Lactose und Maltose eine Nachweislücke gibt, wird der Frage nachgegangen, zu welchem Zeitpunkt in der Geschichte der Chemie erstmals Lactose und Maltose nachgewiesen wurden. Hierzu werden in Kapitel 3 die bekannten Quellen von Wöhlk (1904) und Fearon (1942) ausgewertet, aber auch bislang unbekannte Quellen entdeckt und hinzugezogen (Gautier und Morel 1906, Krüger 1907 und Rochat 1934).

Nach der Betrachtung der historischen Entwicklung stellt sich die Frage, welche chemischen Reaktionen der Wöhlk-Probe und dem Fearon-Test zugrunde liegen. Um dies zu klären, wird in Kapitel 4 zunächst der fachwissenschaftliche Stand betrachtet. Dabei zeigt sich, dass sowohl der konkrete Reaktionsmechanismus als auch die Struktur des roten Farbstoffs, der das entscheidende Merkmal des Nachweises ist, noch im Unklaren liegen.

Daher werden anschließend wichtige Parameter der Reaktion (z. B. pH-Wert, Anwesenheit von Luftsauerstoff) untersucht. Weiterhin werden Variationen der Amin- und der Kohlenhydrat-Komponente durchgeführt und ausgewertet.

Die Ergebnisse aus dem experimentellen Teil und eigenen Literaturrecherchen münden in Überlegungen für einen Reaktionsmechanismus zur Bildung des roten Farbstoffs und seiner Struktur (siehe Kapitel 5).

Die Wöhlk-Probe und der Fearon-Test zeigen gute Möglichkeiten für den Einsatz im experimentellen Chemieunterricht, aber auch Möglichkeiten der Optimierung.

In einem fachdidaktischen Teil der Arbeit wird das Ziel verfolgt, auf Basis der Wöhlk-Probe bzw. des Fearon-Test eine verbesserte Einsatzmöglichkeit für die Verwendung im Chemieunterricht zu finden (siehe Kapitel 6). Bei dieser Gelegenheit wurde ein neues Verfahren entwickelt, das mit dem schulüblichen Stoff 1,6-Diaminohexan (Hexamethylendiamin) funktioniert und bezüglich der obligatorischen Gefährdungsbeurteilung sowie für die Aussagekraft der Ergebnisse weitere Vorteile besitzt.

Abschließend wird der Frage nachgegangen, welche Anknüpfungspunkte, die aus der historischen Entwicklung, den fachwissenschaftlichen Betrachtungen und den schulexperimentellen Möglichkeiten hervorgehen, sich für die Betrachtung der Themen Lactose und Maltose im Unterricht ergeben. Dazu werden umfangreiche, erprobte Unterrichtsmöglichkeiten vorgestellt.

Nach einem Fazit über die gesamte Arbeit endet die vorliegende Arbeit mit einem Ausblick auf weitere Untersuchungsmöglichkeiten und auf umfangreiche Vorteile bei der Verwendung im Unterricht.

2 Kohlenhydrate als Gegenstand des Chemieunterrichts

Kohlenhydrate, umgangssprachlich auch einfach „Zucker“ genannt, werden zurzeit in Wissenschaft, Politik und Gesellschaft stark diskutiert, weil sie wesentlich mit den verbreiteten Gesundheitsproblemen Überernährung, Übergewicht und Diabetes verbunden sind (Hellwig und Henle 2014). Sie sind wichtige Substanzen im Energiestoffwechsel aller Lebewesen und gliedern sich in *Poly-, Oligo- und Monosaccharide* (Belitz et al. 2008). Ebenfalls zu den Kohlenhydraten gehören Zuckeralkohole, Zuckersäuren, Desoxyzucker und andere Derivate, die aber an dieser Stelle nicht von Bedeutung sind.

Je nach Verfügbarkeit einer Aldehydgruppe (oder einer α -Hydroxy-Ketogruppe) werden in einem weiteren Schritt *reduzierende* und *nicht-reduzierende Zucker* unterschieden.

Sowohl im Chemie- als auch im Biologieunterricht sind Kohlenhydrate wichtige Unterrichtsinhalte (KMK 2020, 2004). Besonders sichtbar wird dies in der Ausgestaltung der einschlägigen Lehrbücher (siehe z. B. (Baack et al. 2016; van Nek, R. et al. 2018)), in den Lehrplänen oder Rahmenrichtlinien, die auf Länderebene beschlossen werden (siehe z. B. (Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur des Landes Schleswig-Holstein; Ministerium für Schule und Berufsbildung des Landes Schleswig-Holstein)) bis hinunter zu den individuellen Schulcurricula, die an jeder einzelnen Schule erstellt werden.

Unter den Kohlenhydraten sind Lactose und Maltose zwei besondere Vertreter dieser Stoffgruppe, die im Alltag häufig vertreten sind:

- Lactose ist ein typischer Bestandteil von Milch und Milchprodukten, in Schokolade, im Speiseeis, aber auch unerwartet in Soßenpulvern und zur Verbesserung der Textur in Produkten wie z. B. Tiefkühlspinat (Biehlig 2015).
- Maltose ist als Zwischenprodukt beim Abbau von Stärke aus Brot, Nudeln, Kartoffeln, Reis, Mais usw. allgegenwärtig, aber auch in Bier, Malzbonbons und „Knabbergeback“ gegenwärtig (Souci et al. 2016).

Der Wunsch, beide Stoffe im Chemieunterricht experimentell nachzuweisen, erscheint aufgrund des umfangreichen Kontextbezugs sowohl logisch als auch erforderlich, wird aber gegenwärtig mangels Bekanntheit geeigneter Methoden noch zu selten durchgeführt.

Eine kurze Übersicht im Folgenden soll aufzeigen, welche Kohlenhydratnachweise zurzeit üblicherweise in Chemiebüchern für die gymnasiale Oberstufe aufgelistet sind, was diese leisten und wie sie funktionieren.

2.1 Übliche Kohlenhydratnachweise in gängigen Chemiebüchern

Historische nasschemische Nachweisreaktionen, allen voran die Fehling-Probe aus dem Jahr 1848, sind aufgrund ihrer Anschaulichkeit und Farbenpracht im experimentellen Chemieunterricht sehr beliebt und werden häufig angewendet. In modernen Laboratorien sind diese historischen Methoden jedoch weitestgehend obsolet, weil es bessere, schnellere und exaktere Methoden gibt.

Allerdings handelt es sich bei den modernen maschinellen Nachweismethoden (Gaschromatographie, HPLC usw.) fast ausschließlich um „Blackbox-Methoden“, bei denen der für die Lernenden so wichtige Weg von der Probe zum Ergebnis im Verborgenen bleibt. Auch vom Anschaffungspreis her (z. B. ESI-MS ca. 250.000 Euro) ist es utopisch, eine moderne Nachweismethode im Unterricht anwenden zu wollen¹.

Daher finden sich in modernen Lehrmaterialien weiterhin Nachweisreaktionen aus den Anfängen der naturwissenschaftlichen Forschung. Die nachfolgende Auswertung von gebräuchlichen Schulbüchern aus dem Zeitraum 2009 bis 2019 (Tab. 1) zeigt in einem Überblick, welche Kohlenhydratnachweise zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit üblicherweise gelehrt und angewendet wurden.

¹ Einblicke in moderne Analytik und Forschungsabläufe vermitteln z. B. Schülerforschungslabore wie die Kieler Forschungswerkstatt; dies ist jedoch nicht der Schwerpunkt dieser Arbeit. Ungeachtet dessen wäre es ohne weiteres denkbar, alte und neue Methoden der Kohlenhydratforschung als einen Programmpunkt eines Schülerforschungslabors zusammenzustellen.

Tabelle 1: Kohlenhydrat-Nachweise in einer Auswahl von verbreiteten Oberstufen-Lehrbüchern												
Lehrbuch	Barfoed-Probe	Benedict-Test	Chlorzinkiod-Probe	Fehling-Probe	GOD-Test	Iod-Probe	Molisch-Probe	Schiffsche Probe	Seliwanoff-Probe	Tollens-Probe	Wöhlk-Probe	Anzahl von Nachweisen
Chemie im Kontext (Demuth, R., Parchmann, I., Ralle, B. 2009)				X		X	X	X		X		5
Elemente Chemie 2 (Eisner 2011)				X	X	X			X	X		5
Chemie Oberstufe (Arnold 2011)				X	X	X			X	X		5
Salter's Chemie (Altmayer 2012)				X		X				X		3
Chemie heute S II (Asselborn 2013)				X		X		X		X		4
Chemie 2000+ (Bohrmann-Linde et al. 2014)			X	X	X	X			X	X		6
Fokus Chemie S II (Fischedick et al. 2018)				X	X	X		X	X	X		6
Chemie heute S II (van Nek, R. et al. 2018)	X	X		X	X	X			X	X	X	8
Elemente Chemie Oberstufe (Bee 2019)		X		X	X	X		X	X	X		7
Anzahl der Nennungen	1	2	1	9	6	9	1	4	6	9	1	

Die Aussagekraft der Nachweise und ihre Eignung für den Chemieunterricht sind sehr unterschiedlich. Hierzu sollen die vorgefundenen Nachweisverfahren im Folgenden erläutert werden.

2.1.1 Reaktionen von reduzierenden Zuckern mit Kupfer(II)-Ionen (Fehling u.a.)

Die Fehling-Probe, der Benedict-Test und die Barfoed'sche Probe beruhen allesamt auf der Reduktion von Kupfer(II)-Ionen bei gleichzeitiger Oxidation der Aldehydgruppe reduzierender Zucker, deshalb werden sie vor einer detaillierteren Betrachtung zunächst gemeinsam behandelt.

Schon vor der Fehling-Reaktion von 1848 gab es die Möglichkeit, reduzierende Zucker wie Traubenzucker, Milchzucker und Malzzucker mit Kupfer(II)-Ionen nachzuweisen, z. B. die Trommer'sche Probe aus dem Jahr 1841, zitiert nach Dornblüth:

„Man setzt dem Harn im Reagenzglas 1/3 seines Volumens Kalilauge hinzu, schüttelt gut und fügt tropfenweise eine 2%ige Lösung von Cuprum sulfuricum hinzu, so lange als sich beim Umschütteln der entstehende Niederschlag noch löst, was bei Anwesenheit von Zucker meist unter tiefblauer Farbe geschieht. Dann erhitzt man den oberen Teil der Lösung über der Spirituslampe, bis sich gelbrote Wolken von Kupferoxydul auszuscheiden beginnen. Das Auftreten des gelbroten Reduktionsniederschlages, das nun ohne Erhitzen weiter geht, beweist das Vorhandensein von Traubenzucker“ (Dornblüth 1899).

Das Interesse an einer solchen Nachweisreaktion kommt, wie auch später immer wieder zu sehen ist, von medizinischer Seite, nämlich zum Nachweis von Glucose im diabetischen Harn (Malfatti 1905; Teichmann 1980; Ahrens 1966).

In den untersuchten Schulbüchern (Tabelle 1) war die Trommer'sche Probe nicht mehr aufzufinden, wohl aber die Methoden nach Barfoed, Benedict und natürlich Fehling. Die bei diesen Verfahren verwendeten Kupfer(II)-Ionen können über die rote Zwischenstufe Kupfer(I)-Oxid zu elementarem Kupfer reduziert werden, dies tritt aber oft erst nach ausgiebig langem Erhitzen ein. Da sowohl Kupfer(I)-Oxid als auch elementares Kupfer einen roten Niederschlag bilden, muss an dieser Stelle vorweg auf mögliche Missverständnisse und Fehlinterpretationen hingewiesen werden.

Bei allen drei Verfahren ist Hitze notwendig; hierbei ist ein Wasserbad (60 °C) empfehlenswerter als das Erhitzen im Reagenzglas über der Bunsenbrennerflamme, weil alkalische Flüssigkeiten beim Erhitzen zu gefährlichen Siedeverzügen neigen (Brock 1997).

Außer reduzierenden Zuckern können auch Aldehyde oder andere reduzierende Substanzen nachgewiesen werden. Ascorbinsäure (i.e. Vitamin C) reagiert bereits bei Raumtemperatur (siehe z. B. (Aebi 1965)).

Reaktionsgleichungen zu dieser Gruppe von Nachweismethoden werden **oft falsch dargestellt**. Einigkeit herrscht bezüglich der Reduktion des Kupfer(II)-Ions; ob diese aber bis zum elementaren Kupfer vollzogen wird oder beim Kupfer(I)-Ion stehen bleibt, wird nicht einheitlich vermittelt, weil beide Produkte zu beobachten sind. Der rote Niederschlag besteht zunächst aus Kupfer(I)-oxid; erst im weiteren Verlauf der Reaktion entsteht elementares Kupfer, weswegen gravimetrische Untersuchungen sehr kompliziert sind und nur mit einer empirisch entwickelten Tabelle vorgenommen werden können (Mundinger 2013).

Die größte Uneinigkeit besteht in Bezug auf die Oxidation der Zuckerkomponente: Obwohl seit Jahrzehnten bekannt ist, dass eine Oxidation von Glucose zur Gluconsäure bzw. zum Gluconat *nicht* stattfindet, flammt diese falsche Darstellung immer wieder auf.

Tatsächlich findet in der stark alkalischen Lösung eine Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung statt, als deren Ergebnis ein doppelt gebundenes Sauerstoffatom am zweiten Kohlenstoffatom zu finden ist. Somit kann auch die schnellere Reaktion des Ketozuckers Fructose erklärt werden, die bislang in vielen Schulklassen Verwunderung hervorrief.

In Wahrheit wird die Glucose nicht zur Gluconsäure, sondern zum Glucoson (2-Ketoglucose) oxidiert (Fleischer 2017).

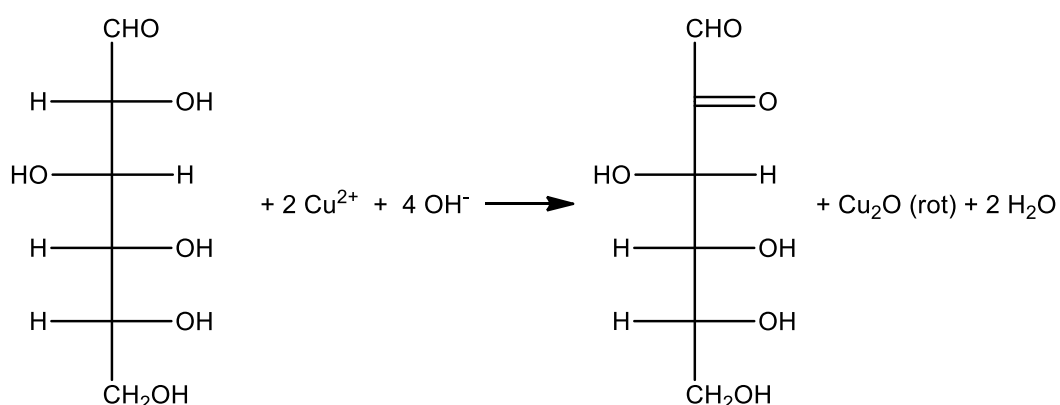


Abbildung 1: D-Glucose wird zu D-Glucoson oxidiert

Es ist aber davon auszugehen, dass Glucoson nicht das einzige Produkt ist, sondern dass durch Eliminierungen, Umlagerungen und Fragmentierungen, die typisch für den alkalischen

Zuckerabbau sind, auch weitere Abbauprodukte entstehen (siehe z. B. (Kanzler 2017; O'Brien 1997)).

Für eine sinnvolle didaktische Reduktion im Unterricht in der Oberstufe wird daher in Anlehnung an Fleischer 2017 eine vereinfachte Reaktionsgleichung² (Abb. 1) vorgeschlagen.

Sicherheit: Kupferhaltige Abfälle sind umweltgefährdend (GHS 09) und daher grundsätzlich als Schwermetall-Abfall zu entsorgen.

Die Unterschiede der drei üblichsten Verfahren mit Kupfer(II)-Ionen werden im Folgenden erläutert.

2.1.1.1 Barfoed'sche Probe

Die Barfoed'sche Probe zur Unterscheidung von Monosacchariden gegenüber Di-, Oligo- und Polysacchariden (Barfoed 1873) findet im Gegensatz zu den anderen Verfahren im schwach sauren Bereich statt und wird vorzugsweise im heißen Wasserbad durchgeführt. Dabei wird das Cu^{2+} -Ion zu Cu^+ reduziert, welches als rotes Kupfer(I)-oxid ausfällt (Ahluwalia und Dhingra 2000). Der Zucker, im obigen Beispiel Glucose, wird zum Glucoson oxidiert (s. o.).

Ganz allgemein reagieren reduzierende Monosaccharide bereits nach wenigen Minuten und somit schneller als Disaccharide und Oligosaccharide. Polysaccharide reagieren kaum oder gar nicht.

Vorgehensweise: Das Barfoed-Reagenz wird hergestellt, indem 6,7 g Kupferacetat und 1 mL Eisessig mit demin. Wasser zu 100 mL Lösung aufgefüllt werden. Von der Testlösung werden 4 mL in ein Reagenzglas gegeben, das schon ca. 50 mg eines reduzierenden Zuckers (z. B. Glucose) enthält, und im Wasserbad erhitzt. Nach wenigen Minuten ergibt sich eine rote Farbe, die beim Stehenlassen als Niederschlag (Kupfer(I)-oxid) ausfällt.

2.1.1.2 Fehling-Probe

Die Fehling-Probe aus dem Jahre 1848 diente ursprünglich ebenfalls als Nachweis von Glucose im Urin, reagiert aber auch mit anderen reduzierenden Kohlenhydraten sowie mit Aldehyden positiv (Fehling 1848). Auch Fructose wird positiv nachgewiesen (s.u.).

² Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden sehr komplexe Reaktionsmechanismen in dieser Arbeit teilweise stark vereinfacht bzw. Zwischenschritte werden ausgelassen; außerdem wird auf die Darstellung von Aggregatzuständen und Reaktionsenthalpien verzichtet.

Vorgehensweise: Für den Test werden je 2 mL der beiden Lösungen in ein Reagenzglas gegeben, das schon ca. 50 mg eines reduzierenden Zuckers (z.B. Glucose) enthält, und im Wasserbad erhitzt.

Nach wenigen Minuten ergibt sich eine rote Farbe, die auf der Bildung von Kupfer(I)-oxid-Partikeln beruht; diese Partikel sedimentieren beim Stehenlassen rasch (Aebi 1965). Bei einem Überangebot von Kupfer(II)-Ionen werden Farbtöne in gelb, grün, braun und ocker hervorgerufen (ähnlich wie in Abb. 2 zur Benedict-Probe).

Die Fehling-Probe kann Glucose und Maltose sowie weitere ähnliche Mono- und Disaccharide nicht unterscheiden, da alle reduzierenden Kohlenhydrate in gleicher Weise reagieren.

Die beiden Lösungen Fehling-I und Fehling-II müssen separat hergestellt und aufbewahrt werden, da sie ansonsten während der Lagerung durch Umlagerungsreaktionen des Tartrats verderben:

- Fehling-I wird hergestellt, indem 7 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat mit demin. Wasser gelöst und zu 100 mL aufgefüllt werden.
- Für Fehling-II werden 10 g Natriumhydroxid und 35 g Kaliumnatriumtartrat in demin. Wasser gelöst und nach dem Abkühlen zu 100 mL aufgefüllt.

Sicherheit: Vor Anwendung aller Methoden mit Kupferionen und stark alkalischen Lösungen ist eine Sicherheitsbelehrung durchzuführen und zu dokumentieren, z. B. im Klassen- oder Kursbuch.

Das Erhitzen der Proben über dem Bunsenbrenner ist zu unterlassen, da hierdurch gefährliche Siedeverzüge provoziert werden. Stattdessen ist dem Wasserbad (60-70 °C) der Vorzug zu geben.

Ersatzstoffprüfung: Die als „Fehling-II“ bezeichnete Lösung ist im Prinzip eine mit Kaliumnatriumtartrat versetzte Natronlauge ($c = 2,5 \text{ mol/L}$), während der alkalische pH-Wert von Benedict-Reagenz (s.u.) nur auf Trinatriumcitrat und Natriumcarbonat beruht. Die als „Fehling-I“ bezeichnete Lösung enthält 7 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat auf 100 mL, während das Benedict-Reagenz auf 100 mL nur 1,73 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat enthält.

Die Ergebnisse der Fehling-Probe lassen sich auch mit dem Benedict-Test erzielen, allerdings mit weniger gefährdenden Stoffen. Deshalb ist die Fehling-Probe gemäß § 7.3 der Gefahrstoffverordnung eigentlich durch den Benedict-Test (s. u.) zu ersetzen (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 01.12.2010).

2.1.1.3 Benedict-Test

Der Benedict-Test auf reduzierende Zucker (Benedict 1909) ähnelt der Fehling-Probe (Fehling 1848), jedoch wird für die Aufbewahrung der Fertiglösung nur ein Gefäß benötigt (anstelle von zwei getrennten Vorratslösungen bei der Fehling-Probe).

Vorgehensweise: Von der Testlösung werden 4 mL in ein Reagenzglas gegeben, das schon ca. 50 mg eines reduzierenden Zuckers (z.B. Glucose) enthält, und im Wasserbad erhitzt. Nach wenigen Minuten ergibt sich eine rote Farbe, die beim Stehenlassen als Niederschlag ausfällt (Ruppersberg 2016a).

Bei der Herstellung der direkt verwendbaren Fertiglösung werden zunächst auch hier zwei Lösungen angesetzt. Die erste Lösung enthält 173 g Trinatriumcitrat und 100 g wasserfreies Natriumcarbonat, welche unter Rühren und Erwärmen³ in 600 mL demin. Wasser gelöst werden. Eine zweite Lösung wird aus 17,3 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat in 100 mL demin. Wasser hergestellt. Nach dem Abkühlen werden beide Lösungen in einem 1000 mL – Messkolben vereinigt und nach dem Abkühlen auf 1000 mL aufgefüllt (Ruppersberg 2016a). Durch die Substitution von Hydroxid durch Carbonat ist das Reagenz weniger stark ätzend und durch die Verwendung von Citrat anstatt Tartrat ist es stabiler als das Fehling-Reagenz.



Foto: Ruppersberg

Abbildung 2: Zucker und Milchprodukte im 60 °C-Wasserbad mit Benedict-Reagenz

Bei einem Überschuss an Kupfer(II)-Ionen ergeben sich -wie bei der Fehling-Probe (s. o.)- weitere Farben (Abb. 2), die semiquantitativ gedeutet werden können:

- „Leichte Verfärbung nach grün: weniger als 0,1%

³ Das Erwärmen dient der besseren Löslichkeit des relativ schwer löslichen Natriumcarbonats.

- Starke Trübung mit gelb-grüner Verfärbung: 0,2-0,3%
- Ansatz gelb-orange: zirka 0,5%
- Ansatz ziegelrot: 1% und mehr“ (Aebi 1965).

Die Angaben von Aebi (1965, S. 97) in Gewichtsprozent beziehen sich auf die Verwendung einer Glucoselösung; bei der Beurteilung der farblichen Ergebnisse von Disacchariden ist daher eine Verdopplung der Prozentzahlen vorzunehmen.

Sicherheit: Vor Anwendung aller Methoden mit Kupferionen und stark alkalischen Lösungen ist eine Sicherheitsbelehrung durchzuführen und zu dokumentieren, z. B. im Klassen- oder Kursbuch.

2.1.2 Nachweis von Cellulose mit der Chlorzinkiodprobe

Die Chlorzinkiodprobe (auch Iod-Zinkchlorid-Test genannt) dient dem Nachweis von Cellulose (Häusler und Rampf 1976). Dieser ist an einer blauen bis braunvioletten Färbung erkennbar, je nach Konzentration und Struktur der Cellulose. Zur Farbentstehung gibt es außer der Vermutung, dass das Zinkchlorid zum Aufquellen der Cellulosestruktur führt und dass es sich um Wechselwirkungen zwischen Iod, Zink und Cellulose handelt (Blume 2019), keinen auffindbaren nachgewiesenen Mechanismus.

Vorgehensweise: Die Testlösung lässt sich bei Raumtemperatur sowohl im Reagenzglas als auch als Tüpfeltest anwenden (Ruppersberg und Proske 2019). Für letztere Methode werden auf einer Tüpfelplatte (heller Untergrund) ein Tropfen Chlorzinkiod-Lösung und eine Mikrospatelspitze Cellulose zusammengegeben. Nach kurzer Zeit ergibt sich eine blaue bis braunviolette Einschlussverbindung.

Die Fertiglösung lässt sich problemlos selbst herstellen, indem man 20 g Zinkchlorid und 6,5 g Kaliumiodid in 10,5 mL Wasser löst. Nach Zusatz von 0,5 g Iod wird 15 Min. lang geschüttelt und falls erforderlich filtriert (Ruppersberg und Proske 2019). Eine historische Anleitung mit leicht abweichenden Mengen lässt sich im Botanischen Zentralblatt von 1912 nachlesen, dort werden auch weitere Rezepturen diskutiert (Nowopokrowsky 1912).

Der Gefahrstoff Zinkchlorid lässt sich in Seeligers Reagenz (auch: Sellegers Reagenz) durch eine weniger gefährliche Lösung von Calciumnitrat-Tetrahydrat ersetzen: 0,1 g Iod und 0,5 g Kaliumiodid werden zunächst trocken vermischt und mit wenig demin. Wasser gelöst. In einem zweiten Gefäß werden 30 g Calciumnitrat-Tetrahydrat in wenig demin. Wasser gelöst.

Beide Lösungen werden vereinigt und zu 25 mL aufgefüllt. Beim Nachweis von Cellulose ergibt sich eine hell- bis dunkelblaue Färbung (Deutscher Apotheker-Verein 1922).

Sicherheit: Aufgrund der Problematik bzgl. Iod-Überempfindlichkeit (siehe auch 2.1.4 Nachweis von Stärke durch die Iodprobe) sind bei der Anwendung als Sicherheitsmaßnahmen Handschuhe zu tragen und nur kleine Substanzmengen einzusetzen. Schülerinnen und Schüler mit bekannter Iod-Überempfindlichkeit sollten durch Verwendung von Kamera und Bildschirm auf sicheren Abstand gehalten werden und sind auf diese Weise besonders zu schützen. Es ist zu prüfen, ob das Reagenz analog zur Iodprobe auch mit einem geringeren Iodgehalt die gewünschten Ergebnisse erbringt.

2.1.3 Spezifischer Glucose-Nachweis mit dem GOD-Test

Der Glucose-Oxidase-Peroxidase-Test (GOD-Test) wird mit Urinteststreifen aus der Apotheke durchgeführt.

Vorgehensweise: Ein Teststäbchen wird kurz in die zu prüfende Lösung getaucht und nach der in der Gebrauchsanleitung angegebenen Zeit anhand der Farbskala auf der Verpackung geprüft. Zeitüber- und Unterschreitungen können zu falschen Ergebnissen führen.

Sicherheitshinweise sind zur Anwendung von GOD-Teststäbchen nicht erforderlich.

Es handelt sich um einen zusammengesetzten enzymatischen Test, bei dem zunächst aus Glucose und Wasser mit Hilfe von Glucose-Oxidase Gluconolacton und Wasserstoffperoxid gebildet werden (Keilin und Hartree 1952).

Anschließend wird das Wasserstoffperoxid durch ein zweites Enzym –die Peroxidase- wieder zu Wasser reduziert. Das dabei auf den Redoxindikator 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure), kurz ABTS, übertragene Sauerstoffatom führt zu einem grün gefärbten Radikalkation (Absorptionsmaximum 405 nm) und somit zum Farbumschlag.

Allein schon diese vereinfachte Darstellung der Vorgänge verdeutlicht, dass der GOD-Test im Schulunterricht zumeist lediglich als Phänomen verwendbar ist; die exakte Erklärung der biochemischen Vorgänge (Bankar et al. 2009) ist erst bei gutem Oberstufenniveau vermittelbar. Dennoch sollten GOD-Teststäbchen in keinem Unterricht über Kohlenhydrate fehlen, da sie Schülerinnen und Schüler schon frühzeitig mit einem Frühtest zur Erkennung von Diabetes bekannt machen.

Im naturwissenschaftlichen Unterricht sind GOD-Teststäbchen insbesondere dann geeignet, wenn es darum geht, bei dem Standardexperiment „Stärkeabbau durch Speichelamylase“ im

Produktgemisch neben dem Hauptprodukt Maltose auch noch die Anwesenheit von Glucose nachzuweisen (Ruppersberg 2016c).

2.1.4 Nachweis von Stärke durch die Iodprobe

Mit der Iod-Probe wird Stärke durch Bildung der farbigen Iod-Stärke-Einschlussverbindung nachgewiesen.

Vorgehensweise: In die zu testende Lösung werden bis zu 10 Tropfen der Iodlösung ($c = 0,025 \text{ mol/L}$) gegeben. Es ergibt sich eine farbige Iod-Stärke-Einschlussverbindung, die je nach verwendeter Stärke blau, rötlich oder violett bis schwarz ist.

Hinweise: Je nach Stärke-Typ (Stärke aus Kartoffeln, Mais, Weizen, Reis ...), industrieller Aufbereitung der Stärkeprodukte und Konzentration der Reaktanden erscheint die Färbung rötlich, violett, blau oder schwarz. Hierzu lässt sich als Regel aufstellen, dass eine stärkere Verzweigung der Molekülkette eine rötliche Verfärbung verursacht (20-30 Glucose-Einheiten bis zur nächsten Verzweigung) und eine weniger verzweigte Kette (über 45 Einheiten bis zur nächsten Verzweigung) einen blauen Eindruck hervorruft (Schwedt 2019).

Bei einem schwarzen Eindruck sollte die Konzentration verringert werden bzw. zu stark verklumpte Stärke durch kurzes Aufkochen gelockert werden.

Der Begriff Iodprobe geht häufig einher mit der Verwendung von Iodtinktur (ethanolische Lösung von Iod) und Lugolscher Lösung (Iodkaliumiodidlösung). Beides wurde früher in Apotheken zur Wunddesinfektion angeboten.

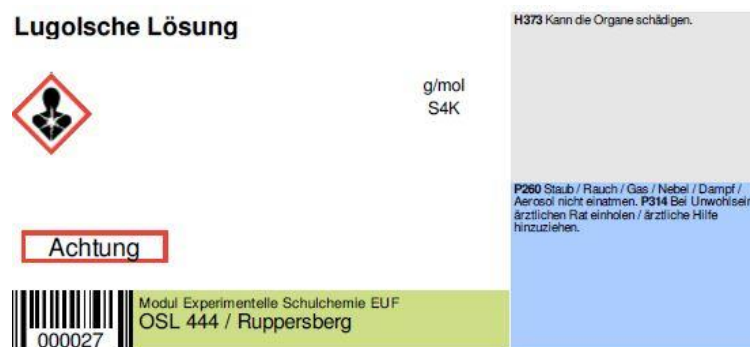


Abbildung 3: Etikett "Lugolsche Lösung" mit Piktogramm GHS 08

Da die Iod-Überempfindlichkeit in der Bevölkerung erheblich zugenommen hat, werden zur Wunddesinfektion nunmehr moderne Antiseptika wie z. B. Phenoxyethanol und Octenidin eingesetzt. Iod und Kaliumiodid wurden mittlerweile mit dem Gefahrstoffsymbol GHS 08

versehen; dies gilt dann auch für Lugolsche Lösungen (Abb. 3). Lugolsche Lösung ist ein Sammelbegriff für Iod-Kaliumiodid-Lösungen mit Konzentrationen von 1%, 2% oder sogar 5% Iod in Wasser.

Ihre **Verwendung im Unterricht ist mittlerweile kritisch zu sehen**, denn Iod-Unverträglichkeiten bei Schülerinnen und Schülern sind mittlerweile ein ernst zu nehmender Aspekt geworden (Carl Roth GmbH + Co KG 2019). Mit einer 0,025 molaren Iodlösung ($\omega = 0,65\%$) kann ebenfalls Stärke nachgewiesen werden, siehe Abbildung 4.



Abbildung 4: Stärkenachweis mit Iodlösung ($c = 0,025 \text{ mol/L}$)

Diese Lösung ist weniger gefährlich und daher kennzeichnungsfrei (siehe Abbildung 5).

Stehen für den gleichen Zweck zwei Möglichkeiten zur Verfügung, von denen die eine weniger gefährlich ist, so ist gemäß RiSU im Rahmen der Gefährdungsbeurteilung und Ersatzstoffprüfung die 0,025 molare Iodlösung der Lugolschen Lösung vorzuziehen (RiSU-Kommission der KMK 14.06.2019; Ruppertsberg 2020b).

Entgegen einer früheren Ansicht sind für die Entstehung der farbigen Iod-Stärke-Einschlussverbindung keine Tri- oder Pentaiodidionen nötig (Madhu et al. 2016).

Die schlechte Löslichkeit von Iod in Wasser spielt keine Rolle, wenn man die Lösung wenigstens einen Tag vor dem ersten Gebrauch ansetzt.

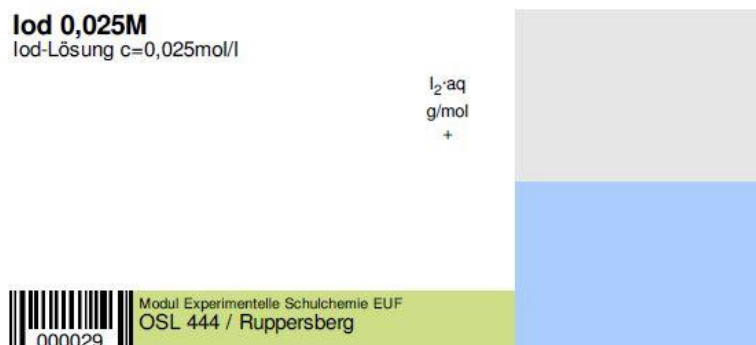


Abbildung 5: Etikett „Iod-Lösung 0,025 mol/L“ ohne Gefahrenpiktogramm

In Verbindung mit dem schulischen Standard-Experiment „Stärkeabbau durch Speichel-Amylase“ wird die Entfärbung der Iod-Probe als Hinweis benutzt, dass die Stärke abgebaut wurde – ein Nachweis der Endprodukte unterbleibt aber zumeist (siehe z. B. (Groth, H., Knippenberg, A., Leiding, U. 2016). Mit der Wöhlk-Probe und dem GOD-Test können Maltose und Glucose nachgewiesen werden (Ruppertsberg 2016c).

Sicherheit: Aufgrund der Problematik bzgl. Iod-Überempfindlichkeit (siehe 2.1.2) ist bei der Anwendung Vorsicht geboten (Handschuhe tragen, kleine Mengen einsetzen, Schülerinnen und Schüler mit bekannter Iod-Überempfindlichkeit durch Abstand und Verwendung einer Unterrichtskamera mit Übertragung auf Bildschirm/ Smartboard schützen).

Ersatzstoffprüfung: Gemäß § 7.3 Gefahrstoffverordnung ist anstelle der Lugolschen Lösung die Iod-Lösung mit der geringeren Konzentration ($c = 0,025 \text{ mol/L}$) anzuwenden (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 01.12.2010).

2.1.5 Nachweis von Ribose und anderen Monosacchariden (Molisch-Probe)

Die Molisch-Probe auf Ribose und andere Monosaccharide (Molisch 1886) wird mit α -Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt.

Vorgehensweise: Zu 1 mL einer ethanolischen Lösung von α -Naphthol ($\omega = 10\%$) wird dieselbe Menge der zu untersuchenden Zuckerlösung gegeben und vorsichtig geschüttelt, bis sich alles gut vermischt hat. Dann lässt man aus einer Pasteur-Pipette vorsichtig 1 mL konzentrierte Schwefelsäure in das Reagenzglas laufen und unterschichtet das Gemisch. An der Grenzfläche bildet sich ein violetter Ring.

Der Mechanismus der Reaktion wurde erstmalig im Jahre 1931 von Hellmut Bredereck beschrieben (Bredereck 1931), jedoch 1984 von einem japanischen Forscherteam um Mutsuko Ohta erneut untersucht und mit modernen Methoden aufgeklärt (Ohta, M., Iwasaki,

M., Kouno, K., Ueda, Y. 1985). Hexosen ergeben einen Farbstoff, der im englischen als „reddish-violet“ (rötlich-violett, etwa wie RAL-Farbpalette 4002 P) bezeichnet wird, Pentosen einen als „purple-red“ (purpurrot, etwa wie RAL-Farbpalette 3004) bezeichneten Farbstoff, der Desoxyzucker Rhamnose ergibt einen roten Farbstoff (etwa wie RAL-Farbpalette 3000). Farbtöne durch Vergleich zu bestimmen ist in der Praxis recht schwierig, da es zu subjektiven Unterschieden bei der Wahrnehmung kommen kann. Je nach Einstellung eines Farbmonitors oder eines Farbdruckers kann es auch zu objektiv unterschiedlichen Ausgaben von ein und demselben Farbwert kommen. Der Abgleich mit der international üblichen RAL-Farbpalette (RAL 2021) kann hierbei als Hilfsmittel bezeichnet werden, wesentlich besser wäre es jedoch, mit einem Vis-Spektrometer ein Maximum zu bestimmen, welches verlässlich überprüfbar ist. Die Reaktion von Glucose mit konzentrierter Schwefelsäure führt zu 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), die Reaktion von Ribose zu Furfural (siehe Abb. 6).

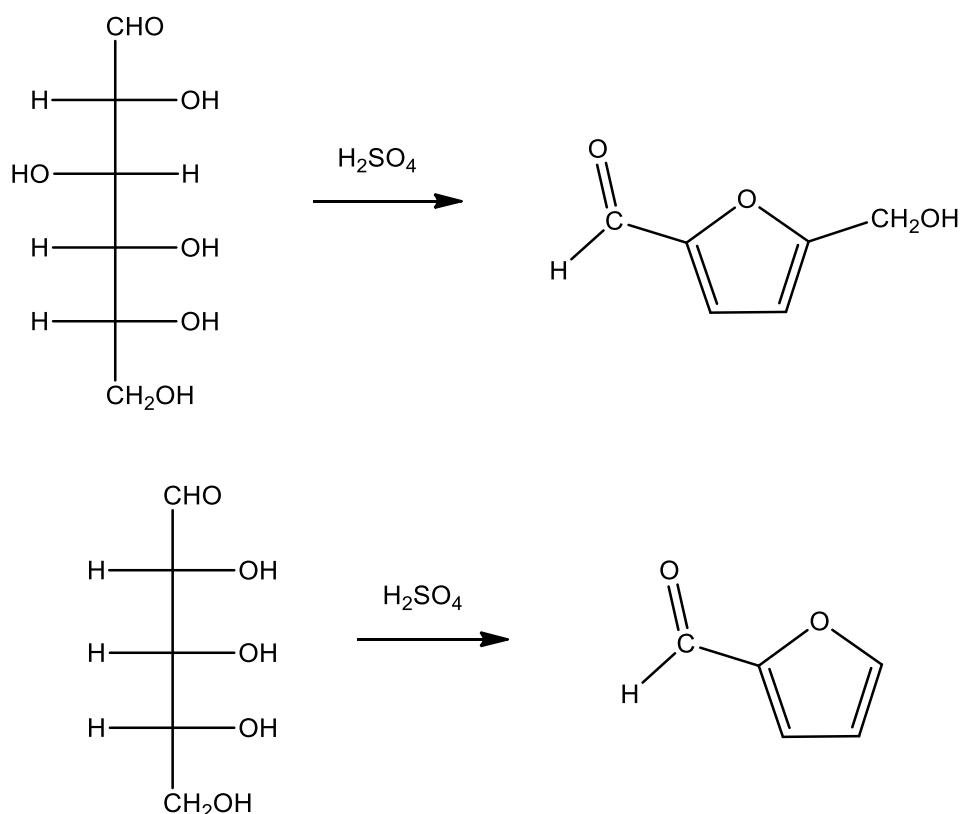


Abbildung 6: Entstehung von 5-Hydroxymethylfurfural (oben) bzw. Furfural (unten)

In einem weiteren Schritt führt die Reaktion mit α -Naphthol zu einem Farbstoff, in Abb. 7 am Beispiel von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) dargestellt, bei dem es sich in Anlehnung an

(Ohta, M., Iwasaki, M., Kouno, K., Ueda, Y. 1985) um 4-((5-((4-hydroxynaphthalen-1-yl)methyl)furan-2-yl)methylene)naphthalen-1(4H)-on handelt.

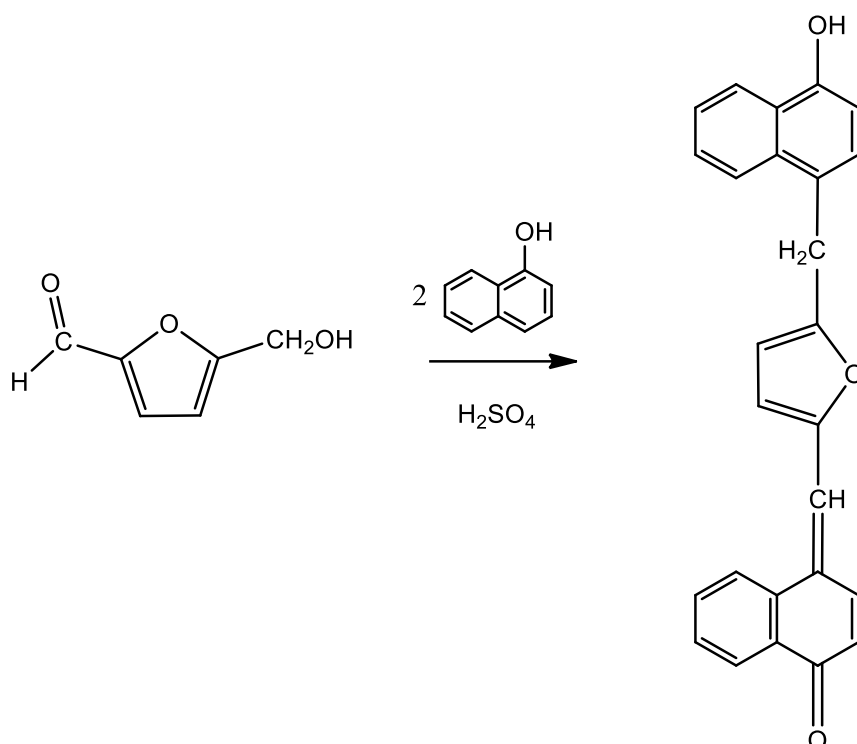


Abbildung 7: HMF und α -Naphthol reagieren zu einem violetten Farbstoff (Ohta et al.)

Sicherheit: α -Naphthol ist ein Gefahrstoff mit den Kennzeichnungen „giftig, ätzend, umweltschädigend“ (GESTIS-Stoffdatenbank 2020), der zum Zeitpunkt der Abfrage (Februar 2021) in DeGINTU nach besonderer Ersatzstoffprüfung zwar noch in der Schule eingesetzt werden darf; es ist aber damit zu rechnen, dass derartige Stoffe in naher Zukunft komplett aus dem Schulunterricht verbannt werden.

Auch aus heutiger Sicht sollte α -Naphthol Schülerinnen und Schülern nur als verdünnte Fertiglösung gereicht werden⁴ oder durch einen Ersatzstoff (s. u.) substituiert werden. Das von Molisch zusätzlich verwendete Thymol (Molisch 1886) führt zwar auch zur Bildung von roten Farbstoffen, diese ermöglichen aber nicht so gute farbliche Unterscheidungen wie das zuerst verwendete α -Naphthol.

Das von Ohta et al. verwendete 2-Methyl-1-naphthol eignet sich nur in geringem Maße als Ersatzstoff, da es

⁴ Laut GisChem-Gemischrechner (www.gischem.de) besteht die Gefährdung dann nur noch in der Brennbarkeit des Ethanols und der ätzenden Wirkung des α -Naphthols.

- a. sehr teuer ist (1 g kostete am 8.11.2020 bei Merck 246 Euro),
- b. in Anwesenheit von Luft instabil ist und nur unter Sauerstoffabschluss aufbewahrt werden kann (Ohta, M., Iwasaki, M., Kouno, K., Ueda, Y. 1985).

Bei einer unterrichtsbezogenen Weiterentwicklung der Molisch-Probe an der Europa-Universität Flensburg wurde der Naturstoff Carvacrol erfolgreich als Ersatzstoff für α -Naphthol getestet⁵.

2.1.6 Nachweis von Aldehyden mit Schiffischem Reagenz

Schiffisches Reagenz ist eigentlich ein Nachweis für Aldehyde⁶, z. B. Formaldehyd (Wieland, H., Scheuing, G. 1921). Mit Glucose ergibt sich bei Raumtemperatur keine Färbung, wohl aber beim Erhitzen. Beim Abkühlen ist die Reaktion reversibel.

Vorgehensweise: In etwa 2 mL einer Glucoselösung und etwa 2 mL einer Aldehydlösung werden je 2 mL Schiffisches Reagenz gegeben. Die Glucoselösung bleibt farblos, die Aldehydlösung wird rot.

Die (umstrittene) Begründung lautet: Glucose liegt bei Raumtemperatur in wässriger Lösung überwiegend in der Ringform vor, in der Hitze öffnet sich der Ring und gibt die Aldehydfunktion frei, die gemäß Wenck (Wenck et al. 2013) sogleich sulfoniert⁷ werden soll und wodurch aus der farblosen „Fuchsinchwefligsäure“ das farbige Fuchsin entsteht. In der folgenden Darstellung (Abb. 8) wird zur Vereinfachung die Reaktion von überschüssigem Hydrogensulfit zu N-Sulfinsäuregruppen weggelassen, da sie zum Verständnis der Farbreaktion nicht beiträgt.

Aus fachlicher Sicht muss an dieser Stelle gesagt werden, dass der Ring der Glucopyranose in der Hitze zu einem größeren Anteil geöffnet ist als in kalter Lösung, aber auch ein kleinerer Anteil ermöglicht Reaktionen an der Aldehydfunktion der offenkettigen Form: Das in kleiner Menge entstehende Reaktionsprodukt würde dann aus dem Gleichgewicht entfernt; die restlichen Moleküle stellen sich wieder auf den Gleichgewichtszustand ein. Auf diese Weise ist trotz eines geringeren Anteils der offenkettigen Form eine kontinuierliche Reaktion der Aldehydfunktion möglich.

⁵ Noch unveröffentlichtes Ergebnis einer neuen Versuchsreihe von Dr. Hanne Rautenstrauch et al., EUF Flensburg, 16.2.2021

⁶ Im Gegensatz hierzu ist die Fehling-Probe ursprünglich ein Nachweis für reduzierende Kohlenhydrate und wurde zu einem allgemeinen Aldehyd-Nachweis erweitert.

⁷ Hierbei handelt es sich nicht um eine Sulfonierungsreaktion im eigentlichen Sinne, sondern um ein Hydrogensulfitaddukt des Aldehyds; es entsteht eine α -Hydroxysulfonsäure.

Dies ist nicht der einzige Grund dafür, dass die „Schiff-Reaktion“ als Nachweis für Glucose u. a. umstritten ist: Die Schiffsche Probe verläuft **auch ohne Glucose** beim Erhitzen „positiv“ – d. h. auch ohne reduzierenden Zucker in der Probe färbt sich das Schiff-Reagenz beim Erhitzen rot. Dies bedeutet, dass das temperaturabhängige Gleichgewicht zwischen der offenkettigen Form und der Ringform der Glucose mit der Schiffschen Probe **nicht aussagekräftig** gezeigt werden kann (Akademie für Lehrerfortbildung und Personalplanung 2020).

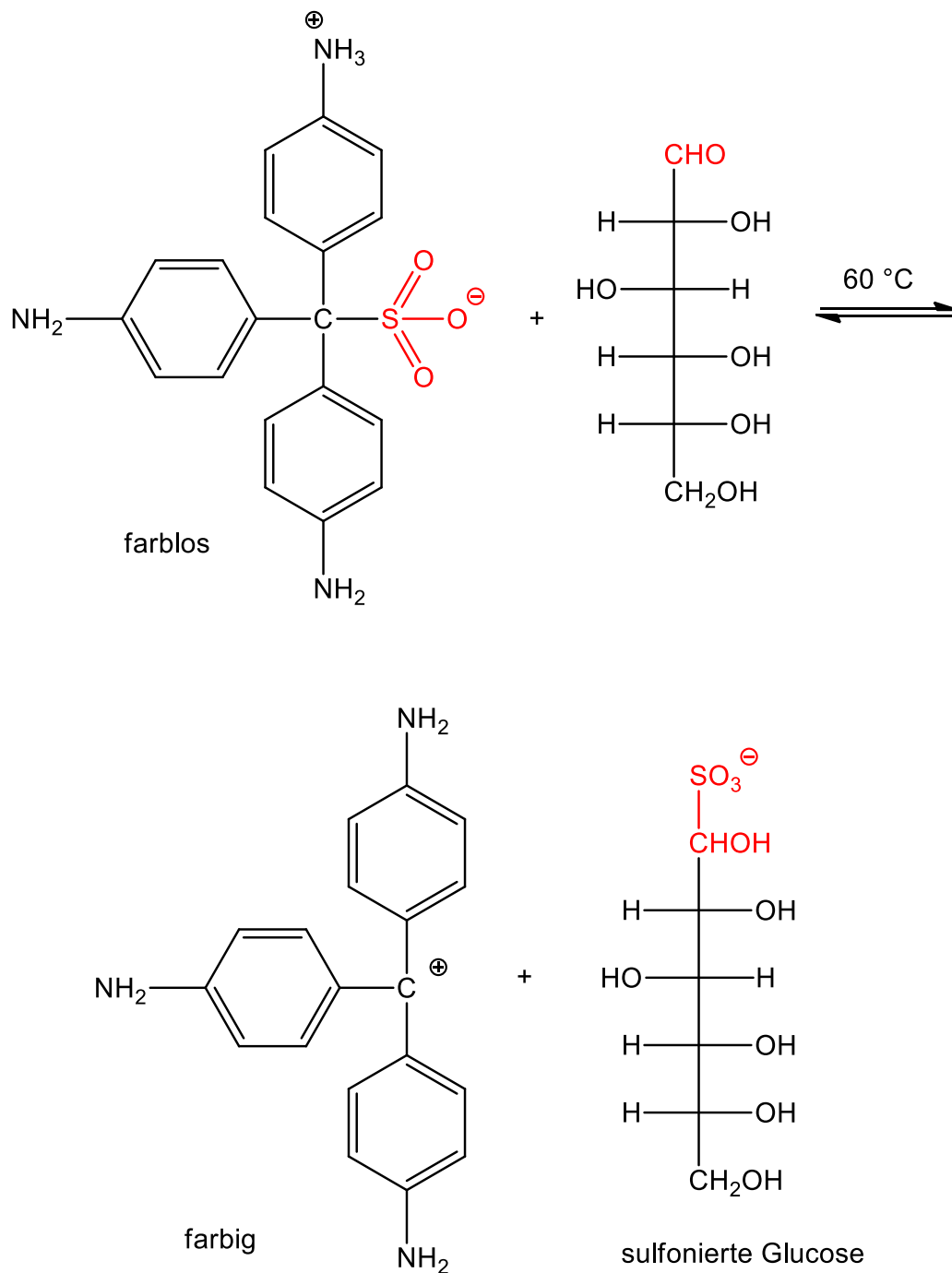


Abbildung 8: Umstrittene Reaktion von Fuchsin und Glucose (vereinfacht)

Allein die Herstellung von Schiffsschem Reagenz, leicht verändert nach einem Vortrag anlässlich der MNU-Fortbildungstagung in Bremerhaven 2013 (Proske und Walter 2013), verdeutlicht den schwierigen Umgang, der eine schulische Verwendung abermals mit großen Fragezeichen versetzt:

„1 g Diamantfuchsin wird in 100 ml Ethanol gelöst und filtriert. 10 ml Filtrat werden mit 90 ml Wasser in einem 200 ml-Erlenmeyerkolben verdünnt, dann werden 2 g Natriumsulfit oder Natriumdisulfit und 10 Tropfen konzentrierter Salz- oder Schwefelsäure zugegeben. Der Erlenmeyerkolben wird mit einem Stopfen verschlossen. Idealerweise müsste nun eine farblose Lösung entstehen, in der Praxis erhält man jedoch eine mehr oder weniger intensiv braun gefärbte Lösung. Die Braunfärbung wird durch Acridin-Verunreinigungen, welche im Farbstoff enthalten sind, hervorgerufen. Aus diesem Grunde wird die Lösung, nachdem die rotviolette Färbung verschwunden ist und die Lösung mehr oder weniger intensiv braun gefärbt ist, mit einem Spatel-Löffel gepulverter Aktivkohle versetzt, kräftig durchgeschüttelt und anschließend filtriert“ (Proske und Walter 2013).

Weiter heißt es:

„Schiffs-Reagenz sollte in farblosen Enghalsflaschen mit dichtschießendem Schraubverschluss aufbewahrt werden. Die Flaschen werden zum Schutz gegen Licht in Aluminium-Folie eingehüllt. Die Lösung ist in kleinen Flaschen, die möglichst vollständig gefüllt sein sollen, aufzubewahren. Schiffs-Reagenz ist gegenüber Sauerstoff empfindlich, deshalb sollten die Flaschen so wenig wie möglich geöffnet werden. Tritt eine violette Färbung ein, ist eine Regeneration mit Sulfit und Säure möglich. Es empfiehlt sich, die Lösung fertig zu kaufen, da die Ausgangssubstanz heute als KMR-Stoff eingestuft ist.“ (Proske und Walter 2013)

Sicherheit: Gemäß den obigen Ausführungen ist von einer Anwendung der Schiffsschen Probe abzuraten. Aufwand, Risiko und Ergebnis stehen in keinem sinnvollen Verhältnis. Als Ersatz für ein Vorführ-Experiment mit Schiffsschem Reagenz, wenn man es nach dem bisher Gesagten überhaupt noch präsentieren möchte, bietet sich eine Videoaufzeichnung an (z. B. (Haase 2017)).

Ersatzstoffprüfung: Bertsche schlägt ein Verfahren vor, bei dem anstelle von Schiffsschem Reagenz das aus der Füllfederpatrone bekannte Königsblau verwendet wird (Bertsche 2017). Dieses Verfahren genauer zu untersuchen würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Dennoch muss auch hier gesagt werden, dass gemäß § 7.3 Gefahrstoffverordnung das weniger gefährdende Verfahren anzuwenden ist (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 01.12.2010).

2.1.7 Nachweis von Fructose nach Seliwanoff

Die Seliwanoff-Probe⁸ mit (Ethyl-) Resorcin und Salzsäure auf Fructose ist ein Nachweis für Ketosen, der einfach durchführbar und schön anzusehen ist (Seliwanoff 1887; Shuklov und Boeck 2015). Auch mit Saccharose und Lactulose ergibt sich rote Färbung (Amine et al. 2000), da beide Disaccharide einen Fructose-Anteil besitzen: Saccharose ist α -D-Glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranose, Lactulose ist β -D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-Fructofuranose.

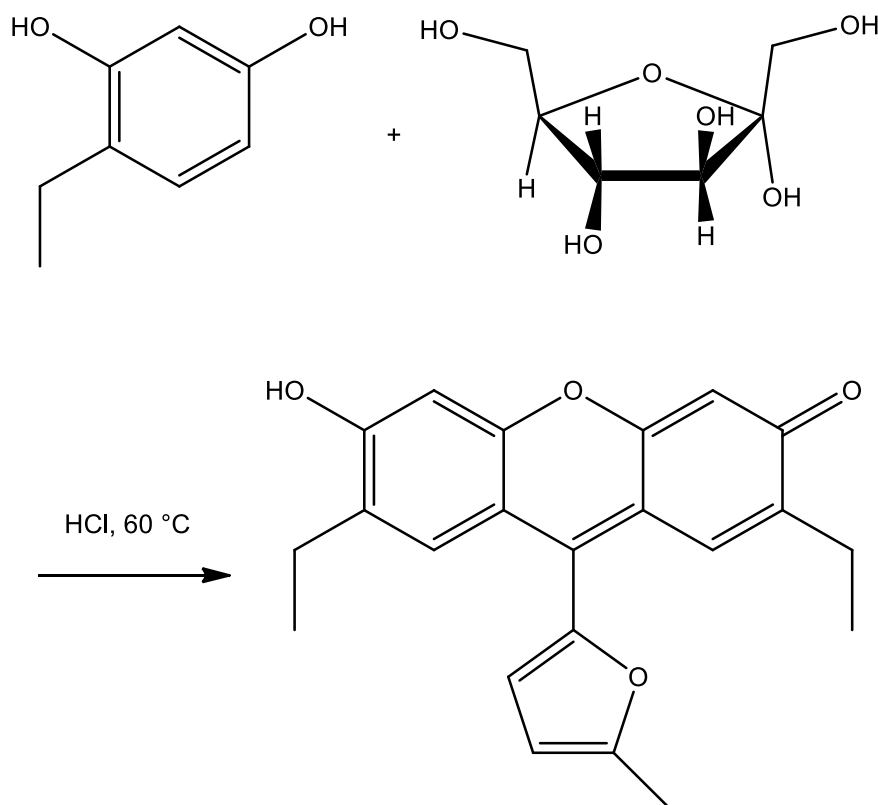


Abbildung 9: Reaktion von Ethylresorcin mit Fructose (nach Shuklov/Boeck 2015)

Vorgehensweise: Zur Durchführung der Seliwanoff-Probe werden in einem Reagenzglas ca. 2 mL ethanolische (Ethyl-) Resorcinlösung ($\omega=1\%$) mit 3 mL Salzsäure ($\omega=37\%$) vermischt, mit einer Spatelspitze eines zu prüfenden Zuckers versetzt und vorsichtig erhitzt. Mit Fructose,

⁸ Schreibweise auch Selivanov u.a., da der 3. Buchstabe des kyrillischen Alphabets „в“ mit ff, v oder w transkribiert werden kann, Originalschreibweise: Селиванов

Saccharose und Lactulose ergibt sich eine lebhaft Rotfärbung, während mit Glucose keine Färbung entsteht. Die Reaktionsgleichung ist am Beispiel von Fructose in Abbildung 9 dargestellt.

Sicherheit: Vor Anwendung ist eine Sicherheitsbelehrung durchzuführen. Reste sind im Abfallbehälter für Aromaten zu entsorgen.

2.1.8 Tollens-Probe auf reduzierende Zucker (Silberspiegelprobe)

Die Tollens-Probe mit Silbernitrat und Ammoniak auf Aldehyde ist eine sehr aussagekräftige und ästhetische Reaktion, an deren Ende bei geschickter und sauberer Arbeitsweise ein von innen verspiegeltes Reagenzglas entsteht (Tollens 1882).

Vorgehensweise: 2 mL Silbernitrat- Lösung ($\omega=1\%$) werden in einem unbenutzten Reagenzglas mit einem Tropfen Natronlauge ($c = 1 \text{ mol/L}$) versetzt, es fällt schwarzes Silberoxid aus. Unter Umschütteln ist tropfenweise Ammoniak-Lösung ($\omega=10\%$) zuzugeben, bis die Lösung gerade klar und farblos geworden ist. In diese Lösung wird eine Spatelspitze Glucose gegeben. Anschließend wird der Ansatz in ein warmes Wasserbad gestellt (siehe z. B. (Wollrab 2014)).

Die Reaktionsgleichung mit einem Aldehyd ist der Abbildung unten dargestellt. Ob dies bei reduzierenden Zuckern ebenfalls in dieser Weise zutrifft oder wie bei der Fehling-Probe einer Berichtigung bedarf, ist derzeit umstritten (Fleischer 2017).

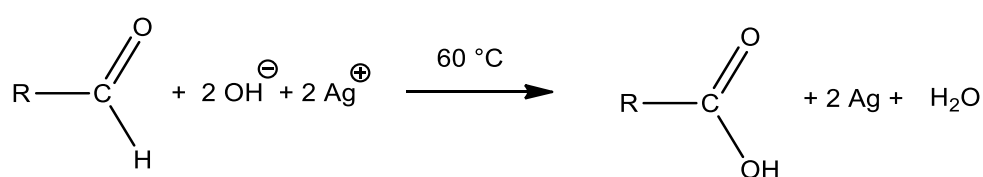


Abbildung 10: Reduktion von Silberionen durch einen Aldehyd

Die Tollens-Probe ist ebenso wie die Fehling-Probe nicht in der Lage, Glucose von Lactose zu unterscheiden.

Wegen der stark gestiegenen Silberpreise kosten 50 g Silbernitrat derzeit ca. 95 Euro (Stand 02/2021), eine Neubeschaffung könnte daher evtl. nicht mehr in dem von der Schule vorgesehenen Rahmen liegen.

Sicherheit: Vor Anwendung sind eine Ersatzstoffprüfung und eine Sicherheitsbelehrung durchzuführen, insbesondere ist auf die Vermeidung von Abfällen hinzuweisen, welche bei

unrichtiger Lagerung zu explosivem Knallsilber weiterreagieren können. Silberabfälle dürfen ebenso wie Goldabfälle im Gegensatz zu Schwermetallabfällen *nicht alkalisch* gelagert werden, sondern müssen *in einem separaten Behälter sauer gelagert* werden (Wilke et al. 2018). Es empfiehlt sich, nur die benötigten Mengen vorzubereiten und eventuelle Reste nicht aufzubewahren, sondern zu verbrauchen.

2.1.9 Wöhlk-Probe auf Lactose und Maltose

Die Wöhlk-Probe unterscheidet 1,4-verknüpfte Disaccharide (rot), reduzierende Monosaccharide (gelb) und nicht-reduzierende Zucker (farblos) (Wöhlk 1904). Wegen der durch Malfatti 1905 erfolgten Verbesserung wird sie auch Wöhlk-Malfatti-Probe genannt (Malfatti 1905). Zur Vereinfachung wird im Folgenden lediglich der Terminus Wöhlk-Probe verwendet.

Vorgehensweise: Zu jeweils 2 mL einer Zuckerlösung ($\omega=1\%$) werden jeweils 2 mL Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$) und Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$) gegeben und anschließend im 65 °C heißen Wasserbad für bis zu 30 Minuten erhitzt, bis sich aussagekräftige Farben entwickelt haben.

Die Wöhlk-Probe ist zusammen mit Fearon's Test, bei dem Ammoniak gegen Methylamin ausgetauscht wurde, Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im weiteren Verlauf noch ausführlicher beschrieben und untersucht (siehe 3.4, 3.5, 4.1, 4.3.1, 6.3).

Die Besonderheit der Wöhlk-Probe besteht darin, dass sie im Unterschied zu Tests mit Kupferionen reduzierende Disaccharide von reduzierenden Monosacchariden und von nicht-reduzierenden Zuckern unterscheiden kann (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Farbergebnisse bei Nachweisen nach Wöhlk und Fehling		
Zucker	Wöhlk-Probe*	Fehling-Probe**
Reduzierende Monosaccharide, z.B. Glucose, Galactose	gelb	rot
Reduzierende Disaccharide, z. B. Lactose, Maltose	rot	rot
Nicht-reduzierende Zucker, z. B. Saccharose	farblos	blau

* Gleiche Farbergebnisse beim Fearon-Test und beim Diaminohexan-Verfahren, siehe Kap. 4

** Gleiche Farbergebnisse beim Benedict-Test und anderen Verfahren mit Kupfer(II)-Ionen

Leider benötigt die klassische Wöhlk-Probe einen Zeiteinsatz von allein 25-30 Minuten für die Entwicklung aussagekräftiger Farben, was mit dem allgemeinen 45-Minuten-Zeitraster in Schulen schwer zu vereinbaren ist. Als Vorgriff auf spätere Kapitel wird darauf hingewiesen, dass folgende Abwandlungen der Wöhlk-Probe wesentlich weniger Zeit benötigen:

- Fearon's Test: ca. 10 Minuten (siehe 3.9, 4.2.1, 6.2)
- 1,6-Diaminohexan-Verfahren: 60 Sekunden (siehe 4.2.6, 6.4.2).

Beide Verfahren werden noch sehr genau geschildert; an dieser Stelle wird lediglich der Stand in den gegenwärtig vorhandenen Schulbüchern reflektiert.

Eine vereinfachte Reaktionsgleichung ist in Abbildung 11 dargestellt⁹.

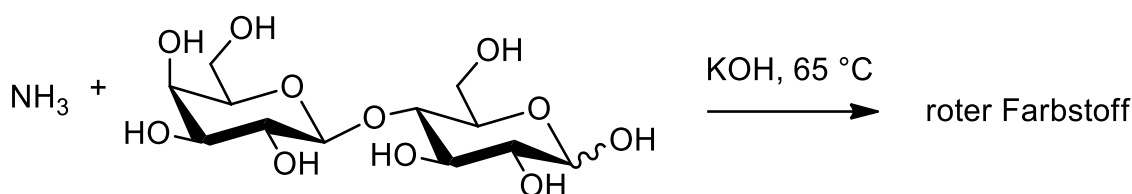


Abbildung 11: Vereinfachte Reaktionsgleichung zur Wöhlk-Reaktion mit Lactose

Sicherheit: Wegen des Ausgasens von Ammoniak sind die Experimente im Abzug oder bei guter Querlüftung durchzuführen. Vor der Anwendung sind eine Ersatzstoffprüfung und eine Sicherheitsbelehrung durchzuführen (siehe hierzu auch 6.1.1).

⁹ Die wellenförmige Bindung, im englischen Sprachgebrauch als „wavy bond“ bezeichnet, soll darauf hindeuten, dass an dieser Stelle durch ständige Ringöffnungen und –schließungen zwei verschiedene räumliche Richtungen der OH-Gruppe sowie eine Aldehydgruppe möglich sind (Mutarotation).

2.2 Anforderungen an Experimente im Chemieunterricht

Um für den experimentellen Chemieunterricht geeignet zu sein, muss ein Experiment im Chemieunterricht in Anlehnung an Bader und Lühken folgende Kriterien erfüllen:

- Es muss **fachlich richtig** sein.
- Das Resultat muss **aussagekräftig** sein.
- Es soll für Lehrkraft und/ oder Lernende **erfolgreich durchführbar** sein.
- Es soll für die Lernenden in Bezug auf Altersstufe und Vorwissen **verständlich** sein.
- Es muss in Anbetracht des Stundenrasters in einen **angemessenen Zeitrahmen** passen.
- Es muss sich bzgl. der **Kosten im Rahmen** der Ausstattungsmöglichkeiten befinden.
- Es muss **sicher** sein (siehe Bader und Lühken in (Sommer et al. 2018)).

Diese nachvollziehbaren Kriterien sollen nun auf die oben dargestellten Kohlenhydrat-Nachweise angewendet werden.

Darüber hinaus sollte ein Experiment auch **motivierend** sein. Eine geringe Motivation entsteht, wenn aus einer farblosen klaren Flüssigkeit eine farblose klare Flüssigkeit entsteht (z. B. beim Lösen von Kochsalz oder Rohrzucker in Wasser) oder wenn ein Experiment misslingt. Hoch ist die Motivation hingegen, wenn eine aus einer farblosen Flüssigkeit z. B. eine leuchtend rote Farbe (Wöhllk) oder ein Silberspiegel (Tollens) entsteht.

2.2.1 Fazit aus dem Vergleich der Nachweisverfahren

Die Auswertung der Schulbücher aus Tabelle 1 zeigt, dass für den Nachweis von Kohlenhydraten bei weitem nicht alle, sondern überwiegend nur drei Nachweisreaktionen gelehrt werden, nämlich

- a) die Fehling-Probe,
- b) die Iodprobe mit Lugolscher Lösung
- c) die Tollens-Probe, die auch Silberspiegelprobe genannt wird.

Beurteilt man die drei oben genannten sowie auch die weniger verwendeten Kohlenhydratnachweise nach der zuvor aufgestellten Kriterienliste (s.o.), so ergeben sich sofort Fragen bezüglich auffälliger Schwachpunkte:

- Fehling-Probe: Die verbreitete Erklärung, dass die eingesetzte Glucose zu Gluconsäure bzw. zu Gluconat umgesetzt wird, ist **fachlich falsch**. Die **Aussagekraft** ist auch nur bedingt gegeben, da nicht nur Aldohexosen wie Glucose und Galactose positiv

reagieren, sondern auch Ketohexosen wie Fructose und Sorbose sowie Disaccharide wie Lactose und Maltose; nach Hydrolyse reagiert auch Saccharose positiv.

- Sofern –wie häufig üblich- die Fehling-Probe im Reagenzglas über dem Bunsenbrenner durchgeführt wird, ist auch die **Sicherheit** ein Problem, denn nicht selten kommt es zu plötzlichen Siedeverzügen, bei denen der stark alkalische Inhalt aus dem schmalen Röhrchen in die Luft spritzt. Die Fehling-Probe sollte daher durch den Benedict-Test mit Erhitzen im Wasserbad substituiert werden.
- Beim Standardexperiment „Stärkeabbau durch Speichelamylase“ sind die Exposition der Schülerinnen und Schüler mit einer unnötig hoch konzentrierten Iodlösung (bis zu 5%) durch die Iodprobe mit Lugolscher Lösung (GHS 08) und das Ausbleiben des Endproduktnachweises zu beanstanden. Der Stärkenachweis lässt sich auch mit einer geringer konzentrierten wässrigen Iod-Lösung durchführen, die keine Gefährdungseinstufung besitzt.
- Die Tollens-Probe ist wegen des entstehenden Silberspiegels zwar hoch motivierend, aber in Bezug auf Kohlenhydrate nur bedingt aussagekräftig, da sie nicht nur mit den Aldohexosen und Ketohexosen positiv reagiert, sondern auch mit reduzierenden Disacchariden. Die Knallsilber-Gefahr lässt sich nur durch ein vernünftiges Chemikalien-Management beherrschen.

Auch die anderen Verfahren weisen Schwächen auf, die verbesserungswürdig erscheinen. Diese sind in Tabelle 3 mit einem Ampelsystem dargestellt:

- Barfoed-Probe und Benedict-Test sind immerhin besser als die Fehling-Probe, können aber ebenfalls weder Ketosen von Aldosen unterscheiden, noch reduzierende Di- von Monosacchariden differenzieren, noch Polysaccharide nachweisen.
- Die relativ unbekannte Chlorzinkiod-Probe kann zwar Cellulose nachweisen, ist aber aufgrund ihres hohen Iodgehalts für Personen mit Iodempfindlichkeit problematisch. Ob eine weniger iodhaltige Lösung auch zum Erfolg führt, wurde noch nicht getestet.
- Der GOD-Test ist wichtig und unverzichtbar, jedoch ist der komplexe chemische Ablauf nur für fortgeschrittene Lernende verständlich.
- Die Molisch-Probe ist wegen der Unterscheidung von Pentosen, Hexosen und Desoxyzuckern ebenfalls wichtig und birgt enormes Potential für die Anwendung von Smartphone-Fotometrie, ist jedoch noch viel zu wenig beachtet. Ein derzeit an der EUF Flensburg untersuchtes Ersatzverfahren mit einer weniger gefährlichen Fertiglösung

bzw. einem Naturstoff als Ersatzstoff für α -Naphthol ist sehr erfolgversprechend, wird jedoch an dieser Stelle nicht weiter erörtert (Rautenstrauch et al., in Arbeit).

- Die Schiffssche Probe ist aufgrund der oben dargestellten Mängel und Risiken für den Schulunterricht obsolet.
- Die Seliwanoff-Probe ist eine der besten unter den aufgeführten Nachweisen, weil fachliche Darstellung, Umfang der Nachweisfähigkeit, schulische Durchführbarkeit, Verstehbarkeit, Kosten und Sicherheit in großem Umfang gegeben sind.
- Die Wöhlk-Probe und der sehr verwandte Fearon-Test sind ebenfalls gut geeignet. Allerdings sind der Zeitrahmen der Wöhlk-Probe (bis zu 30 Min.) und das Arbeiten unter dem Abzug (wegen Ausgasen von Ammoniak) nachteilig. Dies lässt sich aber durch Anwendung des Fearon-Tests und –wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit noch zeigen wird- durch das 1,6-Diaminohexanverfahren verbessern. Alle drei Nachweise ermöglichen als Alleinstellungsmerkmal gegenüber allen anderen genannten Reaktionen erstmals den Nachweis reduzierender Disaccharide.

Tabelle 3: Kohlenhydrat-Nachweise und Anforderungen an Experimente												Vorschau
Nachweismethode:	Barfoed Probe	Benedict-Test	Chlorzink-iod-Probe	Fehling-Probe	GOD-Test	Iod-Probe	Molisch-Probe	Schiffsche Probe	Seliwanoff-Probe	Tollens-Probe	Wöhlk-Probe	Fearon-Test/DAH
Fachlich richtige Darstellung üblich	teils	teils	ja	teils	ja	teils	ja	teils	ja	ja	ja	ja
Aussagekräftig 1: Aldose von Ketose unterscheidbar	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	ja
Aussagekräftig 2: Differenziert reduzierendes Di- von Monosaccharid	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja
Aussagekräftig 3: Erkennt Polysaccharid	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Mit schulischen Mitteln gut durchführbar	ja	ja	ja	ja	ja	ja	teils	nein	ja	ja	ja	ja
Für Lernende verständlich	ja	ja	ja	ja	teils	ja	ja	nein	ja	ja	ja	ja
Schulisch angemessener Zeitrahmen	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	teils	ja
Kosten im schulisch üblichen Rahmen	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja	ja
Schulische Sicherheit unproblematisch	ja	ja	nein	nein	ja	teils	teils	nein	ja	nein	ja	ja
Summe „ja“	5	5	6	4	6	6	5	2	7	4	7	8

2.2.2 Nachweisreaktionen für Lactose und Maltose im Chemieunterricht

Lactose und Maltose werden zusammen mit anderen Kohlenhydraten wie z.B. Glucose, Fructose, Saccharose, Amylose, Cellulose in fast jeder gut geführten Chemikaliensammlung vorrätig gehalten (Staatsinstitut für Schulqualität und Bildungsforschung 2016; Altmayer 2012; Arnold 2011; Asselborn 2013; Baack et al. 2016; Demuth, R., Parchmann, I., Ralle, B. 2009; Eisner 2000; Eisner 2011; Glaum et al. 1984).

Nachweisreaktionen für reduzierende Disaccharide wie Lactose und Maltose wurden jedoch bis zum Jahr 2018 in schulüblichen Lehrbüchern nicht erwähnt (siehe Tabelle 1). Obwohl die Wöhlk-Probe für den Nachweis dieser Substanzen seit 1904 zur Verfügung stand, wurde sie nur sehr vereinzelt in Fachbüchern (Grob 2000), Fachzeitschriften (Fleiss 2013) und auf Fachtagungen (Proske und Walter 2013) erwähnt.

Chemielehrkräften, die sich an üblichen Lehrwerken (siehe z. B. Tab. 1) orientieren, war sie dadurch weitestgehend unbekannt.

Im Bereich der universitären Ausbildung wird die Wöhlk-Probe zu Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie gelehrt und angewendet (Nötzold, H., Raddatz, H., Hellwig, A. et al. 2018).

Die zahlreichen Erwähnungen in Lehrbüchern und sonstigen Schriften aus dem medizinischen Bereich wie z. B. (Teichmann 1980; Hallmann 1952; Siegfried GmbH 1962) fanden im schulischen Bereich eher keine Beachtung.

Eine Parallele im englischen Sprachgebiet ist der sehr ähnliche „Fearon’s test on methylamine“ (Fearon 1942), der außer in der Original-Publikation aus Irland aus dem Jahre 1942 noch in dem in mehreren Auflagen erschienenen Lehrbuch „Fearon’s Introduction to Biochemistry“ (Jessop 1961) und in einem indischen Lehrbuch für Klinische Chemie (Ochei und Kolhatkar 2000) Erwähnung findet. Im schulischen Bereich fand auch diese Nachweisreaktion keine bemerkbare Beachtung.

Außer Wöhlk und Fearon waren noch weitere Forscher des späten 19. Jahrhunderts sowie der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts an der Entwicklung von nasschemischen Nachweisreaktionen für Lactose und Maltose beteiligt. Diese sollen im nächsten Kapitel genauer betrachtet werden.

3 Entwicklung von Nachweisreaktionen für Lactose und Maltose

Lactose wurde um 1615 von Fabricio Bartoletti (auch Bertoletti und andere Schreibweisen) entdeckt (Beckmann 1786), Maltose im Jahre 1847 von Dubrunfaut (Herzfeld 1883).

In dieser frühen Zeit wurden Zucker anhand ihrer Kristalle (Mikroskop, Vergrößerungsglas, siehe z. B. (Jessop 1961, S. 95)) und ihres spezifischen Drehungswinkels¹⁰ im Polarimeter charakterisiert (Flack 2009; van Leent 1894; Aebi 1965); spezifische Nachweisreaktionen für Kohlenhydrate waren noch nicht bekannt. Im Jahre 1848 beschrieb Hermann Fehling eine Nachweisreaktion für Glucose (Fehling 1848), die allerdings in gleicher Weise bei allen reduzierenden Zuckern reagierte: Glucose, Lactose, Maltose, ja sogar der Ketozucker Fructose, ergaben allesamt dieselbe positive Farbreaktion. So ist es kein Wunder, dass nach weiteren Nachweisreaktionen für Kohlenhydrate gesucht wurde, die genauere Unterscheidungen ermöglichen sollten.

Nach Fehling (1848) berichteten Giovanni Campani (Campani 1872) und Max Rubner (Rubner 1884) über „Nachweisungen von Trauben- und Milchzucker“.

Diese Verfahren, teilweise mit der sehr großen Menge von 8 g Bleiacetat (alte Bezeichnung: Bleizucker) in 10 mL Kohlenhydratlösung, waren auch schon Alfred Wöhlk bekannt und wurden von ihm geprüft, aber für ungeeignet befunden (Wöhlk 1904). Max Rubner schreibt:

„Bei der Untersuchung einer Stärke-, Trauben- und Milchzucker haltigen Flüssigkeit, welcher Bleizucker zugesetzt war, habe ich vor mehreren Jahren schon eine eigenthümliche Rothfärbung (sic!) der Mischung beobachtet; es waren auch kleine kirschroth gefärbte Krystalle (sic!) an der Wandung des Glases angeschossen“ (Rubner 1884, S. 398).

Auf mehreren Seiten führt Rubner seine Ergebnisse aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von 1-9 mL Ammoniaklösung und 2-6 g Bleizucker auf 10 mL Zuckerlösung auf, die jedoch allesamt gleichartige Ergebnisse haben, nämlich gelb, rot, kirschrot, gelber Niederschlag, fleischfarbener Niederschlag, kupferfarbener Niederschlag, bräunlich, je nach Kombination der Edukte.

Bereits 12 Jahre früher hatte Giovanni Campani über folgendes Verfahren berichtet:

„Eine concentr. Lösung von basisch essigsaurem Bleioxyd (sog. Bleiessig) wird mit einer verdünnten Lösung von kryst. essigsaurem Kupferoxyd (sic!) versetzt. Zu etwa 5

¹⁰ Daher stammen auch die veralteten Namen Dextrose für die rechtsdrehende Glucose und Lävulose für linksdrehende Fructose (lat.: dexter = rechts, laevus = links).

C.C. dieser Lösung wird die auf Glykose (sic!) zu untersuchende Flüssigkeit gesetzt und zum Sieden erhitzt (...)“ (Campani 1872).

Bei geringen Mengen Traubenzucker ergeben sich eine gelbe Färbung und nachfolgend ein gelber Niederschlag, bei größeren Mengen Traubenzucker orangerot und nachfolgend ein orangeroter Niederschlag, bei Milchzucker ebenso wie bei Traubenzucker eine gelbe Färbung; bei einer „concentrirten Auflösung“ ergeben sich eine rote Färbung und nach längerem Erhitzen ein ziegelroter Niederschlag (Campani 1872).

Die auf diese Weise erzielten Farbreaktionen unterscheiden sich hauptsächlich in Bezug auf die Konzentration der Zuckerlösung, egal welcher Zucker eingesetzt wurde.

Wöhls Augenmerk lag jedoch auf der Suche nach einem geeigneten Verfahren zur **Abgrenzung** von Traubenzucker (Glucose) gegen Milchzucker (Lactose), wodurch sich beide Kohlenhydrate **klar unterscheiden** lassen sollten. Die Versuche von Campani und Rubner waren für Wöhlk daher nicht zielführend.

In der Pharmazeutischen Lehranstalt Kopenhagen kam Wöhlk auf die Idee, „das Verhalten verschiedener alkalisch reagierender Körper und besonders das der löslichen Basen gegenüber Milchzucker zu prüfen“, offensichtlich ohne davon zu wissen, dass man in Sankt Petersburg schon einige Jahre zuvor Muttermilch mit Ammoniak überprüft hatte (Umikoff 1896; Sieber 1900). Immerhin hatte Wöhlk von Frederik Hendrik van Leent gelesen (Wöhlk 1904; van Leent 1894). Van Leent war ein Mitarbeiter von Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein (Bruyn und van Ekenstein 1895). arbeitete in Amsterdam und promovierte in Basel über „Einige Untersuchungen über den Milchzucker“, (van Leent 1894).

Auch Forscher in weiteren europäischen Ländern, z.B. G. Marchetti, Florenz, (Marchetti 1897) beschäftigten sich um 1900 mit dem Nachweis von Milchzucker, traten aber nicht mit gegenwärtig auffindbaren Publikationen in Erscheinung.

In Lyon im Süden Frankreichs wurde von Claude Gautier und Albert Morel beobachtet, dass Milch nach 24 Stunden eine rote Farbe entwickelt, wenn man „ein Fünftel ihres Volumens an 40%iger Natron- oder Kalilauge“ hinzufügt (Gautier, C., Morel, A. 1906). Dies hatte auch schon Friedrich Krüger im Baltikum beobachtet; 1907 untersucht er als Professor in Tomsk (Sibirien) verschiedene Variationen mit Beobachtungszeiten von bis zu 60 Stunden genauer und berichtet darüber (Krüger 1907).

Ebenfalls 1907 wird die Beobachtung von Gautier und Morel insofern präzisiert, als es sich um eine Reaktion von Casein (aus Milcheiweiß) mit Lactose in Anwesenheit von starken Laugen

handelt und hinzugefügt, dass außer Casein auch tierische und pflanzliche Eiweiße aus anderen Quellen als Milch und auch bestimmte Aminosäuren in Anwesenheit von starken Laugen analoge rote Farben ergeben (Gautier, C., Morel, A. 1907).

Erst 27 Jahre später erscheint in Lyon die Dissertation von Renée Rochat, die sich eingehend mit der „Réaction de Morel et Gautier“ beschäftigt (Rochat 1934). Zwar ist sowohl bei Rochat als auch bei Krüger, Gautier und Morel ein Ansatz zum Auffinden einer Nachweisreaktion nicht zu finden, dennoch handelt es sich um wichtige Beiträge zur Reaktion von Aminosäuren mit Lactose und „analogen Zuckern“ im stark alkalischen Bereich. Im Folgenden sollen die recherchierten Beiträge der einzelnen Wissenschaftler genauer dargestellt werden.

3.1 Frederik Hendrik van Leent (1894)

Der in Den Haag, Niederlande, geborene Frederik Hendrik van Leent (1866-1935) (Niederländisches Institut für Militärgeschichte 2017) arbeitete in Amsterdam mit zwei Chemikern zusammen, die vor allem durch die Keto-Enol-Tautomerie von Zuckern im Alkalischen und die längste Namensreaktion der organischen Chemie bekannt wurden, nämlich Cornelis Adriaan Lobry van Troostenburg de Bruyn und Willem Alberda van Ekenstein (Bruyn und van Ekenstein 1895).

Seine Dissertation publizierte Frederik Hendrik van Leent im Jahre 1894 an der Universität Basel unter dem Titel „Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen“ (van Leent 1894).

Darin untersuchte er die Mutarotation beim Auflösen der Zucker in Wasser mit einem Polarimeter und berichtet über den Milchzucker: „In konzentriertem wässrigen Ammoniak geht die spezifische Drehung in fünf Tagen von $48,3^\circ$ zu 30° hinab. Die Lösung aber färbt sich rot und allmählich braun“ (van Leent 1894).

Van Leent geht im weiteren Text nicht mehr auf die Rotfärbung ein, und bezüglich der „Braunfärbung“ (i.e. nicht-enzymatische Bräunung bzw. Melanoidbildung) bleibt zu sagen, dass Louis Camille Maillard seine Untersuchungen mit Zuckern und Aminosäuren (Maillard 1912) erst 18 Jahre nach van Leent veröffentlichte.

3.2 Nersess Sacharewitsch Umikoff (1896)

Nersess Sacharewitsch Umikoff wurde am 7. Oktober 1865 in Tiflis (Georgien) geboren, absolvierte im November 1891 seinen Abschluss als Arzt an der Kaiserlichen Akademie in Charkow und wurde am 1. März 1895 Internist am Kaiserlichen Findelhaus in St. Petersburg (Hayazg Enzyklopädie 2020).



Foto: Gemeinfrei

Abbildung 12: Nersess S. Umikoff, 1865-1956

Da es noch keine künstliche Babynahrung im heutigen Sinne gab, waren ausgesetzte Säuglinge damals auf die Milch von Ammen angewiesen, die ihre Muttermilch (im damaligen Sprachgebrauch „Frauenmilch“ genannt) gegen Entlohnung beim Kaiserlichen Findelhaus abgaben. Die Mortalität unter den jährlich bis zu 10.000 eingelieferten Säuglingen war hoch; man nimmt an, dass die meisten unter ihnen an Verdauungskrankheiten verstarben (Pawlowsky 2001).

Bereits 1896 hatte Umikoff „viele Hunderte vergleichende Versuche mit Frauen- und Kuhmilch“ durchgeführt und eine Methode gefunden, mit der er Frauen- und Kuhmilch unterscheiden sowie herausfinden konnte, wie viele Wochen seit Beginn der Laktation vergangen waren (Umikoff 1896):

„Frauenmilch mit Ammoniak gemischt nimmt bei Zimmertemperatur allmählich eine roth-violette Farbe an, welche recht intensiv wird. (...) Kuhmilch, derselben

Ammoniakeinwirkung ausgesetzt wie die Frauenmilch, zeigt absolut keine violette Verfärbung“ (Umikoff 1896, S. 356).

Leider irrte sich Umikoff bezüglich der Kuhmilch, denn auch mit dieser ergibt sich eine Färbung.

Schon ein Jahr später berichtete der in Florenz arbeitende Wissenschaftler Giovanni Marchetti mit einer halbseitigen Notiz in Maly's Jahresbericht von 1897:

„Die (Umikoff'sche) Reaktion findet sich nicht ausschließlich bei der Frauenmilch, auch Kuhmilch giebt (sic!) dieselbe bei zwanzig Minuten langer Erwärmung auf 70 °C. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Reaktion auf der Gegenwart von Milchzucker beruht“ (Marchetti 1897, S. 266).

Auch in Wien wurde die Umikoff'sche Reaktion noch einmal näher untersucht (Zaribnicky 1942). Dabei wurde herausgefunden, dass die Kuhmilch manchmal keine Rotfärbung ergibt, weil sie mitunter einen so geringen pH-Wert aufweist, dass Ammoniaklösung alleine nicht ausreicht, um die notwendige Alkalität zu erzeugen:

„Wird Kuhmilch vor dem Erhitzen ... auf einen pH von 12 gebracht oder Ammoniak in großem Überschuß zugesetzt, so ergibt auch die Kuhmilch eine positive Umikoff-Reaktion“ (Zaribnicky 1942, S. 543).

Dies ist ein sehr früher Hinweis auf die starke pH-Abhängigkeit der Reaktion, die später noch genauer untersucht werden wird (siehe Kapitel 3.10 und 4.1).

Weiterhin muss aus heutiger Sicht ergänzt werden, dass Muttermilch außer Lactose noch viele weitere Kohlenhydrate (HMOs, i.e. **H**uman **M**ilk **O**ligosaccharides) enthält, die zum Teil ebenfalls eine 1,4-Verknüpfung aufweisen und ebenfalls farbbildende Reaktionen eingehen können (Bode 2012). Aus diesem Grund ist die farbliche Erscheinung bei der „Umikoff'schen Reaktion“, die vom Prinzip identisch mit der Wöhlk-Probe, mit Muttermilch in den dunkelroten Bereich („brombeerrot“) verschoben, während Kuhmilch eine lachsrote Farbe ergibt (Ruppersberg 2016b).

3.3 N. Sieber alias Nadeschda Olimpijewna Ziber-Schumowa (1900)

Vier Jahre später publizierte „N. Sieber“ am Sankt Petersburger Nencki-Institut ihre systematischen Untersuchungen der Umikoff'schen Reaktion (Sieber 1900).

Über „N. Sieber“ waren bei normalen Recherchen in Bibliotheken und im Internet zunächst keine sinnvollen Ergebnisse zu erhalten. Um weitere Informationen zu finden, wurde die kyrillische Schreibweise Н. Зибер¹¹ versucht. Bei der „Rückübersetzung“ in die damals gebräuchliche Deutsche Kurrentschrift (ähnlich der 1911 entwickelten Sütterlin-Schrift, siehe auch (Universität Wien 2020)) sieht der Buchstabe Z ähnlich aus wie das gesummte S im Kyrillischen, wodurch der Schriftzug „N. Ziber“ entstand.

Надина Зибер

Nadine Ziber

Abbildung 13: Siber/Ziber-Schreibweisen kyrillisch/Sütterlin

Mit dieser Suche konnte die in Samara an der Wolga geborene Nadeschda Olimpijewna Ziber-Schumowa mit vollständigem Namen gefunden werden (Ruppersberg 2016b).



Foto: Gemeinfrei

Abbildung 14: Nadine Sieber alias Nadeschda O. Ziber-Shumova, ca. 1900

Der Lebenslauf von Nadine Sieber alias Nadeschda Olimpijewna Ziber-Shumova (1854-1917 oder auch 1856-1916) ist auf der Homepage der Sächsischen Akademie der Wissenschaften vorhanden (Fischer 2013). Wie sich beim genaueren Lesen herausstellt, handelt es sich um eine Pionierin unter den Wissenschaftlerinnen (Creese 1998): Die Tochter Olimpij Schumows, Erb-Ehrenbürgers in Samara, besuchte die Höheren Vladimir-Kurse (i.e. öffentliche

¹¹ Das Dehnungs-e wird bei der Wiedergabe deutscher Namen im Russischen nicht transkribiert (Kirschbaum 2016)

Vorlesungen für Männer und Frauen) in Sankt Petersburg. Ab 1875 studierte sie Medizin an der Universität Bern, wo sie 1880 promoviert wurde (Sieber 1880).

Ab 1877 war sie Mitarbeiterin und ab 1884 Assistentin von Marcellus Wilhelm von Nencki am Pathologischen Institut der Universität Bern. 1892 folgte sie Nencki nach St. Petersburg in die Chemische Abteilung des Kaiserlichen Instituts für Experimentelle Medizin (IEM).

Nach Nenckis Tod 1901 übernahm sie dessen Stelle, wurde 1912 als erste Frau „Ordentliches Mitglied“ am IEM und war somit die erste Frau mit wissenschaftlicher Leitungsfunktion in Russland.

Sieber arbeitete in St. Petersburg systematisch mit Proben von Muttermilch, die sie aus dem Kaiserlichen Findelhaus erhalten hatte, und überprüfte die Umikoff'sche Reaktion außer mit Ammoniak auch noch mit verschiedenen Aminen sowie deren Derivaten: Ethylamin, Anilin, Dimethylanilin, Pyridin, Picolin (Methylpyridin), Piperidin, Nicotin, Chinolin und Benzylamin (Sieber 1900).

Dabei stellte sie unterschiedliche Farbreaktionen fest, die sich im Rahmen dieser Arbeit nachvollziehen ließen (siehe 4.2 Variationen der Amino-Komponente), zum Teil aber auch falsch berichtet wurden, z.B. ergeben Benzylamin keine „citronengelbe“ und Ethylamin keine orange Farbe, sondern beide eine kirschrote Färbung (Ruppersberg und Hain 2017).

Weiterhin war sie die erste, die –wenn auch nicht bewusst– eine Reaktion von Milchzucker mit Aminosäuren beschrieb, denn „Pepton Witte“ (Abb. 15) war der damals gebräuchliche Name für ein Eiweiß-Hydrolysat; dies wiederum ist nichts anderes als ein Gemisch von Aminosäuren:

getrieben. In zwei anderen wurde eine Spur Pepton Witte zugesetzt und daneben als Kontrolle 5%ige Milchzuckerlösung aufgestellt. Alle Röhrchen wurden zugleich auf 60° erwärmt. Die Färbung trat in allen Röhrchen etwas später als wie in der Milch resp. Milchdialysaten ein — erst nach 30 bis 45". — Die Kontrollprobe mit Milchzucker allein hatte eine röthliche Färbung. Den stärksten violetten Stich zeigten die Röhrchen mit Peptonzusatz und die, die bei Luftausschluss erwärmt wurden. In den Röhrchen, die bei Luftzutritt mit verschiedenem

Faksimile: Sieber 1900, S. 111

Abbildung 15: Farbreaktion von Milchzucker mit einem Aminosäuregemisch

3.4 Alfred Wöhlk (1904)

Im Jahr 1904 arbeitete der in Frederikshavn geborene dänische Apotheker und Pharmazeut Alfred Wöhlk (1868-1949) an der Pharmazeutischen Lehranstalt Kopenhagen an der selbstgestellten Aufgabe, „ein Spezial-Reagens auf Milchzucker, beziehungsweise Galaktose, herauszufinden“ (Wöhlk 1904).

Nach seiner Arbeit an der Pharmazeutischen Lehranstalt Kopenhagen übernahm Alfred Wöhlk im Jahre 1910 die Trianglen-Apotheke in Kopenhagen (siehe Abb. 16), die er bis zu seinem Tod im Jahre 1949 leitete.



Foto: Wiley, Lizenz 4927150882529

Abbildung 16: Alfred Wöhlk im Kreise seiner Mitarbeiter in der Trianglen-Apotheke

Für seine Publikation aus dem Jahre 1904 testete Wöhlk verschiedene Zucker mit 10%iger Ammoniaklösung im heißen Wasserbad, offensichtlich ohne von den Arbeiten von Umikoff und Sieber zu wissen (s.o.).

Wie er selbst schreibt, hätte er den Versuch fast schon verworfen, wenn er nicht nach einer halben Stunde noch einmal zufällig auf die Reagenzgläser geschaut und zu seinem Erstaunen „eine prachtvolle, lebhaft rote Farbe“ entdeckt hätte.

Wöhlk untersucht daraufhin noch weitere Zucker mit 10%iger Ammoniaklösung in einem Wasserbad, „das eben zu kochen aufgehört hat“ und stellt weitere Nachforschungen an, da es ihm sehr sonderbar schien, „dass eine solche Beobachtung nicht früher gemacht und als Milchzuckerreaktion verwendet worden sein sollte“ (Wöhlk 1904, S. 672).

Dabei stößt er auf Lobry de Bruyn (Bruyn und van Ekenstein 1895) und van Leent (s.o., (van Leent 1894)); letzterer hatte zwar eine rote Färbung entdeckt, aber nicht weiter ausgeführt. Wöhlk schreibt dazu: „Dieser Beobachtung hat er (i.e. van Leent) aber offenbar keinen Wert beigelegt, und in Betreff der Maltose macht er überhaupt keine entsprechende Bemerkung“ (Wöhlk 1904, S. 673).

Auffällig in Wöhlks Bericht ist, dass er die „prachtvolle rote Farbe“ seiner Reaktion als „krapprot“ bezeichnet. Krapp ist ein Farbstoff, der ursprünglich aus der Krapp-Pflanze (*Rubia tinctorium* L.) gewonnen wurde und seit 1869 nach dem preisgünstigeren Verfahren von Graebe und Liebermann bzw. Perkin aus dem im Steinkohlenteer enthaltenen Anthracen technisch hergestellt werden konnte (Struckmeier 2003). Durch den Niedergang des Krapp-Anbaus ging das Wort im Sprachgebrauch nach und nach verloren und wurde in Bezug auf die Wöhlk-Probe durch „lachsrot“ ersetzt (Fischler und Schlemmer 1960).

Die allererste Wöhlk-Probe wurde wie folgt durchgeführt: „0,7 bis 0,5 g Milchzucker werden in einem schmalen Reagensglas (sic!) in 10 cc 10-prozentigem Ammoniak gelöst. Dieses wird danach in ein Dampfbad oder in ein Wasserbad gestellt, das eben zu kochen aufgehört hat (...)“ (Wöhlk 1904, S. 672).

Nachfolgend gab es verschiedene Abwandlungen der Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 4); die wichtigste stammt von Hans Malfatti (siehe unten).

Bis heute wird die klassische Wöhlk-Probe ohne die Veränderung durch Malfatti zur Identitätsbestimmung von Lactose in der US-Pharmakopeia (United States Pharmacopeial Convention 2012) aufgeführt und gelangt z.B. zur Bestimmung von Lactose in Asthma-Inhalern (ähnlich wie Dosieraerosole) zur Anwendung (Hebbink, G., Peters, H. 2012).

Maßgeblich für Deutschland ist das Europäische Arzneibuch, in dessen 8. Ausgabe (2014) die Durchführung der Wöhlk-Probe ohne Nennung des Namens auf S. 3820 zur Prüfung von Lactose-Monohydrat auf Identität aufgeführt ist (Deutscher Apotheker Verlag 2014).

3.5 Johann (Hans) Baptist Malfatti (1905)

Wenige Monate nach der Publikation von Wöhlk meldet sich der Innsbrucker Urologie-Professor Johann (Hans) Baptist Malfatti (1864-1945) aus Innsbruck mit einer vierseitigen Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift zu Wort:

„Gar nicht selten tritt an den Harnanalytiker die Frage heran, ob eine reduzierende Substanz im Harne Milchzucker oder Traubenzucker sei, oder mit anderen Worten: ob sich im konkreten Falle im Verlaufe der Schwangerschaft Diabetes entwickelt habe oder ob nur ein harmloser Fall von Laktosurie vorliegt“ (Malfatti 1905, S. 68).

Nach seiner Pensionierung im Jahre 1924 (Huber und Plankl 2010) kehrte der in Rovereto (Gardasee, Italien) geborene Johann (Hans) Baptist Malfatti von Innsbruck an seinen Geburtsort zurück. Dort wurde er 19 Jahre später Opfer von Nazi-Unrecht: Am 25. März 1943 wurde ihm auf Betreiben der Gestapo-Leitstelle Wien die deutsche Staatsbürgerschaft entzogen, gleichzeitig wurde er für unwürdig erklärt, einen Dokortitel zu tragen (Österreichische Nationalbibliothek 1980; Österreichische HochschülerInnenschaft 2013).

Malfatti verbesserte die Wöhlk-Reaktion durch den Zusatz von fünf Tropfen 1-molarer Kalilauge, weswegen die Reaktion eigentlich fortan „Wöhlk-Malfatti-Reaktion¹²“ heißen müsste und in einigen Fundstellen auch so zu finden ist (Frerichs et al. 1938).

Durch diese Verbesserung verschaffte Malfatti der bis dahin nur im pharmazeutischen Lehrbetrieb genutzten Nachweisreaktion von Alfred Wöhlk eine klinische Anwendung, die über Jahrzehnte hinweg in Kliniken, Arztlaboren, sowie in der Ärzte-, Apotheker- und PTA-Ausbildung verwendet wurde (Siegfried GmbH 1962; Rauen und Rauen-Buchka 1975; Hallmann 1952; Teichmann 1980; Ahrens 1966; Nötzold, H., Raddatz, H., Hellwig, A. et al. 2018).

Die Zugabe von Kalilauge hat folgende Funktionen: Erstens benötigt die klassische Wöhlk-Reaktion streng alkalische Bedingungen (pH 12-13) und kann durch sauren Urin oder darin vorhandene puffernde Substanzen (z.B. Phosphate) misslingen, zweitens verkürzt sich dadurch auch der Zeitaufwand. Hierzu gibt es weitere Abwandlungen von Konzentrationen und Temperaturen des Wasserbades, z.B. 60 °C / 80°C / 90° C, 25%ige Ammoniaklösung, Zugabe von mehr Kalilauge, usw. (Proske und Walter 2013).

¹² Zur Vereinfachung wird im folgenden Text die Bezeichnung „Wöhlk-Probe“ bevorzugt.

Alle diese Abwandlungen bergen aber die Gefahr, dass die Wöhlk-Malfatti-Reaktion in die späte Maillard-Reaktion (Hodge 1953) entgleitet und eine unerwünschte Melanoid-Bildung stattfindet, zu erkennen an der unschönen schwarz-braunen Farbe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wöhlk-Probe seit ihrer Entdeckung im Jahre 1904 vielfach bezüglich der verwendeten Mengen an Ammoniak, der Durchführungstemperatur und der Menge an hinzugetropfter Lauge geändert worden ist, um

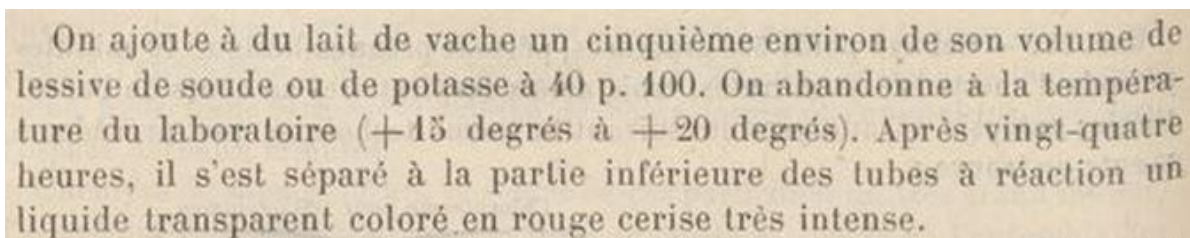
1. eine Beschleunigung und
2. eine Erhöhung der Aussagekraft (Misslingen vermeiden) zu erreichen.

Die drei wichtigsten Varianten sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Varianten der Wöhlk-Probe von 1904 bis 1980			
Quelle:	Über eine neue Reaktion auf Milchzucker und Maltose (Wöhlk 1904)	Über den Nachweis von Milchzucker im Harne (Malfatti 1905)	Untersuchungen von Harn und Konkrementen (Teichmann 1980)
Verwendete Reagenzien:	10 mL Ammoniaklösung 10%ig, dazu Zucker geben (Gewichtsanteil: 5%)	5 mL Urin, 2,5 mL starke Ammoniaklösung, dazu 5 Tropfen Kalilauge	5 mL Urin, 2-3 mL Ammoniaklösung 25%ig, 5 Tropfen Kalilauge 3,6 mol/L
Art des Erhitzens:	15-20 min. im Dampfbad	5 min. im heißen, nicht siedenden Wasserbad.	30 min. im Wasserbad (50-70 °C)

3.6 Claude Gautier und Albert Morel (1906)

In der Zeitschrift der „Société de biologie“ erscheint im Jahre 1906 ein kleiner, einseitiger Artikel, die die Entstehung einer sehr intensiven kirschroten Farbe beschreibt, wenn Kuhmilch mit einem Fünftel ihres Volumens an 40%iger Kalilauge für 24 Stunden stehen gelassen wird (siehe Faksimile unten) (Gautier, C., Morel, A. 1906).



On ajoute à du lait de vache un cinquième environ de son volume de lessive de soude ou de potasse à 40 p. 100. On abandonne à la température du laboratoire (+15 degrés à +20 degrés). Après vingt-quatre heures, il s'est séparé à la partie inférieure des tubes à réaction un liquide transparent coloré en rouge cerise très intense.

Abbildung 17: Faksimile aus Gautier/Morel 1906, S. 376

Claude Gautier und Albert Morel hatten an der Universität Lyon zu 10 mL Milch 2 mL Kalilauge ($\omega = 40\%$) gegeben und bei Raumtemperatur (15 - 20 °C) stehengelassen. Nach 24 Stunden bildete sich im Reagenzglas eine untere transparente Schicht mit einer sehr intensiven kirschroten Farbe, „en rouge cerise très intense“, siehe Abb. 17 (Gautier, C., Morel, A. 1906, S. 376). Diese Reaktion wurde im Folgenden als „Réaction de A. Morel et C. Gautier“ bezeichnet und im Rahmen der 1934 erschienenen Doktorarbeit von Renée Rochat (s.u.) genauer untersucht.

Albert Morel (1875-1953) wurde 1902 in Lyon zum Doktor der Medizin promoviert und war ab 1910 Professor für organische Chemie an der medizinischen Fakultät der Universität Lyon (Bibliothèque nationale de France 2020). Seine bevorzugten Forschungsgebiete waren Blutfette und Abbauprodukte von Proteinen.

Claude Gautier wurde 1883 in Lyon geboren und promovierte 1910 ebendort an der medizinischen Fakultät mit einer Arbeit über Urin- und Fäkalfarbstoffe (Gautier 1910).

3.7 Friedrich Karl von Krüger (1907)

Im fast 7000 km entfernten Tomsk wird der Professor für physiologische Chemie Friedrich Karl von Krüger auf die in französischer Sprache abgefasste Notiz von Gautier und Morel aufmerksam (Gautier, C., Morel, A. 1906) und erinnert sich daran, dass er etwas Ähnliches bereits 1894 in Dorpat (heute Tartu/ Estland) beobachtet hat, doch durch ein Versehen des Herausgebers wurde sein Bericht nicht veröffentlicht (Krüger 1907).

Daher stellt er umfangreiche Beobachtungen an, die sich über einen Zeitraum von bis zu 60 Stunden erstrecken, und schreibt rasch an die Redaktion der Zeitschrift für physiologische Chemie. Diese erhält sein Schreiben am 1. Dezember 1906 und veröffentlicht auf zehn Druckseiten den folgenden Artikel: „Über eine eigentümliche Veränderung der Milch durch Natron resp. Kalilauge“ (Krüger 1907).



Foto: Universitätsarchiv Rostock (20.08.2020 Kamlah)

Abbildung 18: Friedrich Karl von Krüger, 1862-1938

Friedrich Karl von Krüger wurde am 24. April 1862 in St. Petersburg geboren und war nach seinem Medizinstudium in Estland und Zwischenstationen in Heidelberg und Rostock von 1895-1914 Professor für physiologische Chemie an der Universität Tomsk, Sibirien (Universitätsbibliothek Rostock 2020). Dort verfasste er ein „Lehrbuch der medicinischen Chemie“ (Krüger 1898).

Aufgrund des politischen Geschehens in Russland flüchtete er 1916 nach Dorpat (heute Tartu/ Estland) und 1918 nach Rostock, wo er von 1921-1937 als Professor am Institut für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät lehrte. Am 13. Januar 1938 verstarb Friedrich Karl von Krüger in Braunschweig.

In seinem Aufsatz über die Reaktion von Milch mit starken Laugen beschreibt Krüger mehrere Versuchsreihen, bei denen nach zunächst 30 Stunden, später fünf Stunden, eine kirschrote Farbe mit einem Absorptionsmaximum von 555-556 nm entsteht (Krüger 1907), siehe hierzu auch 4.2.7.2.

Zwar verfolgten sowohl Krüger als auch Gautier und Morel nicht die Absicht, eine Nachweisreaktion für Lactose zu finden, dennoch müssen sie in diesem Zusammenhang Erwähnung finden, weil sie –ohne es zu wissen- die Reaktion von Lactulose mit einer Aminosäure beschreiben. Beides findet im Laufe dieser Arbeit noch stärkere Beachtung (siehe Kapitel 4, insbesondere 4.2.7 und 4.3.2).

Auch Krüger hat sich vergeblich um die Isolierung des kirschroten Farbstoffs bemüht: „Alle Versuche, den Farbstoff zu isolieren, sind bisher erfolglos geblieben“ (Krüger 1907, S. 21).

3.8 Renée Rochat (1934)

Renée Rochat wurde am 14. Juni 1908 in Grenoble, Département Isère, Frankreich, geboren und arbeitete an der Universität Lyon in der Fakultät für Medizin und Pharmazie. Dort fertigte sie im Alter von 26 Jahren unter Leitung ihres Doktorvaters („Président du Thèse“) Albert Morel ihre 1934 in französischer Sprache veröffentlichte Dissertation an, in der sie die bereits von Krüger erwähnte Reaktion von Gautier und Morel genauer untersucht (Rochat 1934). Leider gibt es keine auffindbaren Zitationen ihrer Dissertation oder weitere Publikationen. Renée Rochat heiratete Marcel Revenusso, hatte drei Kinder und verstarb am 18. November 1982 im Alter von 74 Jahren in Nizza (Geneanet 2021).

Auf den 90 Seiten ihrer Dissertation berichtet Renée Rochat über verschiedene sorgfältig durchgeführte und protokollierte Experimente, bei denen sie u.a. herausfand, dass die bei Milch beobachtete Färbung folgende unverzichtbare Bestandteile benötigt:

- a. Lactose und
- b. Casein bzw. aus dem Casein die Aminosäuren Glycin (damals noch Glycokoll genannt), Lysin, Cystin und Taurin¹³.

Sie fand und berichtete Fehler, die bei früheren Untersuchungen gemacht wurden; so sollten auch Leucin, Alanin und Phenylalanin den roten Farbstoff ergeben; dies war jedoch höchstwahrscheinlich Verunreinigungen der jeweiligen Substanzen, z. B. mit Glycin, bei früheren Untersuchungen geschuldet.

Mit verunreinigten Substanzen hatte offenbar auch Renée Rochat zu kämpfen, denn weder das Monomer Cystein noch das Dimer Cystin ergeben bei heutigen Kontrollexperimenten einen roten Farbstoff.

Taurin, heutzutage vor allem bekannt aus sogenannten „Energy-Drinks“, ist eine Aminosulfonsäure, die als Abbauprodukt der biogenen Aminosäure Cystein in der Leber entsteht. Auch Taurin ergibt einen roten Farbstoff (siehe 12.1.3).

Renée Rochat verfügt neben Lactose und Maltose auch über Cellobiose und spricht von „gleicher Struktur“: „Le lactose, maltose et cellobiose ont la même structure.“ (Rochat 1934, S. 33). Dies führt sie auf den Folgeseiten genauer aus und erklärt, dass die drei Disaccharide als einzige Unterschiede entweder eine α - oder β -glycosidische Bindung oder Galactose anstelle von Glucose besitzen, ansonsten aber gleich sind.

¹³ Taurin, u. a. in Vollmilch enthalten (ca. 24 mg in 1 L), ist der Trivialname von 2-Aminoethansulfonsäure (siehe auch 11.1.3).

Renée Rochat untersuchte auch schon die Reaktion der genannten Disaccharide mit Methylamin, welches allerdings nach ihren Ergebnissen keine rote Farbe verursacht (S. 58 in (Rochat 1934)). Eine mögliche Erklärung für diesen Irrtum könnte sein, dass der pH-Wert nicht alkalisch genug eingestellt wurde.

Auch wenn Renée Rochat nicht die Absicht verfolgte, eine Nachweisreaktion zu finden, so sind ihre Ergebnisse wichtig, denn sie beinhalten schon wichtige Kernaussagen zur Entstehung der roten Farbstoffe, z. B. über die nötigen Kohlenhydrat- und Amin-Komponenten.

Die Dissertation von Renée Rochat wurde im Verlauf dieser Arbeit durch einen Zufall gefunden, weil im Titel der Arbeit die Namen Morel und Gautier enthalten sind. Erst über die Suche nach Morel und Gautier ergab sich, dass in der Universitätsbibliothek Leipzig ein Exemplar der Arbeit von Renée Rochat über die Reaktion von „Amino-Acides“ und „Glycides“ vorliegt.

3.9 William Robert Fearon (1942)

Eine dem Wöhlk-Test sehr ähnliche Nachweisreaktion ist Fearon's Test¹⁴ (Fearon 1942), der sich in Irland, Großbritannien, USA, Indien und Teilen der arabischen Halbinsel großer Beliebtheit erfreut und wohl auch noch aktuell gelehrt wird.

Die jüngste Erwähnung (neben eigenen Arbeiten) ist in einem Lehrbuch über medizinische Laborwissenschaft zu finden (Ochei und Kolhatkar 2000). Anstelle von Ammoniak wird bei diesem Verfahren Methylamin verwendet (Strukturformel siehe Abb. 19 rechts).



Abbildung 19: Strukturformeln von Ammoniak (links) vs. Methylamin (rechts)

Da Methylamin unter Normalbedingungen ein Gas ist, das recht unkomfortabel aus Stahlmantelflaschen entnommen werden müsste, ist es laborüblich, ein Salz des Methylamins

¹⁴ Zur Vereinfachung wird im folgenden Text die Bezeichnung „Fearon-Test“ bevorzugt.

zu verwenden und dieses in eine alkalische Lösung zu geben. Methylamin wird somit in situ aus Methylamin-Hydrochlorid (auch: Methylammoniumchlorid, $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$) hergestellt.

William Robert Fearon (1892-1959) war nicht nur als Biochemiker am Trinity-College in Dublin (Abbildung siehe unten) tätig, sondern wesentlich bekannter durch seine langjährige Mitgliedschaft im 4. bis 9. Senead Éireann, dem irischen Senat und Oberhaus des irischen Parlaments (House of Oireachtas 2020; British Medical Journal 1960).

Die erste Auflage seines Lehrbuchs „Fearon’s Introduction to Biochemistry“ erschien 1934, seine vierte und letzte Auflage erschien 1961 posthum (Jessop 1961).



Foto: Trinity College, Dublin

Abbildung 20: William R. Fearon (ganz oben rechts) vor dem Trinity-College, Dublin

Bei der Durchführung von Fearon’s Test gibt es verschiedene Versionen. In der ursprünglichen Veröffentlichung wird die Probe vor der Zugabe von Natronlauge für 30 Sekunden aufgeköcht (Fearon 1942):

„To 4 ml. of the neutral solution add 3 or 4 drops of a 5 per cent. aqueous solution of methylamine hydrochloride. Boil the mixture for about 30 seconds. Remove the tube from the flame, and at once add 3 to 5 drops of 20 per cent. sodium hydroxide solution“ (Fearon 1942, S. 130).

Auch im Lehrbuch „Fearon’s Introduction to Biochemistry“ wird diese Reihenfolge empfohlen:

„Boil briefly, remove from the flame, and while still warm make alkaline by addition of sufficient (10 drops) 20 per cent sodium hydroxide“ (Jessop 1961, S. 93).

Beim Erhitzen eines Reagenzglases über der Flamme besteht die Gefahr eines Siedeverzuges; deshalb ist die Variante von Ochei mit einem heißen Wasserbad zu bevorzugen (Ochei und Kolhatkar 2000).

Weitere Unterschiede bestehen darin, dass die Probe, wie bereits im englischen Text erwähnt,

- a. *ohne* Natronlauge kurz über der Flamme aufgekocht wird und erst während des Abkühlens alkalisch gemacht wird (Fearon 1942; Jessop 1961) oder
- b. *erst alle Chemikalien* zusammen gegeben werden und *dann erhitzt* wird (Ochei und Kolhatkar 2000).

Letztendlich führen aber alle Verfahren zum Erfolg. Eine Übersicht der drei verschiedenen Verfahren ist in Tabelle 5 zu finden.

Nachdem Fearon in seiner ersten Publikation zu der hier besprochenen Nachweisreaktion (Fearon 1942) lediglich Lactose und Maltose anführte, wurde in dem später erschienenen Lehrbuch (Jessop 1961) auch schon das Disaccharid Cellobiose aufgeführt, das aus zwei β -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen besteht.

Ohne dass es explizit erwähnt worden wäre, deutet sich nach Renée Rochat (Rochat 1934) ein zweites Mal an, dass es sich nicht um eine Nachweisreaktion für *einen bestimmten Zucker*, sondern für *einen Verbindungstyp* handelt, nämlich Disaccharide, die aus zwei 1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen bestehen. Im Beispiel Lactose darf das Galactose-Molekül durch Glucose substituiert werden.¹⁵

¹⁵ Theoretisch könnten auch andere Verknüpfungen eine Rolle spielen, z. B. Isomaltose mit einer 1,6-Verknüpfung, was aber in der Praxis nicht zutrifft. Experimente hierzu sind in 11.2.1 aufgeführt.

Tabelle 5: Varianten des Fearon-Tests von 1942 bis 2000			
Quelle:	The detection of lactose and maltose (Fearon 1942)	Fearon's Introduction to Biochemistry (Jessop 1961)	Medical Laboratory Science (Ochei und Kolhatkar 2000)
Verwendete Reagenzien:	Zuckerkonzentration 0,1% bis 1%, ansonsten verdünnen. Auf 4 mL Probelösung 3-4 Tropfen einer 5%igen Methylamin-Hydrochlorid-Lösung und 3-5 Tropfen einer 10%igen Natronlauge	Fünf Tropfen einer 5%igen Methylammoniumchlorid-Lösung zu 5 mL einer neutralen Lösung geben. Genügend (10 Tropfen) einer 20%igen NaOH-Lösung.	1 mL Methylamin-Hydrochlorid-Lösung, $\omega=0,2\%$ 0,2 mL Natriumhydroxid-Lösung, $\omega=10\%$ 5 mL Urin
Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien:	Erst Methylamin hinzugeben, dann erhitzen, dann Natronlauge. Alternativ: Zucker und Methylamin alkalisch machen, dann aufkochen.	Erst Methylamin, dann erhitzen, dann Natronlauge: „Kurz über der Flamme aufkochen, abkühlen lassen, noch während es warm ist, genügend (10 Tropfen) einer 20%igen NaOH-Lösung hinzugeben.“	Erst alle Reagenzien zusammengeben, dann erhitzen
Art des Erhitzens:	30 Sekunden über der Flamme aufkochen, dann sofort 3-5 Tropfen einer 10%igen Natronlauge, oder aber die alkalische Lösung erhitzen.	Kurz über der Flamme aufkochen, abkühlen lassen.	Wasserbad 56 °C, 30 Minuten, anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen
Erklärung:	„Mit Alkalien ergibt sich eine gelbe Farbe (...), die sich in karminrot verändert, wenn Lactose oder Maltose anwesend sind. Das Pigment ähnelt Versuchen von Feigl und Anger“ (Fearon 1942)	Reduzierende Zucker bilden durch die Alkali-Endiol-Reaktion eine gelbe Farbe; „if the yellow changes to bright carmine the sugar is maltose, lactose, cellobiose or other reducing oligo-saccharide“ (Jessop 1961).	Endiol-Bildung aufgrund von Umlagerung der Keto- bzw. Aldehydgruppe. Das Endiol reagiert mit Methylamin-Hydrochlorid und bildet einen roten Komplex.

3.10 Thomas Andrew Nickerson (1976)

Thomas Andrew Nickerson (1921-1978) war Professor für Ernährungswissenschaft und Lebensmitteltechnologie an der Universität Davis (California). Im Alter von 57 Jahren verstarb Thomas Andrew Nickerson an den Folgen eines Herzinfarkts (University of California 1979).

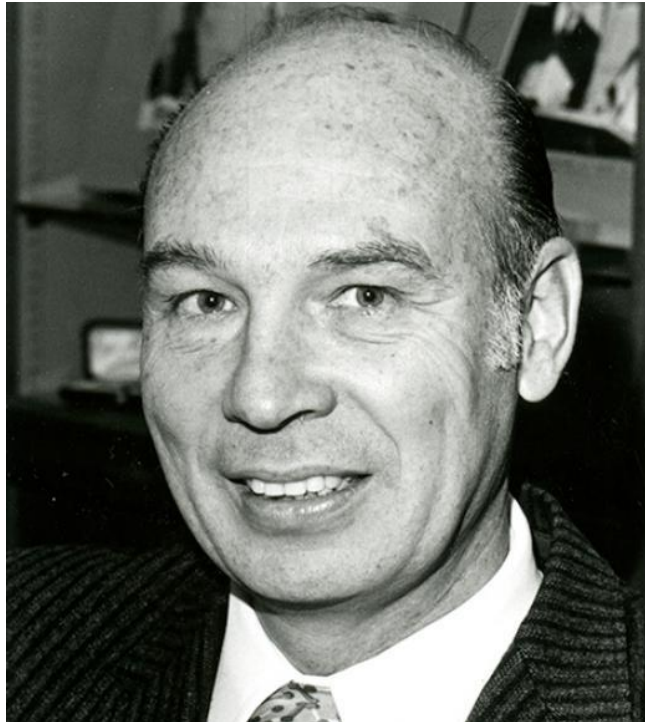


Foto: University Davis, speccoll@ucdavis.edu vom
2020-10-26

Abbildung 21: Thomas A. Nickerson, 1921-1978, Davis (Kalifornien/USA)

1976 veröffentlichte er zusammen mit I.F. Vujicic und A.Y. Lin eine Anleitung zur kolorimetrischen Messung von Lactose und ihrer Hydrolyseprodukte (Nickerson et al. 1976).

Der Anlass zu Nickersons Untersuchungen war die Suche nach einer Nachweismethode für Lactose, bei der die Hydrolyseprodukte Galactose und Glucose nicht stören. Als Anwendung ihrer Methode führten die Lebensmittelchemiker aus Davis/USA an: „Kann genutzt werden, um Lactose in Molke oder in Milchprodukten zu messen“ (Nickerson et al. 1976).

Dabei untersuchten sie auch das pH-Optimum von Fearon's Test, das bei pH 12,7 liegt. Schon geringe Abweichungen des pH-Werts führen zu Farbvarianten: orange-rot bei pH 12,5 und zu gelb bei pH 13,25 – darüber hinaus sogar zum Misslingen der Reaktion.

Das Temperaturoptimum des Versuchs liegt bei 65 °C; bei dieser Temperaturvariante wird die höchste Extinktion nach 30 Minuten erreicht; anschließend geht die Extinktion wieder zurück, da der Farbstoff nicht stabil ist und zerfällt (Nickerson et al. 1976).

Ferner beobachteten Nickerson et al., dass der verwendete NaOH-Glycin-Puffer mit Lactose über Nacht ebenfalls eine rote Farbbildung verursacht.

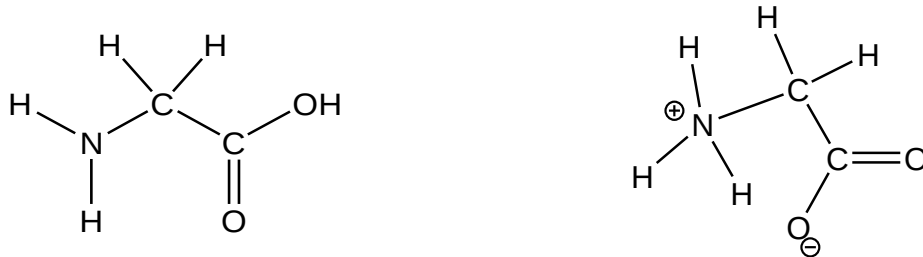


Abbildung 22: Strukturformel von Glycin (links neutrale, rechts zwitterionische Schreibweise)

Dass Glycin unter alkalischen Bedingungen mit Lactose ebenfalls einen roten Farbstoff ergibt, wurde schon von Renée Rochat beobachtet (Rochat 1934). Dieses Phänomen hatte zu Beginn dieser Arbeit allerlei Rätsel und Vermutungen verursacht; als mögliche Erklärung wurde über einen Strecker-Abbau nachgedacht, der durch Decarboxylierung von Glycin direkt zur Bildung Methylamin führen würde (Strecker 1862; Schönberg, A., Moubacher, R. 1952).

In Wahrheit ist die Erklärung für das Phänomen der Rotfärbung mit Glycin viel einfacher und liegt in der molekularen Struktur begründet: Glycin besitzt als einzige¹⁶ unter den biogenen Aminosäuren zwei Wasserstoffatome am α -C-Atom und somit in direkter Nachbarschaft zur Aminogruppe eine CH₂-Gruppe (Abb. 22).

Diese Gruppe ist, wie sich später ergibt (Vorgriff auf Kap. 4.2.7), eine fundamentale Voraussetzung für die Bildung des roten Farbstoffs.

¹⁶ Die biogene Aminosäure Lysin besitzt noch eine zweite Aminogruppe und ermöglicht durch diese eine Rotfärbung. Dies wird ebenfalls in 4.2.7 behandelt.

3.11 Fazit der geschichtlichen Entwicklung von Lactose- (und Maltose-) Nachweisen

In Kurzform lässt sich Folgendes sagen:

- Mit den Nachweisen von Fehling, Campani, Rubner und anderen ließ sich Lactose bereits ab 1848 als reduzierender Zucker nachweisen, diese Nachweise ergaben aber keinen Aufschluss darüber, dass es sich um ein Disaccharid handelt. Monosaccharide wie Glucose und andere reduzierende Zucker ergaben die gleiche positive Reaktion.
- Erst 1894 beobachtet und berichtet Frederik Hendrik van Leent (Amsterdam und Basel) eine rote Farbe, die sich bei der Reaktion von Lactose mit Ammoniak ergibt, beachtet sie aber nicht weiter (van Leent 1894).
- Zwei Jahre später (1896) nutzt Nersess Sacharewitsch Umikoff dieselbe Reaktion erstmals als einen Nachweis, und zwar für die Beurteilung von Ammenmilch in St. Petersburg (Umikoff 1896), die je nach Stadium der Laktation einen unterschiedlichen Lactosegehalt aufweist. Von van Leent weiß er aber offensichtlich nichts.
- Diese Reaktion wird nun „Umikoff'sche Reaktion“ genannt und von Nadine Sieber genauer untersucht, ebenfalls in St. Petersburg (Sieber 1900).
- Ohne von Umikoff und Sieber zu wissen, probiert auch Alfred Wöhlk 1904 das Erhitzen von Lactose mit Ammoniak in Kopenhagen aus und entdeckt dabei, dass auch Maltose in gleicher Weise reagiert (Wöhlk 1904).
- Da die ursprüngliche Variante der Wöhlk-Reaktion nicht besonders zuverlässig ist – insbesondere wenn leicht saure oder puffernde Flüssigkeiten wie Milch oder Harn den stark alkalischen pH-Wert mindern- wird sie bereits ein Jahr später von Hans Malfatti in Innsbruck durch Zugabe von drei bis fünf Tropfen Kalilauge verbessert (Malfatti 1905).
- Gautier, Morel, Krüger und Rochat arbeiten in Frankreich und Russland ebenfalls mit Lactose und Aminen (besser Aminosäuren) und erhalten eine rote Farbe, verfolgen aber nicht die Absicht, eine Nachweisreaktion zu finden. 1934 weist Renée Rochat auf die sehr ähnlichen Strukturen von Lactose, Maltose und Cellobiose hin und stellt Kriterien für das Gelingen der Reaktion auf; leider erlangt ihre in französischer Sprache verfasste Dissertation keinen Bekanntheitsgrad und wird erst im Jahr 2020 durch einen Zufall als Bestandteil eines Sammelbandes mit mehreren anderen Dissertationen in der Universitätsbibliothek Leipzig wiederentdeckt. Bezüglich der Amino-Komponente

erwähnt Renée Rochat schon sehr richtig Glycin und Lysin, ebenso wird der sehr alkalische pH-Wert als notwendiges Kriterium für das Gelingen der Reaktion erkannt.

- William Robert Fearon ersetzt 1942 in Dublin den Ammoniak aus der klassischen Wöhlk-Probe durch eine Lösung von Methylamin-Hydrochlorid in Natronlauge und bezeichnet sowohl den Wöhlk-Test als auch die Umikoffsche Reaktion als „erratic and untrustworthy“ (Fearon 1942). Er vermutet, dass Ammoniak nur mittelbar zur Farbbildung beiträgt; seiner Meinung nach führt ein Amin zur Farbbildung, das **erst während der Reaktion gebildet** wird. Deswegen verkürzt sich auch die Reaktionszeit, wenn man statt Ammoniak direkt ein Amin einsetzt. Trotz der unübersehbaren Vorteile wird Fearon's Test vorwiegend nur im englischen Sprachgebiet ausgeführt (Jessop 1961; Ochei und Kolhatkar 2000), während im deutschen Sprachraum bis in die 1960er Jahre und teilweise auch danach die Wöhlk-Probe mit der Verbesserung von Malfatti angewendet wird (Teichmann 1980; Siegfried GmbH 1962; Ahrens 1966).
- 1976 untersucht Thomas Andrew Nickerson zusammen mit Kollegen die starke pH-Abhängigkeit der Fearon-Reaktion und beweist experimentell ein Optimum bei pH 12,7. Außerdem findet er heraus, dass der optimale Versuchsablauf bei einer Temperatur von 65 °C stattfindet. (Nickerson et al. 1976). Die Anwendung seiner Ergebnisse liegt in der Messung von Lactose in Molke und Milchprodukten.

Eine systematische Untersuchung der beiden sehr ähnlichen Nachweisreaktionen beginnt erst 2015 durch die experimentellen Arbeiten und Recherchen des Autors am IPN Kiel und am Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel. Bei dieser Gelegenheit wurden auch fehlerhafte Theorien und Missverständnisse zur Natur der roten Farbstoffe aufgedeckt (Ruppersberg und Hain 2016; Ruppersberg et al. 2017a). Über die hierzu durchgeführten Experimente und Arbeiten wird im Folgenden berichtet.

4 Experimentelle Untersuchungen zur Wöhlk-Probe und zum Fearon-Test

Ein wesentlicher Weg der Erkenntnisgewinnung ist das Experiment – ganz besonders gilt dies für die Naturwissenschaften, und darin ganz besonders für die Chemie (Sommer et al. 2018). Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe experimenteller Untersuchungen zum einen fachwissenschaftliche Unsicherheiten zur Wöhlk-Probe und zum Fearon-Test zu klären und andererseits mögliche Experimente für den naturwissenschaftlichen Unterricht zu entwickeln. In diesem Abschnitt werden hierzu Experimente auf unterschiedlichen Niveaus beschrieben, die je nach materieller Ausstattung in Schule, Schülerlabor oder Universität nachvollziehbar sind.

Bei der Entstehung dieser Arbeit halfen zunächst Literaturrecherchen und eigene Experimente auf Basis eines Labors für die Lehramtsausbildung. Für größere Arbeiten (Arbeiten unter Stickstoffatmosphäre u.a.) war die Kooperation mit dem Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel erforderlich; später wurden weitere Institute und Expertisen hinzugezogen. Bei der Suche nach geeigneten Untersuchungsmethoden boten Prof. Dr. Mischnick (Braunschweig, erste UV-Vis-Messungen), Prof. Dr. Sönnichsen (Kiel, NMR), Prof. Dr. Kroh, Dr. Kanzler, Dr. Doert (Berlin, spezielle Feinchemikalien), Prof. Dr. Henle, Dres. Hellwig (Dresden, HPLC-DAD-MS), Prof. Dr. Göttlich, Dr. Wende (Gießen, ESI-MS) ihre Kooperation an.

Durch das Angebot von Prof. Dr. Busker, ein leistungsfähiges modernes UV-Vis-Spektrometer mit heizbarem Küvettenhalter benutzen zu dürfen, fand schließlich der größte Teil der Untersuchungen an der EUF Flensburg statt.

Die experimentellen Untersuchungen gliedern sich in:

1. Eine Bestandsaufnahme zum Forschungsstand und Überprüfungen wichtiger Parameter wie z. B. pH-Wert und Sauerstoffabhängigkeit der Reaktion (Kap. 4.1),
2. Variationen der Amino-Komponente: Durch die Experimente von Sieber (3.3) und Fearon (3.9) war schon bekannt, dass außer Ammoniak auch andere Stickstoffverbindungen zur Farbstoffbildung beitragen. Diese Erkenntnisse sollten überprüft und erweitert werden (Kap. 4.2),
3. Variationen der Kohlenhydrat-Komponente: Ebenso sollten die verschiedenen Kohlenhydrat-Komponenten aus der Arbeit von Alfred Wöhlk (1904) genauer untersucht und variiert werden; diese Experimente und Ergebnisse sind in Kap. 4.3 zu finden.

Experimentelle „Sackgassen“ und Experimente, die Wiederholungen und Bestätigungen von Regeln darstellen (z. B. das Verhalten aromatischer Amine) werden für besonders interessierte Leserinnen und Leser in den Anhang gestellt.

Ein Verzeichnis aller Experimente befindet sich am Ende der Arbeit (9.3).

4.1 Forschungsstand zur Bildung der roten Farbstoffe

Über den Mechanismus der Farbstoffbildung waren bis 2015 nur wenige Details bekannt: „Milchzucker (Lactose) ist ein aus Galactose und Glucose zusammengesetztes Disaccharid. Der Galactoseteil zeigt nach Oxidation zu Schleimsäure (= Galactozuckersäure) mit Ammoniak die „Pyrrolrot-Reaktion“ (pyrros [griech.] = feuerrot)“ (Grob 2000).

Ähnlich lautet es bei Fleiss:

„Lactose besteht aus einem D-Galactosemolekül und einem D-Glucosemolekül, die β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Durch das Kochen im Wasserbad mit NaOH und NH_3 erfolgt eine hydrolytische Spaltung von Lactose in D-Glucose und D-Galactose. Die D-Glucose wird anschließend zur D-Glucarsäure (...) oxidiert. Der weitere Reaktions-mechanismus ist ungeklärt, wahrscheinlich wird die D-Galactose zur Schleimsäure (Meso-Galactarsäure) oxidiert. Durch Reaktion mit Ammoniak reagiert diese in weiterer Folge vermutlich zu Pyrrol und Pyrrolrot“ (Fleiss 2013, S. 41).

Noch einmal anders formuliert, werden folgende Kernthesen aufgestellt:

- Der prachtvolle Farbstoff aus der Wöhlk-Probe soll „Pyrrolrot“ heißen (Überprüfung diese These in Kap. 4.1.1).
- Zu dessen Entstehung sollte Lactose zunächst durch Hydrolyse in ihre Bestandteile Glucose und Galactose zerlegt werden (Überprüfung in Kap. 4.1.2).
- Dann sollte durch Oxidation aus Galactose Schleimsäure gebildet werden. (Andere Namen: Galactarsäure, Mucinsäure; Abb. 23 zeigt Ammoniummucat, ein Salz der Schleimsäure.) Eine Überprüfung erfolgt in Kap. 4.1.3.
- Das Ammoniak-Salz der Schleimsäure, Ammoniummucat, sollte dann zu Pyrrolrot reagieren (siehe Abbildung 23: Pyrrolsynthese aus Ammoniummucat, nach (Gattermann et al. 1982)).

4.1.1 Um welche Verbindung könnte es sich bei „Pyrrolrot“ handeln?

Pyrrol ist eine farblose Verbindung mit der Summenformel C_4H_5N , die 1834 von F. F. Runge im Steinkohlenteer entdeckt wurde; die Strukturformel wurde jedoch erst 1870 von Baeyer und Emmerling aufgestellt. Auf der Basis von Pyrrol lassen sich unzählige Farbstoffe finden, allen voran Häm aus dem roten Blutfarbstoff und Chlorophyll aus dem Blattgrün der Pflanzen (Ammon 2017).

Pyrrolrot ist die umgangssprachliche Bezeichnung für das C.I. Pigment Red 254, ein Diketopyrrolopyrrol-Pigment, bekannt als „Ferrari-Rot“ (Farnum 1974). Trotz zahlreicher Recherchen ließ sich aber kein Zusammenhang zwischen dem Farbstoff der Wöhlk-Probe und diesem oder einem anderen pyrrolbasierten Farbstoff finden.

Eventuell sollte die Bezeichnung Pyrrolrot im Zusammenhang mit der Wöhlk-Probe auf einen Farbstoff hinweisen, der ähnlich aussieht, ohne eine direkte chemische Klassifizierung vorzunehmen. Eine andere Möglichkeit wäre die Entstehung eines Missverständnisses. In einem Lehrbuch aus dem Jahr 1969 heißt es: „... der qualitative Nachweis des Milchzuckers (erfolgt) durch die Schleimsäure-Reaktion; hierbei wird der Galaktose-Teil des Disaccharids Laktose mittels konz. HNO_3 in Schleimsäure (...) übergeführt, die (...) nach dem Eindampfen mit NH_3 an der Pyrrolrotreaktion (Fichtenspanreaktion¹⁷) leicht erkannt wird“ (Heimann 1969).

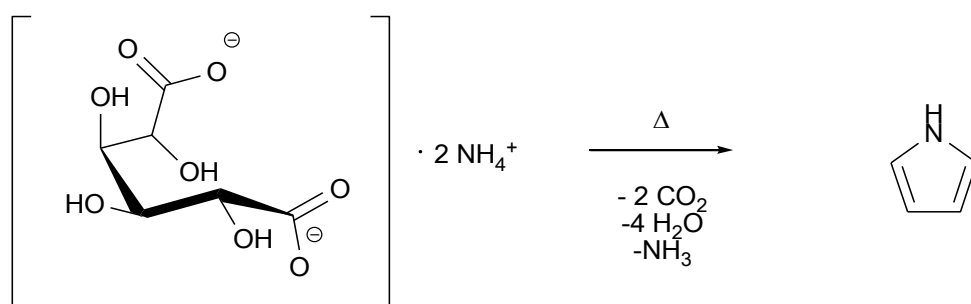


Abbildung 23: Pyrrolsynthese aus Ammoniummucat, nach (Gattermann et al. 1982)

Wiley 4927150882529

Diese Reaktion wird in dem bekannten Lehrbuch (Gattermann et al. 1982) genauer beschrieben; hierbei wird Pyrrol aus einem Salz der Schleimsäure, nämlich Ammoniummucat hergestellt (Abb. 23). Durch Abspaltung von Kohlenstoffdioxid entsteht aus der 1,6-

¹⁷ Der von Runge mit der Fichtenspanreaktion gefundene Nachweis auf Pyrrol (Rotfärbung, bei Furan grün) ist auf eine Reaktion von Pyrrol, aber auch Indol (Benzopyrrol) mit den aldehydischen Bestandteilen des Lignins zurückzuführen und hat nichts mit dem Pyrrolopyrrolpigment zu tun; es handelt sich um zwei verschiedene Pyrrollderivate mit dem gleichen Namen „Pyrrolrot“.

Dicarbonsäure ein 1,4-Dialdehyd, aus dem sich farbloses Pyrrol bildet (Abb. 23). Letzteres bildet in der von Runge gefundenen Nachweisreaktion mit dem Fichtenspan das Pyrrolrot (Heimann 1969).

Die Pyrrolsynthese aus Ammoniummucate setzt allerdings Temperaturen zwischen 170 °C und 300 °C voraus, während die Wöhlk-Probe bei nur 60 °C – 70°C stattfindet und keine Kohlenstoffdioxidentwicklung zu beobachten ist (Gattermann et al. 1982).

Ein weiterer Einwand ist die Tatsache, dass die Wöhlk-Probe mit Lactose und Maltose gleichermaßen funktioniert, Galactose aber nur ein Bestandteil von Lactose ist (Abb. 11). Im Disaccharid Maltose ist jedoch anstelle von Galactose lediglich ein zweites Molekül Glucose enthalten. Spätestens an dieser Stelle wird die „Pyrrolrot-Theorie“ ad absurdum geführt. Dennoch werden zum Zwecke der Gründlichkeit im Folgenden auch weitere Aussagen untersucht.

4.1.2 Wird Lactose während der Wöhlk-Reaktion in Galactose und Glucose hydrolysiert?

Die beiden bereits oben genannten Publikationen (Fleiss 2013; Grob 2000) führen an, dass das Disaccharid Lactose bei der Wöhlk-Probe hydrolysiert würde, d.h. in die Monomere Glucose und Galactose zerlegt würde.

Wenn diese Darstellung richtig wäre, dann müsste die rote Farbe auch aus einem Gemisch von Glucose und Galactose entstehen. Durch das folgende Experiment, das sich in jedem Schullabor auf einfache Weise durchführen lässt, lässt sich diese Aussage überprüfen und falsifizieren (siehe auch (Ruppersberg und Hain 2016)).

Die im Experiment aufgeführten Zucker lassen sich auch durch andere Vertreter dieser Stoffgruppe ersetzen, außer: Lactose, Glucose, Galactose sowie ein Gemisch von Glucose und Galactose.

Die im Experiment aufgeführten Milchprodukte lassen sich auch durch andere Produkte, wie z.B. Skyr, Ayrn, Kumys etc. ersetzen. Lediglich die lactosefreie Milch sollte keinesfalls ersetzt werden, weil darin die Produkte der enzymatischen Hydrolyse (Galactose und Glucose) enthalten sind.

Bei Fruchtzusätzen muss darauf geachtet werden, dass diese nicht rot sind (Kirschen, Blaubeeren usw.), weil hierdurch der Farbnachweis behindert wird.

Bei sehr sauren Milchprodukten muss auf den pH-Wert geachtet werden – er muss für das Gelingen der Wöhlk-Probe bei 12,7 liegen; ggf. ist mit einer Pipette etwas Kalilauge nachzutropfen.

Experiment 1: Wöhlk-Probe mit verschiedenen Milchprodukten und Zuckern

Geräte: Eine auf 65 °C einstellbare Heizplatte, ein 1000-mL-Becherglas, ein Thermometer (Messbereich bis 100 °C), Spatel, Wägepapier, Waage (Messgenauigkeit 0,001 g), Einmalpipetten 3 mL, 10 Reagenzgläser, ein wasserfester Stift zum Beschriften, Reagenzglasklammer, Reagenzglashalter, Abzug bzw. gute Querlüftung, Schutzbrillen, Kittel.

Chemikalien: Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$), Ammoniaklösung ($\omega=10\%$), demin. Wasser, Milchprodukte, **Reihenfolge** wie in Abbildung 24 :

1. Vollmilch,
2. Lactosefreie Milch (glucose- und galactosehaltig),
3. Buttermilch,
4. Kefir,
5. Naturjoghurt,
6. Kaffeesahne auf Milchbasis,
7. Sahne,
8. Lactose, 50 mg in 2 mL demin. Wasser ($\omega = 2,5\%$),
9. Gemisch Glucose und Galactose, je 50 mg in 2 mL demin. Wasser
10. Glucose, 50 mg in 2 mL demin. Wasser ($\omega = 2,5\%$),
11. Galactose, 50 mg in 2 mL demin. Wasser ($\omega = 2,5\%$),
12. Saccharose, 50 mg in 2 mL demin. Wasser ($\omega = 2,5\%$).

Vorgehensweise: Im Becherglas werden 300 ml demin. Wasser¹⁸ auf 65 °C aufgeheizt. Von den Milchprodukten aus der vorangegangenen Aufzählung werden jeweils 2 mL in die nummerierten Reagenzgläser gegeben (ggf. Pipette etwas kürzen, um dickflüssige Produkte besser handhaben zu können), Zuckerlösungen wie oben beschrieben. Alle Reagenzgläser erhalten zusätzlich 2 mL Ammoniaklösung sowie 3-5 Tropfen Kalilauge und werden **gleichzeitig** in das Wasserbad gegeben, die Startzeit wird notiert.

¹⁸ Die Verwendung von demin. Wasser verhindert Kalkbildung an der Innenseite des Becherglases.

Ergebnis nach ca. 20 Min.: Je nach Lactosegehalt der Lösungen ergeben sich unterschiedlich starke rötliche / rosa Färbungen. Produkte, die keine Lactose enthalten, sind gelblich gefärbt (Abb. 24). Im 2. Reagenzglas von links (lactosefreie Milch) befindet sich ein Gemisch aus Galactose und Glucose, daher ergibt sich nur eine gelbe Farbe, ebenso wie in Reagenzglas 9. Würde der rote Farbstoff aus Galactose oder aus einem Gemisch von Glucose und Galactose entstehen, dann müssten die Reagenzgläser 2, 9 und 11 ebenfalls eine rötliche / rosa Färbung aufweisen.

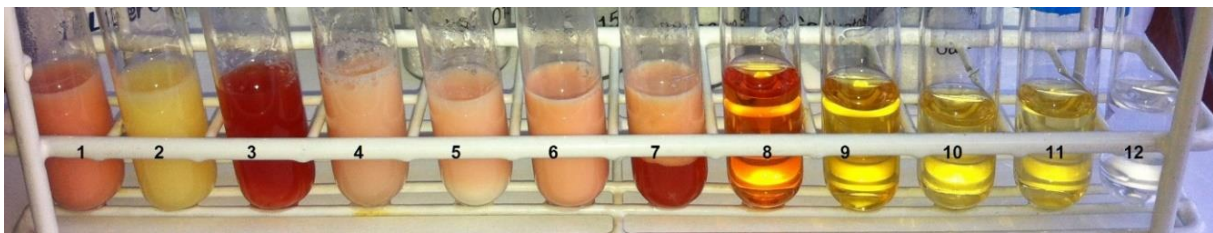


Abbildung 24: Wöhlk-Probe gemäß obiger Auflistung im Text, Lizenz: Wiley 4927610665851

Bei einigen Milchprodukten ist die Färbung geringer als bei Vollmilch, da die Lactose z.B. durch Milchsäurebakterien bereits biologisch abgebaut wurde, in anderen Milchprodukten ist die Färbung stärker, da durch Verarbeitungsprozesse eine Aufkonzentrierung der Lactose stattfand (Buttermilch¹⁹, Sahne).

Diskussion: Dass die Wöhlk-Probe nicht mit einer Hydrolyse von Lactose beginnt, lässt sich auch aus der Fachliteratur (Töpel 2016) belegen, denn für eine thermische Hydrolyse von Lactose müssen wesentlich drastischere Bedingungen herrschen (1 Stunde erhitzen bei 90 °C mit Salzsäure, $c = 1,5 \text{ mol/L}$) als bei der Wöhlk-Probe gegeben ist.

Der Grund für die so schwer erreichbare Hydrolyse von Lactose liegt darin, dass die β -1,4-glykosidische Bindung bei Lactose viel stabiler als die β , α -1,2-glykosidische Bindung bei Saccharose ist. Dies lässt sich auch theoretisch und für Schülerinnen und Schüler verständlich im Unterricht herleiten, wenn man die Molekülstrukturen von Lactose und Saccharose (Abb. 25) vergleicht:

¹⁹ Es gibt Buttermilchsorten mit erhöhtem Lactoseanteil; jedoch auch solche, die aufgrund der Zugabe von Milchsäurebakterien einen deutlich verringerten Lactoseanteil besitzen.

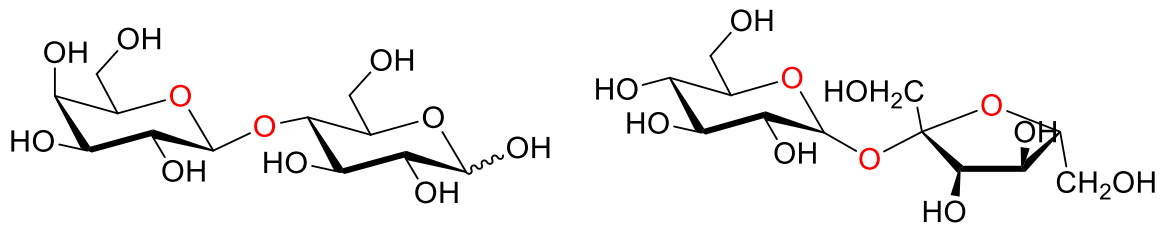


Abbildung 25: Strukturformeln von Lactose (links) und Saccharose (rechts) im Vergleich ²⁰

Bei Saccharose wird die 1,2-glycosidische Bindung durch die Nachbarschaft von zwei (elektronenziehenden) Sauerstoffatomen an den beiden verknüpften C-Atomen geschwächt, während Lactose nur ein Sauerstoffatom in der direkten Nachbarschaft der glycosidischen Bindung besitzt.

Lactose lässt sich daher nicht wie Saccharose bei Raumtemperatur mit verdünnter Salzsäure hydrolysieren, sondern nur mit stärkeren Methoden:

- a) Mit dem Enzym β -Galactosidase - dieses wird oft falsch vereinfachend „Lactase“²¹ genannt, oder
- b) durch einstündiges Erhitzen bei 90 °C mit 1,5 M Salzsäure (Töpel 2016).

Lactosefreie Milch aus dem Lebensmittelhandel ist das Ergebnis einer *enzymatischen Hydrolyse*. Die Produkte dieser Spaltung führen zu Galactose und Glucose, diese führen als 1:1 Mischung lediglich zur Bildung einer gelben Farbe. Darauf kann geschlussfolgert werden, dass eine Hydrolyse nicht zum roten Farbstoff der Wöhlk-Probe führt.

²⁰ Anmerkung zu den Formeln der Zucker: Diese werden –soweit möglich– als Sesselkonfiguration dargestellt. Die Schlangenlinie („wavy bond“) weist auf das Vorhandensein zweier Anomere (α und β) hin, die sich in wässriger Lösung ineinander überführen lassen; dazwischen erscheint als dritte Möglichkeit die offenkettige Konfiguration mit einer Aldehydgruppe (siehe auch 5.1).

²¹ Im Handelsnamen Lactrase® ermöglicht das zusätzliche „r“ den Markenschutz.

4.1.3 Einfluss von Luftsauerstoff auf die Farbstoffbildung

In den bereits erwähnten Publikationen von Fleiss und Grob (Fleiss 2013; Grob 2000) wird eine Oxidation der Galactose zur Schleimsäure (auch: Galactarsäure, Mucinsäure) postuliert.

Für grundlegende Überlegungen zur Aufstellung eines Mechanismus für die Reaktion stellte sich daher die Frage, ob für die Entstehung des roten Farbstoffes gelöster Sauerstoff aus der Luft verantwortlich sein könnte.

Aus Gründen der Vereinfachung wurde dies anhand des sehr ähnlichen Tests von Fearon (siehe 3.6) untersucht. Die Vorteile bestehen in der Substitution von Ammoniak durch Methylamin, dem Einsatz kleinerer Mengen und einem verlässlicheren, schnelleren Versuchsablauf.

Da dieser erstmals 2015 durchgeführte Versuch zu einem späteren Zeitpunkt (2019) wiederholt wurde, sind auf den Fotos weitere Substanzen zu erkennen, die erst später „ins Puzzle“ gelangten. Diese werden in Kapitel 4.3 genauer erklärt.

Experiment 2: Ist für die Entstehung der roten Farbe Luftsauerstoff nötig?

Ort: Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel, Arbeitskreis Prof. Dr. Lindhorst

Geräte: Vakuumpumpe, vier Rundkolben, vier Rührmagnete, Heizplatte mit Magnetrührer, Glasschale für Wasserbad, Thermometer (bis 100 °C).

Chemikalien: 25 mL demin. Wasser, das mit drei Zyklen der Freeze-Pump-Thaw-Methode²² (Lonergan o.J.) entgast wurde, 63 mg Methylamin-Hydrochlorid, 250 mg Natriumhydroxid, Stickstoffgas, 8 mg Lactose, 4 mg 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose, 4 mg 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose, 8 mg Melibiose = D-Galactopyranosyl- α -(1,6)-D-Glucopyranose²³.

Durchführung: 25 mL demin. Wasser wurden mit drei Zyklen der Freeze-Pump-Thaw-Methode (Lonergan o.J.) entgast und anschließend mit 63 mg Methylamin-Hydrochlorid und 250 mg Natriumhydroxid versetzt. Jeweils 2 mL dieser Lösung wurde unter Stickstoff mit jeweils 2 mL einer Lösung von:

- a) Lactose (8 mg), im Bild hinten links,
- b) 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose (4 mg), vorne links,

²² Eine Menge an demin. Wasser wird eingefroren und unter Unterdruck wieder aufgetaut, dies dreimal hintereinander.

²³ Vorgriff; diese Kohlenhydrate werden in 4.3 genauer behandelt.

c) 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose (4 mg), vorne rechts,
 d) Melibiose = D-Galactopyranosyl- α -(1,6)-D-Glucopyranose (8 mg), hinten mittig,
 vereinigt und im Wasserbad bei 70° C erhitzt. Die Fotos in Abb. 26 zeigen den Versuch nach 10 Minuten, 16 Stunden und 30 Stunden.



Fotos: Ruppersberg

Abbildung 26: Fearon-Test unter Sauerstoffausschluss, nach 10 Min., 16 Std., 30 Std. (siehe Text)

Beobachtung: Der Farbstoff entsteht trotz Sauerstoffausschluss, am schnellsten mit den geschützten Glucosen, dann folgt Lactose. Bei Melibiose (reduzierendes Disaccharid mit 1,6-Verknüpfung) entsteht nur ein gelber Farbstoff.

Nach 16 bzw. 30 Stunden ist der rote Farbstoff zerfallen; am schnellsten bei der 4,6-O-Ethylidenglucose, gefolgt von 4,6-O-Benzylidenglucose. Relativ am stabilsten ist der Farbstoff bei Lactose.

Ergebnis: Für die Entstehung der roten Farbe ist kein Luftsauerstoff nötig.

Zur Sicherheit wurde auch Schleimsäure den Bedingungen von Wöhlk-Probe und Fearon-Test unterzogen; es bildete sich kein roter Farbstoff (Ruppersberg und Hain 2017).

Unter Sauerstoffausschluss bleibt die normalerweise nach wenigen Minuten vom Zerfall bedrohte Farbe noch weitere 18 Stunden erhalten. Durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumsulfit lässt sich die Haltbarkeit weiter erhöhen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die von Grob (Grob 2000) und Fleiss (Fleiss 2013) verbreiteten Gedanken zum Mechanismus der Farbstoffbildung nicht auf die Wöhlk-Probe zutreffen können. Daher befassen sich die nachfolgenden Unterkapitel mit der Frage, welcher Reaktionsmechanismus der Wöhlk-Probe in Wahrheit zugrunde liegen könnte. Um sich der Lösung dieser Frage zu nähern, wird eine Unterteilung in einzelne Unterfragen durchgeführt.

4.1.4 Findet die Wöhlk-Probe auch unter Wasserausschluss statt?

Stellt man grundlegende Dinge wie die Anwesenheit von Sauerstoff in Frage, so muss aus Gründen der Sorgfalt auch die Anwesenheit von Wasser in Frage gestellt werden: Ist Wasser überhaupt nötig für diese Reaktion oder handelt es sich um eine Zucker-Amin-Reaktion, die auch im wasserfreien Milieu stattfinden könnte? Anstelle einer wässrigen Ammoniak-Lösung lässt sich für diesen Zweck eine methanolische, wasserfreie Ammoniaklösung verwenden.

Experiment 3: Findet die Wöhlk-Probe auch unter Wasserausschluss statt?

Ort: Otto-Diels-Institut für Organische Chemie in Kiel, Arbeitskreis Lindhorst

Geräte: Zweihals-Rundkolben, Rückflusskühler, Heizplatte mit Magnetrührer, Rührmagnet, Thermometer, Glasschale für Wasserbad, Thermometer (bis 100 °C).

Chemikalien: Methanolische Ammoniaklösung (wasserfrei), Lactose

Durchführung: Die Wöhlk-Probe wird im wasserfreien Milieu durchgeführt (die wässrige Ammoniaklösung wird dabei durch eine methanolische Ammoniaklösung ersetzt, 60 °C, Rückflusskühlung, siehe Abbildung 27).

Beobachtung: Die Lactose löst sich zu Beginn nur sehr langsam, danach ist lediglich eine Gelbfärbung zu beobachten. Selbst nach einer Stunde Reaktionszeit bleibt die markante rote Farbe aus.

Ergebnis: Das Vorhandensein von Wasser/ Hydroxidionen ist also wichtig für die Bildung der roten Farbe.



Abbildung 27: Wöhlk-Probe im wasserfreien Milieu (meth. Ammoniak, Rückflusskühlung)

Foto: Wiley, Lizenz 4926580682681

Weitere Experimente sollen den zeitlichen Ablauf und andere Faktoren der Farbstoffbildung genauer untersuchen.

4.1.5 Mit welcher Methode lässt sich der rote Farbstoff gut untersuchen?

Für die Untersuchung von Farbstoffen bietet sich die UV-Vis-Spektrometrie an. Der wissenschaftliche Hintergrund besteht darin, dass elektromagnetische Wellen, hier mit den Wellenlängen 250 nm bis 650 nm, die Elektronen ungesättigter organischer Verbindungen anregen können.

Zu diesem Thema gibt es zahlreiche Lehrbücher und Skripten, z.B. (Gottwald und Heinrich 1998), (Lehmann 1997), (Analytik Jena o.J.). In aller Kürze geht es um folgenden vereinfachten Sachverhalt: Eine Lichtquelle emittiert elektromagnetische Wellen verschiedener Wellenlängen, ein Spektrum. Dieses umfasst üblicherweise einen Wellenlängenbereich von 190 nm bis 700 nm und wird von einem Detektor erfasst. Setzt man nun zwischen Lichtquelle und Detektor eine Küvette mit einer (farbigen) Lösung, dann absorbieren die Farbstoffmoleküle bestimmte Wellenlängen (Absorption), andere kommen ungehindert hindurch (Transmission). Für diese Transmission gibt der Detektor logarithmische Messwerte aus, diese nennt man Extinktion E . Die Extinktion ist abhängig von der Schichtdicke d der Küvette, von der Konzentration c der Lösung, von dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ und von den Intensitäten des emittierten und des detektierten Lichtes (I_0 und I_1). Diesen Sachverhalt spiegelt das 1852 publizierte Lambert-Beer'sche Gesetz (Beer 1852) wieder:

$$E_{\lambda} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Legende:

E_{λ} = Absorbanz des Materials bei der Wellenlänge λ

$\log_{10}$ = Logarithmus zur Basis 10

I_0 = Intensität des einfallenden Lichts

I_1 = Intensität des transmittierten Lichts

ϵ_{λ} = spezifischer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Lösung

d = Schichtdicke der Küvette

Auch das menschliche Auge ist ein Detektor. Da bei den hier zur Diskussion stehenden Substanzen vor allem gelbe, orange und rote Farben zu beobachten sind, kann vereinfacht gesagt werden, dass jeweils die komplementären Farben absorbiert werden; d.h. erscheint eine Lösung gelb, so ist grob mit einer Absorption im blauen Bereich (435 - 480 nm) zu rechnen, bei roten Lösungen im grünen Bereich (490-560 nm).

Bei der Zubereitung von Lösungen ist darauf zu achten, dass Konzentrationen für einen möglichst gut beobachtbaren Bereich gewählt werden: Ist die Lösung zu stark konzentriert, dann ist die Messung nicht aussagekräftig, man spricht von „verrauschten Werten“, ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 31.

In einem derartigen Fall könnte man

1. die Lösung verdünnen (zu zeitaufwändig, ungenau, ggf. falscher pH-Wert durch falsches Verdünnen der Lösung),
2. komplett neue Lösungen herstellen und das Experiment am nächsten Labortag wiederholen (zu großer Zeitaufwand) oder
3. eine Zehntelküvette verwenden; i.e. eine Küvette, in der die Lösung eine Schichtdicke von 1 mm anstelle von 10 mm hat (Variante mit der geringsten Fehlerwahrscheinlichkeit und schnellste Lösung).

Natürlich dürfen die Lösungen auch nicht zu gering konzentriert sein, denn bei einer zu niedrigen Konzentration gibt es ebenfalls keine auswertbaren Kurven.

Für das praktische Arbeiten haben sich folgende Mengenangaben als vorteilhaft erwiesen:

- Für eine 4 mL umfassende Reaktionslösung werden 4 mg Monosaccharid abgewogen bzw. 8 mg Disaccharid. Das bedeutet, dass die Lösungen ca. 5,5 Millimol Kohlenhydrat pro Liter enthalten. Fertiglösungen für Kohlenhydrate sollten vorsichtshalber am Tag der Herstellung verbraucht werden, da diese in der angewendeten sehr geringen Konzentration instabil und nicht lagerfähig sind.
- Die Zugabe der Amino-Komponente wird so berechnet, dass die vorbereiteten Fertiglösungen 0,025 mol/L enthalten; durch Zugabe von NaOH-Plättchen wird ein pH-Wert von 13 eingestellt. Wenn dann jeweils 2 mL Kohlenhydratlösung und 2 mL Amino-Komponente zusammen gegeben werden, verringert sich die Konzentration der Amino-Komponente auf 0,0125 mol/L.)
- Die Kohlenhydrat-Komponente verringert sich nicht, denn es wurden ja 4 mg bzw. 8 mg eingewogen, die Menge an eingewogenem Feststoff bleibt in der Küvette gleich.

- Bei flüssigen Aminen ist unter Verwendung einer Mikroliterpipette die Zugabe von 10-20 μL Amin sinnvoll.
- Soll außer dem Vis-Bereich (450 – 650 nm) auch der UV-Bereich beobachtet werden, dann werden von den 4 mL Gesamtlösung 0,4 mL für die Zehntelküvette abpipettiert.
- Als optimal hat sich eine Reaktionstemperatur von 65 °C herausgestellt. (Bei 60 °C läuft die zu beobachtende Reaktion zu langsam, bei 70 °C zu schnell ab.)

An der Europa-Universität Flensburg, Institut für mathematische, naturwissenschaftliche und technische Bildung, Abt. Chemie und ihre Didaktik, befindet sich ein UV-Vis-Spektrometer Specord 50 plus der Firma Analytik Jena (Abbildung 28 ff.) mit dem Zubehör „Temperierbarer Küvettenhalter“.



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 28: UV-Vis-Spektrometer Specord 50 plus (Analytik Jena)

Ausgehend von einem auf 65 °C temperierten Wasserbad leitet ein Zuführungsschlauch (Abb. 29 rechts) mit einer Schlauchpumpe das heiße Wasser in den temperierbaren Küvettenhalter (Abbildung 30), in dem sich eine Quarzküvette mit dem Reagenz befindet. Ein weiterer Schlauch leitet das Wasser zurück in das Wasserbad, wo es wieder auf 65 °C erwärmt wird.



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 29: Temperierbares Wasserbad mit Schlauchpumpe und Stromversorgung

Beschreibung der Apparatur: In Abbildung 29 hinten links ist ein Transformator (6 Volt) sichtbar, an den Stromkabeln (schwarz und rot) befindet sich eine Schlauchpumpe, darunter das Wasserreservoir, temperiert auf 65 °C, nach rechts verlaufen transparente Schläuche als Zu- und Ablauf für den heizbaren Küvettenhalter (Abbildung 30).



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 30: Temperierbarer Küvettenhalter im Innenraum des UV-Vis-Spektrometers

Im Innenraum des UV-Vis-Spektrometers befindet sich ein heizbarer Küvettenhalter, rechts oben ist der Ablauf des Schlauchsystems sichtbar; der Zulauf befindet sich am unteren Ende des Küvettenhalters. In der Mitte befindet sich die Quarzküvette mit 4 mL Reaktionslösung. Die Ausgabe der Messwerte erfolgt am Windows-Computer über eine mitgelieferte Software, die die Überlagerung von mehreren Kurven in einer dat-Datei sowie den Export als csv-Datei

ermöglicht. Letztere wird dann bei der weiteren Bearbeitung mit Excel in eine xlsx-Datei umgewandelt.

Somit konnte erstmalig die Farbreifung von Wöhlk-Proben und Fearon-Tests mit einem UV-Vis-Spektrometer verfolgt und aufgezeichnet werden.

Da die entstehenden Farbstoffe, insbesondere im UV-Bereich, schnell über die maximal anzustrebende Extinktion 1 (Rauschfreiheit, Negativ-Beispiel siehe Abb. 31) hinausgehen, wird für die Untersuchung des UV-Bereiches eine zweite Quarzküvette bereitgehalten, die nur 1 mm Schichtdicke aufweist (normal: 10 mm).

Auf diese Weise sollen fehlerbehaftete Verdünnungsschritte vermieden und gleichzeitig der pH-Wert (Einfluss auf die Farbgebung, siehe 4.1.7) stabil gehalten werden.

4.1.6 Beobachtung der Farbreifung in Abhängigkeit von der Zeit

Als Vorversuch der gesamten folgenden Messungen wird die Farbreifung von 8 mg Lactulose (Abkürzung lul) in 4 mL Fearon-Reagenz in der heizbaren Küvette (Abkürzung hk) beobachtet (siehe Abb. 31); die Angaben hinter den Substanzkürzeln sind die Uhrzeiten der Messungen.

Lactulose wurde der Lactose deswegen vorgezogen, weil Lactose beim gegenwärtigen Stand des Wissens (Ruppersberg et al. 2019) zunächst zeitraubend in Lactulose umgelagert wird.

Zur Einsparung der zeitintensiven Umlagerung, die später noch genauer erklärt wird, erfolgte an dieser Stelle direkt der Einsatz des Umlagerungsproduktes Lactulose.

Außerdem wird bei dieser Wahl des Eduktes die Bildung von Nebenprodukten während der Umlagerung ausgeschlossen.

Experiment 4: Wie verläuft die Farbreifung im Zeitabschnitt von 10 Minuten?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzglas, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: demin. Wasser, 8 mg Lactulose, 4 mL Fearon-Reagenz (siehe 7.3.3), Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 8 mg Lactulose und 4 mL Fearon-Reagenz in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis die Lactulose gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in Abbildung 31.

Ergebnis: Die Auswertung des Vorversuches ergab, dass schon nach 5 Minuten die als Grenzlinie anzusehende Extinktion 1 („Rauschfreiheit“) überschritten wurde, nach 7 Minuten ergaben sich im UV-Bereich nicht mehr messbare Werte, andererseits wird es gerade dann im VIS-Bereich interessant, weil bei ca. 540 nm ein zweites Maximum entsteht (detaillierte Darstellung des letzteren Maximums in Abbildung 32).

Um bei den nachfolgenden Experimenten die Abbildung „verrauschter Werte“ wie in Abb. 31 zu unterbinden, werden die Messungen aufgetrennt: Vis-Messungen im Bereich von 450-650 nm werden mit der 10 mm-Küvette durchgeführt (Zeitraumen: Start bis 30 Minuten, teilweise länger bzw. bis ein Maximalwert erreicht wird), Messungen mit UV-Bereich der 1-mm-Küvette (Zeitraumen: Start bis ca. 5 Min.).

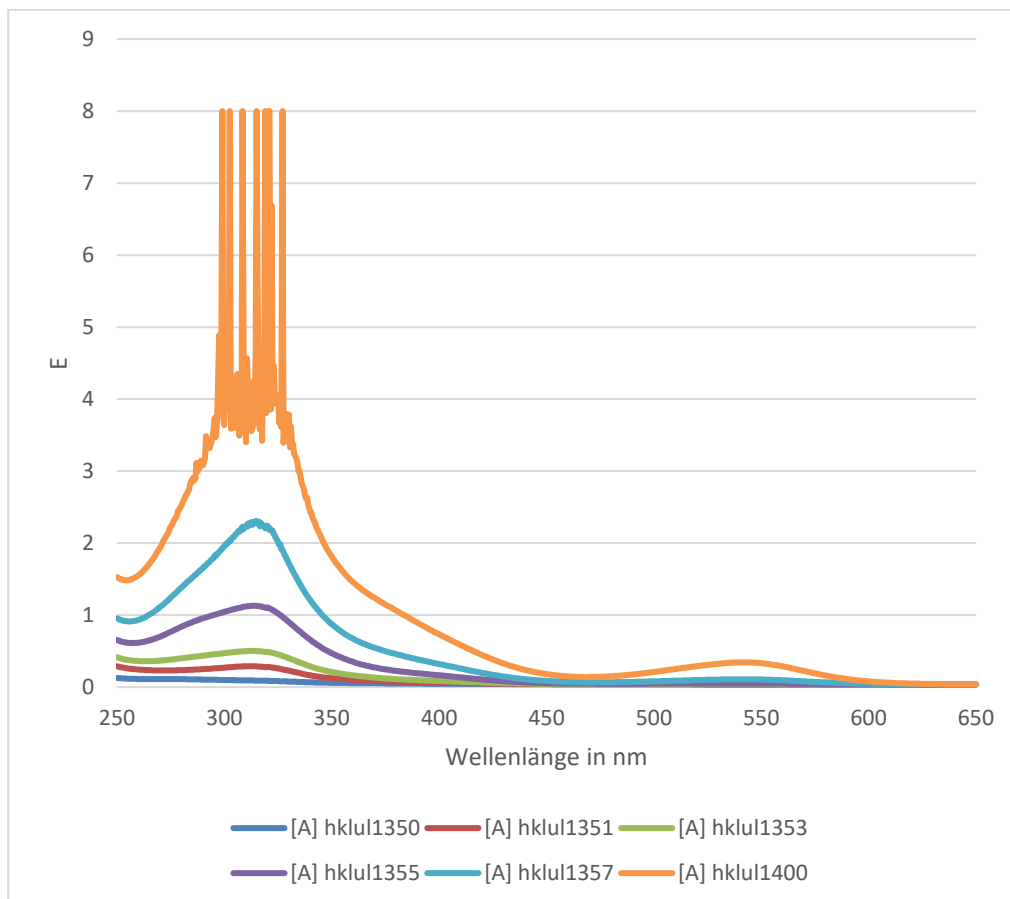


Abbildung 31: „Verrauschte“ Werte im UV-Bereich 10 Minuten nach Start mit 8 mg Lactulose

Außerdem werden die Zuckermengen limitiert: Für Monosaccharide werden üblicherweise 4 mg eingewogen, für Disaccharide 8 mg, wodurch sich bei einem Reagenzglas- bzw. Küvettenvolumen von 4 mL 0,1%ige Monosaccharid-Lösungen bzw. 0,2%ige Disaccharid-Lösungen (Gewichtsprozent) ergeben.

In Bezug auf die Stoffmengen bedeutet dies sowohl für Di- als auch für Monosaccharide, dass ca. 5,5 millimolare Lösungen gehandhabt wurden. Diese Vorgehensweise wird in den folgenden Experimenten im Prinzip durchgängig angewendet.

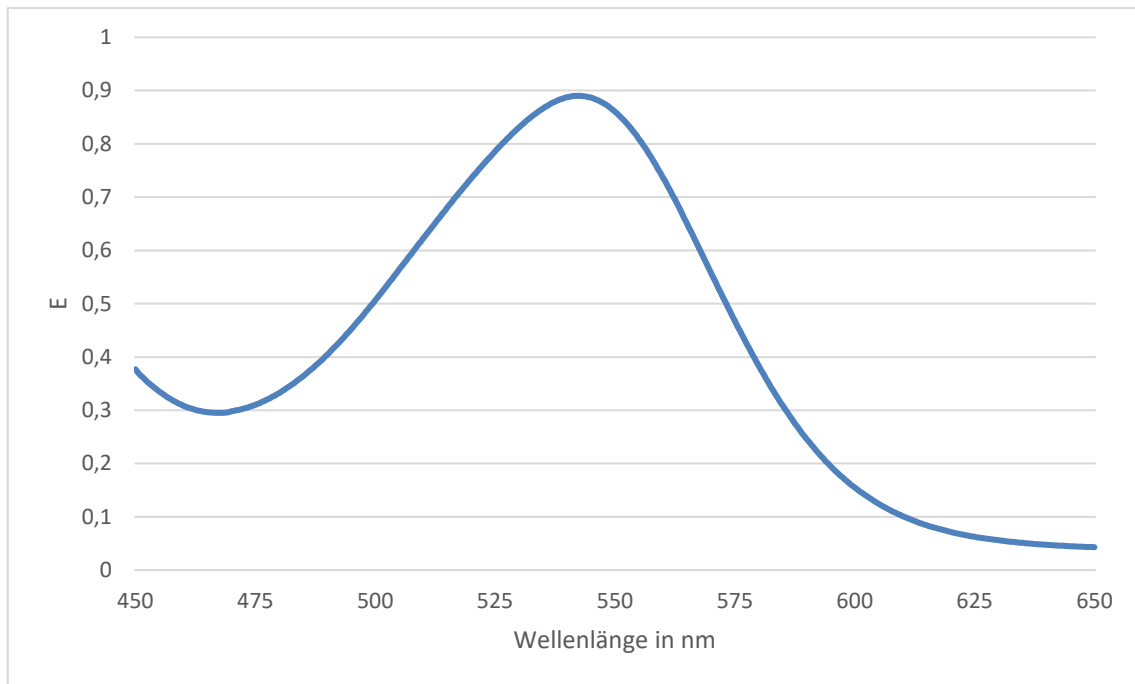


Abbildung 32: Vis-Messung 8 mg Lactulose (12 Min. nach dem Start der Reaktion)

Abbildung 32 stellt ein optimales Beispiel für eine Messung des roten Farbstoffes im Vis-Bereich dar: Das Maximum liegt bei 541 nm, die Extinktion liegt unterhalb von $E = 1$ (aussagekräftigster Bereich), und das vorangehende Maximum im UV-Bereich ist durch ein deutliches Minimum im Bereich von 467 nm abgetrennt.

Aufgrund dieser Darstellung liegt die Idee nahe, die Kurve –wie bei UV-Spektrometrie üblich– quantitativ auszuwerten. Wie die folgende Abbildung zeigt, ist dies äußerst schwierig, wenn nicht sogar unmöglich zu realisieren, denn **das Maximum ändert sich fortlaufend mit der Zeit** – teilweise über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Zu einem nicht vorhersagbaren Zeitpunkt beginnt dann der Zerfall des roten Farbstoffes und das Maximum sinkt von Messung zu Messung kontinuierlich wieder ab.

Es gibt also keinen definierbaren Endpunkt der Messung mit einem Maximum, das nicht mehr überschritten wird.

Wenn man also eine unbekannte Konzentration mittels einer Kalibrationskurve herausfinden wollte, *dann* müssten Proben bekannter Konzentration und die Probe unbekannter Konzentration zeitgleich ins Wasserbad gestellt werden (möglich) und nach einem definierten Zeitpunkt, z. B. nach 10 Minuten, zeitgleich entnommen werden (auch möglich) *und allesamt zeitgleich gemessen werden* – letzteres ist nicht möglich: Ein Küvettenwechsel und die Durchführung einer neuen Messung liegen immer mindestens 30 Sekunden auseinander, d. h.

von der ersten bis zur sechsten Messung vergehen zweieinhalb Minuten, innerhalb derer die Farbstoffentwicklung schon wieder fortgeschritten ist und einen linearen Vergleich unmöglich macht.

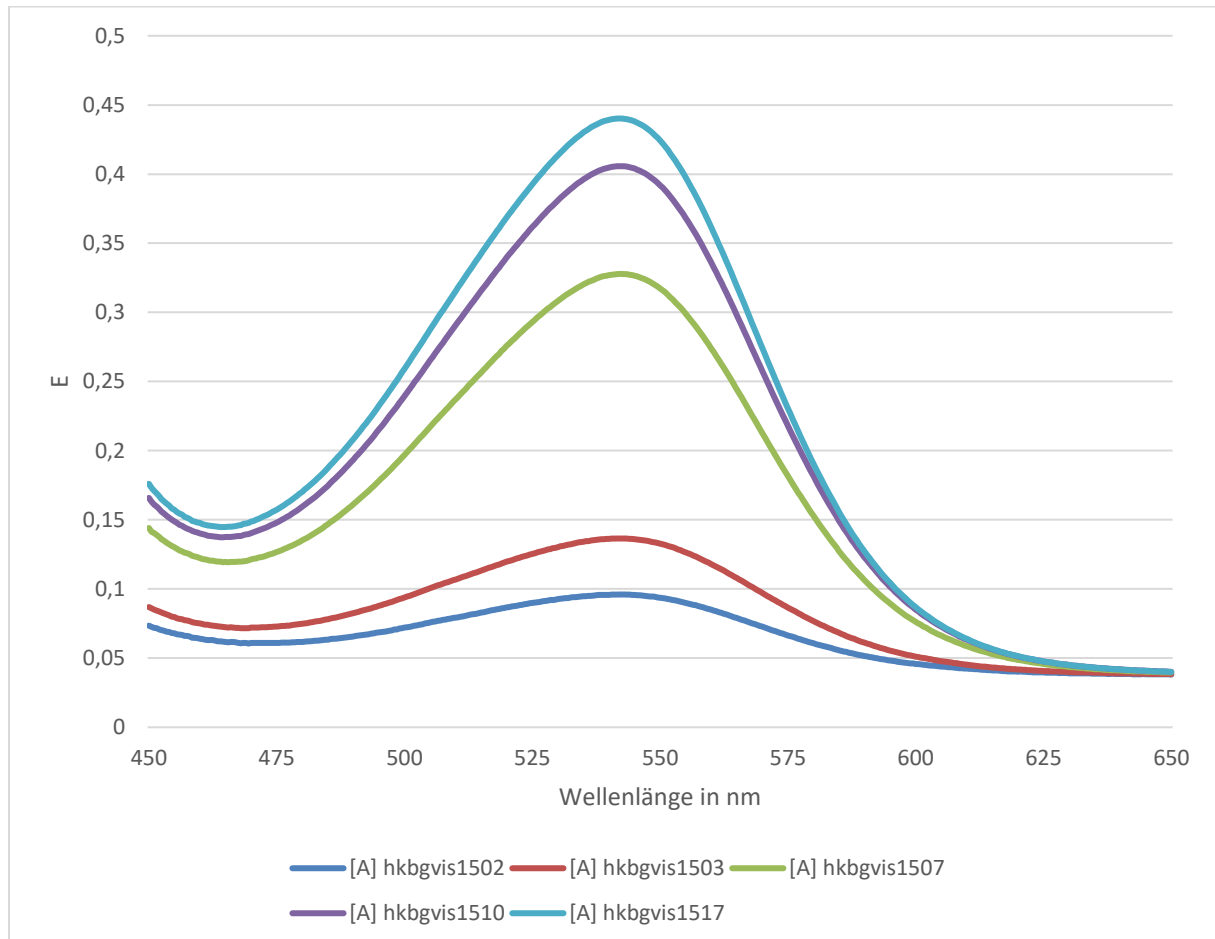


Abbildung 33: Messungen mit 1 mg Benzylidenglucose in 4 mL Fearon-Reagenz, 0-15 min.

Wie bei der obigen Abbildung zu sehen ist, verändert sich das Maximum im Verlauf von 15 Minuten stetig – für eine Kalibrationsgerade zur Berechnung einer unbekannten Konzentration sind diese Werte unbrauchbar.

Positiv an dieser Messung im Messbereich 450 – 650 nm ist, dass sowohl Lactulose als auch 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose wenige Minuten nach dem Start der Reaktion ein Maximum bei 541 nm zeigen.

Dies führt zu der Feststellung, dass es für den entstehenden Farbstoff und die Wellenlänge seines Vis-Maximums **egal ist, welche Zuckerkomponente** eingesetzt wird.

Eine weitere Feststellung ist, dass **die Amino-Komponente ausschlaggebend** für die Wellenlänge des Maximums ist.

Bezüglich der eingesetzten Menge von 1 mg Zuckerkomponente auf 4 mL Gesamtlösung und der maximalen Extinktion von 0,44 nach 15 Minuten lässt sich nach der Erfahrung aus vielen durchgeführten Experimenten sagen, dass bei einem erneuten Ansatz durchaus auch eine größere Menge an Kohlenhydrat (zunächst einmal das Doppelte) ausprobiert werden kann.

4.1.7 Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich

Die Wöhlk-Probe (Tabelle 4) und der Fearon-Test (Tabelle 5) verwenden beide eine Amino-Komponente und finden im stark alkalischen Bereich statt, sie erzeugen beide einen roten Farbstoff, wenn 1,4-verknüpfte Disaccharide untersucht werden, aber sie unterscheiden sich bezüglich der Amino-Komponente, der Konzentration, der Dauer bis zur Farbreifung, des Farbeindrucks, des Maximums im Vis-Bereich und der Zuverlässigkeit.

In Bezug auf die nachweisbaren Substanzen sind sie gleich, wie in der Zusammenstellung in Tabelle 6 (siehe unten) aufgeführt ist. Die Ähnlichkeiten zwischen beiden Reaktionen sind unübersehbar, dennoch gibt es Unterschiede, die sich vor allem bei den verwendeten Chemikalienkonzentrationen und bei der Zeitdauer der Nachweise zeigen.

Historisch wurden beide Methoden zunächst zum Nachweis von Lactose und Maltose benutzt, später kamen Cellobiose, Lactulose, Maltulose, 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose und 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose hinzu (Wöhlk 1904; Jessop 1961; Kussler und Ruppertsberg 2019).

Im Unterschied zum Fearon-Test misslingt die Wöhlkprobe bisweilen; als Ursache kann regelmäßig ein zu geringer pH-Wert vermutet werden (siehe 4.1.8 Die Entstehung des roten Farbstoffs in Abhängigkeit vom pH-Wert).

Tabelle 6: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich			
Zu vergleichende Parameter:	Wöhlk-Probe (Wöhlk 1904), (Malfatti 1905)	Fearon's Test (Jessop 1961)	Erläuterung:
Amino-Komponente	NH_3	NH_2CH_3	Ein Wasserstoffatom wird durch eine Methylgruppe substituiert
Konzentration der Amino-Komponente	2 mL Ammoniaklösung $\omega=10\%$, $c = 5,6 \text{ mol/L}$ auf 2 mL Zuckerlösung, teilweise auch , $\omega=25\%$	5 Tropfen einer Methylamin-Hydrochlorid-Lösung , $\omega=5\%$, $c = 0,74 \text{ mol/L}$	Hypothese: Ammoniak muss im Überschuss vorhanden sein, da viele Nebenprodukte erzeugt werden, die nicht zielführend sind
Konzentration der Lauge	Kalilauge $0,05 \text{ mol/L}$	Natronlauge $0,25 \text{ mol/L}$	Methylamin ist per se zwar stärker basisch als Ammoniak, es wird jedoch als saure Hydrochlorid-Lösung hinzugegeben
Dauer bis zur Farbreifung	Bis 30 Min.	Ca. 5-6 Min.	Hypothese: Die Wöhlk-Probe dauert länger, weil das farbstoffbildende Amin erst noch erzeugt werden muss
Farbeindruck mit 1,4-verknüpften Disacchariden	Lachsrot	Kirschrot	Hypothese: Das Chromophor des Wöhlk-Farbstoffes ist durch einen noch unbekannten ²⁴ Effekt blauverschoben
Farbeindruck mit reduzierenden Monosacchariden	Gelb	Gelb	Kein Unterschied
Farbeindruck mit nicht-reduzierenden Zuckern	Farblos	Farblos	Kein Unterschied
Maximum im Vis-Bereich	527 nm (idealerweise; oft Abweichungen)	540-541 nm (wird zuverlässig erreicht)	Hypothese: Die Methylgruppe des Methylamins führt beim Fearon-Chromophor zu einer Rotverschiebung

Ein anderer Grund für das häufige Misslingen könnte in dem komplizierteren Ablauf der Wöhlk-Probe bestehen: Schon 1942 vermutete Fearon, dass der rote Farbstoff durch ein Amin erzeugt wird, das bei seiner Methode *von vornherein* vorhanden ist, während es bei der

²⁴ Evtl. handelt es sich um ein sauerstoffhaltiges Amin, das aus einem Kohlenhydrat-Fragment und Ammoniak gebildet wird.

Wöhlk-Probe und bei der Umikoff'schen Reaktion erst noch aus Ammoniak und Fragmenten des Zuckerabbaus *erzeugt* werden muss:

„I have found these ammonium hydroxide tests erratic and untrustworthy. When positive, they are probably due to the formation of an amine (...) and subsequent reaction between the amine and the carbohydrate“ (Fearon 1942, S. 132).

Ein möglicher Kandidat für das in Frage kommende Fragment aus dem Zuckerabbau ist Methylglyoxal (Abbildung 34 links), das beim alkalischen Zuckerabbau auftritt (Telegdy Kováts et al. 1970). Dieses Fragment könnte mit Ammoniak zu einem Amin reagieren (Fearon 1942). Methylglyoxal könnte reduktiv mit Ammoniak zu 1-Amino-2-propanon reagieren, ggf. kommt aber ein anderes, noch nicht näher bekanntes Kohlenhydratfragment in Frage. Um diese Frage zu klären, wäre eine weitere experimentelle Arbeit erforderlich, da keine Literatur hierzu gefunden werden konnte.



Abbildung 34: Methylglyoxal (links), 1-Aminopropanon (rechts)

Experiment 5: Sind Wöhlk-Probe und Fearon-Test dieselbe Reaktion?

Geräte: Eine auf 70 °C eingestellte Heizplatte, ein 1000-mL-Becherglas, ein Thermometer (Messbereich bis 100 °C), Spatel, Wägebapier, Waage (Messgenauigkeit 0,001 g), Einmalpipetten 3 mL, 12 baugleiche Reagenzgläser, Reagenzglashalter.

Chemikalien: Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$), Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$), Fearon's Reagenz, demin. Wasser, Kohlenhydrate gemäß Tabelle 7.

Vorgehensweise: Im Becherglas werden 300 ml demin. Wasser (verhindert Kalkbildung) auf 70 °C aufgeheizt. Die eingewogenen Kohlenhydrate gemäß Tabelle 7 werden in jeweils 2 mL demin. Wasser gelöst. Die Reagenzgläser 1-6 erhalten zusätzlich jeweils 2 mL Ammoniaklösung sowie 3-5 Tropfen Kalilauge, die Reagenzgläser 7-12 erhalten jeweils 2 mL Fearon's Reagenz²⁵. Alle Proben werden gleichzeitig in das Wasserbad gegeben, die Startzeit und die Farbreifung werden notiert.

²⁵ Fearon's Reagenz: 1,25 g Methylamin-Hydrochlorid und 5 g NaOH, mit demin. Wasser aufgefüllt auf 500 mL

Ergebnis: siehe Abb. 35 sowie Tabelle 7.

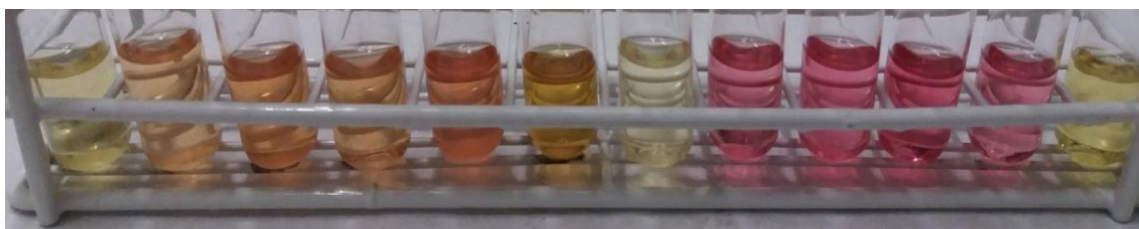


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 35: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich (siehe Tabelle 7)

Bemerkungen: Die Proben mit 4,6-O-Benzyliden-Glucose riechen auffällig nach Benzaldehyd, die Proben mit 4,6-O-Ethylidenglucose haben einen stechenden Geruch wie Acetaldehyd. Dies deutet darauf hin, dass die Schutzgruppen im späteren Versuchsablauf abgespalten werden.

Tabelle 7: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich, Wasserbad, 70 °C				
Nr.	Beschreibung	Menge in g	Farbeintritt nach Minute	Farbreifung bei Minute
1	Glucose / Wöhlk-Test	4	7	8
2	4,6-O-Ethylidenglucose / Wöhlk-Test	4	5	6
3	4,6-O-Benzylidenglucose / Wöhlk-Test	4	5	6
4	Lactose / Wöhlk-Test	8	9	12
5	Lactulose / Wöhlk-Test	8	6	7
6	Fructose / Wöhlk-Test	4	5	6
7	Glucose / Fearon-Test	4	4	5
8	4,6-O-Ethylidenglucose / Fearon-Test	4	2	3
9	4,6-O-Benzylidenglucose / Fearon-Test	4	2	3
10	Lactose / Fearon-Test	8	4	5
11	Lactulose / Fearon-Test	8	2	3
12	Fructose / Fearon-Test	4	3	4

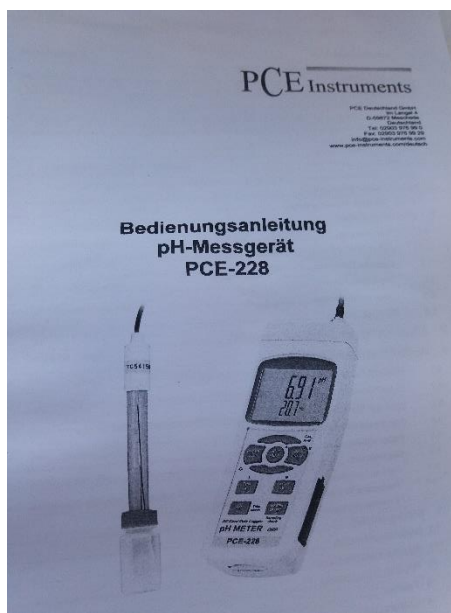
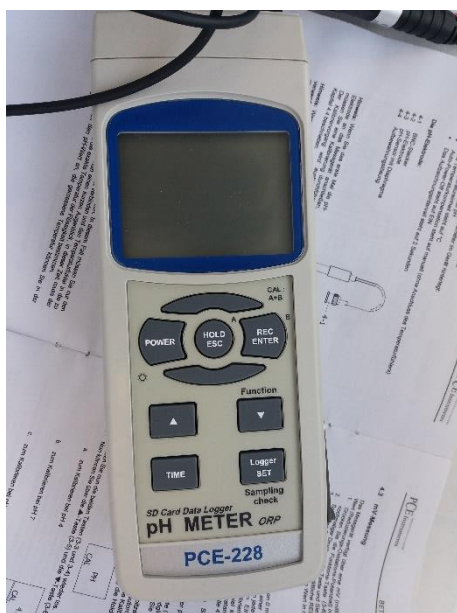
Wie die Abbildung und die Beschreibung der Versuchsabläufe zeigen, sind Wöhlk-Probe und Fearon-Test sehr verwandte Reaktionen. Die Unterschiede ergeben sich durch den Einsatz unterschiedlicher Stickstoff-Komponenten.

Die Hypothese von Fearon, dass letztlich ein Amin zur Farbstoffbildung führt, welches bei der Wöhlk-Probe erst noch aus Fragmenten des alkalischen Zuckerabbaus hergestellt werden muss, während es beim Fearon-Test von vornherein vorhanden ist, würde viele Auffälligkeiten bei den Unterschieden erklären und ist daher sehr plausibel.

4.1.8 Die Entstehung des roten Farbstoffs in Abhängigkeit vom pH-Wert

Bereits 1976 hatte der amerikanische Lebensmittelchemiker Nickerson mit seiner Arbeitsgruppe die Auswirkungen des pH-Werts auf die Farbgebung des Fearon-Tests untersucht (Nickerson et al. 1976). Diese Ergebnisse sollen mit einem pH-Meter, das speziell für den stark alkalischen Bereich geeicht ist, nachvollzogen werden.

Zum Einsatz kam das pH-Meter PCE 228 des Herstellers PCE-Instruments (siehe Abbildung unten). Die Abstimmung des Geräts erfolgt durch elektronische Feinjustierung und Eintauchen der pH-Sonde in eine Lösung, die mit einem speziellen Kalibrierungsreagenz des Herstellers erstellt wurde.



Fotos: Ruppertsberg

Abbildung 36: pH-Meter PCE-228, Hersteller: PCE-Instruments

Experiment 6: Welchen Einfluss hat der pH-Wert auf die Farbstoffbildung?

Geräte: pH-Meter PCE 228 des Herstellers PCE-Instruments, Bechergläser, 10 Reagenzgläser, Reagenzglasständer, UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Quarzküvette 1 mm, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), Natronlauge ($c = 4 \text{ mol/L}$), Salzsäure ($c = 0,5 \text{ mol/L}$), Fearon-Reagenz (siehe 6.2.3 Herstellung von Fearon's Reagenz als Fertiglösung), Lactose (8 mg pro Reagenzglas), Ethanol zum Säubern der Küvetten, Natriumsulfit zum Stabilisieren der Farbe.

Durchführung: Es wurden in Anlehnung an den Test von Nickerson (Nickerson et al. 1976) zehn Proben vorbereitet, in denen die pH-Werte gemäß Tabelle 8 vor Beginn der Reaktion eingestellt wurden.

Die aus Standardlösungen zubereitete Probe ist Probe Nr. 6; die saureren Lösungen wurden durch Hinzutropfen von Salzsäure ($c = 0,5 \text{ mol/L}$) erhalten, die alkalischeren durch Hinzutropfen von Natronlauge ($c = 4 \text{ mol/L}$).

Tabelle 8: pH-Abhängigkeit der Farbausreifung beim Fearon-Test		
Probe	Nickerson 1976	Ruppersberg 2019
1	10,75	11,70 *
2	11,70	12,19 *
3	12,50	12,50
4	12,70	12,70
5	12,80	12,80
6	12,90	12,90
7	13,00	13,00
8	13,15	13,15
9	13,25	13,25
10	13,28	13,29

Da jeweils ein Tropfen ausreichte, um den pH-Wert messbar zu ändern, konnten die Originalwerte von Nickerson in zwei Proben (Nr. 1 und 2, siehe Tabelle 8) nicht exakt reproduziert werden, was aber keine Rolle spielt, da der betroffene Bereich am Rand liegt und farblos ist.

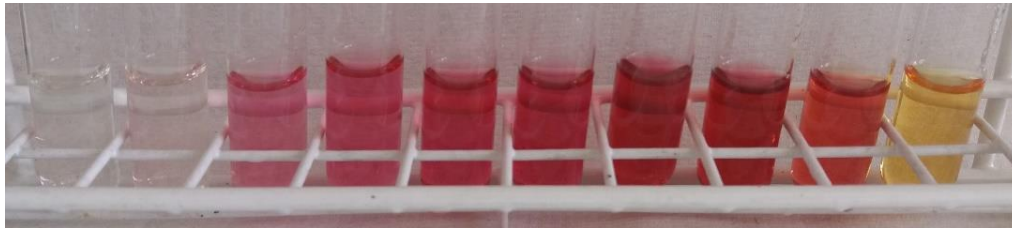


Foto:
Ruppersberg

Abbildung 37: pH-Abhängigkeit: Proben 1 bis 10 (v.l.n.r.) nach der Farbreifung

Nach einer Farbreifung von 20 Min. im Wasserbad bei 65 °C wurden alle Proben mit jeweils ca. 30 mg Natriumsulfit zur Farbstabilisierung versetzt.

Die Bezeichnung der Proben erfolgt nach folgender Codierung: „n1vis“ in Abb. 38 bedeutet: „Nickerson-Experiment Tabelle 8 Probe 1 mit Messung im Vis-Bereich“.

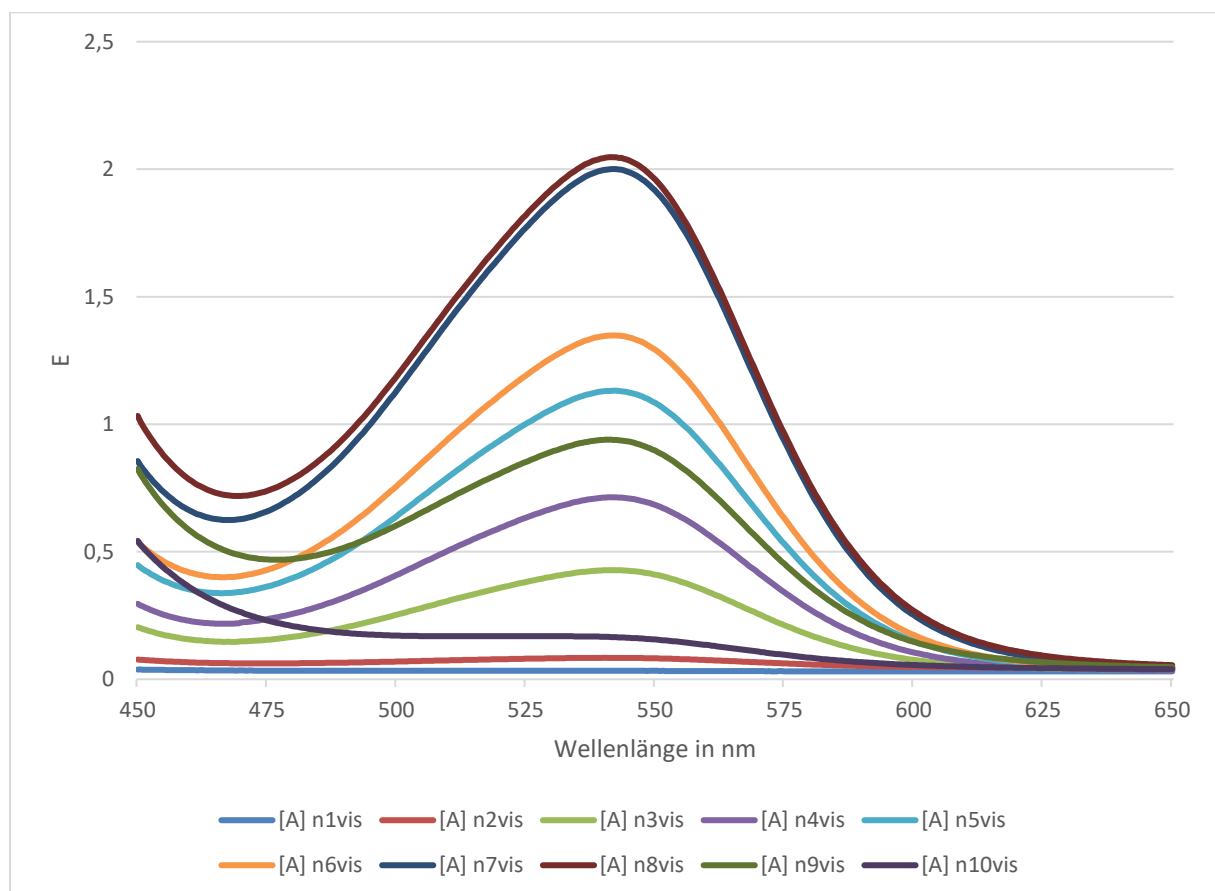


Abbildung 38: pH-Abhängigkeit: Proben n1 bis n10 im Vis-Bereich

Ergebnis: Bei der Überlagerung der Kurven in Abbildung 38 zeigt sich deutlich, dass erst ab Probe 3 (pH 12,50) die Bildung eines Maximums bei 541 nm zu erkennen ist. Dieses Maximum vergrößert sich bis zu Probe 8 (pH 13,15), um dann bei den verbleibenden Proben 9 und 10 (pH 13,25 bzw. 13,29) wieder abzusinken, und zwar unterhalb dasjenige des Wertes von Probe 5 bzw. 3.

Die Farbbildung beginnt also erst bei pH 12,5 und hat ihr Optimum bei pH 13,15.

Bei pH 13,25 findet zwar auch noch eine Farbbildung statt, aber deutlich schwächer als bei 13,15. Für die Herstellung von Fertiglösungen bedeutet dies, dass zur Vermeidung von zu niedrigen pH-Werten der pH-Wert der Fertiglösung mit einem kalibrierten pH-Meter überprüft werden muss. Steht ein solches Gerät nicht zur Verfügung, so ist zur Sicherheit zumindest die Einwaage der NaOH- oder KOH-Plätzchen²⁶ sehr genau zu kontrollieren.

Lagerung im Labor und Klima ergeben weitere Abweichungen, wodurch die Kontrolle des pH-Werts ein weiteres Mal wichtig erscheint.

Um die Korrelation von Maxima im UV-Bereich zu zeigen, wurden Messungen im Bereich 250-650 nm durchgeführt. Wie schon zu erwarten, war die Absorption im UV-Bereich weit über 1, so dass die Proben zur Messung dieses Bereiches mit Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) verdünnt werden mussten. Die 1:3 verdünnten Proben tragen die Namen 11-20 (Abbildung siehe unten).

Erläuterung zu Abb. 39: Die Bezeichnung der Proben erfolgt nach folgender Codierung:

„n11uv“ bedeutet: „Nickerson-Experiment Tabelle 8 Probe 1 mit Messung im UV-Bereich“.

Obwohl alle Proben mit jeweils 8 mg Lactose begonnen wurden, ist die Ausprägung der Maxima sehr unterschiedlich. Im pH-Bereich 11,7 bis 13,29 zeigt sich die starke pH-Abhängigkeit der Farbreaktion:

- Die Proben n11uv und n12uv lassen noch keine Bildung von Maxima im UV- und Vis-Bereich erkennen.
- Das in Probe n13uv erstmals auftretende Maximum im UV-Bereich bei 320 nm entwickelt sich weiter und erreicht ein Maximum bei Probe n18uv, parallel dazu entwickelt sich ein zweites Maximum bei 541 nm.
- Die Proben n19uv und n20uv verdeutlichen den Abfall der Maxima, wenn das pH-Optimum überschritten ist.

²⁶ Bei KOH-Plätzchen beträgt der Wassergehalt je nach Angabe des Herstellers teilweise 20 Gewichtsprozente.

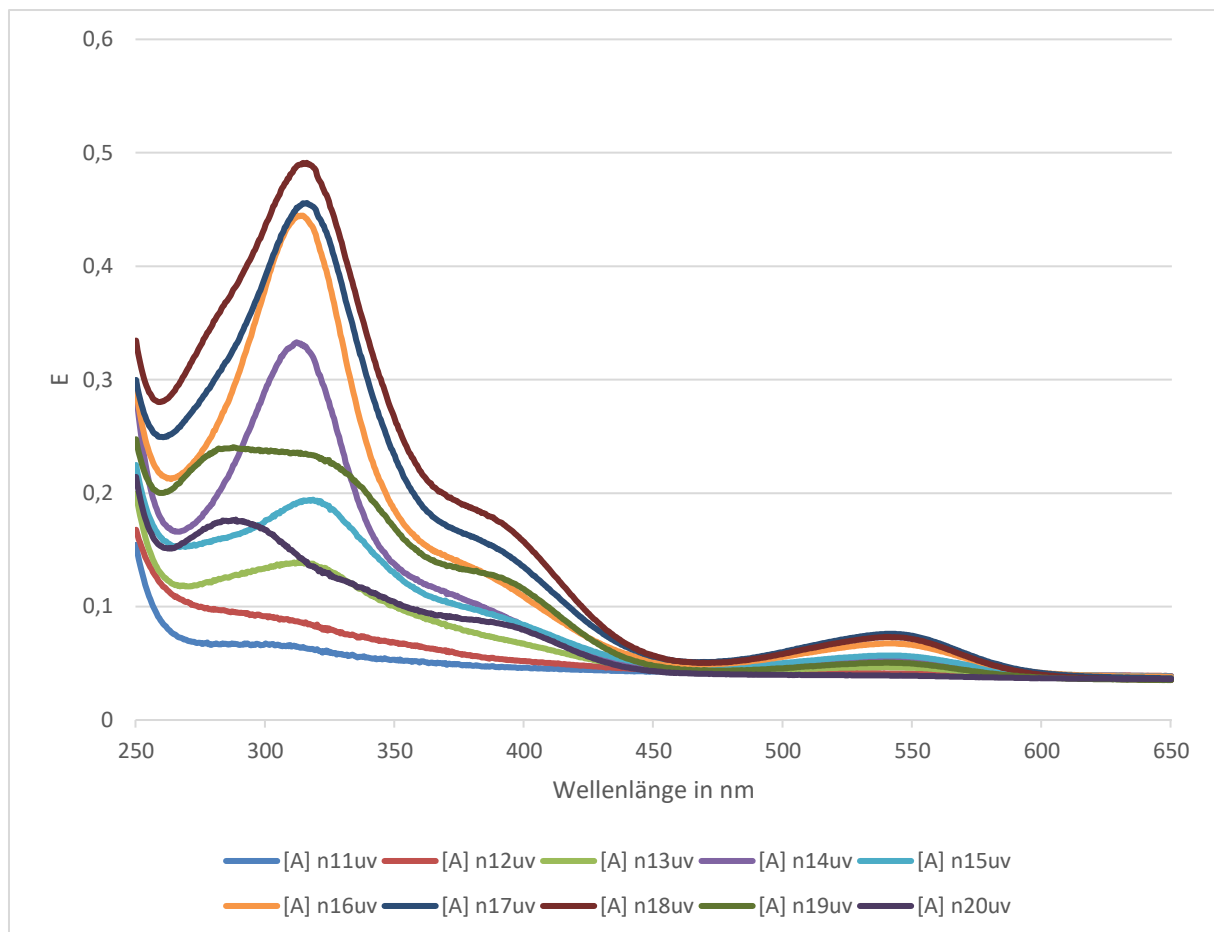


Abbildung 39: Proben wie in Abb. 38, aber in dreifacher Verdünnung, UV-Vis, 1 mm-Küvette

4.2 Variationen der Amino-Komponente

Die ersten systematischen Experimente zur Untersuchung verschiedener Amino-Komponenten wurden im Jahre 1900 von Nadine Sieber in St. Petersburg an Muttermilch, Kuh-, Büffel-, Ziegen- und Schafsmilch sowie Milchzuckerlösungen durchgeführt und publiziert (Sieber 1900). Im Folgenden werden diverse Amine in einem systematischen Ansatz mit standardisierten Zuckerlösungen zur Reaktion gebracht und UV-Vis-spektroskopisch untersucht.

4.2.1 Farbstoffbildung mit Methylamin in Abhängigkeit von der Zeit

Mit dem Zubehör „Temperierbarer Küvettenhalter“ (siehe Abbildung 28ff.) der Firma Analytik Jena zum UV-Vis-Spektrometer Specord 50 plus wurde zunächst ein ganz normaler Fearon-Test von Methylamin-Hydrochlorid und Lactulose durchgeführt, um die Veränderung des Maximums bei fortschreitender Zeit zu beobachten und zu messen.

Experiment 7: Wie verhält sich Methylamin im Zeitrahmen von 20 Minuten?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzglas, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: demin. Wasser, 8 mg Lactulose, 4 mL Fearon-Reagenz, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert.

Dann werden 8 mg Lactulose und 4 mL Fearon-Reagenz in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis die Lactulose gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in Abb. 40.

Ergebnis: Es zeigt sich, dass sich zunächst UV-absorbierende Substanzen im Bereich von 296-300 nm bilden. Erst dann, wenn diese eine so hohe Konzentration erreicht haben, dass die Extinktion über 1 hinausgeht, bildet sich ein zweites Maximum im Vis-Bereich bei 540-541 nm aus (siehe Abbildung unten, vergrößerter Ausschnitt des Vis-Bereiches).

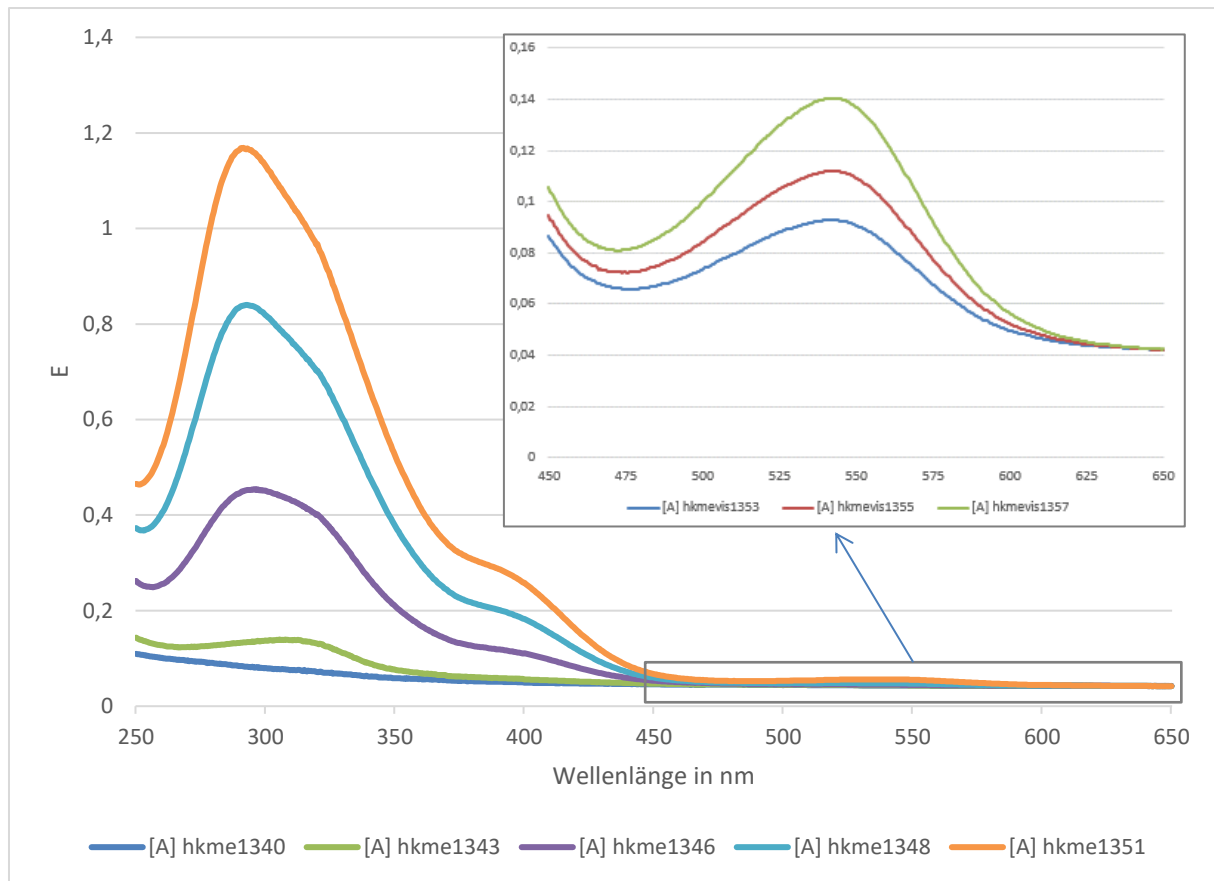


Abbildung 40: Fearon-Test (Methylamin, Lactulose), Zahlengruppe = Uhrzeit

Erläuterung zu Abbildung 40: Die jeweiligen Uhrzeiten sind in den Namen der Proben als Zahlengruppe codiert, z. B. hkme1340: „Heizküvette mit Methylamin, Zeitpunkt 13:40 Uhr“. Die obige Abbildung zeigt, dass in den ersten 10 Minuten ein Maximum im UV-Bereich ausgebildet wird, welches schnell anwächst. Dies verdeutlichen die Kurven zu den Proben hkme1340 (Start), hkme1343 (3 Min. nach Start), hkme1346 (6 Min. nach Start) und hkme1348 (8 Min. nach Start). Probe hkme1351 erreicht schon einen Wert oberhalb von 1. Zur Vermeidung von „verrauschten“ Messwerten wird ab diesem Zeitpunkt nur noch der Vis-Bereich gemessen (ab Probe hkmevis1353 – 13 Min. nach Start).

Es bildet sich ein zweites Maximum bei 540 nm, das bei fortschreitendem zeitlichem Reaktionsverlauf bis 17 Min. nach dem Start – Probe hkmevis1357 - weiter anwächst. Anschließend sinken die Werte wieder, was auf die Unbeständigkeit und den Zerfall des Farbstoffs hindeutet.

4.2.2 Farbstoffbildung mit Ethylamin und Ethanolamin

Zur Untersuchung weiterer Aminokomponenten folgt nun eine Reihe weiterer Experimente, die in systematischer Vorgehensweise mit Aminen beginnt, die zwei Kohlenstoffatome besitzen.

Ethylamin ist ebenso wie Methylamin ein Gas und wird zur leichteren Handhabung als Ethylamin-Hydrochlorid gehandelt. Ethanolamin ist eine Flüssigkeit.

Für den ersten Test (Experiment 8) wurden 4 mg Ethylamin-Hydrochlorid und 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose eingewogen und mit Natronlauge auf pH 13 eingestellt.

Für den zweiten Test (Experiment 9) wurden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose eingewogen und mit Natronlauge auf pH 13 eingestellt, dann wurden mit der Mikroliterpipette 20 µL Ethanolamin hinzugegeben.

Experiment 8: Wie reagiert Ethylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 4 mg Ethylamin-Hydrochlorid, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 4 mg Ethylamin-Hydrochlorid in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist.

Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und auf einem Speichermedium abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in Abbildung 41.

Ergebnis: Die Reaktion verläuft in gleicher Weise wie in Experiment 7. Das Maximum im Vis-Bereich liegt ebenfalls bei 541 nm und ist damit nicht von Methylamin unterscheidbar.

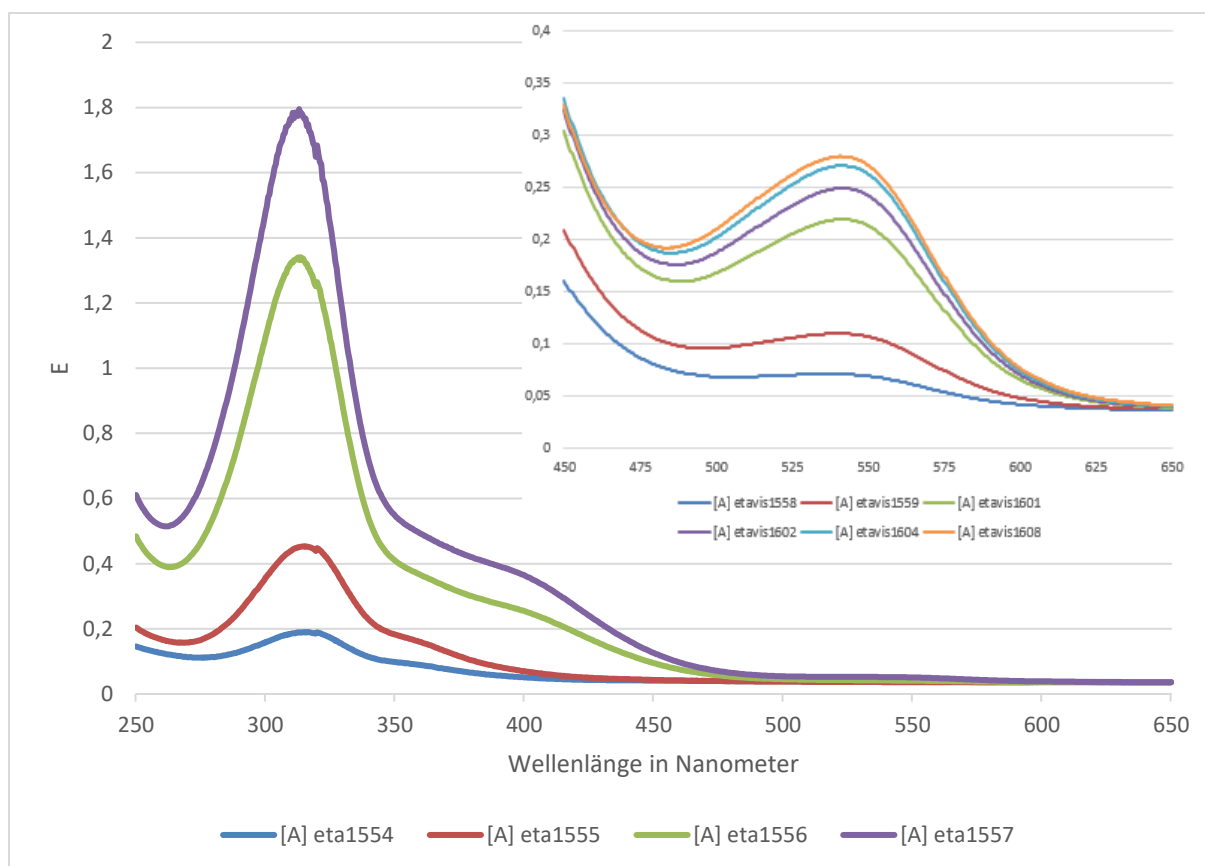


Abbildung 41: Reaktion von Ethylamin mit Ethylidenglucose, Max. (Vis.): 541 nm

Erläuterung zu Abbildung 41: Wie die obige Abbildung zeigt, ist der Reaktionsverlauf mit dem von Methylamin vergleichbar: Zunächst einwickelt sich ein Maximum im UV-Bereich. Sobald dessen Werte über $E = 1$ liegen (Probe eta1556, grüne Kurve), wird es im Vis-Bereich interessant und es prägt sich in der Folgezeit ein immer deutlicher werdendes Maximum bei 541 nm aus. Bei Probe etavis1558 (4 Min. nach Start) ist es gerade erst erkennbar, bei Probe etavis1608 (14 Min. nach Start) ist das Vis-Maximum am stärksten ausgeprägt.

Wegen der um ein Kohlenstoffatom längeren Alkylkette würde das Maximum eigentlich leicht rotverschoben bei >541 nm erwartet, es ist jedoch am selben Platz bei ebenfalls 541 nm.

Experiment 9: Wie reagiert Ethanolamin?

Hypothese: Ethanolamin enthält ein Sauerstoffatom; dieses ist wesentlich elektronegativer (nämlich 3,44 auf der Pauling-Skala) als Kohlenstoff (2,55) und Stickstoff (3,04). In der Nähe der mutmaßlichen konjugierten Doppelbindungen des Farbstoffmoleküls könnte sich durch den elektronenziehenden Effekt des elektronegativeren Sauerstoffatoms eine Blauverschiebung ergeben, d. h. es wäre ein Vis-Maximum von deutlich unter 541 nm zu erwarten.

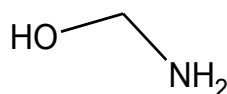


Abbildung 42: Formel von Ethanolamin

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge (c = 0,1 mol/L), demin. Wasser, 20 µL Ethanolamin, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge (c = 0,1 mol/L) und 20 µL Ethanolamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Das Maximum liegt bei 530 nm, siehe Abbildung 43.

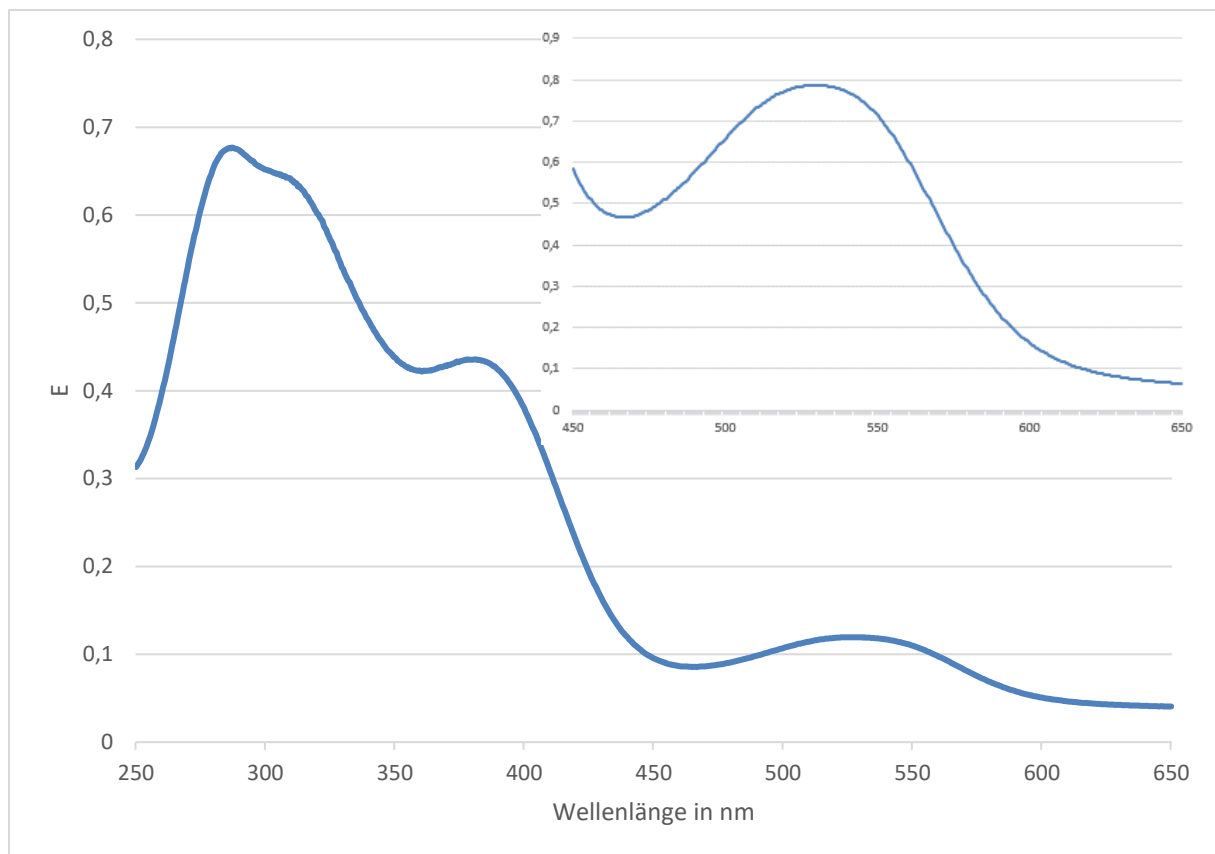


Abbildung 43: 4,6-O-Ethylidenglucose mit 20 µL Ethanolamin, Max. (Vis.): 530 nm

Ergebnis: Die Hypothese, dass das Maximum im Vis-Bereich blauverschoben wird, wurde bestätigt. Statt 541 nm liegt das Vis-Maximum bei 530 nm. Dies lässt sich mit dem elektronenziehenden Effekt des Sauerstoffatoms in der benachbarten Hydroxygruppe begründen.

4.2.3 Verhalten sich die beiden isomeren Propylamine gleichermaßen?

Bei einer Alkylkette mit drei Kohlenstoffatomen ergibt sich das Phänomen der Strukturisomerie, weil die Aminogruppe endständig sein kann, aber sich auch am mittleren C-Atom befinden kann (Abbildung 44). Außer n-Propylamin gibt es daher noch das strukturisomere iso-Propylamin (2-Aminopropan). Ist zu erwarten, dass beide Propylamine einen roten Farbstoff bilden?



Abbildung 44: Die beiden isomeren Propylamine: n-Propylamin (l.), Isopropylamin (r.)

Ein wichtiger Unterschied, der für den Verlauf der Reaktion Auswirkungen haben kann, besteht darin, dass das erste C-Atom, welches auf die Aminogruppe folgt, beim n-Propylamin ein sekundäres C-Atom ist, während beim iso-Propylamin ein tertiäres C-Atom vorliegt.

Experiment 10: Wie verhält sich n-Propylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvette 10 mm , Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge (c = 0,1 mol/L), demin. Wasser, 20 µL n-Propylamin, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert.

Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge (c = 0,1 mol/L) und 20 µL n-Propylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Bei der Überprüfung wurden die Ergebnisse in Abb. 45 erzielt.

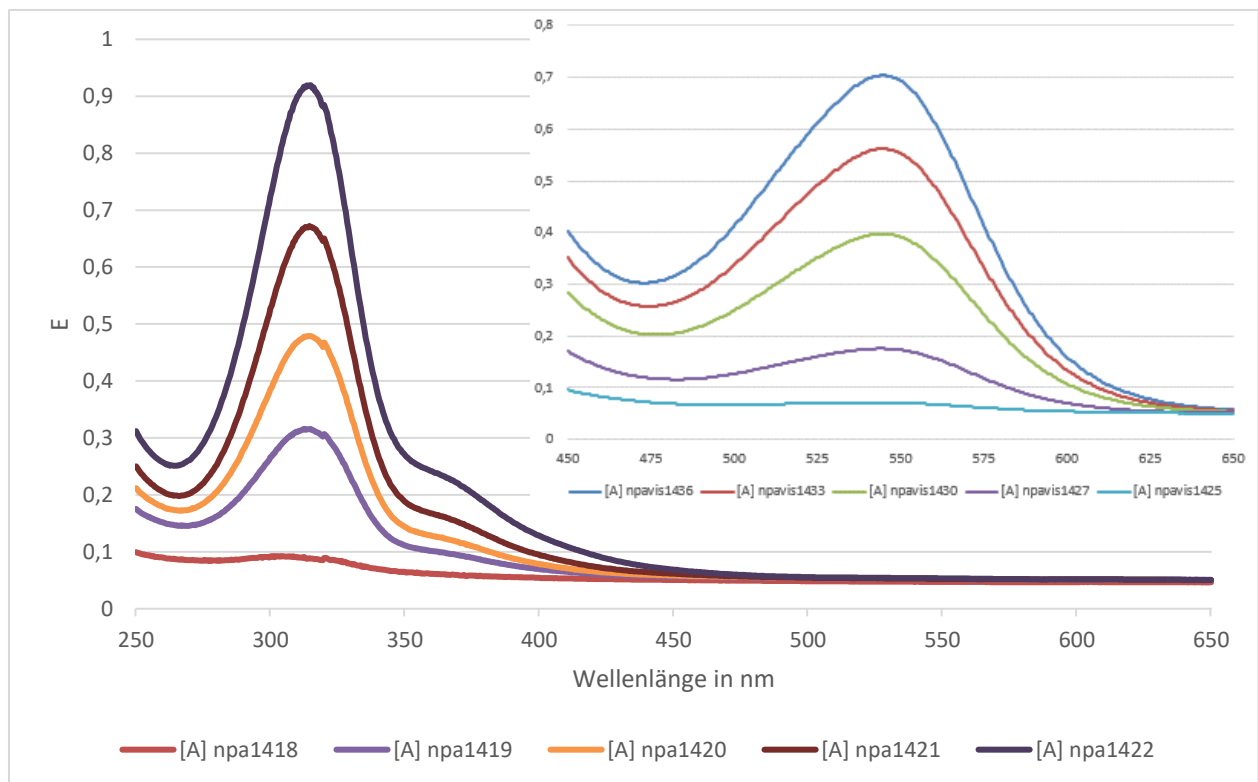


Abbildung 45: 20 μL n-Propylamin und EGLc, UV-Vis, Max. (vis.): 544 nm

Der Start der Reaktion lag bei 14:18 Uhr. Bereits nach einer Minute lassen sich im UV-Bereich erste Intermediate detektieren, nach 4 Minuten wird eine Intensität von mehr als 0,9 erreicht. Zur Vermeidung von „verrauschten Werten“ wird nun lediglich im Vis-Bereich gemessen. Nach 10 Minuten (kleiner Ausschnitt) bildet sich ein Maximum im roten Bereich, das in 18 Minuten eine Intensität von $E=0,7$ erreicht. Es liegt bei 544 nm, ist also im Vergleich zu Methylamin (541 nm) und Ethylamin (ebenfalls 541 nm) leicht rotverschoben.

Erklärung: Die Rotverschiebung lässt sich durch die längere Alkylkette erklären, die einen elektronenschiebenden Effekt auf die chromophore Gruppe ausübt.

Experiment 11: Verhält sich Isopropylamin genauso wie n-Propylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μL Isopropylamin, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 20 μL Isopropylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 46 zu sehen. Das Maximum im Vis-Bereich bleibt aus; auch mit bloßem Auge ist keine Farbstoffbildung zu erkennen. Die Messungen wurden mehrfach wiederholt, um einem Irrtum auszuschließen.

Ergebnis: Während sich bei n-Propylamin ein Farbstoff mit einem leicht rotverschobenen Maximum (544 nm) bildet, gibt es bei iso-Propylamin keinen roten Farbstoff.

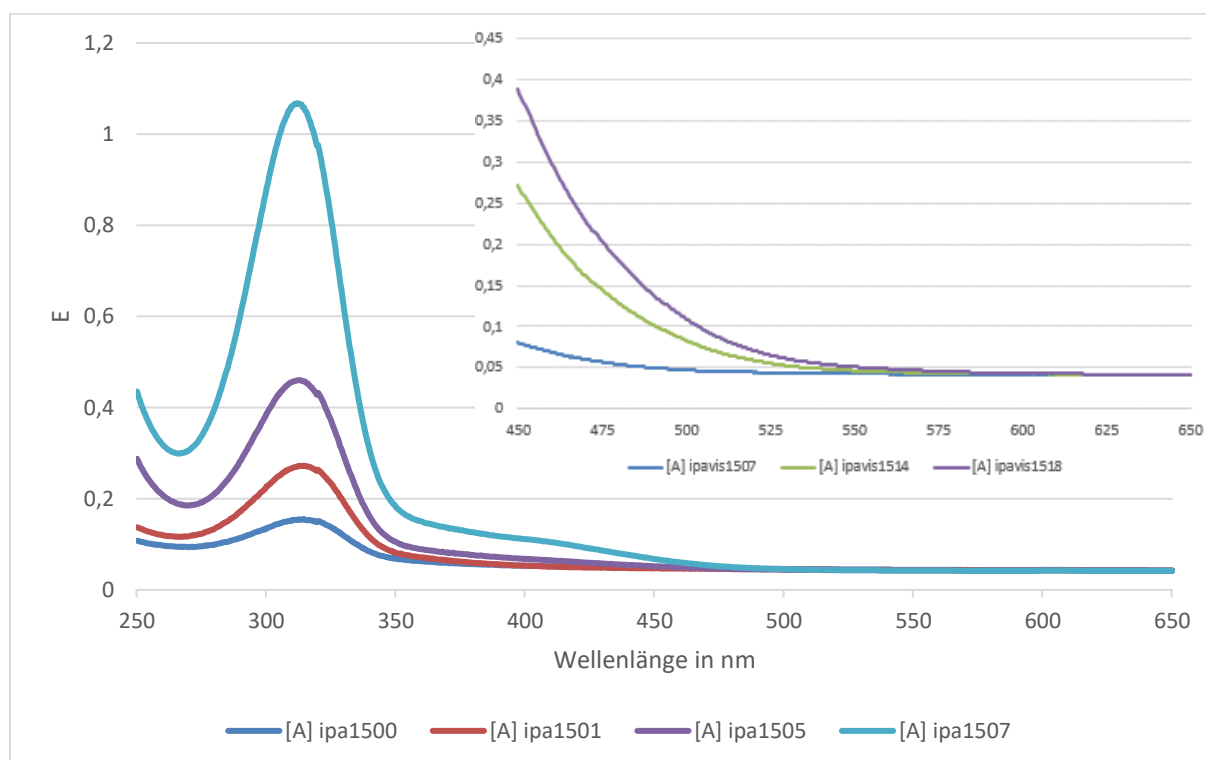


Abbildung 46: 20 μL Isopropylamin und 4 mg Ethylidenglucose, UV-Vis, klein: Vis-Bereich

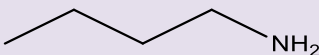
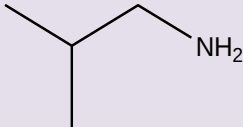
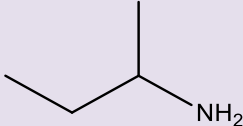
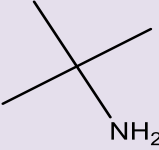
Versuch einer Erklärung, Hypothese: Eventuell ist die Bildung des roten Farbstoffes daran gebunden, dass das C-Atom, welches der Aminogruppe folgt, primär oder sekundär sein muss, nicht aber tertiär (Iso-Propylamin).

Wenn das so ist, dann müsste bei Untersuchung der vier isomeren Butylamine ein ähnlicher Befund auftreten.

4.2.4 Wie verhalten sich die vier isomeren Butylamine?

Butylamin kommt in vier verschiedenen Strukturisomeren vor, von denen zwei Isomere (nBu, IBA) eine $-\text{CH}_2-$ -Gruppe (sekundäres C-Atom mit zwei Wasserstoffatomen) nach der Aminogruppe besitzen (siehe Tabelle 9). Ein Isomeres (SBA) besitzt an dieser Stelle ein tertiäres und eines (TBA) sogar ein quartäres C-Atom.

Hypothese: n-Butylamin (NBA) und iso-Butylamin (IBA) bilden einen analogen Farbstoff wie n-Propylamin, Ethylamin und Methylamin, während sec. Butylamin (SBA) und t-Butylamin (TBA) genau wie iso-Propylamin keinen Farbstoff bilden. Das zur Aminogruppe vicinale C-Atom mit den zwei Wasserstoffatomen wird im Folgenden als „Abstandhalter“ oder „Spacergruppe“ bezeichnet.

Tabelle 9: Hypothesen zur Farbbildung der vier isomeren Butylamine			
Nr.	Namen und Kürzel der Strukturisomeren	Strukturformel	Hypothese zur Farbbildung
1	n-Butylamin nbu		Zur Aminogruppe vicinale CH_2 -Gruppe („Spacer-Gruppe“) ist vorhanden, daher Farbbildung
2	iso-Butylamin (1-Amino-2-Methylpropan) iba		Zur Aminogruppe vicinale CH_2 -Gruppe („Spacer-Gruppe“) ist vorhanden, daher Farbbildung
3	sec. Butylamin (2-Aminobutan) sba		Zur Aminogruppe vicinale CH_2 -Gruppe („Spacer-Gruppe“) nicht vorhanden, daher keine Farbbildung
4	t-Butylamin (2-Amino-2-methylpropan) tbu		Zur Aminogruppe vicinale CH_2 -Gruppe („Spacer-Gruppe“) nicht vorhanden, daher keine Farbbildung

Die in der obigen Tabelle aufgestellten Hypothesen werden im Folgenden experimentell überprüft.

Experiment 12: Verhält sich n-Butylamin genauso wie n-Propylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

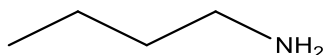


Abbildung 47: Strukturformel von n-Butylamin

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μL n-Butylamin (nbu), 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 20 μL n-Butylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 48 zu sehen.

Ergebnis: Deutlich ist zu sehen, dass ein roter Farbstoff gebildet wird. Das Maximum seiner Absorption im Vis-Bereich liegt bei 545 nm.

Die Spacer-Hypothese ist für dieses Experiment bestätigt.

Die Wellenlänge des Vis-Maximums ist gegenüber n-Propylamin (544 nm) leicht rotverschoben, was mit dem elektronenschiebenden Effekt der längeren Alkylkette erklärt werden kann.

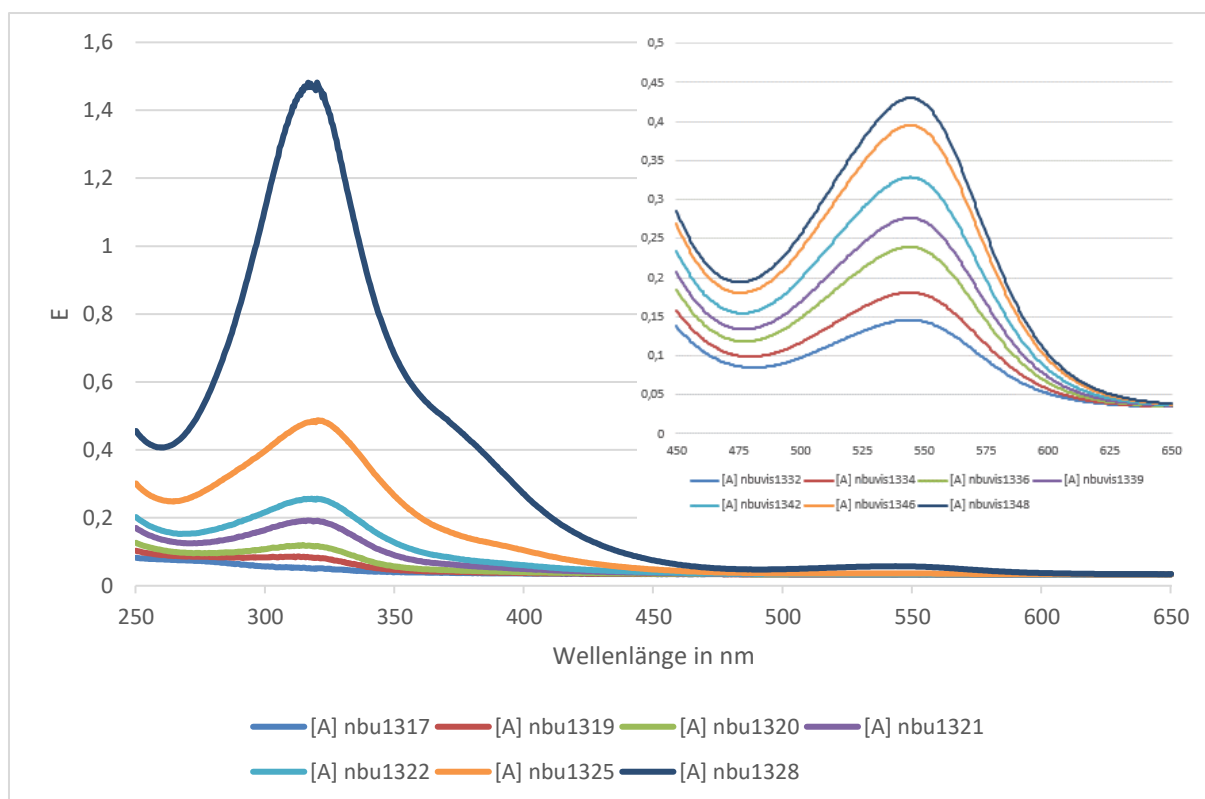


Abbildung 48: 20 μ L n-Butylamin im zeitlichen Verlauf, Max. (Vis.): Max.: 545 nm

Experiment 13: Verhält sich Isobutylamin genauso wie n-Butylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

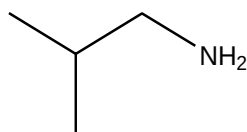


Abbildung 49: Strukturformel von iso-Butylamin (1-Amino-2-Methylpropan)

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μ L Isobutylamin (iba), 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abbildung 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 20 μ L Isobutylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist.

Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 50 zu sehen.

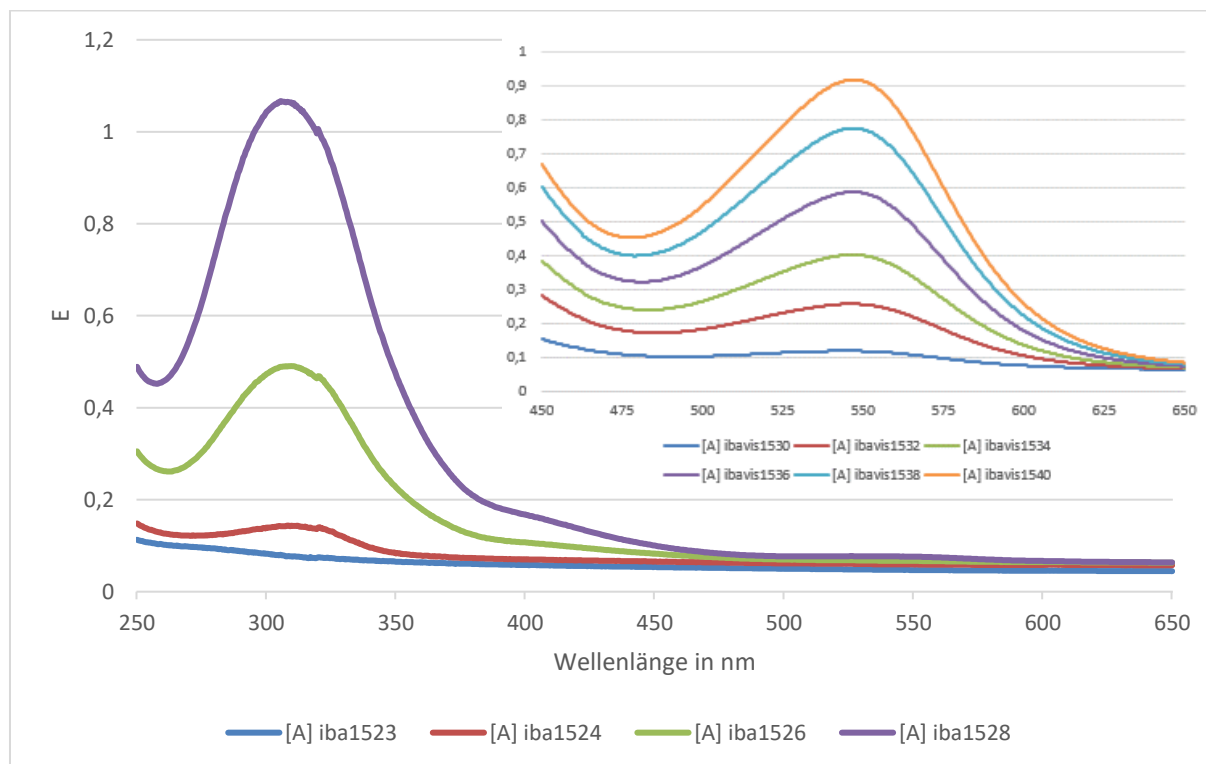


Abbildung 50: 20 μ L Isobutylamin und 4 mg Lactulose, Max. (Vis.): 547 nm

Ergebnis: Der rote Farbstoff wird gebildet. Dieses Ergebnis stützt die Spacer-Hypothese. Das Maximum im Vis-Bereich liegt bei 547 nm und ist somit auch gegenüber dem strukturisomeren aus n-Butylamin gebildeten Farbstoff leicht rotverschoben.

Experiment 14: Verhält sich sec. Butylamin wie n-Butylamin oder wie Isopropylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

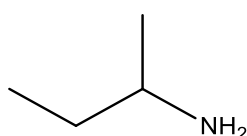


Abbildung 51: Strukturformel von sec. Butylamin (2-Aminobutan)

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, $20 \mu\text{L}$ sec. Butylamin, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65°C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und $20 \mu\text{L}$ sec. Butylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm -Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Beobachtung: Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 52 zu sehen.

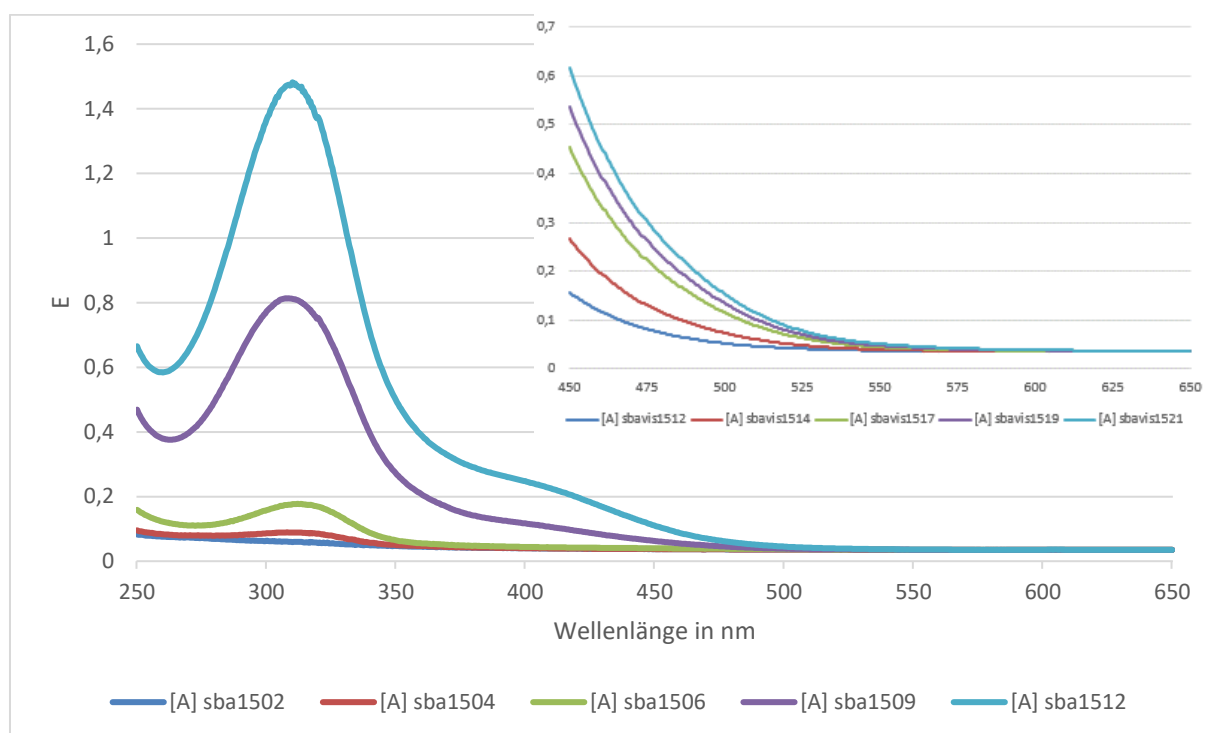


Abbildung 52: $20 \mu\text{L}$ sec. Butylamin mit 4 mg Lactulose, UV-Vis: Kein roter Farbstoff

Ergebnis: Das Maximum im Vis-Bereich bleibt aus; es handelt sich um dasselbe Phänomen wie bei Isopropylamin. Die Spacer-Hypothese ist für dieses Experiment bestätigt.

Experiment 15: Verhält sich t-Butylamin genauso wie sec. Butylamin?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

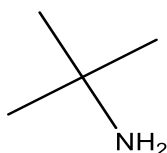


Abbildung 53: Formel von t-Butylamin (2-Amino-2-methylpropan)

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μL t-Butylamin, 4 mg Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg Lactulose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 20 μL t-Butylamin in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

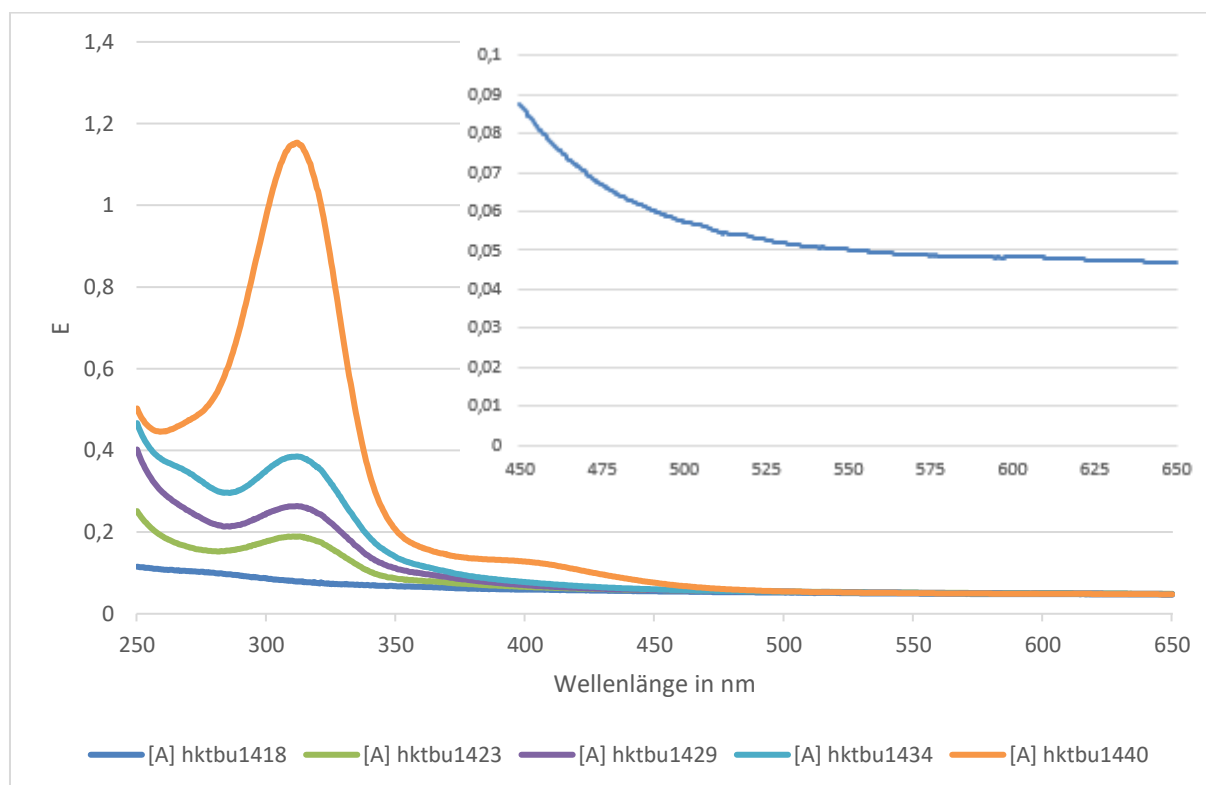


Abbildung 54: 20 μL tert. Butylamin und 4 mg Lactulose, klein: Vis-Bereich, kein roter Farbstoff

Beobachtung: Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 54 zu sehen.

Ergebnis: Das Maximum im Vis-Bereich bleibt aus; es ist kein roter Farbstoff zu beobachten und es handelt sich um dasselbe Phänomen wie bei Isopropylamin. Die Spacer-Hypothese ist auch für dieses Experiment bestätigt.

Fazit der Experimente mit den isomeren Butylaminen:

Wie die Experimente 12-15 zeigen, wurde die Hypothese, die sich aus dem Verhalten der beiden Propylamine ergab, bestätigt: Nur die beiden Butylamine, die über eine Spacer-Gruppe verfügen, bilden den roten Farbstoff. Hingegen bilden sek. und tert. Butylamin keinen roten Farbstoff.

Offensichtlich ist die Bildung eines roten Farbstoffes bei Kettenlängen ab drei C-Atomen an das Vorhandensein einer CH_2 -Spacergruppe geknüpft.

Warum für eine positive Farbreaktion ein Spacer vonnöten ist, kann bislang noch nicht erklärt werden. Eine mögliche Begründung könnte in einer sterischen Hinderung liegen.

4.2.5 Reaktionsverhalten von Amylamin

In dem bereits mehrfach zitierten Artikel von Fearon ist folgendes zu lesen:

*„A positive colour reaction is given by lactose or maltose and an amine of the type $R\text{-CH}_2\text{-NH}_2$, where R represents H , CH_3 , or HOCH_2 . That is to say, the test is positive with methylamine, ethylamine and hydroxyethylamine (colamine). It is negative with higher aliphatic amines, such as **amylamine** and ornithine; also with secondary and tertiary amines, and with cyclic derivatives, such as aniline, cyclohexamine, and both the naphthylamines“* (Fearon 1942, S. 131).

Diese Aussage ist teilweise richtig, teilweise falsch und deshalb sehr interessant:

- Sie beschreibt Amine, auf welche die „Spacer-Regel“ zutrifft: „... the type $R\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ “. Explizit wird die „Spacer-Regel“ von Fearon nicht ausgesprochen, aber mit „the type of...“ deutet sich an, dass er eine Regelmäßigkeit beschreibt.
- Die Aussage zu cyclischen Derivaten trifft zwar für die genannten Verbindungen zu, jedoch hatte Fearon offensichtlich nicht an Benzylamin gedacht. Auf Letzteres trifft die Spacer-Regel zu, somit gibt es mindestens eine cyclische Verbindung, welche eine Farbreaktion durchführt (siehe 12.1.2).
- Auch die Aussage, Amylamin ergäbe keine positive Farbreaktion, kann eigentlich nicht richtig sein, denn sie steht mit der Spacer-Regel im Widerspruch.

Um letztere Aussage zu überprüfen, wurde Amylamin (1-Pentylamin) beschafft und gemäß Tabelle 10 mit verschiedenen Kohlenhydraten getestet.

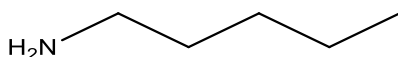


Abbildung 55: Abbildung: Strukturformel von Amylamin (1-Pentylamin)

Experiment 16: Reagiert 1-Aminopentan wie 1-Aminobutan?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), 500 mL-Becherglas, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 1-Aminopentan (jeweils 10 μL), Kohlenhydrate gemäß Tabelle 10 (s.u.), Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert.

Dann werden die Lösungen 21-26 gemäß Tabelle 10 zubereitet und gleichzeitig in das 65 °C heiße Wasserbad gestellt.

Tabelle 10: 1-Pentylamin (10 µL) mit diversen Zuckern in Natronlauge (c=0,1 mol/L)		
Probe	Zucker und Menge	Ergebnis
21	Lactose, 8 mg	Rot
22	Lactulose, 8 mg	Rot
23	Maltose, 8 mg	Rot
24	4,6-O-Ethylidenglucose, 4 mg	Rot
25	Glucose 4 mg	Gelb
26	Saccharose 8 mg	Farblos

Beobachtung: Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 56 und 57 zu sehen.

Ergebnis: Die Maxima im Vis-Bereich (siehe unten) der Proben 21-24 liegen durchweg bei 542 nm.



Abbildung 56: Pentylamin-Proben 21-26 v.l.n.r. nach 15 Min. im Wasserbad bei 65 °C

Foto: Ruppertsberg

Erläuterung zu den Abbildungen 56 und 57:

1-Pentylamin reagiert mit Lactose, Lactulose, Maltose und 4,6-O-Ethylidenglucose zu einem roten Farbstoff. Die Spacerregel ist bestätigt.

Wie bei den anderen farbbildenden Aminen ist auch hier die Reaktion mit Lactulose am schnellsten und am stärksten.

Der Grund könnte darin liegen, dass Lactulose durch die bereits erfolgte Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung schon einen Reaktionsschritt weiter vorangeschritten ist, wodurch

unnötige Nebenprodukte vermieden werden und eine schnellere Farbbildung ermöglicht wird.

Mit Glucose entsteht nur ein gelber Farbstoff, mit Saccharose bleibt die Lösung farblos, auch wenn Amine eingesetzt werden, die mit Lactose usw. den roten Farbstoff bilden.

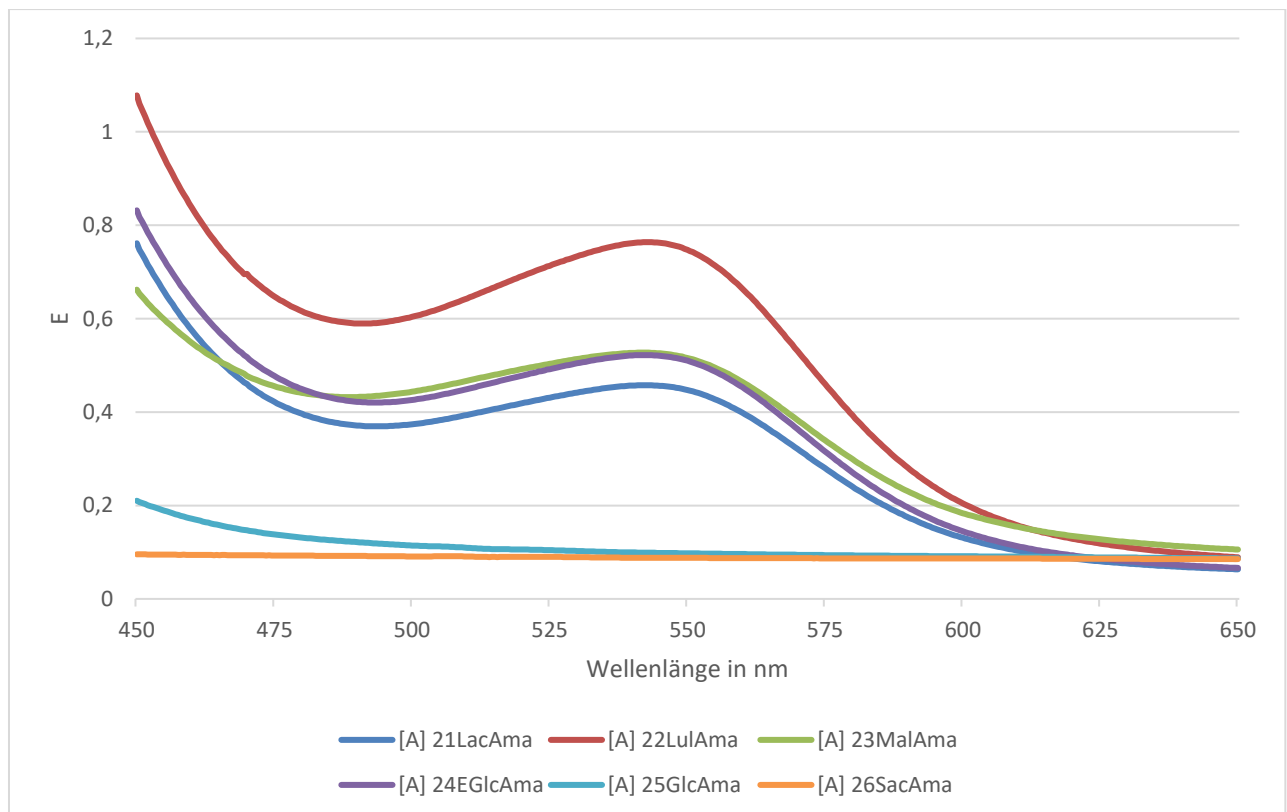


Abbildung 57: Proben gemäß Tabelle 10, Vis-Bereich, Maximum: 542 nm

Wie ist nun die Aussage von Fearon zu bewerten, dass Amylamin keinen roten Farbstoff bilde? Eventuell könnte Fearon mit „Amylamin“ nicht 1-Pentylamin, sondern ein isomeres Amylamin gemeint haben: Zu den drei isomeren Pentanen gibt es acht verschiedene isomere Pentyl(mono)amine, von denen drei eine Spacergruppe besitzen und fünf nicht. Diese Fragestellung weiter zu prüfen ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.2.6 Reaktionsverhalten primärer Diamine

Bislang wurden nur *Mono*-Amine mit einem aliphatischen Rest getestet. Welches Reaktionsverhalten ergibt sich, wenn an *beiden* Enden des Moleküls eine Aminogruppe vorhanden ist?

Eine zur Lösung dieser Frage benötigte Chemikalie ist in vielen schulischen Chemiesammlungen bereits vorhanden, nämlich Hexamethyldiamin (1,6-Diaminohexan, bekannt aus dem „Nylon-Seil-Trick“ bei der Kunststoffherstellung (Verband der Chemischen Industrie e.V. o.J.)).

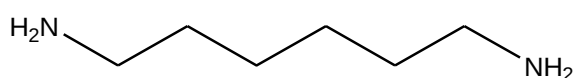


Abbildung 58: 1,6-Diaminohexan, auch bekannt als Hexamethyldiamin

Im Gegensatz zu 1,6-Diaminohexan sind andere primäre Diamine recht schwer zu beschaffen: 1,5-Diaminopentan trägt den Trivialnamen Cadaverin, weil es bei der Zersetzung von Leichen und Tierkadavern durch Decarboxylierung der Aminosäure Lysin entsteht (Habermehl et al. 2008).

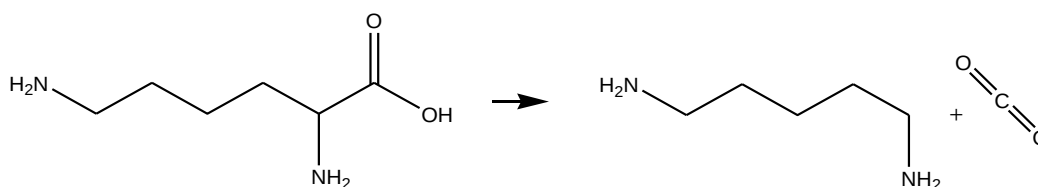
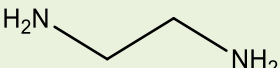
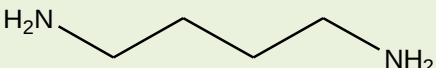
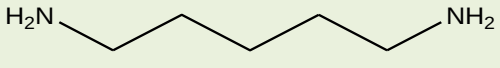
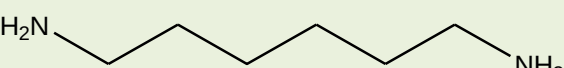


Abbildung 59: Lysin wird zu Cadaverin decarboxyliert

Dieser Stoff riecht extrem unangenehm und wird nur an Forschungslabore geliefert. Eine Endverbleibs-Erklärung ist unterschrieben und abgestempelt an den Chemikalienhändler einzusenden.

Ähnliches gilt für 1,4-Diaminobutan, dessen Trivialname Putrescin sich vom lateinischen Wort für Fäulnis (putor) ableitet. In der Lebensmittelchemie wird die Anwesenheit von Putrescin als Indikator für verdorbene Fleischwaren benutzt (Belitz et al. 2008).

Eine Übersicht der verwendeten primären Diamine befindet sich in Tabelle 11 (unten).

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten primären Diamine		
Nr.	Namen und Strukturformeln der verwendeten primären Diamine	Farbentwicklung bei Reaktion mit Methylamin; in nm: Vis-Maximum
1	1,2-Diaminoethan (Ethylendiamin) 	Hellgelb
2	1,4-Diaminobutan (Putrescin) 	Hellgelb
3	1,5-Diaminopentan  (Cadaverin, Zerfallsprodukt von Lysin)	Rot, 546 nm
4	1,6-Diaminohexan (Hexamethylendiamin) 	Rot, 550 nm

4.2.6.1 Bildung eines roten Farbstoffs mit dem Diamin 1,6-Diaminohexan

1,6-Diaminohexan (auch Hexamethylendiamin genannt, im folgenden Text abgekürzt als DAH) ist eine schulübliche Chemikalie, die routinemäßig für den Nylon-Seil-Trick (Verband der Chemischen Industrie e.V. o.J.) im Rahmen der Kunststoff-Chemie verwendet wird.

Leider verklumpt 1,6-Diaminohexan bei der Lagerung und verklebt oft den Rand des Schraubverschlusses so sehr, dass sich die Vorratsgefäße nur schwer oder gar nicht öffnen lassen.

Hierzu gibt es eine einfache Problemlösung: Man stellt die Vorratsgefäße in ein warmes Wasserbad (wärmer als der Schmelzpunkt 41 °C) und wartet ca. 30 Minuten, bis die Schraubverschlüsse leicht zu öffnen sind (möglichst unter dem Abzug).

Da das Hantieren mit dem Reinstoff wegen des ammoniakähnlichen Geruchs unangenehm und kompliziert ist, empfiehlt sich die Herstellung von 100 mL einer Fertiglösung ($c = 0,025$ mol/L) in Natronlauge ($c = 0,1$ mol/L).

Hierbei sollte der pH-Wert 13 erreicht werden (Ruppersberg und Klemeyer 2020).

Die Menge von 100 mL Fertiglösung reicht für 50 Messungen mit der 4-mL-Küvette, weil immer 2 mL Fertiglösung (Amin in Natronlauge, pH 13 voreingestellt) und 2 mL Zuckerlösung unmittelbar vor der Messung zusammengegeben werden.

Ein früheres Vermischen der Komponenten verbietet sich, weil alle Kohlenhydrate im Alkalischen Umlagerungsreaktionen eingehen, die zu einem vielfältigen Produktgemisch führen und erstmalig 1895 von de Bruyn und van Ekenstein beschrieben wurden (Bruyn und van Ekenstein 1895).

Die Haltbarkeit der Fertiglösung beträgt bei Aufbewahrung in einer Braunglasflasche im dunklen Chemikalienschrank ca. sechs Monate²⁷.

Zur Herstellung der Fertiglösung siehe auch Kap. 6.2.4.



Gefäße mit 1,6-Diamino-
hexan, stark verklumpt

Gefäße für 30 min im
warmen Wasserbad

Austariertes Gefäß auf der
Laborwaage

Fotos: Ruppertsberg

Abbildung 60: Zubereitung einer Fertiglösung von 1,6-Diaminohexan (DAH)

Es reicht, wenn im angewärmten Vorratsgefäß eine kleine Menge des verklumpten 1,6-Diaminohexans flüssig geworden ist. Mit einer Einmalpipette oder Plastikspritze entnimmt man etwa 0,3 mL zur Herstellung der Fertiglösung ($c = 0,025 \text{ mol/L}$). Die Menge von 0,29 g wird in ein austariertes braunes Schraubdeckelglas gegeben, das auf einer Laborwaage steht, und mit 100 mL 0,1 molarer Natronlauge aufgefüllt, um pH 13 zu erreichen.

Berechnung der Stoffmengen:

Molekulargewicht von 1,6-Diaminohexan: 116,21 g/mol, 25 mmol sind 2,9025 g.

Für die Herstellung von 100 mL einer Lösung ($c = 0,025 \text{ mol/L}$) werden 0,29 g verwendet.

²⁷ Eigene Beobachtung; der Verfall der Fertiglösung macht sich durch Trübung, Niederschlag und fehlerhafte Ergebnisse bemerkbar.

Experiment 17: Was passiert, wenn 1,6-Diaminohexan als Amin eingesetzt wird?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Becherglas 300 mL, Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, DAH-Fertiglösung (siehe 7.3.4), Kohlenhydrate gemäß Tabelle 12 (s.u.), Ethanol zum Säubern der Küvette.

Tabelle 12: Reaktionen diverser Kohlenhydrate mit 1,6-Diaminohexan			
Proben-Nr.	Substanz, Abkürzung	Menge in mg	Farbe, nm
1	Lactose, Lac	8	Rot,550
2	Lactulose, Lul	8	Rot,550
3	Maltose, Mal	8	Rot,550
4	Cellobiose, Cel	8	Rot,550
5	4,6-O-Benzylidenglucose, BGlc	4	Rot,550
6	4,6-O-Ethylidenglucose, EGlc	4	Rot,550
7	Glucose, Glc	4	Gelb
8	Fructose, Fru	4	Gelb
9	Galactose, Gal	4	Gelb
10	Gemisch Gal + Glc	2+2	Gelb
11	Saccharose, Sac	8	Farblos
(12)	Lactulose, Lul (bei Raumtemperatur)	8	Rot,550

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden die Lösungen 1-11 gemäß Tabelle 12 zubereitet und gleichzeitig in das 65 °C heiße Wasserbad gestellt.

Beobachtung: Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 61 und 62 zu sehen.

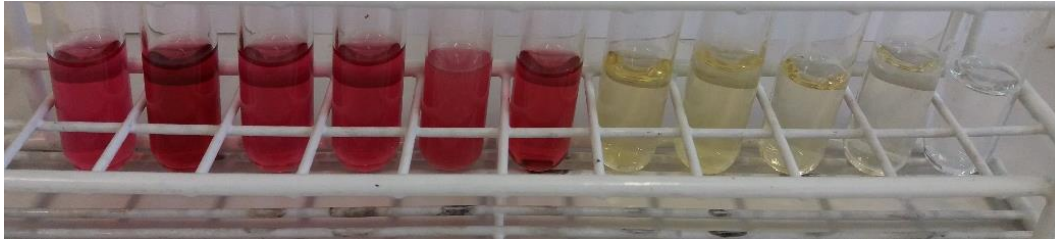


Abbildung 61: Reagenzgläser gemäß Tab. 12 mit DAH, 30 Min. Wasserbad

Foto: Ruppertsberg

Ergebnis und Vorbereitung der UV-Vis-Untersuchung: Die roten Farbstoffe der Proben 1, 3 und 4 (Lactose, Maltose und Cellobiose) haben sich später entwickelt als bei den Proben 2, 5 und 6 (Lactulose, BGlc, EGlc). Die Probe mit Saccharose (ganz rechts) bleibt farblos.

Probe 5 ist trübe und riecht nach Benzaldehyd. Probe 6 riecht stechend nach Acetaldehyd. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Schutzgruppen der geschützten Glucosen während der Reaktion abgespalten worden sind.

Die Maxima im Vis-Bereich (siehe unten) liegen durchweg bei 550 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Proben 1-6 sowie 12 den gleichen Farbstoff bilden. Die Maxima im UV-Bereich sind jedoch sowohl bezüglich der Höhe als auch der Wellenlänge des Maximums sehr unterschiedlich.

Bei Probe 12 (Raumtemperatur-Experiment, violette Kurve) liegen im Vis-Bereich ähnliche Werte wie bei den Proben 1-6 vor, jedoch im UV-Bereich deutlich niedrigere Werte. Außerdem gibt es bei Probe 12 im UV-Bereich statt einem Maximum zwei Maxima, die kurz aufeinander folgen. Für dieses Phänomen gibt es zurzeit keine schlüssige Erklärung.

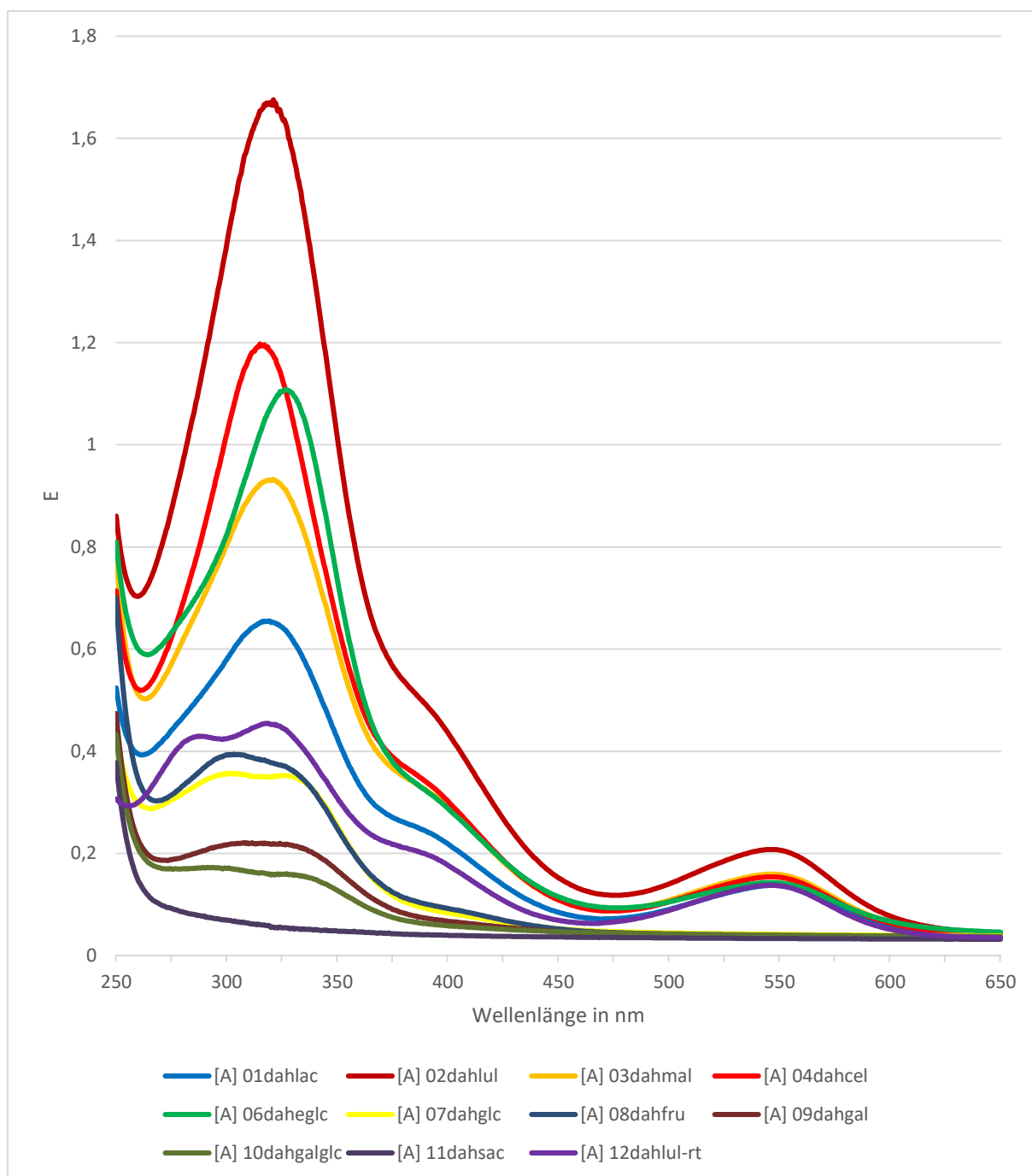
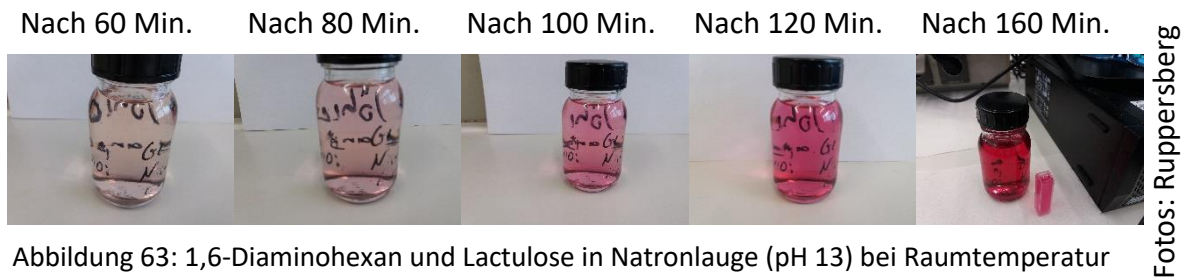


Abbildung 62: Messungen der Diaminohexan-Proben 1-12, Max. (Vis.): 550 nm

4.2.6.2 Reaktion von 1,6-Diaminohexan und Lactulose bei Raumtemperatur

Bei der Zubereitung einer Fertiglösung wurde durch Zufall beobachtet, dass sich auch ohne Erhitzen eine rote Färbung zeigt, wenn **Lactulose** und **1,6-Diaminohexan-Lösung** zusammengegeben werden. Im untenstehenden Beispiel (Abb. 63) wurden 0,29 g 1,6-Diaminohexan mit 0,2 g Lactulose in 100 mL Natronlauge (pH 13) über fast drei Stunden bei Raumtemperatur beobachtet.



Das Phänomen der Farbreifung bei Raumtemperatur wird im folgenden Experiment mit dem UV-Vis-Spektrometer genauer untersucht.

Experiment 18: Wie verläuft die Farbentwicklung mit DAH bei Raumtemperatur?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: DAH-Fertiglösung (siehe 6.2.4), 8 mg Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert.

Dann werden 8 mg Lactulose in 2 mL demin Wasser gelöst und mit 2 mL DAH-Fertiglösung in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den Küvettenhalter eingesetzt. Die Farbentwicklung wurde bei Raumtemperatur im Verlauf von 270 Minuten untersucht.

Beobachtung: Bei der Überprüfung mit UV-Vis-Spektrometrie wurden die Ergebnisse in Abb. 64 erzielt.

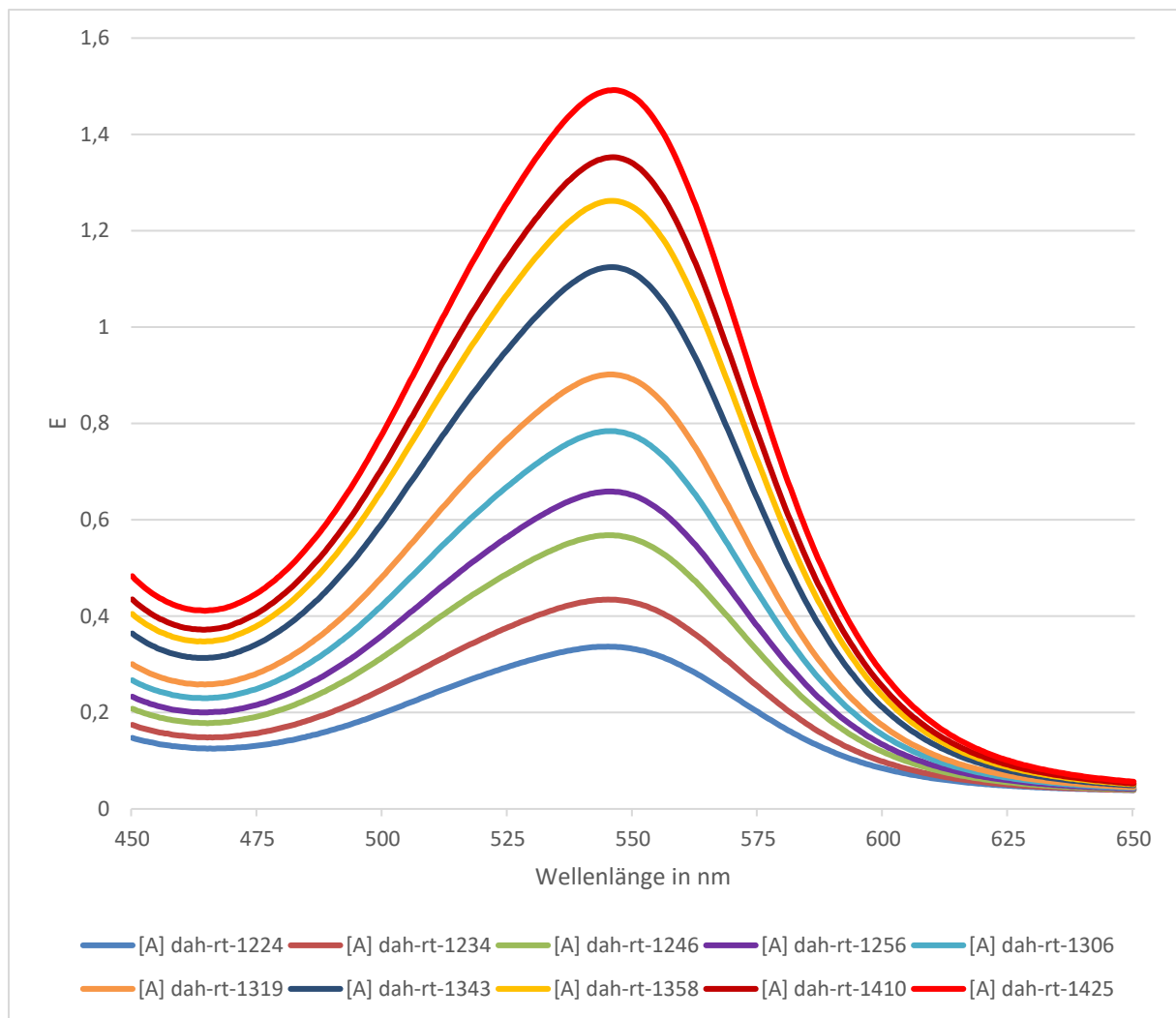


Abbildung 64: Farbentwicklung DAH/Lul bei Raumtemperatur in 270 Min.

Auffällig ist hier nicht nur, dass die Reaktion von 1,6-Diaminohexan und Lactulose bereits bei Raumtemperatur stattfindet, sondern auch, dass über den hier verfolgten Zeitraum von viereinhalb Stunden eine kontinuierliche Intensitätszunahme zu beobachten ist.

Bei anderen Zucker-Amin-Kombinationen (z. B. Lactose mit Ammoniak oder 4,6-O-Ethylidenglucose mit Ethylamin) gab es schon nach ca. 30 Minuten eine Intensitätsabnahme, zurückzuführen auf die Instabilität der roten Farbstoffe.

Nach 270 Minuten war aber auch bei der hier beobachteten Reaktion ein Rückgang der Werte zu detektieren, so dass das Experiment an dieser Stelle beendet wurde.

4.2.6.3 Reaktionsverhalten von 1,5-Diaminopentan (Cadaverin)

Wenn 1,6-Diaminohexan mit Lactulose eine rote Farbe bildet, dann könnte dies bei weiteren Diaminen auch der Fall sein.

Zuerst wurde 1,5-Diaminopentan getestet. Da dieser Stoff bei der Verwesung von Fleisch aus der Aminosäure Lysin entsteht und sehr unangenehm riecht, trägt er den Trivialnamen Cadaverin.

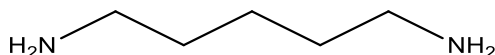


Abbildung 65: Skelettformel von Cadaverin (1,5-Diaminopentan)

Experiment 19: Reagiert 1,5-Diaminopentan wie 1,6-Diaminohexan?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzglas, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μL Diaminopentan, 8 mg Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abb. 28 ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 20 μL 1,5-Diaminopentan mit der Mikroliterpipette in ein Reagenzglas gegeben, in dem sich schon 2 mL Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 8 mg Lactulose in 2 mL demin Wasser befinden.

Es wird sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gelöst hat.

Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in Abbildung 66.

Ergebnis: Die Reaktion verläuft in gleicher Weise wie in Experiment 18. Das Maximum im Vis-Bereich liegt bei 546 nm und ist damit im Vergleich zu 1,6-Diaminohexan um 4 nm

blauverschoben. Dies lässt sich durch die kürzere Alkylkette erklären, die einen geringeren elektronenschiebenden Effekt aufweist.

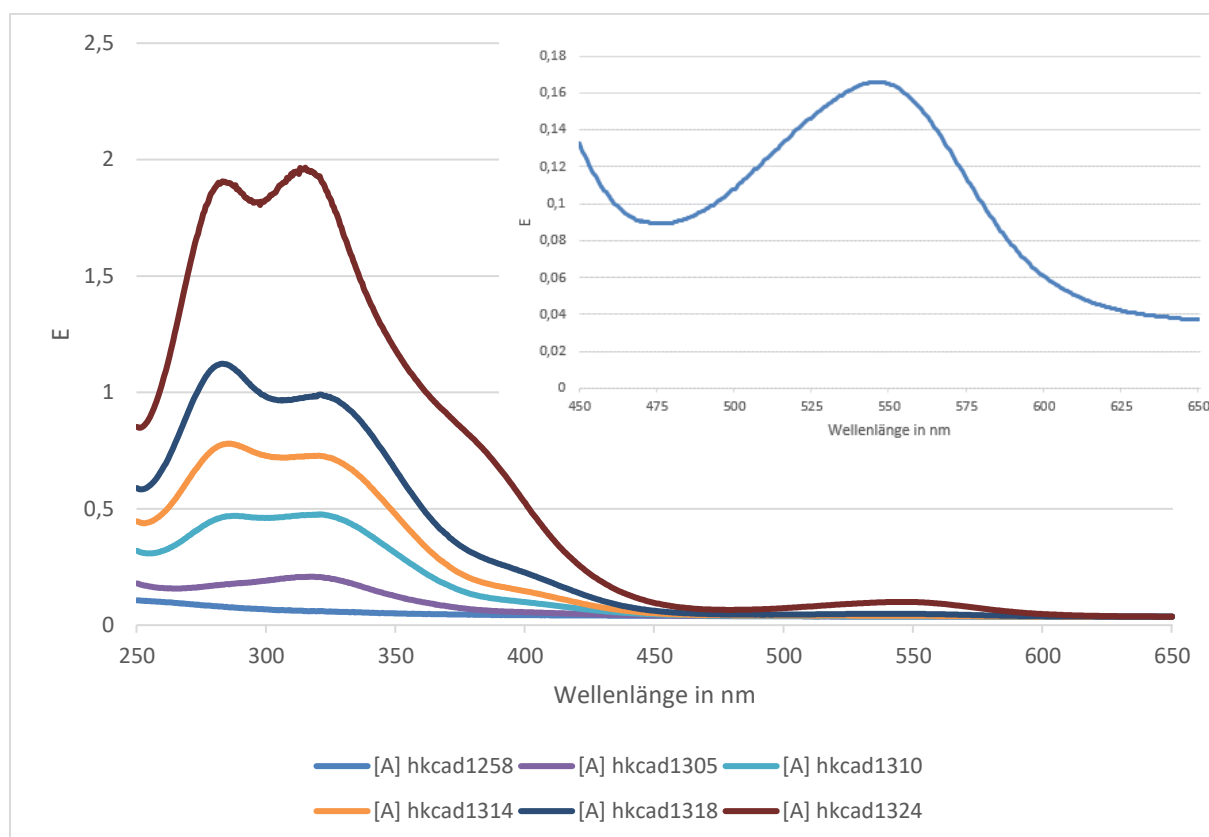


Abbildung 66: Reaktion von 1,5-Diaminopentan mit Lactulose, Max.(Vis.): 546 nm

4.2.6.4 Reaktionsverhalten von 1,4-Diaminobutan (Putrescin)

Das nächstfolgende homologe Diamin ist 1,4-Diaminobutan (Putrescin). Im Unterschied zu den beiden anderen getesteten Diaminen ist Putrescin ein kristalliner Feststoff.

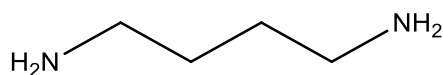


Abbildung 67: Strukturformel von Putrescin (1,4-Diaminobutan)

Experiment 20: Wie verhält sich 1,4-Diaminobutan?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzglas, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 4 mg 1,4-Diaminobutan, 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abb. 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65°C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 1,4-Diaminobutan in ein Reagenzglas gegeben, in dem sich schon 2 mL Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose in 2 mL demin Wasser befinden.

Es wird sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gelöst hat.

Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt.

Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in der folgenden Abbildung.

Ergebnis: Die Reaktion ergibt keinen roten Farbstoff.

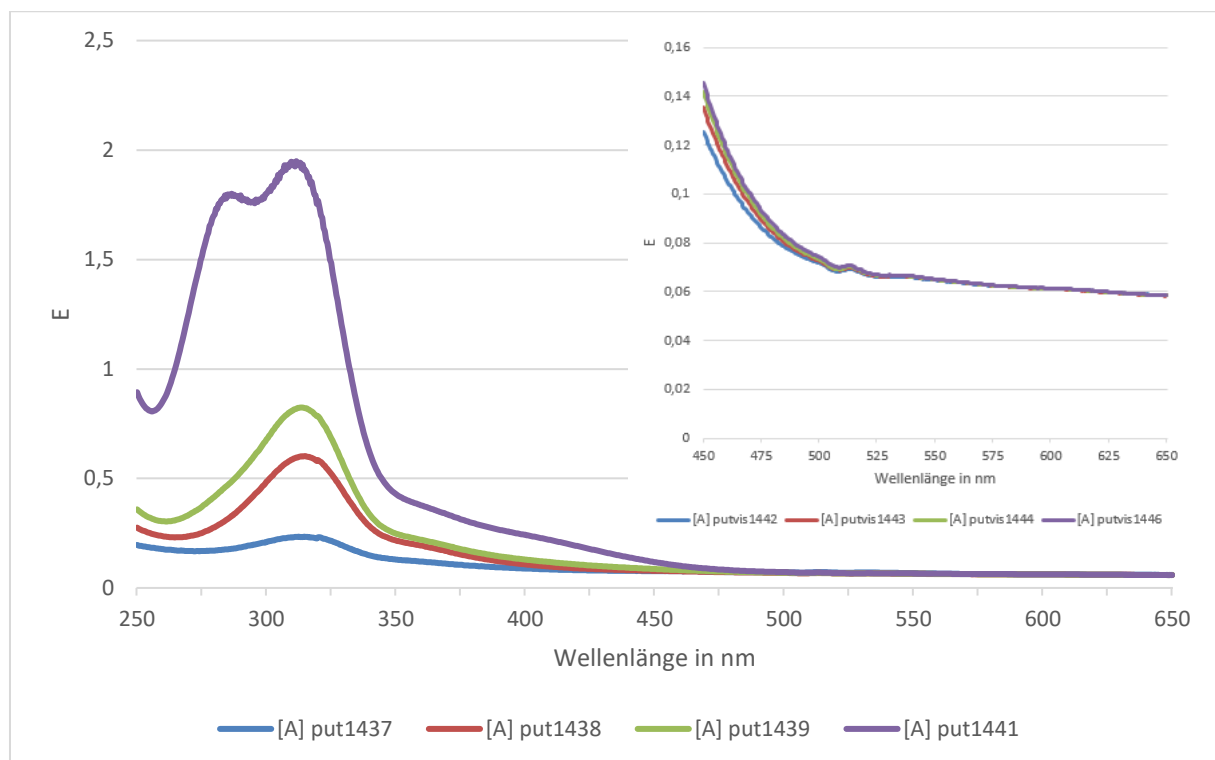


Abbildung 68: Putrescin 4 mg und Ethylidenglucose, kein roter Farbstoff im Vis-Bereich

4.2.6.5 Reaktionsverhalten von 1,2-Diaminoethan

Nach Putrescin (1,4-Diaminobutan) müsste logischerweise zunächst 1,3-Diaminopropan getestet werden. Diese Chemikalie ist aber nur sehr schwer zu beschaffen, und wegen des farblich negativen Ergebnisses bei Putrescin ist bei 1,3-Diaminopropan kein anderer Ausgang zu erwarten. Im Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel war jedoch die nächstkleinere Variante, 1,2-Diaminoethan, vorhanden und wurde folglich auch getestet. Dieser Stoff ist bei Raumtemperatur eine Flüssigkeit.

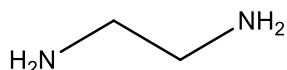


Abbildung 69: Skelettformel von 1,2-Diaminoethan

Experiment 21: Wie verhält sich 1,2-Diaminoethan?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzglas, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 20 μL Diaminoethan, 4 mg Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung und Abb. 28ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 20 μL 1,2-Diaminoethan mit der Mikroliterpipette in ein Reagenzglas gegeben, in dem sich schon 2 mL Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 4 mg Lactulose in 2 mL demin Wasser befinden.

Es wird sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gelöst hat.

Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in der folgenden Abbildung.

Ergebnis: Die Reaktion ergibt keinen roten Farbstoff.

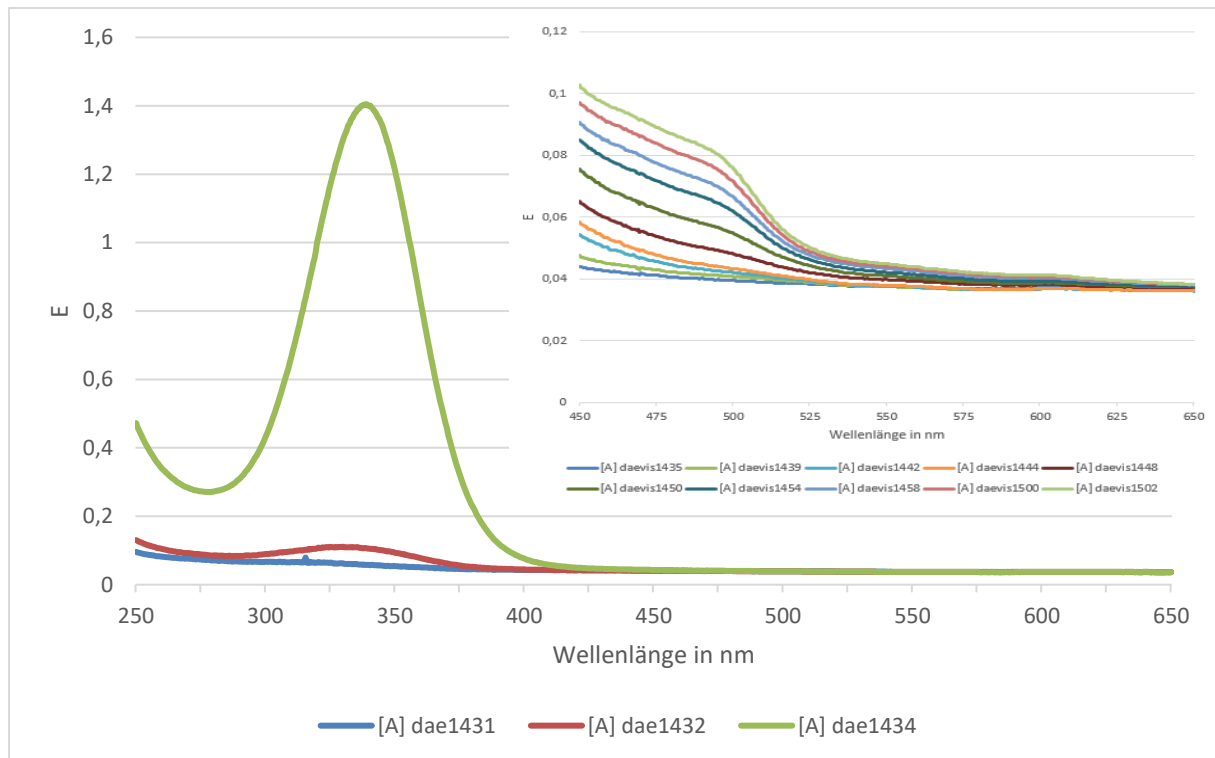


Abbildung 70: 20 μL 1,2-Diaminoethan mit 4 mg Lactulose, kein roter Farbstoff im Vis-Bereich

4.2.7 Amine mit Carbonsäuregruppe (Aminosäuren)

Amine mit einer Carbonsäuregruppe werden allgemein Aminosäuren genannt. Hierbei muss unterschieden werden zwischen a) den 20 natürlich vorkommenden α -Aminosäuren aus der Proteinbiosynthese und b) weiteren Aminosäuren wie z. B. γ -Aminobuttersäure (GABA) und β -Alanin, die z. B. für organische Synthesen von Interesse sind.

Eine Übersicht der 20 biogenen oder Standard-Aminosäuren befindet sich in vielen Lehrbüchern, z. B. S. 255 in (Matissek et al. 2014).

Bei der einfachsten Aminosäure Glycin (veraltet: Glykokoll) befinden sich am α -C-Atom außer der Aminogruppe und der Carboxylgruppe nur zwei Wasserstoffatome; deshalb ergeben sich an dieser Stelle kein Chiralitätszentrum und somit keine optischen Isomeren.

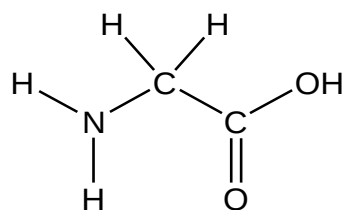


Abbildung 71: Strukturformel von Glycin (CH_2 -Gruppe mittig)

Die restlichen proteinogenen α -Aminosäuren besitzen vier unterschiedliche Liganden am α -C-Atom bilden somit *theoretisch* Paare von optischen Isomeren, *praktisch* liegen sie grundsätzlich in der L-Konfiguration vor. Die theoretisch mögliche D-Konfiguration spielt in der Natur keine Rolle; aus Gründen der Vereinfachung erfolgt in diesem Zusammenhang keine weitere Kennzeichnung.

Was jedoch eine wichtige Rolle spielt, sind die beiden Wasserstoffatome am α -C-Atom; dies wird im nächsten Abschnitt genauer erklärt.

4.2.7.1 Bildung eines roten Farbstoffes mit Glycin

Die beiden Wasserstoffatome am α -C-Atom von Glycin bilden mit ihrem C-Atom eine „Spacergruppe“, die mit der vorausgehenden Aminogruppe beim alkalischen Zuckerabbau zu einem roten Farbstoff reagiert. Ohne von der „Spacergruppe“ zu wissen, haben schon andere Forscher über die Bildung eines roten Farbstoffes berichtet, der auf eine Reaktion mit Glycin (veraltet Glykokoll, Strukturformel siehe Abbildung 71) zurückzuführen ist:

- Nadine Sieber beobachtete um 1900 die Reaktion von „Pepton Witte“, einem Eiweiß-Hydrolysat, welches ein Gemisch von allen 20 biogenen Aminosäuren darstellt, zu einem roten Farbstoff (Sieber 1900).
- Friedrich Karl von Krüger (siehe 3.7) beobachtete einen roten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 555-556 nm, welches auf Lysin schließen lässt (Krüger 1907). Da aber auch er –wie Sieber– ein Eiweiß-Hydrolysat verwendete, nämlich hydrolysiertes Casein, müsste eigentlich auch Glycin als einfachste aller Aminosäuren dabei gewesen sein. Warum er kein zweites Maximum bei 545 nm gefunden hat, ist aus heutiger Sicht nicht erklärbar.
- Renée Rochat berichtete 1934 über eine Farbstoffbildung von Lactose, Maltose und Cellobiose mit Glycin (damals: Glykokoll) bei Einwirkung starker Laugen (Rochat 1934). Diese Ergebnisse blieben aber leider unbeachtet und wurden erst 2020 durch eigene Recherchen wiederentdeckt.
- Fearon (Fearon 1942) hatte ebenfalls die Bildung eines roten Farbstoffs mit Lactose und Glycin beobachtet und dies fälschlich (s. u.) auf eine Decarboxylierung von Glycin unter Bildung von Methylamin zurückgeführt.

- Auch aus den Experimenten von Nickerson (Nickerson et al. 1976) ist bekannt, dass die Aminosäure Glycin über Nacht eine rote Farbe verursacht, wenn sie sich mit Lactose zusammen in der Pufferlösung (pH 13) befindet.

Bei eigenen Versuchen, die bei Raumtemperatur stattfanden, wurde der Beginn einer optisch wahrnehmbaren rötlichen Färbung nach zwei Stunden beobachtet; bei Substitution von Lactose durch Lactulose bereits nach 12 Minuten.

Das Maximum der Absorption im Vis-Bereich liegt bei 545 nm (siehe Abb. 72).

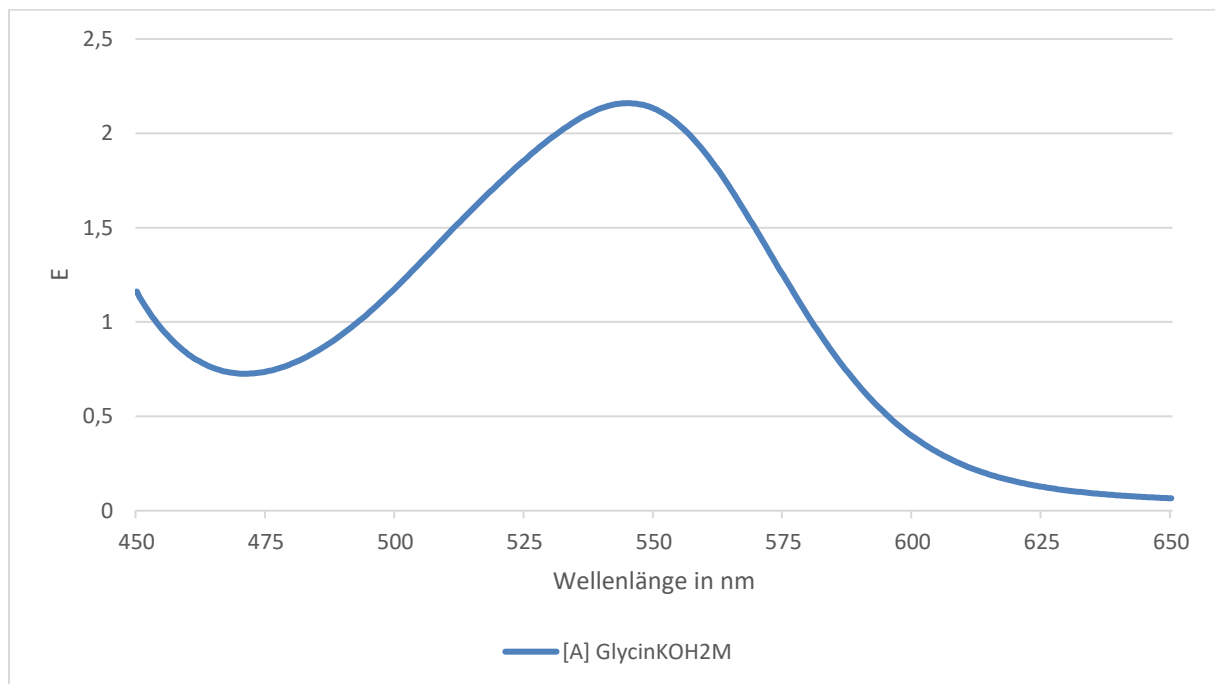


Abbildung 72: Reaktion von Lactulose mit Glycin in Kalilauge bei 65 °C nach 12 Min.

Wäre zur Bildung eines roten Farbstoffs tatsächlich eine Decarboxylierung notwendig, wie von Fearon postuliert (Fearon 1942), dann müsste sich das entstandene Kohlenstoffdioxid als Carbonat nachweisen lassen, z. B. mit Barytwasser oder Kalkwasser – ein derartiger Nachweis verlief aber negativ.

Warum Glycin auch ohne Decarboxylierung zu einem roten Farbstoff reagiert, ist leicht zu erklären: Glycin ist die einzige natürliche Aminosäure mit einer CH_2 -Gruppe zwischen Aminogruppe und Carbonsäuregruppe und erfüllt dadurch die Kriterien der „Spacer-Theorie“ (siehe 4.2.3 Verhalten sich die beiden isomeren Propylamine gleichermaßen?).

4.2.7.2 Bildung eines roten Farbstoffes mit Lysin

Unter den 20 biogenen Aminosäuren gibt es nur eine einzige mit einer ϵ -ständigen Aminogruppe: Lysin (Matissek und Baltes 2016).

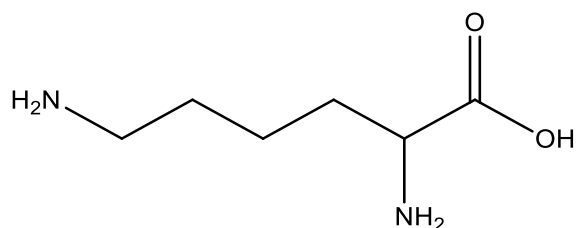


Abbildung 73: Strukturformeln von Lysin

Da auch diese Strukturformel eine vicinale CH_2 -Gruppe gemäß der „Spacer-Regel“ besitzt, sollte die Bildung eines roten Farbstoffs mit Lysin möglich sein. Vorversuche zur Farbstoffbildung mit Lysin lieferten widersprüchliche Ergebnisse – der Grund könnte darin gelegen haben, das Lysin auch als HCl-Salz vertrieben wird und dass der für die Farbstoffbildung nötige pH-Wert nicht korrekt eingehalten wurde. Dies sollte nun unter genauer kontrollierten Bedingungen überprüft werden.

Experiment 22: Bildet auch Lysin einen roten Farbstoff?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, Lysin-Varianten gemäß Tabelle 13, Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Tabelle 13: Farbbildung verschiedener Lysin-Varianten		
Probe	Lysin-Varianten, jeweils in 2 mL NaOH gelöst, pH 13	Zuckerkomponente
09	16 mg Lysin Monohydrat (von TU Dresden)	Lactulose 8 mg
10	16 mg Lysin Hydrochlorid ohne zusätzliche Natronlauge	Lactulose 8 mg
11	16 mg Lysin Hydrochlorid + 1 Tropfen NaOH-Lösung ($\omega=20\%$)	Lactulose 8 mg

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird

eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg Lactulose in einem Reagenzglas gelöst, jeweils 16 mg Lysin gemäß Tabelle 13 hinzugegeben und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut gelöst hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben, nach guter Farbentwicklung herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Es ergeben sich bei allen drei Proben rote Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum von 556 nm im Vis-Bereich. Alle Kurven in Abb. 74 verlaufen weitestgehend parallel.

Diskussion: Die annähernd gleichen Ausbeuten an rotem Farbstoff zeigen, dass die Mengen genau eingewogen wurden.

Die etwas geringere Intensität bei der HCl-Variante (rote Kurve in Abb. 74) deutet darauf hin, dass hier ein etwas niedrigerer pH-Wert vorlag, welcher die Ausprägung der Farbbande des roten Farbstoffs leicht reduzierte (vgl. Nickerson-Experiment, 4.1.8) – umgekehrt ist die Farbstoffausbeute bei derjenigen Probe mit einem zusätzlichen Tropfen Natronlauge (grüne Kurve in Abb. 74) am höchsten. Dies stellt abermals die extreme pH-Wert-Empfindlichkeit der Farbbildungsreaktion unter Beweis.

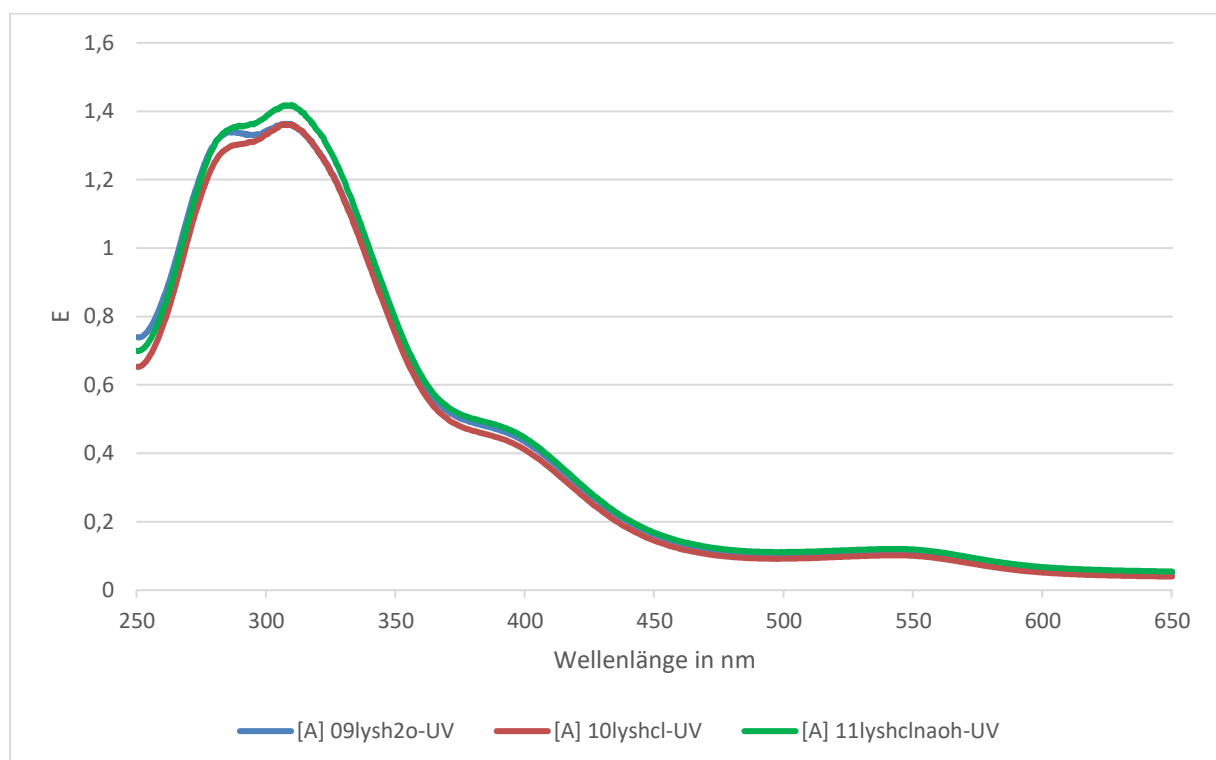


Abbildung 74: Lysin-Varianten mit Lactulose, 5 min., UV-Vis-Bereich, pH 13

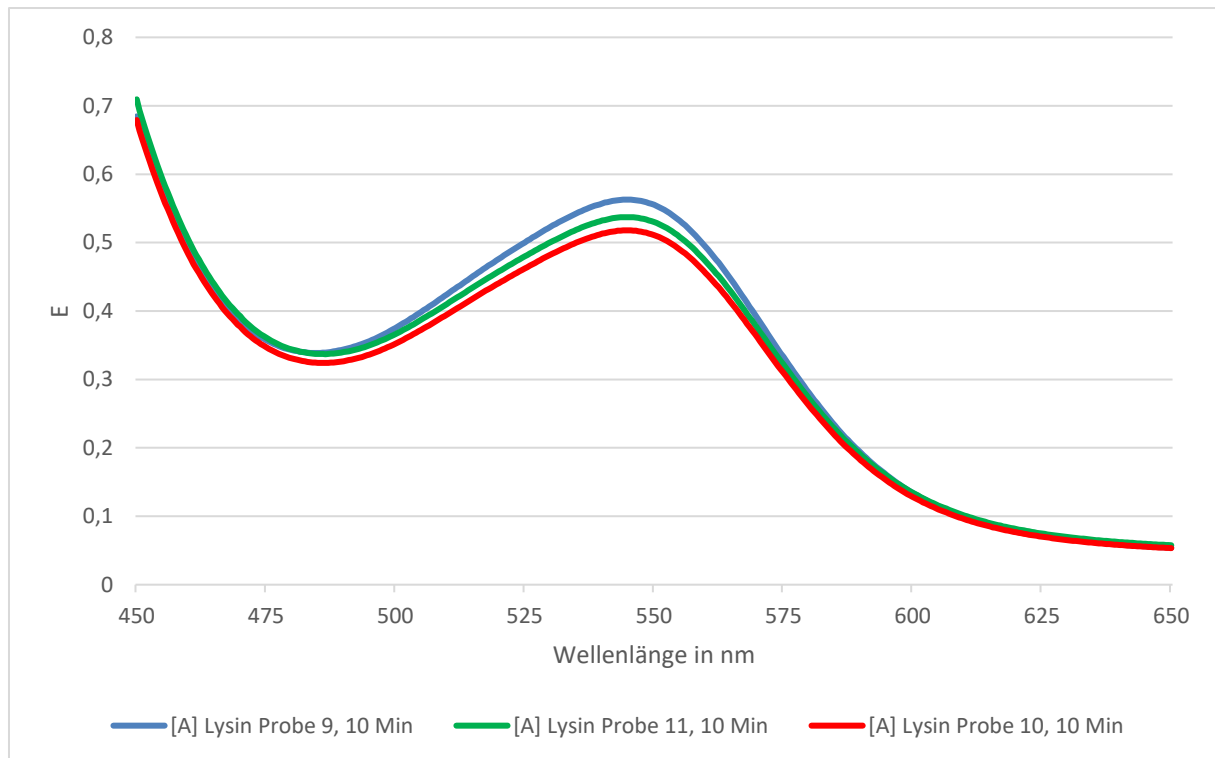


Abbildung 75: Mit allen drei Lysin-Varianten entsteht ein roter Farbstoff (10 min., Vis-Bereich)

Friedrich Karl von Krüger (siehe 3.7) hatte bereits um 1907 ein Casein-Hydrolysat mit Lactulose reagieren lassen und einen roten Farbstoff mit einem Maximum von 555-556 nm gefunden, welches sehr genau mit den eigenen Versuchen zur Bildung eines roten Farbstoffes mit Lysin korreliert (Krüger 1907).

4.2.7.3 Reaktionsverhalten von γ -Aminobuttersäure (GABA), α - und β -Alanin

Weitere zu testenden Amino-Komponenten waren γ -Aminobuttersäure (GABA), α -Alanin und β -Alanin (Strukturformeln siehe Abb. 76): Ergeben auch diese einen roten Farbstoff im Vis-Bereich, obwohl den Aminogruppen keine reinen Alkylreste folgen, sondern Kohlenstoffatome mit Hydroxyl- und Carbonylgruppen?

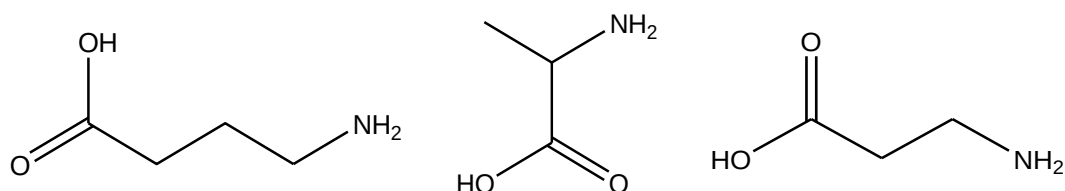


Abbildung 76: Strukturformeln von GABA (links), α -Alanin (mittig), β -Alanin (rechts)

Experiment 23: Wie reagieren GABA, α - und β -Alanin?

Hypothese: Bei der proteinogenen Aminosäure α -Alanin fehlt die Spacer-Gruppe, deshalb wird kein roter Farbstoff erwartet.

GABA und β -Alanin verfügen über eine Spacer-Gruppe, deshalb sollten hier rote Farbstoffe entstehen. Da die Alkylkette von GABA länger ist als bei β -Alanin, könnte bei dem GABA-Farbstoff eine leichte Rotverschiebung zu beobachten sein.

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, GABA, α -Alanin, β -Alanin, Lactulose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg Lactulose mit demin. Wasser in einem Reagenzglas gelöst, jeweils 2 mL Natronlauge und 16 mg Amino-Komponente hinzugegeben und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut vermischt hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben und nach guter Farbentwicklung herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Wie erwartet, ergeben sich rote Farbstoffe bei GABA und β -Alanin. Erwartungsgemäß bildet α -Alanin keinen roten Farbstoff.

Ergebnis: Deutlich ist in Abb. 77 zu sehen, dass α -Alanin keinen Farbstoff liefert (grüne Kurve), hingegen ergeben β -Alanin (3-Aminopropansäure) und GABA einen roten Farbstoff mit einem Vis-Maximum bei 550 nm (braune und blaue Kurve).

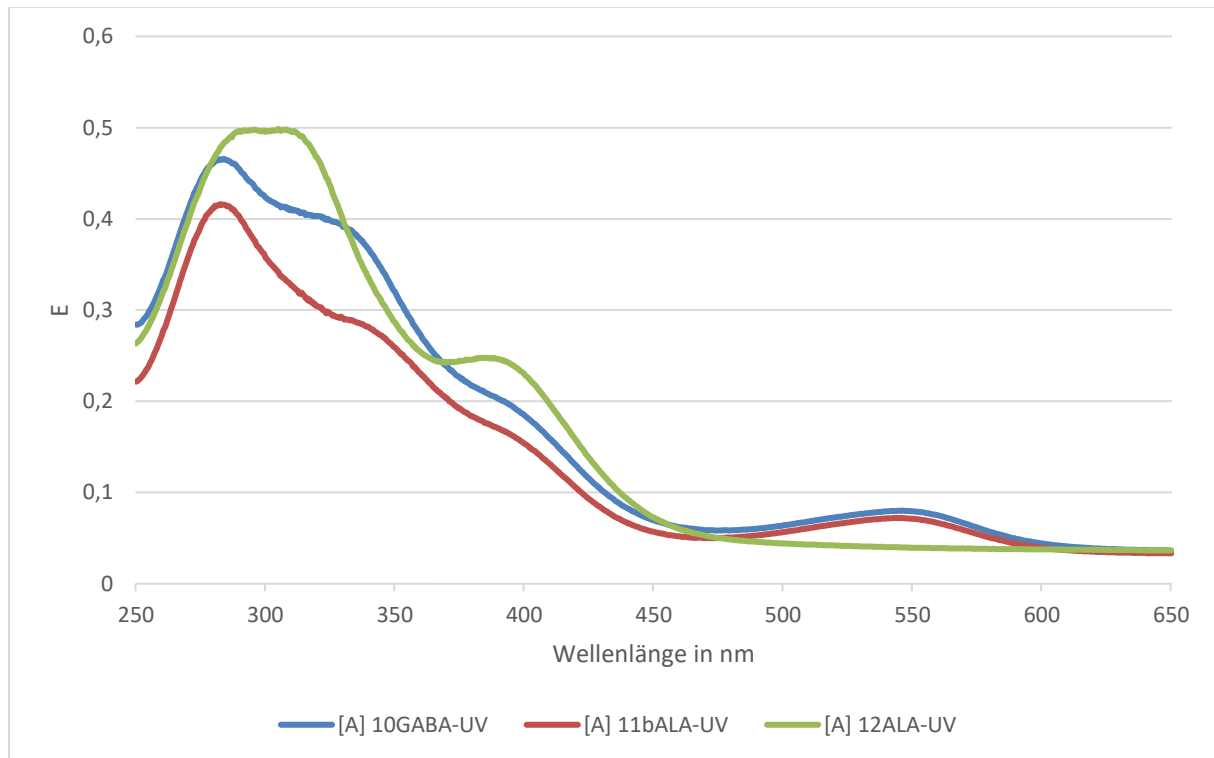


Abbildung 77: Vergleich von GABA, α -Alanin und β -Alanin (UV-Vis)

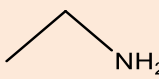
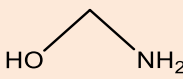
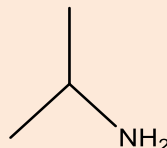
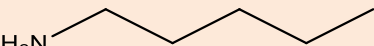
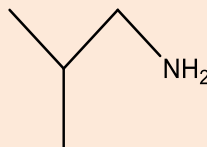
Um die Hypothese bzgl. der Rotverschiebung bei GABA noch einmal genauer zu überprüfen, wurde das Experiment mit der doppelten Masse an Aminokomponente wiederholt (weiterhin 8 mg Lactulose, aber 16 mg Aminokomponente).

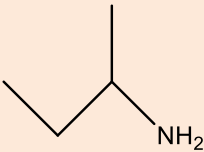
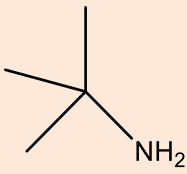
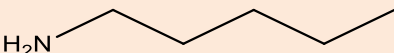
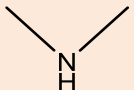
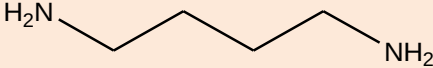
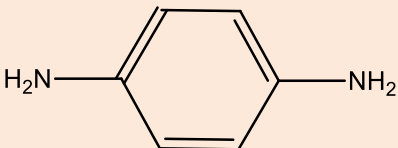
Das Maximum des roten Farbstoffs von GABA liegt nun bei 546 nm, dasjenige von β -Alanin bei 545 nm. Die leichte Rotverschiebung bei GABA gegenüber β -Alanin ist bei den überlagerten Kurven mit bloßem Auge zu erkennen. Bei α -Alanin (grüne Kurve) ergab sich erwartungsgemäß kein roter Farbstoff, weil die Spacer-Gruppe fehlt.

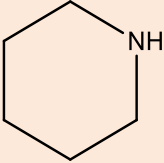
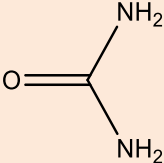
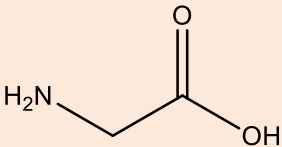
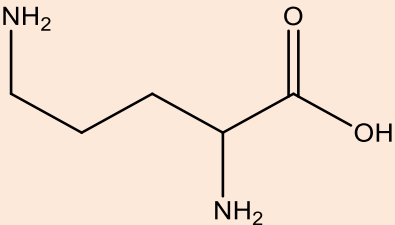
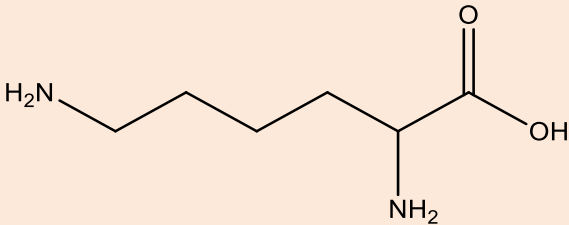
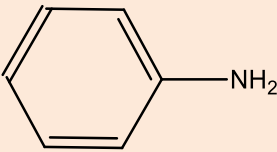
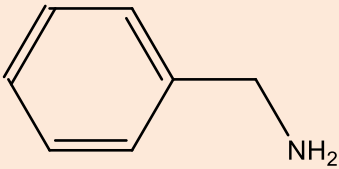
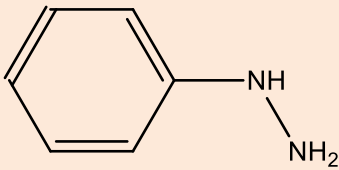
4.2.8 Fazit der Untersuchungen mit anderen Amino-Komponenten

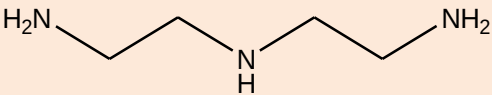
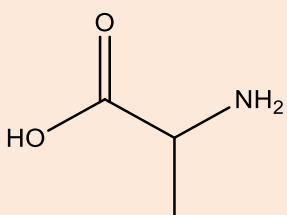
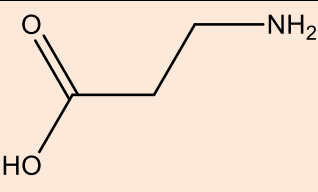
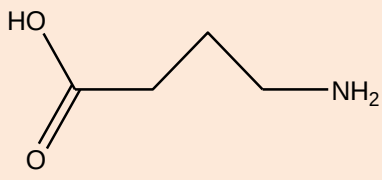
Ausgehend von den ersten Untersuchungen durch Nadine Sieber, die im Jahre 1900 publiziert wurden, fanden weitere Untersuchungen mit Derivaten des Ammoniaks statt, die im vorangegangenen Text beschrieben sind. Untersuchungen mit weiteren getesteten Aminen wurden in den Anhang verlegt, um den Lesefluss nicht zu beeinträchtigen.

Das Gesamtergebnis wird in Tabelle 14 (s. u.) zusammengefasst.

Tabelle 14: Reaktion von Lact(ul)ose mit verschiedenen stickstoffhaltigen Verbindungen		
Nr.	Amin/ Stickstoffkomponente: Name und Strukturformel	Farbeindruck; falls gemessen: Vis-Maximum in nm
1	Ammoniak NH_3	Lachsrot, 527 nm
2	Methylamin —NH_2	Kirschrot, 541 nm
3	Ethylamin 	Kirschrot, 541 nm
4	Ethanolamin 	Rot, 530 nm
4	n-Propylamin 	Rot, 545 nm
5	Isopropylamin 	Gelb
6	n-Butylamin 	Rot, 545 nm
7	i-Butylamin (1-Amino-2-Methylpropan) 	Rot, 547 nm

8	sec-Butylamin (2-Aminobutan) 	Gelb
9	t-Butylamin (2-Amino-2-Methylpropan) 	Gelb
10	Amylamin (n-Pentylamin) 	Rot, 542 nm
11	Hydrazin $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$	Farblos
12	Dimethylamin 	Farblos
13	1,2-Diaminoethan (Ethylendiamin) 	Hellgelb
14	1,4-Diaminobutan (Putrescin) 	Hellgelb
15	1,5-Diaminopentan  (Cadaverin, Zerfallsprodukt von Lysin)	Rot, 546 nm
16	1,6-Diaminohexan 	Rot, 550 nm
17	1,4-Diaminobenzol  (p-Phenylendiamin)	Gelb

18	Piperidin 	Gelb
19	Harnstoff 	Farblos
20	Glycin 	Rot, 545 nm
21	Ornithin 	Gelb
22	Lysin (2,6-Diaminohexansäure) 	Rot, 556 nm
23	Anilin 	Gelb
24	Benzylamin 	Rot, 551 nm
25	Phenylhydrazin 	Rot, 494 nm

26	 Diethylentriamin	Gelb
27	 α -Alanin	Gelb
28	 β -Alanin	Rot, 545 nm
29	 γ -Aminobuttersäure (GABA)	Rot, 546 nm

Nach all diesen durchgeführten unterschiedlichen Versuchen lassen sich zur Reaktion von Aminen mit Glucosen, die in der Position 4 eine Verknüpfung besitzen, folgende Aussagen zum Erhalt eines roten Farbstoffs treffen:

- 1) Nötig ist ein Amin mit mindestens einer primären Aminogruppe **und** das α -C-Atom muss mindestens zwei Wasserstoffatome besitzen (Methylamin, Ethylamin, ...). Verzweigungen am α -C-Atom (Isopropylamin, tert-Butylamin und größere homologe Amine) sind nicht erlaubt.
- 2) Ab dem β -C-Atom ist eine Hydroxygruppe erlaubt (z. B. in Ethanolamin)
- 3) Ab dem β -C-Atom ist eine Carboxygruppe erlaubt (Glycin, β -Alanin, GABA),
- 4) Ab dem ϵ -C-Atom in eine weitere Aminogruppe erlaubt (nicht Putrescin, wohl aber Cadaverin und 1,6-Diaminohexan; nicht Ornithin, wohl aber Lysin).
- 5) Aromatische Amine bilden ebenfalls rote Farbstoffe, aber nur dann wenn sich zwischen dem aromatischen Ringsystem und der Aminogruppe eine CH_2 -Spacergruppe befindet (siehe 11.1.2.1 Reaktionen von Benzylamin und Anilin („Spacer-Theorie“)).
- 6) n-Dodecylamin ergibt keinen roten Farbstoff (Hypothese: Das Molekül ist zu hydrophob und kann deswegen nicht zur Farbstoffbildung beitragen.)

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich folgende Hypothese aufstellen:

Ammoniak reagiert erst nach Addition an ein Fragment aus dem Zuckerabbau - diese Vermutung wurde schon früher geäußert (Fearon 1942) und würde auch erklären, warum die Farbbildung bei der Wöhlk-Reaktion wesentlich später einsetzt als beim Fearon-Test. Möglich wäre z. B. eine Addition von Ammoniak an Methylglyoxal (Pyruvaldehyd, 2-Oxopropanal), die zu 1-Amino-2-oxopropan (Aminoacetone) führen könnte.

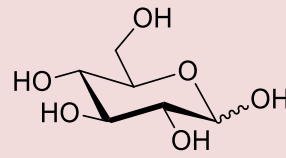
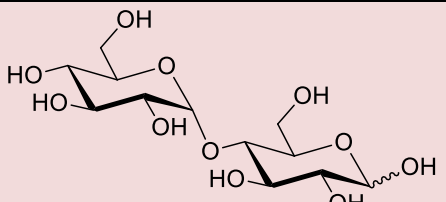
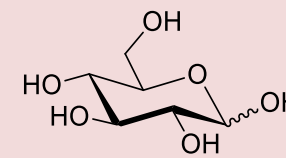
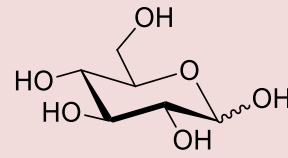
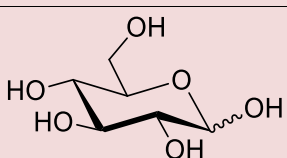
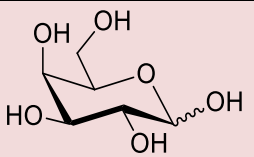
Weitere Beobachtungen:

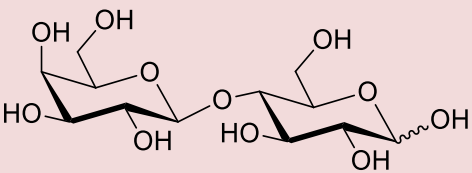
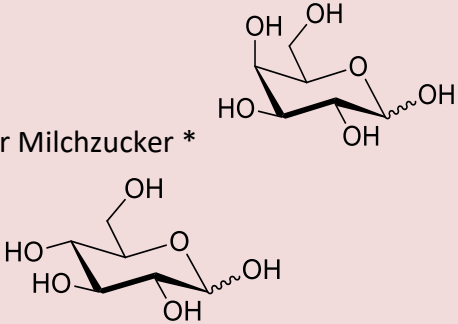
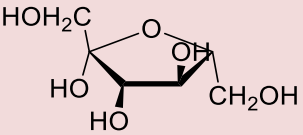
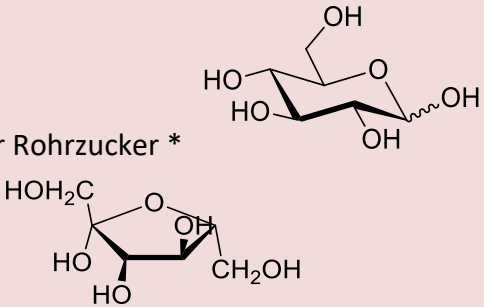
- A) Bei einer benachbarten elektronenziehenden Komponente (z.B. Harnstoff) ergibt sich keine Färbung, ebenso bei Hydrazin.
- B) Mit sekundären Aminen (Piperidin, Dimethylamin, ...) ergibt sich ebenfalls kein roter Farbstoff, wohl aber ein Gelb bei Piperidin.
- C) Phenylhydrazin (isoelektronisch mit Benzylamin) führt auch zu roten Farbstoffen (siehe 11.1.2.3 Reaktion von Phenylhydrazin).

Nach den Untersuchungen zu Variationen der Amino-Komponenten werden im Anschluss die Kohlenhydrat-Komponenten variiert und genauer untersucht.

4.3 Variationen der Kohlenhydrat-Komponente

Schon Alfred Wöhlk hatte 1904 außer Lactose und Maltose weitere damals bekannte und verfügbare Kohlenhydrate getestet (siehe Tabelle 15). Die Schreibweise erfolgt gemäß Seite 675 in der Originalveröffentlichung (Wöhlk 1904). Weiterhin werden Strukturformeln, soweit darstellbar, eingefügt.

Tabelle 15: Farbreaktionen verschiedener Zucker mit Ammoniaklösung (Wöhlk 1904, S. 675)		
Nr.	Verwendeter Zucker (mit Strukturformel, soweit darstellbar):	Farbe nach Wöhlk (1904):
1	 Glucose	Harngelb
2	 Maltose	Krapprot (damaliger Sprachgebrauch)
3	Hydrolysierte  Maltose* 	Strohgelb *
4	Lösliche Stärke oder Amylodextrin*	Beinahe farblos *
5	 Hydrolysierte Stärke*	Hellgelb *
6	Rohes Handelsdextrin (Polysaccharid-Gemisch)*	Braun *
7	Hydrolysiertes Handelsdextrin (Gemisch von Mono-, Di- und Oligosacchariden)*	Gelbbraun *
8	 Galactose	Gelb

9	Milchzucker (Lactose) 	Krapprot (damaliger Sprachgebrauch)
10	Hydrolysiertes Milchzucker * 	Hellgelb *
11	Fructose 	Gelb
12	Hydrolysiertes Rohrzucker * 	Lebhaft gelb*
13	Hydrolysierte Raffinose (Trisaccharid Gal-Glc-Fru)*	Gelb *
14	Reine Sorb(in)ose (Ketohehexose, ähnlich Fructose, aus Eberesche)	Hellgelb
15	Reine Xylose (Pentose)	Strohgelb
16	Reine Arabinose (Pentose)	Strohgelb
17	Gummi arabicum (Polysaccharid-Gemisch)	Farblos *
18	Hydrolysiertes Gummi arabicum (Gemisch von Mono-, Di- und Oligosacchariden)	Gelb *

Beim Betrachten der Tabelle fällt auf, dass die damals übliche Bezeichnung „krapprot²⁸“ nur an zwei Stellen benutzt wird, nämlich bei Maltose und Lactose. Ebenso fällt auf, dass die beiden betroffenen Strukturformeln einander sehr ähnlich sind.

²⁸ Weitere Ausführungen hierzu siehe Kap. 3.4.

4.3.1 Optimierung der Wöhlk-Probe mit Lactose und Maltose

Trotz der Verbesserung durch Hans Malfatti (Malfatti 1905) funktioniert die Wöhlk-Probe oftmals nicht wie vorgesehen; manchmal misslingt sie vollständig, manchmal stellt sich das erwartete Maximum von 527 nm im Vis-Bereich nur sehr zögerlich ein, manchmal aber auch bei 519 nm, und das auch erst nach ca. 50 Minuten. Diese unregelmäßigen Versuchsabläufe tragen dazu bei, dass die Wöhlk-Probe gegenüber dem Fearon-Test als unzuverlässig bezeichnet wird. Deshalb ist es für das Erzielen aussagekräftiger Versuchsergebnisse sinnvoll, entweder die Wöhlk-Probe zu optimieren oder sie durch ein besseres Verfahren (wie z. B. den Fearon-Test oder das 1,6-Diaminohexan-Verfahren) zu ersetzen.

Zur Optimierung der Wöhlk-Probe können folgende Beobachtungen aus eigenen Experimenten herangezogen werden:

- Ist der Kurvenverlauf im linken Bereich des Vis-Spektrums höher als das Maximum bei 527 nm, so wurde zu viel Zuckerkomponente eingesetzt oder der pH-Wert war zu stark alkalisch. Dies zeigt sich durch einen hohen Anteil im Gelb-Bereich bei fehlender Ausprägung eines Maximums im Rot-Bereich im Vis-Spektrum und ist auch mit bloßem Auge beobachtbar.
- Bei sehr geringer Zugabe von Disacchariden bildet sich zwar eine sichtbare lachsrote Färbung; diese ist jedoch sehr schwach ausgeprägt und UV-Vis-spektrometrisch nicht darstellbar.
- Derartige Probleme tauchen nicht oder weniger auf, wenn exakt die Stoffmenge an Disacchariden eingesetzt wird, die in der historischen Versuchsbeschreibung genannt wird, und zwar nach Wöhlk (1904) 20 mg Zucker in 2 mL Wasser (also eine Zuckerlösung mit $\omega=1\%$), dazu nach Malfatti (1905) 3 Tropfen Kalilauge, $c = 1 \text{ mol/L}$. Diese Mengenverhältnisse stellen offensichtlich optimale Bedingungen für das Gelingen der Wöhlk-Probe dar.

4.3.2 Cellobiose, Lactulose und Maltulose bilden ebenfalls den roten Farbstoff

In den historischen Quellen (Wöhlk 1904; Fearon 1942) wurden zunächst nur Lactose und Maltose als nachzuweisende Stoffe für Wöhlk-Probe und Fearon-Test genannt, später kam auch Cellobiose hinzu (Jessop 1961).

Eine frühere Erwähnung in der Dissertation von Renée Rochat (Rochat 1934) wurde leider nicht beachtet, da ihre in französischer Sprache verfasste Arbeit offensichtlich nicht genügend verbreitet und daher nicht zur Kenntnis genommen wurde.

Alle drei genannten Disaccharide besitzen eine Verknüpfung von C-Atom 1 des ersten Rings zu C-Atom 4 des 2. Rings, kurz eine 1,4-Verknüpfung. In Bezug auf α - und β -glycosidische Verknüpfung lässt sich sagen, dass dieses Merkmal nicht entscheidend ist, da Cellobiose (4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose) in gleicher Weise wie Maltose (4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucose) reagiert (Rochat 1934).

Lactose enthält anstelle eines Glycosylrestes einen Galactosylrest. Da Lactose in gleicher Weise wie Maltose und Cellobiose reagiert, ist es offensichtlich beliebig, ob ein Galactosyl- oder ein Glucosylrest verknüpft wird.

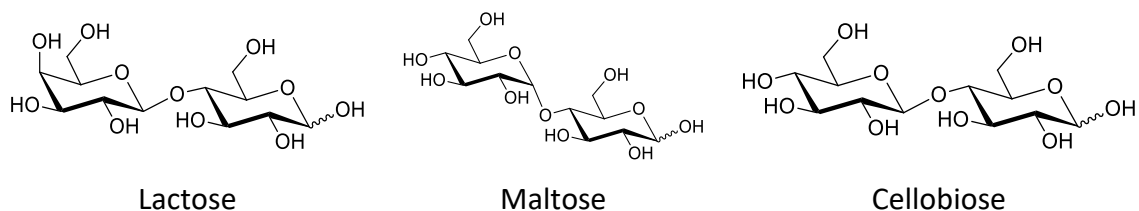


Abbildung 78: Formeln verschiedener 1,4-verknüpfter Disaccharide

In alkalischer Lösung entstehen mittels einer Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung (Bruyn und van Ekenstein 1895) aus Lactose, Maltose und Cellobiose die **Umlagerungsprodukte** Lactulose, Maltulose und Cellobiulose: An der Stelle, wo sich bei den Ausgangsprodukten eine Aldopyranose befand, steht beim Umlagerungsprodukt die entsprechende Ketofuranose (siehe Abbildung 79).

Über die Bildung von Lactulose wurde erstmals im Jahre 1930 berichtet (Montgomery und Hudson 1930).

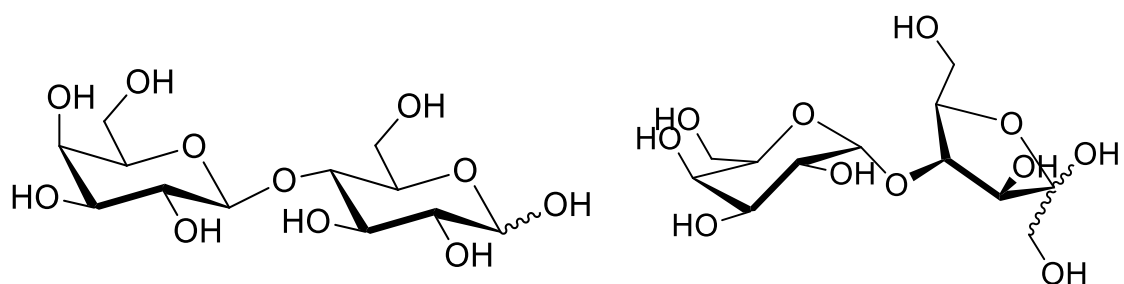


Abbildung 79: Lactose (links) und ihr Umlagerungsprodukt Lactulose (rechts)

Da Lactulose unabhängig von ihrer Entdeckung durch eine Umlagerung von Lactose in alkalischer Lösung entsteht, lässt sich daraus ableiten, dass vor 1930 schon viele Forscher (u. a. Umikoff, Sieber, Wöhlk) mit Lactulose gearbeitet haben, ohne es zu wissen.

Weil die Umlagerungsprodukte schneller als ihre Ursprungsverbindungen reagieren, lässt sich vermuten, dass die Zeitersparnis daraus resultiert, dass Lactose und Maltose auf dem Weg zur Bildung des roten Farbstoffes über eine Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung reagieren müssen.

Dies bedeutet mit anderen Worten, dass der Reaktionsmechanismus zur Bildung des roten Farbstoffs offensichtlich mit dem zeitraubenden Umlagerungsschritt von der Aldopyranose zur Ketofuranose beginnt (Ruppersberg et al. 2019).

Experiment 24: Wie reagieren Lactose, Lactulose, Maltose und Cellobiose in der Wöhlk-Probe?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglasshalter, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Kalilauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), Ammoniaklösung ($\omega=10\%$), demin. Wasser, jeweils 20 mg Lactose, Lactulose, Maltose und Cellobiose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 20 mg Lactose, Lactulose, Maltose und Cellobiose in einem Reagenzglas gelöst und mit jeweils 2 mL Ammoniaklösung versetzt. Anschließend werden 3 Tropfen Kalilauge hinzugegeben und vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut gelöst hat.

Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben und nach guter Farbentwicklung (hier: 35 Minuten) herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Die Maxima liegen zwischen 529 und 531 nm (s.u.).

Ergebnis: Lactulose (violette Kurve in Abb. 80) erbringt bei gleicher Einwaage stets eine höhere Ausbeute an Farbstoff als die anderen eingesetzten Disaccharide.

Hypothese: Der Grund für die höhere Ausbeute könnte sich darauf zurückführen lassen, dass bei der Umsetzung von Lactulose weniger Nebenprodukte entstehen als beim Einsatz von nicht umgelagerten Disacchariden. Anders formuliert: Beim Einsatz von Lactose entstehen auf

dem Weg zur Lactulose Nebenprodukte, deren Substanz für die Bildung des Farbstoffs verloren geht.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass in Lösung die offenkettige Form bei Lactulose häufiger als bei Lactose vorliegt und dass diese zu einem schnelleren Reaktionsverhalten führt; auch dadurch werden unerwünschte Nebenprodukte vermieden.

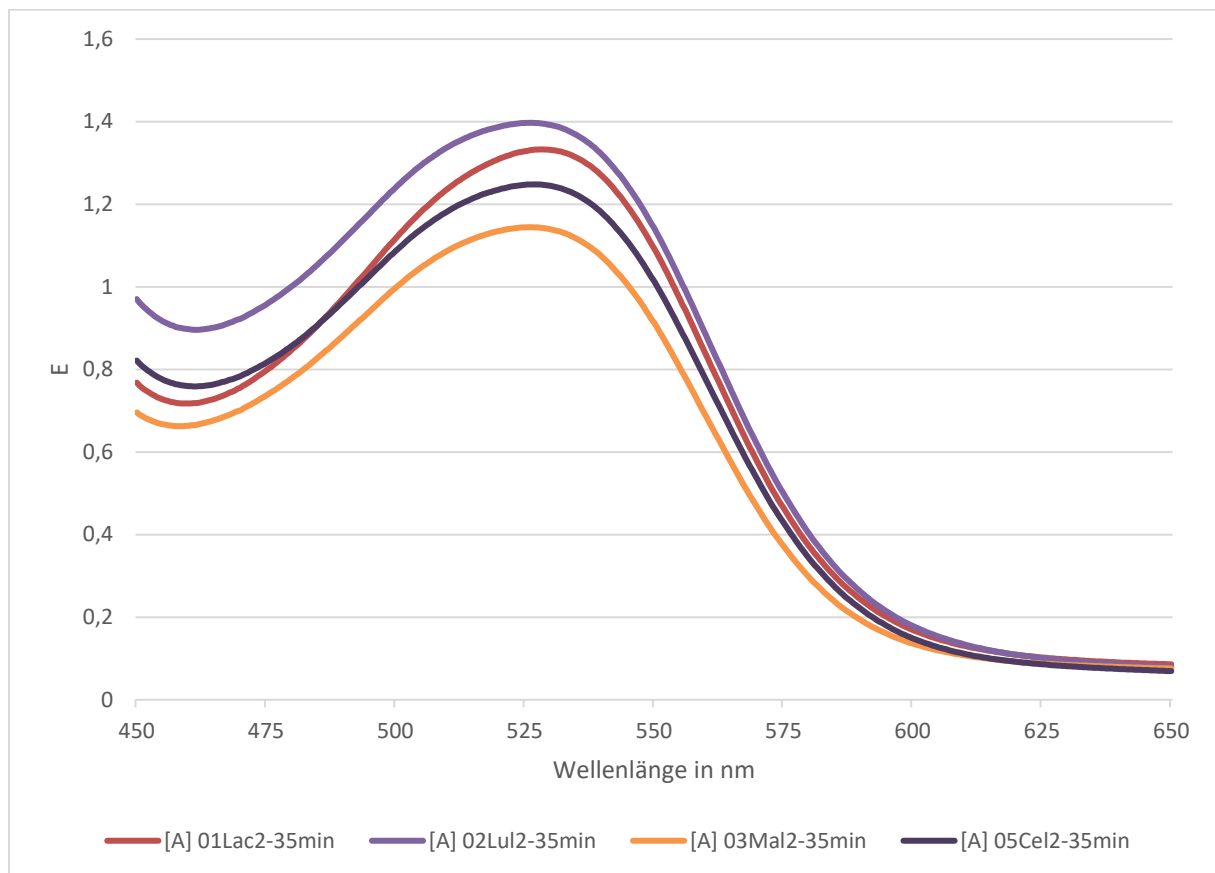


Abbildung 80: Wöhlk-Probe mit Zuckerlösungen ($\omega = 1\%$)

4.3.3 Farbreaktion des Trisaccharids Maltotriose

Bislang wurden bezüglich ihrer Reaktion mit Ammoniak und Aminen lediglich Mono-, Di- und Polysaccharide untersucht, jedoch gibt es auch Trisaccharide wie z. B. Maltotriose (Abb. 81). Maltotriose tritt natürlicherweise beim Stärkeabbau durch Speichelamylase auf, nämlich dann, wenn bei der von innen beginnenden zufälligen Zerschneidung der Stärkespirale eine ungeradzahlige Kette entsteht und weiter zerteilt wird (Hofmann 2006)).

Dabei entsteht anschließend neben Maltoseeinheiten eine Dreiereinheit – Maltotriose (Ruppersberg 2016c).

Um die Farbstoffbildung von Maltotriose mit derjenigen von Maltose zu vergleichen, wurden Proben gemäß Tabelle 16 vorbereitet und mit Fearon's Reagenz getestet.

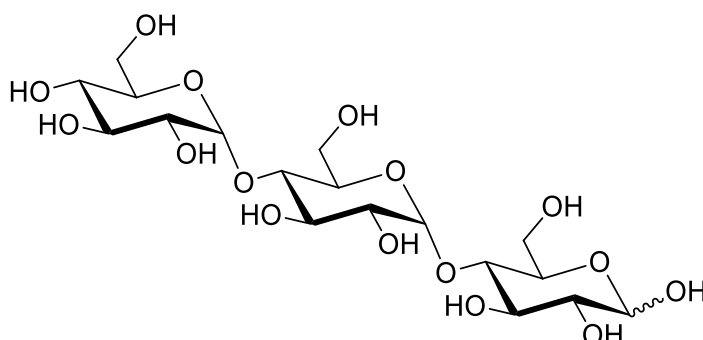


Abbildung 81: Strukturformel des Trisaccharids Maltotriose

Experiment 25: Wie reagiert Maltotriose mit Fearon's Reagenz?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Maltotriose, Maltose, demin. Wasser, Fearon's Reagenz (Fertiglösung: 5 g NaOH-Plätzchen, 1,25 g Methylamin-Hydrochlorid mit demin. Wasser ad 500 mL), Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Tabelle 16: Vergleich der Maltotriose- und Maltose-Reaktion mit Methylamin	
Maltotriose (Mtt)	Maltose (Mal)
01 Mtt 6 mg (dunkelblau)	05 Mal 4 mg (violett)
02 Mtt 9 mg (dunkelrot)	06 Mal 6 mg (türkisblau)
03 ²⁹ Mtt 12 mg (grün)	07 Mal 8 mg (orange)

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert.

Dann werden sechs Proben gemäß Tabelle 16 vorbereitet, mit jeweils 2 mL Wasser und 2 mL Fearon's Reagenz versetzt und in das Wasserbad gestellt. Nach guter Farbentwicklung (hier:

²⁹ Die ursprünglich geplanten Proben 04 und 08 konnten nicht durchgeführt werden, da die Menge an Maltotriose nicht ausreichte.

nach 5 Min.) werden die Gläser herausgenommen und die Reaktion durch Einsetzen der Gläser in ein kaltes Wasserbad abgestoppt.

Die erkalteten Lösungen werden im UV-Vis-Spektrometer vermessen. Danach werden sie wieder in das heiße Wasserbad gestellt und nach 60 Min. erneut vermessen.

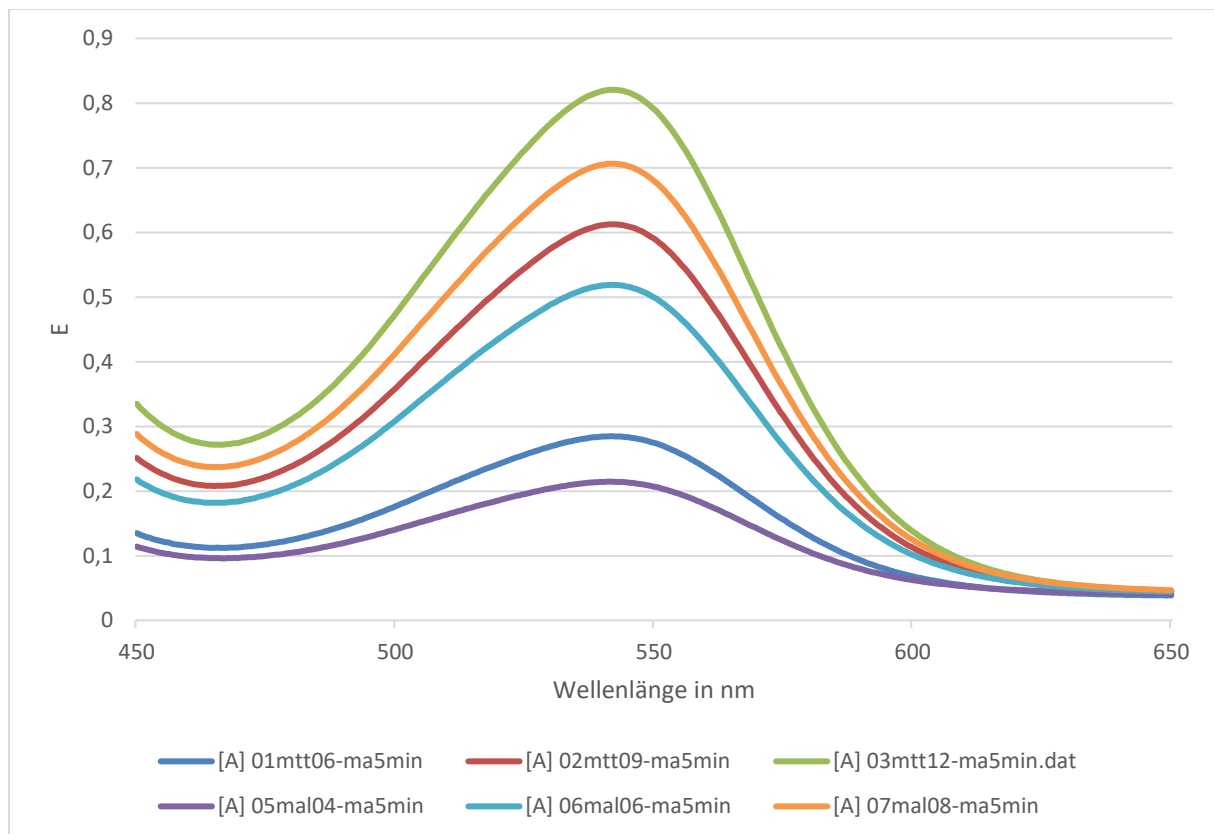


Abbildung 82: Farbreaktionen von Maltotriose und Maltose, 5 Min.

Ergebnis: In der Grafik (Abb. 82) sind die Ergebnisse nach 5 Minuten festgehalten. Es fällt auf, dass alle Proben mit Maltotriose (dunkelblau, dunkelrot, grün) eine höhere Farbintensität entwickeln als die analogen Proben mit Maltose (violett, türkisblau, orange).

Die folgende Abbildung (Abb. 83, s.u.) zeigt, dass sich dieser Effekt nach 60 Minuten noch erheblich verstärkt.

Hypothese: Eine Erklärung für das andere Verhalten könnte sein, dass im weiteren Verlauf der Reaktion die Bindung in Position 4 gelöst wird. Bei Maltose wird ein Glucosylrest abgespalten, bei Maltotriose wird ein Maltosyl-Rest abgespalten, der dann analog Maltose weiterreagiert und somit die höhere Farbintensität verursacht.

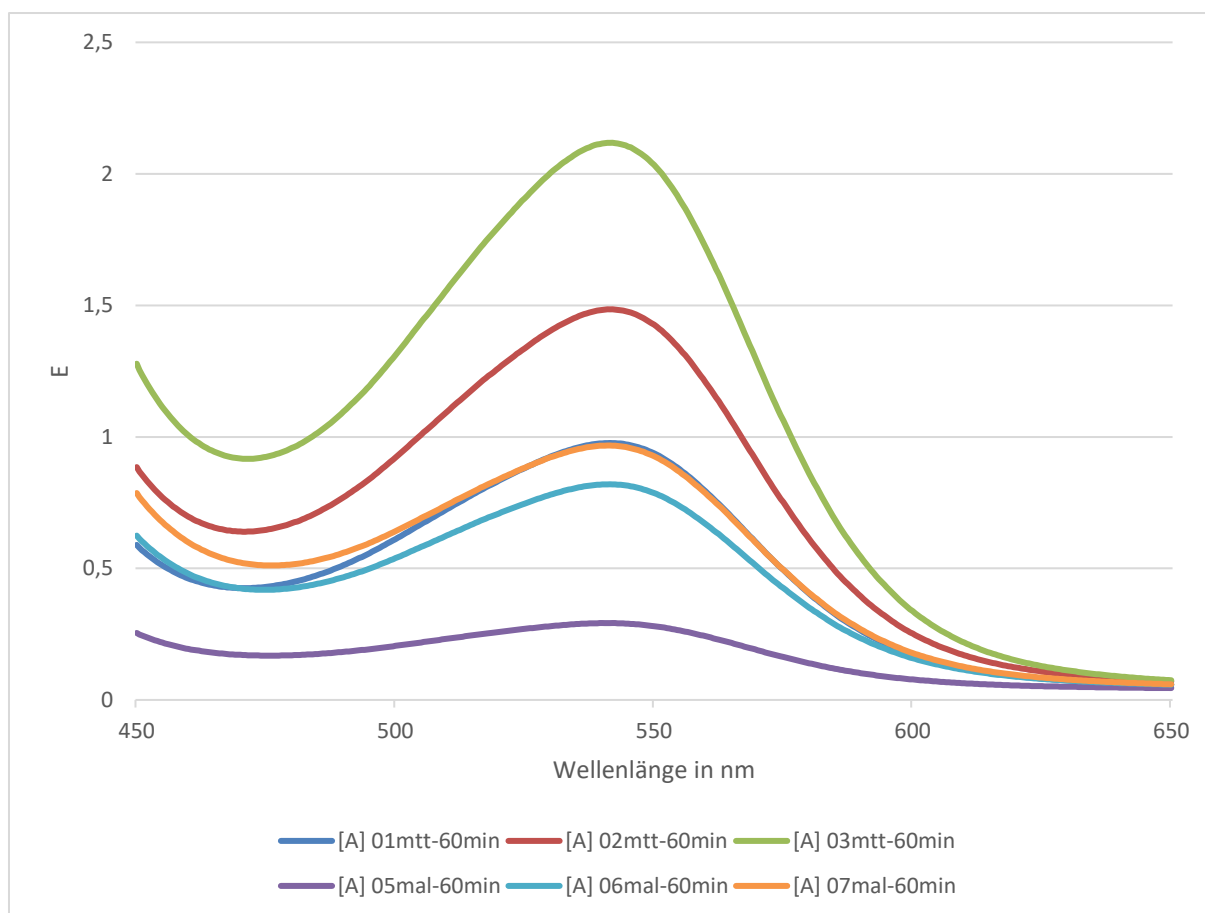


Abbildung 83: Farbreaktionen von Maltotriose und Maltose, 60 Min.

4.3.4 Geschützte Glucosen in Wöhlk-Probe und Fearon-Test

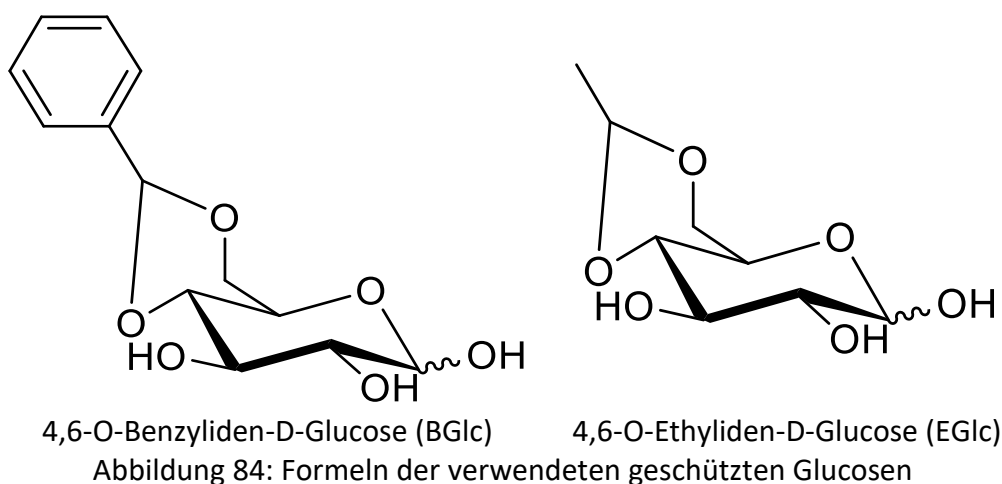
Unter geschützten Glucosen versteht man Glucosemoleküle, die mit einer Schutzgruppe versehen sind, zum Beispiel mit einer Benzyliden- oder einer Ethylidengruppe. Diese Schutzgruppe verhindert Reaktionen an der zu schützenden OH-Gruppe (Zervas 1931).

Die folgenden Experimente dienen der Überprüfung der Hypothese, dass in Position 4 geschützte Glucosen in der Wöhlk- oder Fearon-Reaktion ebenfalls einen roten Farbstoff ergeben. Käuflich zu erwerben³⁰ sind 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose und 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose (Abb. 84).

In einigen Vorversuchen hatte es widersprüchliche Ergebnisse gegeben, die aber der Empfindlichkeit der Testmethode gegenüber abweichenden pH-Werten und Konzentrationen geschuldet waren.

Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert, UV-Vis-spektroskopisch gemessen und publiziert (Kussler und Ruppertsberg 2019).

³⁰ 10 g kosten ca. 80 Euro. Bezugsquelle: Carbosynth Limited, Compton, Berkshire, UK; www.carbosynth.com



Experiment 26: Wie reagieren geschützte Glucosen im Wöhlk- und Fearon-Test?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Becherglas (500 mL), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Kalilauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), Ammoniaklösung ($\omega=10\%$), Lactose, Lactulose, Maltose, Maltotriose, Cellobiose, 4,6-O-Ethylidenglucose, 4,6-O-Benzylidenglucose, Fructose, Glucose, demin. Wasser, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann.

Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden neun Reagenzgläser mit den oben genannten Kohlenhydraten vorbereitet, mit jeweils 2 mL Wasser, 2 mL Ammoniaklösung und 3 Tropfen Kalilauge versetzt und in das Wasserbad gestellt.

Nach guter Farbentwicklung (hier: nach 15 bzw. 20 Min.) werden die Reagenzgläser herausgenommen und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden im UV-Vis-Spektrometer vermessen (siehe Abb. 85).

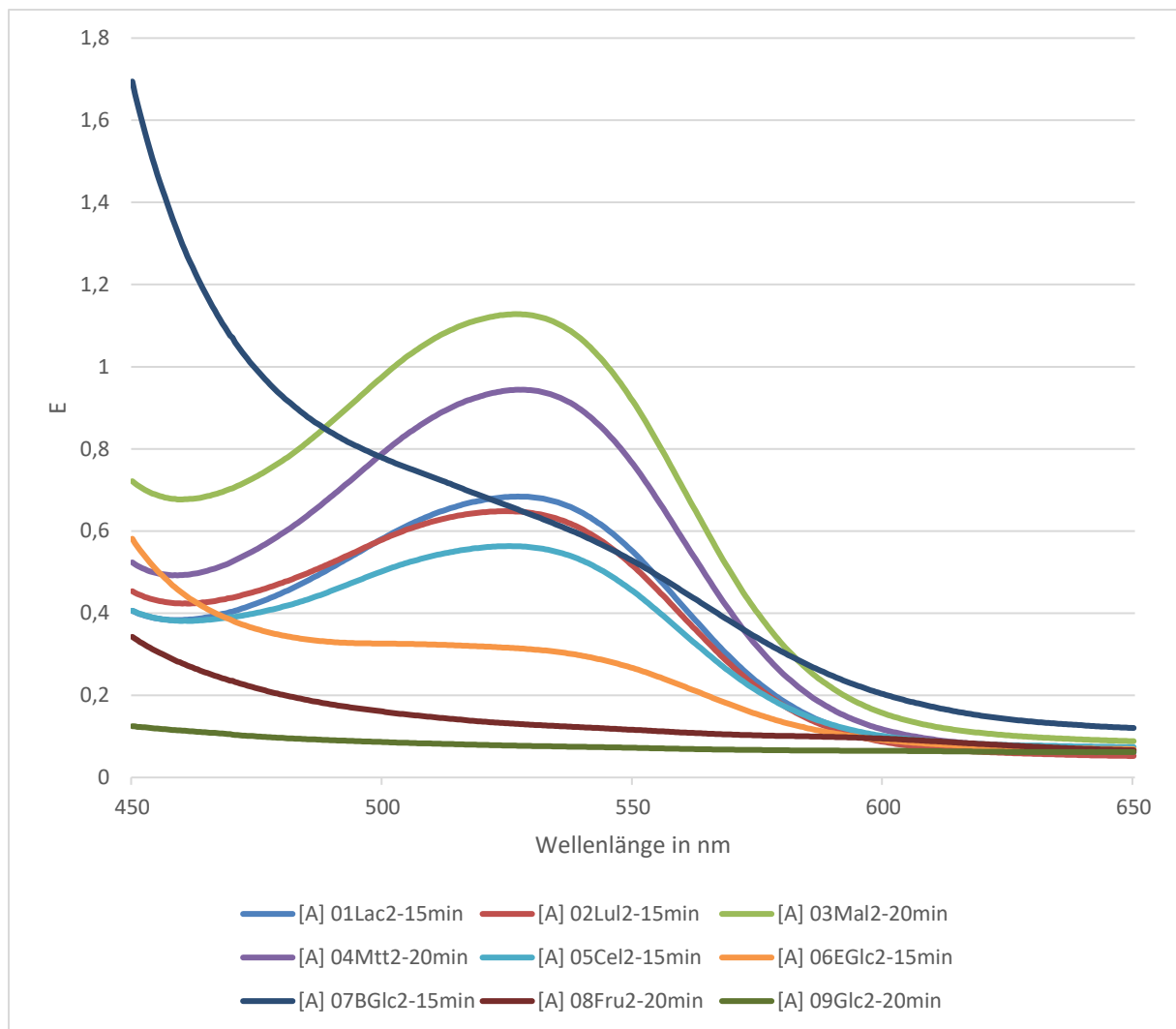


Abbildung 85: Verschiedene Zuckerkomponenten bei der Wöhler-Probe in zeitlicher Sukzession

Ergebnis: Glucose und Fructose zeigen wie erwartet keine Rotfärbung und ergeben somit auch kein Maximum im Bereich 480-650 nm. Wegen des fehlenden Vis-Maximums von Probe 07 (4,6-O-Benzylidenglucose mit Ammoniak) wurde dieser Test wiederholt und ergab, dass auch 4,6-O-Benzylidenglucose einen roten Farbstoff in der Wöhler-Probe bildet, jedoch ist der Farbstoff relativ instabil und zerfällt rasch wieder.

Die anderen Kohlenhydrate besitzen ein Maximum im Bereich von 529-532 nm, wobei zu beobachten ist, dass die Maxima der geschützten Glucosen in diesem Test schlecht ausgebildet sind.

Eine weitere Beobachtung ist, dass die beiden geschützten Glucosen (Probe 06 und 07) während der Farbstoffbildung einen charakteristischen Geruch erzeugen: Bei Verwendung von 4,6-O-Benzylidenglucose riecht es nach Bildung des roten Farbstoffes nach Benzaldehyd;

bei Verwendung von 4,6-O-Ethylidenglucose riecht es nach Acetaldehyd. Dies weist darauf hin, dass die Schutzgruppen im späteren Verlauf der Reaktion abgespalten werden.

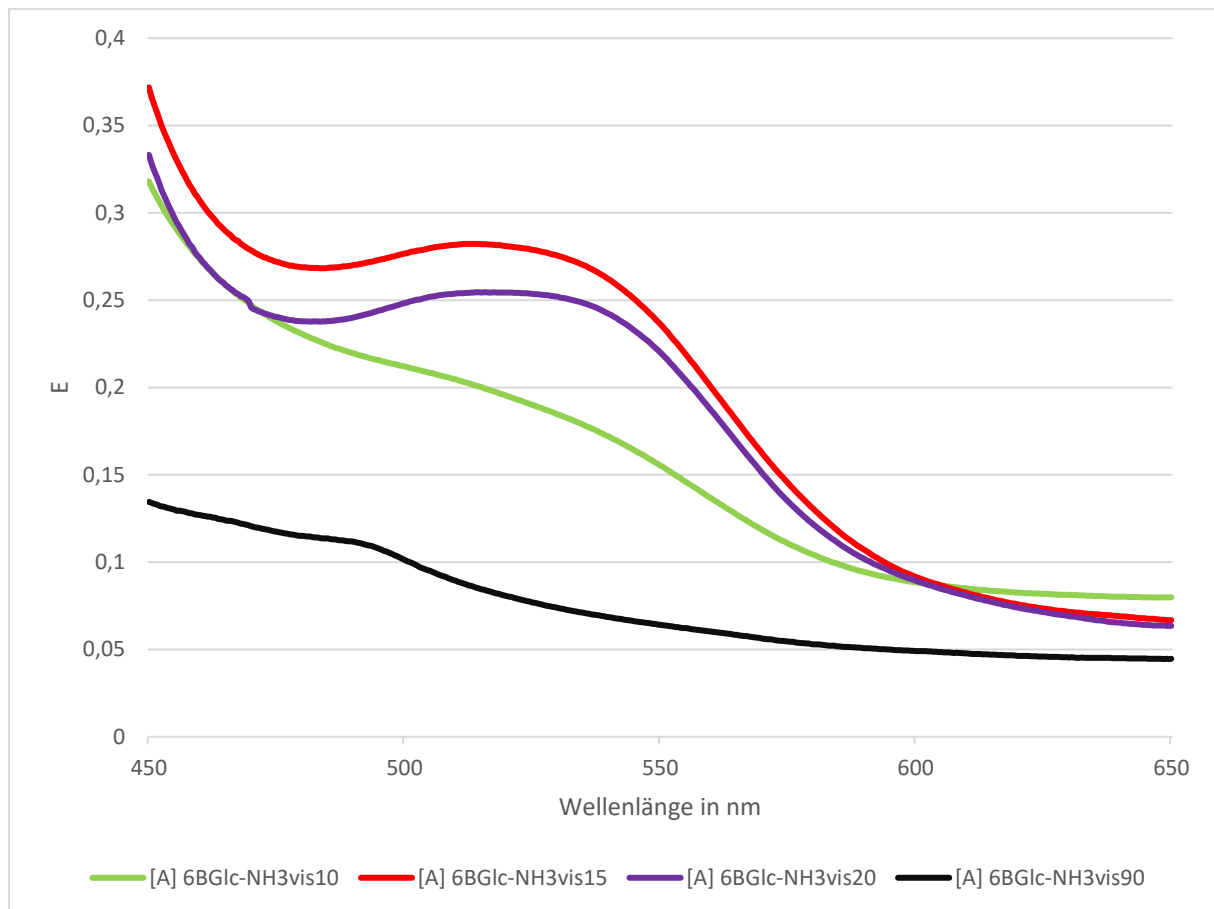


Abbildung 86: 4,6-O-Benzylidenglucose mit Ammoniaklösung (Wöhlk-Probe)

Abbildung 86 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion von 4,6-O-Benzylidenglucose mit 10%iger Ammoniaklösung, die mit Kalilauge auf den pH 13 eingestellt wurde. Nach 10 Minuten beginnt eine leichte Farbstoffbildung (grüne Kurve), die nach 15 Minuten ein Maximum bei 519 nm erreicht (rote Kurve).

Nach 20 Minuten (violette Kurve) ist durch die Abnahme der Intensität schon ein Zerfall des Farbstoffes zu beobachten, bis schließlich nach 90 Minuten (schwarze Kurve) kein Maximum im grünen Spektralbereich mehr zu erkennen ist.

Die Farbe bildet sich sowohl bei der Wöhlk-Probe als auch bei dem Fearon-Test mit Lactulose schneller als mit Lactose, am schnellsten jedoch mit einer geschützten Glucose (Kussler und Ruppertsberg 2019).

Dieser Ablauf kann durch den höheren Prozentsatz der (reaktionsfreudigeren) offenkettigen Form gegenüber der geschlossenen Ringform erklärt werden (Bunn, H., Higgins, P. 1981).

Eine Hypothese zur Erklärung dieses Reaktionsverhaltens ist, dass durch die 4,6-O-Benzyliden- bzw. 4,6-O-Ethylidenbrücke die Flexibilität des in Lösung normalerweise zu weniger als 1% offenkettigen Glucosemoleküls eingeschränkt ist, sodass die Ringbildung erschwert ist. Dadurch liegen die geschützten Glucosen verstärkt in der offenkettigen Form vor und können daher schneller mit dem Amin bzw. Ammoniak reagieren (Reynolds 1963; Micheel, F., Frowein, A. 1957).

Pischetsrieder und Severin beschreiben bereits 2007 eine „Weichenstellung“ durch die 1,4-Verknüpfung (Pischetsrieder und Severin 2007).

Demnach werden je nach Vorhandensein eines Wasserstoffatoms an der OH-Gruppe von C4 andere Intermediate erzeugt, als wenn die OH-Gruppe mit einem Glycosyl- oder Galactosylrest verknüpft ist.

Insofern ist es nicht verwunderlich, dass auch Cellobiose und sogar Glucose mit einer Schutzgruppe in Position 4 (4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose, bzw. 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose) bei der Wöhlk-Malfatti-Reaktion und beim Fearon-Test dieselbe Farbbildung verursachen wie Lactose und Maltose (weitere Erläuterungen folgen in Kap. 5).

4.3.5 Fazit der Untersuchungen mit anderen Kohlenhydrat-Komponenten

Im Rahmen der Wöhlk-Reaktion, des Fearon-Tests und des 1,6-Diaminohexan-Verfahrens sowie mit anderen Amino-Komponenten (siehe Kapitel 4.2) bilden sich rote Farbstoffe nicht nur mit den ursprünglich bekannten Disacchariden Lactose und Maltose. Die Liste der Kohlenhydrate, die eine positive Nachweisreaktion erbringen, muss wie folgt erweitert und spezifiziert werden:

- A) 1,4-verknüpfte reduzierende Disaccharide wie Lactose, Maltose, Cellobiose
- B) Trisaccharide wie Maltotriose
- C) Umlagerungsprodukte von A, also z. B. Lactulose und Maltulose. Diese reagieren schneller als die Ursprungsverbindungen
- D) An Position 4 geschützte Glucosen wie 4,6-O-Ethyliden- und 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose, und zwar schneller als die Komponenten aus A, B, C (Ruppersberg et al. 2019).

Für alle roten Farbstoffe ist die Wellenlänge der Maxima im Vis-Bereich bei verschiedenen Zuckern gleich, sofern jeweils dieselbe Amino-Komponente verwendet wurde (Tabelle 17). Die roten Farbstoffe unterscheiden sich also lediglich durch die verwendete Amino-Komponente, nicht durch die verwendete Zucker-Komponente.

Tabelle 17: Vis-Maxima (nm) der roten Farbstoffe je nach Testmethodet				
Nr.	Zucker-Komponente	Wöhlk-Probe	Fearon-Test	1,6-Diaminohexan-Verfahren
1	Lactose	527, auch: 519-532	541	550
2	Maltose	527, auch: 519-532	541	550
3	Cellobiose	527, auch: 519-532	541	550
4	Maltotriose	527, auch: 519-532	541	550
5	Lactulose	527, auch: 519-532	541	550
6	Maltulose	527, auch: 519-532	541	550
7	4,6-O-Benzyliden-glucose	527, auch: 519-532	541	550
8	4,6-O-Ethylidenglucose	527, auch: 519-532	541	550

Bei Anwendung der Wöhlk-Probe wird regulär ein Maximum von 527 nm erzielt, jedoch sind auch andere Vis-Maxima von 519 nm (Abb. 86) bis 532 nm (Abb. 85) beobachtet worden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass beim alkalischen Zuckerabbau unterschiedliche Fragmente entstehen, die dann mit Ammoniak zu abermals unterschiedlichen Aminen weiterreagieren. Unterschiedliche Amine erzeugen unterschiedliche Maxima (Tab. 14).

4.4 Fazit des experimentellen Teils

Die zahlreichen durchgeführten Experimente haben einerseits viele Unklarheiten und Widersprüche beseitigt, aber andererseits auch viele Ergebnisse herbeigeführt, die teils aufschlussreich waren, teils aber trotz aller Bemühungen leider noch nicht vollständig verstanden werden konnten und in der Zukunft weiterverfolgt werden müssen. Immerhin konnte Folgendes geklärt werden:

1. Wöhlk-Reaktion und Fearon-Test sind zwei sehr ähnliche Nachweisreaktionen mit sehr ähnlichen roten Farbstoffen als Produkten, denen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit sehr ähnliche Mechanismen und Strukturformeln zugrunde liegen, siehe hierzu auch Kapitel 5 und (Ruppersberg et al. 2019).
2. In beiden Fällen werden nicht nur Lactose und Maltose nachgewiesen, sondern grundsätzlich 1,4-verknüpfte Disaccharide wie z.B. Cellobiose sowie die Umlagerungsprodukte Lactulose und Maltulose. Es reicht zur Bildung der roten Farbstoffe sogar aus, wenn sich am 4. Kohlenstoffatom eine Schutzgruppe befindet (Kussler und Ruppersberg 2019).
3. Schutzgruppen an anderen C-Atomen als C4 bewirken keine Farbstoffbildung, Schutzgruppen an allen C-Atomen verhindern die Farbstoffbildung; eine Schutzgruppe an C6 übt weder einen positiven noch einen negativen Einfluss aus.
4. Frühere Berichte, dass Lactose erst in ihre Bestandteile Galactose und Glucose zerlegt werden muss (Hydrolyse), um den roten Farbstoff zu bilden, sind widerlegt. Der Beweis wird dadurch geführt, dass ein Gemisch von Galactose und Glucose nicht zur roten Farbe führt (Ruppersberg und Hain 2016).
5. Beobachtungen in Experimenten mit geschützten Glucosen zeigen, dass im Verlauf der Reaktion die Schutzgruppen abgespalten werden, denn bei Verwendung von 4,6-O-Benzylidenglucose riecht es nach Bildung des roten Farbstoffes nach Benzaldehyd; bei Verwendung von 4,6-O-Ethylidenglucose riecht es nach Acetaldehyd (Kussler und Ruppersberg 2019).
6. Arbeiten ohne Sauerstoff oder im wasserfreien System zeigten, dass für den Ablauf der Reaktion Luftsauerstoff nicht nötig ist, wohl aber Wasser (Ruppersberg et al. 2017a).
7. Beide Reaktionen sind stark pH-abhängig; entscheidend für die Bildung und die Stabilität der roten Farbstoffe ist ein stark alkalischer pH-Wert, der im Bereich 12,5-13,0 liegen muss (Ruppersberg et al. 2019).

8. Anstelle von Ammoniak, Methylamin und Diaminohexan können auch andere primäre Amine zur Bildung der roten Farbstoffe eingesetzt werden, allerdings mit der Einschränkung, dass auf die Aminogruppe eine CH₂-Gruppe folgen muss. Ist diese „Spacer-Gruppe“ nicht vorhanden, z.B. bei Isopropylamin, bildet sich kein roter Farbstoff. Diese Gesetzmäßigkeit gilt auch für aromatische Amine (Benzylamin: roter Farbstoff, Anilin: kein roter Farbstoff, Phenylhydrazin: roter Farbstoff, aber im Vergleich zum isoelektronischen Benzylamin blauverschoben) (Ruppersberg et al. 2017a).
9. Bei primären Diaminen konnte die Farbstoffbildung nur beobachtet werden, wenn die Alkylkette zwischen den beiden Aminogruppen fünf C-Atome oder sechs C-Atome besitzt. Bei einer Kettenlänge von vier oder weniger C-Atomen ergab sich keine rote Färbung.
10. Bei substituierten Aminen gilt, dass sich ein roter Farbstoff bilden kann, wenn sich am β-C-Atom eine OH-Gruppe befindet; ab dem β-C-Atom ist eine Carboxygruppe erlaubt (Glycin, β-Alanin, γ-Aminobuttersäure (GABA)).
11. Ist die Alkylkette zu lang (z. B. bei n-Dodecylamin), erfolgt keine Bildung eines roten Farbstoffs.
12. Reduzierende Pentosen und Hexosen bilden gelbe Farbstoffe, nicht-reduzierende Zucker bilden keinen Farbstoff.
13. Es gibt Hinweise darauf, dass Methylglyoxal als Fragment aus dem Zuckerabbau der Maillard-Reaktion zusammen mit Ammoniak das Amin bildet, das in der Wöhlk-Probe zur Bildung des roten Farbstoffes führt. Der Beweis dieser Hypothese würde auch erklären, warum die Wöhlk-Probe unsicherer ist und wesentlich länger dauert als ein gleichzeitig angesetzter Fearon-Test.

Alle diese experimentellen Ergebnisse tragen dazu bei, das Rätsel um die geheimnisvollen roten Farbstoffe einzugrenzen. Sie werden ergänzt durch Literaturrecherchen, die sich mit ähnlichen Reaktionen befassen, die vor allem im Bereich der organischen Chemie und Lebensmittelchemie untersucht wurden. Diese werden im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

5 Welcher Reaktionsmechanismus könnte zum roten Farbstoff führen?

Die Suche nach einem Reaktionsmechanismus für die Wöhlk-Probe oder den Fearon-Test ist außerordentlich schwierig, denn es gibt keine „naheliegende“ andere Reaktion, die direkt vergleichbar wäre. Dennoch gibt es auffällige Gemeinsamkeiten, die in eine Richtung weisen: Die Bildung der roten Farbstoffe hat etwas mit **Zuckern** zu tun, die im **stark alkalischen Bereich** mit **Aminen** reagieren. Genauer kann folgendes gesagt werden:

- Die Reaktion benötigt *reduzierende* Zucker; diese bilden ohne die Verknüpfung an Position 4 einen gelben Farbstoff und mit Verknüpfung an Position 4 (zweites Zuckermolekül oder Schutzgruppe) einen roten Farbstoff.
- Die Reaktion benötigt entweder Ammoniak oder bestimmte primäre Amine.
- Die Reaktion benötigt einen ungewöhnlich hohen pH-Wert, nämlich 12,5-13,0.
- Die Reaktion benötigt eine Temperatur von 60-70 °C, eine Ausnahme wurde bei Lactulose und Diaminohexan festgestellt; hier ist die Farbbildung innerhalb von 30 Minuten mit bloßem Auge bereits bei Raumtemperatur zu beobachten, mit einem UV-Vis-Spektrometer schon früher. Bei höheren Temperaturen als 70 °C entgleitet die Farbstoffbildung; in diesem Fall erfolgt Melanoidbildung, erkennbar an einer unschönen rot-braunen Färbung, die schnell komplett braun wird.

Zucker unterliegen nach O'Brien in wässriger Lösung fünf grundlegenden Typen von Reaktionen (O'Brien 1997):

1. Anomerisierung
2. Isomerisierung
3. Eliminierung und Fragmentierung
4. Benzilsäure-Umlagerung
5. Maillard-Reaktion

Diese werden im Folgenden erläutert.

5.1 Anomerisierung von Zuckern in wässriger Lösung

Löst man kristalline α -D-Glucopyranose in Wasser, so wandelt sich diese über die offenkettige Zwischenform in β -D-Glucopyranose um und umgekehrt (Abbildung 87). Das ständige Öffnen und Schließen des Halbacetal-Ringes führt zur Bildung eines Gleichgewichtszustandes und verursacht auf diese Weise eine Veränderung des Drehwinkels von polarisiertem Licht – die Mutarotation (Matissek und Baltes 2016).

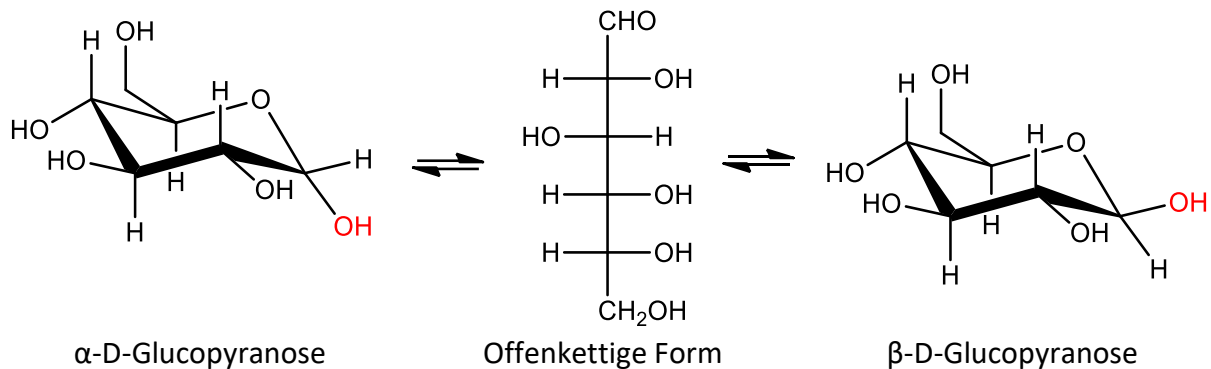


Abbildung 87: Mutarotation - Anomerisierung von Glucose)

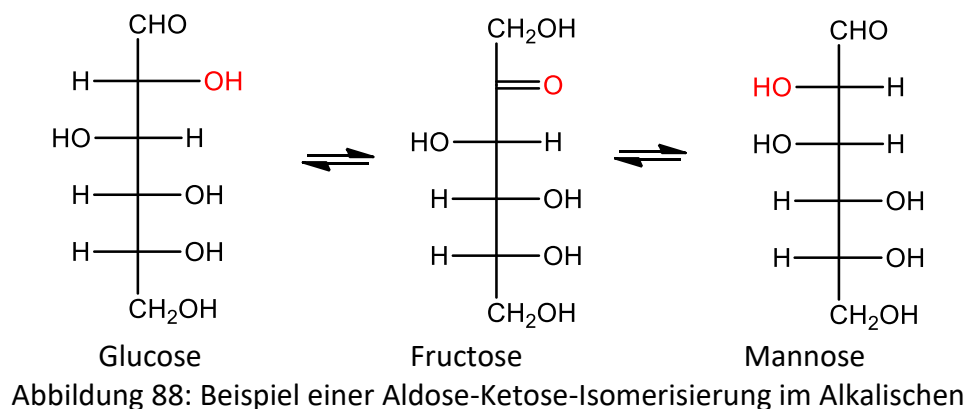
Die Mutarotation lässt sich mit einem Polarimeter beobachten, wenn man bei einer frisch zubereiteten Glucoselösung die Drehwinkel des polarisierten Lichts fortlaufend misst (Aebi 1965). In vielen Schulen befinden sich einfache Polarimeter, mit denen sich der Vorgang veranschaulichen lässt. Um die umständliche doppelte Darstellung von anomeren Strukturen zu vermeiden, wurde die geschlängelte Linie am anomeren C-Atom („wavy bond“) eingeführt (siehe Abbildung 89).

Wichtig in dem hier dargestellten Zusammenhang ist die offenkettige Form, denn diese besitzt eine Aldehydgruppe, an der sich verschiedene weitere Reaktionen vorstellen lassen, z.B. eine Glucosamin- oder Lactosamin-Bildung. Die offenkettige Form ist in Lösung nur zu weniger als 1% vorhanden, jedoch wird sie durch das Gleichgewicht immer nachgebildet und stellt einen wichtigen Ausgangspunkt für weitere Überlegungen dar (O'Brien 1997).

5.2 Isomerisierung durch Umlagerung nach Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein (1895)

Die Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung findet besonders im Alkalischen und bei Temperaturerhöhung statt (Bruyn und van Ekenstein 1895). Es handelt sich um einen Sonderfall der Keto-Enol-Tautomerie; das bedeutet, dass sich als Zwischenschritt zwischen einer Carbonylgruppe und einem chiralen C-Atom mit einer OH-Gruppe eine Doppelbindung (-en) bildet und das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe ein Wasserstoffatom erhält, sodass eine Hydroxygruppe (-ol) entsteht (Enol-Form). Im nächsten Schritt entsteht durch Verlust eines (anderen) Wasserstoffatoms wieder eine Carbonylgruppe; es ist aber nicht festgelegt, *welche* der beiden OH-Gruppen wieder zur Carbonylgruppe wird und an *welchem* C-Atom ein neues chirales Zentrum entsteht.

Dadurch entsteht ein Gemisch aus verschiedenen optischen Isomeren und Strukturisomeren; im dargestellten Beispiel (Abbildung 88) entsteht aus Glucose (links) zunächst Fructose (mittig) und dann Mannose (rechts) (Matissek und Baltes 2016).



In der Schule ist dieser Zusammenhang dadurch bekannt, dass der Ketozucker Fructose eine positive Fehling-Probe liefert, obwohl die Fehling-Probe eigentlich ein Aldehyd-Nachweis ist (Fleischer 2017).

Wenn aus **Glucose** durch Umlagerung **Fructose** entstehen kann, dann kann auch aus Lactose das Umlagerungsprodukt Lactulose entstehen; dasselbe gilt analog für Maltose und Maltulose. Aus den Abbildungen 89 und 90 geht hervor, dass jeweils die in den Abbildungen linken Molekülhälften gleichbleiben. Lediglich die 1,4-verknüpfte **Glucose** in der rechten Molekülhälfte wird zu einer 1,4-verknüpften **Fructose**.

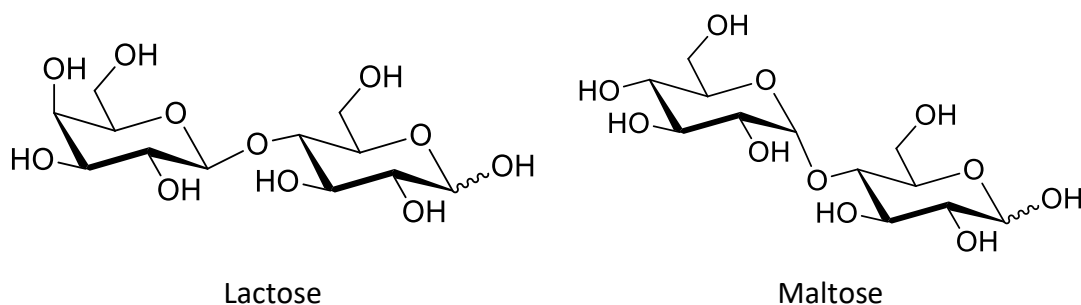


Abbildung 89: Formeln von Lactose und Maltose

Die Umlagerungsprodukte Lactulose und Maltulose (Abbildung 90) reagieren sowohl bei der Wöhlk-Probe als auch beim Fearon-Test wesentlich schneller zu den roten Farbstoffen als ihre Ausgangsverbindungen Lactose und Maltose (Abb. 89).

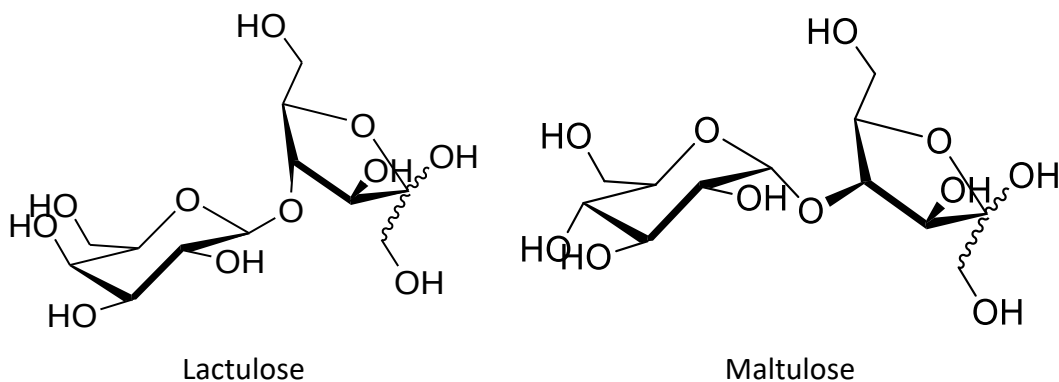


Abbildung 90: Umlagerungsprodukte Lactulose und Maltulose

Die schnellere Farbreifung bei Lactulose und Maltulose deutet darauf hin, dass bei diesen Verbindungen der zeitbestimmende Schritt der Umlagerung eingespart wird, bzw. untermauert die Annahme, dass die Reaktionen von *Lactose* und *Maltose* zu den roten Farbstoffen der Wöhlk-Probe bzw. des Fearon-Tests mit einer Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-

Umlagerung beginnen, als deren Resultat zunächst *Lactulose* und *Maltulose* entstehen (Ruppersberg et al. 2019).

Die Umlagerungen nach Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein ermöglichen nicht nur Umlagerungen und die Entstehung einer Doppelbindung zwischen dem ersten und zweiten C-Atom (C1 und C2), sondern auch einer Doppelbindung zwischen dem zweiten und dritten C-Atom, und logischer weise dann auch weiter abwärts in Richtung C6, wodurch eine unüberschaubare Zahl von weiteren Isomeren, Zwischen- und Nebenprodukten entstehen kann (Kanzler 2017).

Bei Lactose und Maltose wird allerdings diese „Wanderung“ der Doppelbindung in Richtung C6 vorzeitig gestoppt, weil durch die glycosidische Bindung an C4 keine Deprotonierung der OH-Gruppe möglich ist. Dadurch entstehen bei Monosacchariden andere Abbauprodukte als bei Disacchariden. Dieses Phänomen wurde erstmals von Kramhöller, Pischetsrieder und Severin sowie später von Kanzler beschrieben (Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M., Severin, Th. 1993; Pischetsrieder und Severin 1994, 2007; Kanzler 2017) und wird „Weichenstellung“ genannt. Diese „Weichenstellung“ ermöglicht die Bildung eines Zwischenprodukts, aus dem der instabile rote Farbstoff gebildet wird.

Außer den Umlagerungen ergeben sich auch noch weitere Möglichkeiten wie Abspaltung von Wasser (Eliminierung) oder Fragmentierung. Auch für diese Reaktionen spielt die glycosidische Bindung an C4 eine Rolle.

5.3 Eliminierungen und Fragmentierungen von Zuckern

Durch Abspaltung von Wasser ergibt sich, wie schon in 5.2 beschrieben, eine Doppelbindung mit einer benachbarten Hydroxygruppe (Enol, siehe Abbildung 91). Diese Reaktion unterliegt aber nicht der leichten Umkehrbarkeit wie bei einer Keto-Enol-Tautomerie.

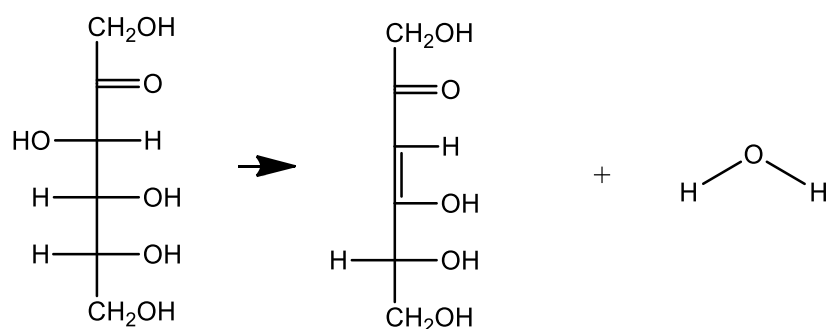


Abbildung 91: Durch Eliminierung von Wasser entsteht ein Enol (siehe Text)

Die benachbarte Hydroxygruppe kann deprotoniert werden; es bildet sich ein Enolat. Aus der deprotonierten Hydroxygruppe kann in einem weiteren Schritt eine zweite Carbonylgruppe entstehen. Auf diese Weise können besonders reaktive α -Dicarbonyl-Verbindungen (Abbildung 92) gebildet werden (Kanzler 2017).

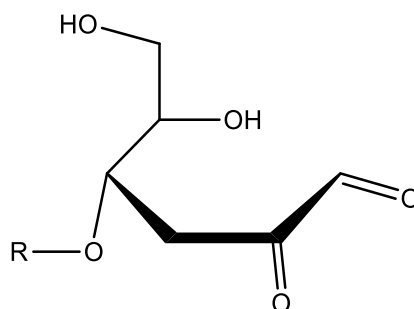


Abbildung 92: Bildung einer α -Dicarbonyl-Verbindung (hier: 3-Desoxyoson)

Wasser ist nicht das einzige Eliminierungsprodukt; auch andere Moleküle können abgespalten werden, z. B. Ameisen- oder Essigsäure (S. 159 in (O'Brien 1997)).

Beim alkalischen Zuckerabbau in der Hitze (65 °C) sind vor allem Eliminierungen und Fragmentierungen denkbar (Belitz et al. 2008). Neben der Abspaltung von Wasser, die normalerweise im Säuren bevorzugt auftritt, ist auch die Eliminierung von Kohlenstoffdioxid denkbar, welches man normalerweise an aufsteigenden Gasbläschen erkennen würde. Aufgrund der streng alkalischen Bedingungen entsteht jedoch kein Kohlenstoffdioxidgas, sondern Carbonationen.

Durch die Abspaltung von sauer reagierenden Molekülen, wie z. B. Ameisensäure, ändert sich der pH-Wert der Lösung, was durch Verschiebung (Shift) der Peaks bei NMR-Untersuchungen mehrfach beobachtet wurde (Sönnichsen 2018).

Werden nicht nur kleine Teile des Moleküls abgespalten, sondern zerfällt es in zwei Hälften, so spricht man von Fragmentierung (O'Brien 1997). Ein solches mögliches Fragment ist z.B. Methylglyoxal, das zusammen mit Ammoniak zu Aminopropanon reagieren könnte (Abbildung 93), einem möglichen Amin-Kandidaten für die Farbstoffbildung der Wöhlk-Reaktion.

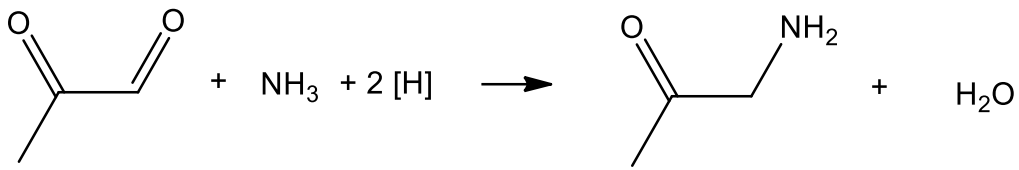


Abbildung 93: Methylglyoxal reagiert unter reduktiven Bedingungen zu Aminopropanon

Als Spezialfall für Eliminierungen und Fragmentierungen muss der Spengler-Pfannenstiel-Abbau (Luftsauerstoff, alkalisches Milieu) unter Bildung von Ameisensäure und Derivaten der Arabonsäure (Spengler, O., Pfannenstiel, A. 1935) angesehen werden. Dieser Mechanismus könnte ebenfalls das mehrfach beobachtete Absinken des pH-Wertes erklären.

5.4 Benzilsäure-Umlagerungen (Bildung einer verzweigten Kette)

Die Benzilsäure-Umlagerung wurde 1838 von Justus von Liebig entdeckt. Es handelt sich um eine intramolekulare Umlagerung (formale Disproportionierung) zweier Carbonylgruppen in eine Alkohol- und eine Carbonsäuregruppe, gleichzeitig entsteht eine verzweigte Kohlenstoffkette (siehe Abb. 95, nach Abb. 5.3 in (O'Brien 1997)).

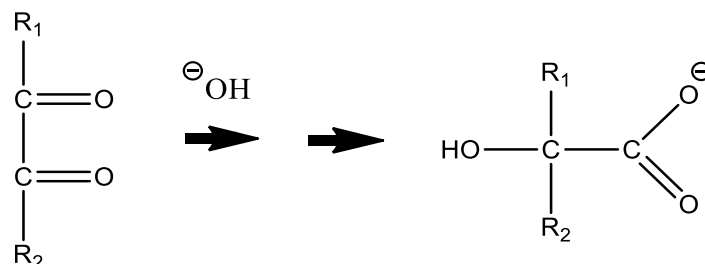


Abbildung 94: Vereinfachte Darstellung einer Benzilsäure-Umlagerung

In Bezug auf Zucker kommen Benzilsäure-Umlagerungen bei der Bildung von Saccharinsäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette vor.

5.5 Maillard-Reaktion

Wenn Zucker beim Erhitzen mit Aminosäuren reagieren, spricht man von einer Maillard-Reaktion (Maillard 1912). Sieht man Methylamin als „vereinfachte Aminosäure“ (decarboxyliertes Glycin) an, dann kann der Fearon-Test als frühe und mittlere Maillard-Reaktion betrachtet werden (s.u.). Auch die späte Maillard-Reaktion ist in diesem

Zusammenhang zu beobachten, nämlich dann, wenn der Fearon-Test durch zu starkes Erhitzen (ab ca. 80° C) misslingt und die Melanoidbildung in Form eines unschönen braunschwarzen Ergebnisses sichtbar wird.

Bei der Wöhlk-Probe gibt es starke Hinweise darauf, dass das zum Farbstoff führende Amin erst während der Reaktion gebildet wird. Eine erste Vermutung in diese Richtung äußerte Fearon 1942 (Fearon 1942).

Die Einteilung der Maillard-Reaktion in drei Stadien wurde 1953 von John Edward Hodge (1914-1996) vorgenommen. Diese drei Stadien kann man grob wie folgt beschreiben (Hodge 1953):

- a) In der frühen Maillard-Reaktion bilden sich Zuckeramine (Amadori- und Heyns-Verbindungen, s.u.),
- b) die mittlere Maillard-Reaktion wird durch Abbaureaktionen und Eliminierungen bestimmt, begleitet von starken Absorptionen im UV-Bereich, und
- c) in der späten Maillard-Reaktion bilden sich Farben im sichtbaren Bereich, es entstehen O- und N-Heterocyclen, weiterhin vernetzen sich die Säureenden der Aminosäuren mit den verbliebenen Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle, am Ende bilden sich braunschwarze Melanoide (Hodge 1953).

Über die Maillard-Reaktion gibt es unzählige Publikationen; selbst die Zahl der Übersichtsartikel ist sehr groß, u. a. (Belitz et al. 2008; Hellwig und Henle 2014; Ledl und Schleicher 1990; Matissek und Baltes 2016). Einige Publikationen und Dissertationen zur Maillard-Reaktion beschäftigen sich explizit mit den Reaktionsprodukten von Lactose (praktischer Bezug: Milchprodukte) und Maltose (praktischer Bezug: Rösten, Röstmalz, Bierherstellung) (Frandrup-Kuhr 2004; Kanzler 2017; Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M., Severin, Th. 1993; Pischetsrieder und Severin 1994, 2007; Severin und Loidl 1976).

Auch wenn bisherige Testreaktionen zur Erzeugung eines roten Farbstoffs mit Maillard-Zwischenprodukten fehlschlagen (Kanzler 2019), so ist die Erörterung der Maillard-Reaktion an dieser Stelle wichtig, denn immerhin wurde hier die „Weichenstellung“ im Zuckerabbau aufgrund von 1,4-Verknüpfungen beobachtet: Befindet sich am Sauerstoffatom in Position 4 eines Glucosemoleküls ein weiteres Monosaccharid, so entstehen andere Heterocyclen als bei der Maillard-Reaktion von unverknüpfter Glucose (Pischetsrieder und Severin 2007).

Die 1,4-Verknüpfung bzw. eine Schutzgruppe an der OH-Gruppe von C-4 verhindert eine Eliminierung der ursprünglich dort lokalisierten OH-Gruppe und stellt somit eine molekulare Weichenstellung dar. Bei Lactose gibt es z.B. keine 3,4-Endiolisierung (O'Brien 1997).

Leider werden Maillard-Reaktionen häufig nur im pH-Bereich von 4-7,5 untersucht (Ledl und Schleicher 1990), obwohl es auch alkalische nicht-enzymatische Bräunungsreaktionen gibt, z.B. bei Laugenbrötchen, Salzstangen, Laugenbrezeln oder bei der Zuckercouleur-Gewinnung (häufigste Anwendung von Zuckercouleur: Cola-Getränke). Aus diesem Grund gibt es zahlreiche Arbeiten zur Maillard-Reaktion von Lactose und Maltose, die aber an dieser Stelle nur von eingeschränktem Nutzen sind, da sie sich nur auf den neutralen bis sauren Bereich beziehen und den hier wichtigen alkalischen Bereich völlig außer Acht lassen.

Da bekannte Zwischenprodukte wie Maltol und Furaneol (siehe Abb. 95) unter Wöhlk- bzw. Fearon-Bedingungen *nicht* zur Bildung eines roten Farbstoffs führen, muss an eine Kombination von verschiedenen Zuckerabbauwegen gedacht werden. Doch zunächst müssen noch zwei bekannte Umlagerungsreaktionen erläutert werden, die Amadori-Umlagerung (aus Aldosen) und die Heyns-Umlagerung (aus Ketosen).

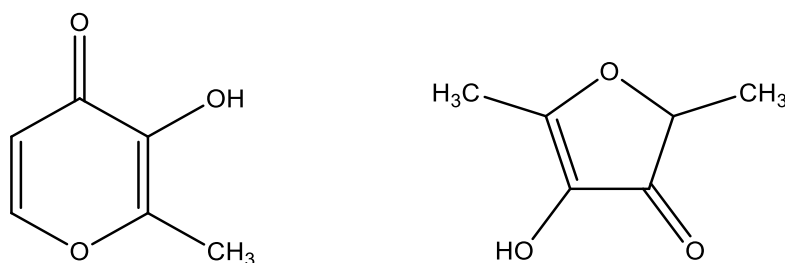


Abbildung 95: Maillard-Zwischenprodukte Maltol (links) und Furaneol (rechts)

5.5.1 Amadori-Umlagerungen

Aldosen reagieren mit Aminen in der Weise, dass das Sauerstoffatom am anomeren C-Atom (auch betrachtbar als das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des geöffneten Halbacetal-Rings) durch das Stickstoffatom des Amins substituiert wird, indem zunächst das Amin an die Carbonylgruppe addiert wird und nach Eliminierung von Wasser infolge Umlagerung eine 1-Aminoketose entsteht (siehe Abbildung 96) (Kuhn, R., Weygand, F. 1937).

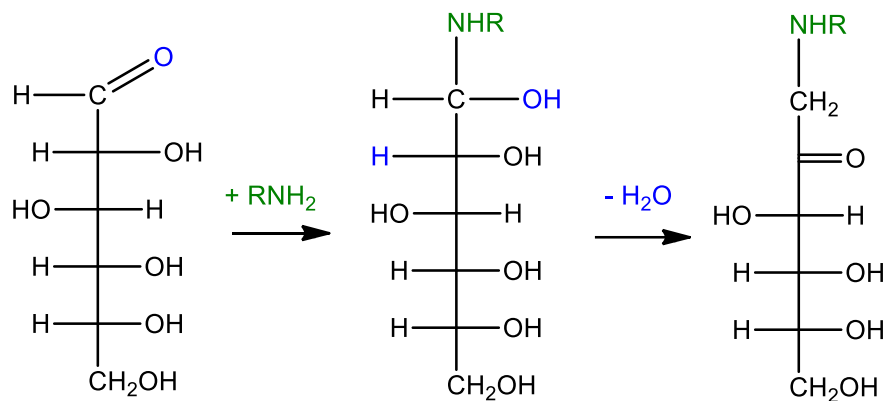


Abbildung 96: Amadori-Umlagerung (verkürzte Darstellung)

Wahlweise entstehen über mehrere Zwischenschritte (verkürzte Darstellung siehe Abbildung oben) eine 1-Amino-1-desoxyketopyranose oder eine 1-Amino-1-desoxyketofuranose. Diesen gesamten Vorgang nennt man nach seinem Entdecker eine Amadori-Umlagerung (Gallas et al. 2012; Kuhn, R., Weygand, F. 1937; Micheel und Dijong 1962).

5.5.2 Heyns-Umlagerungen

Reagieren anstelle von Aldosen **Ketosen** mit einem Amin, so wird das Sauerstoffatom der Keto-Gruppe durch das Stickstoffatom des Amins substituiert (Heyns und Beilfuß 1973).

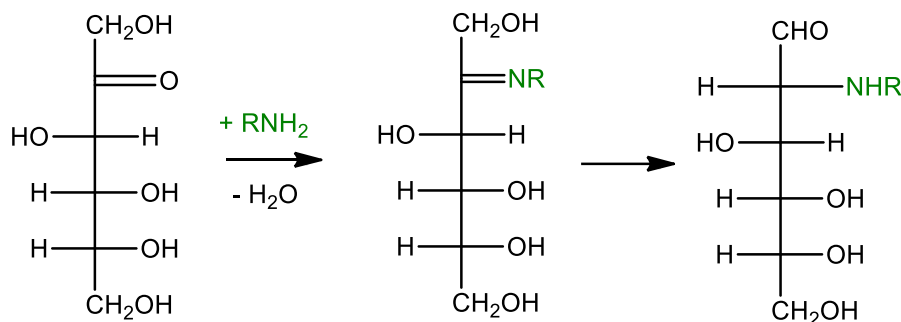


Abbildung 97: Heyns-Umlagerung (verkürzte Darstellung)

Über Zwischenschritte bilden sich hier jedoch 2-Amino-2-desoxy-aldosen. Zusätzlich zu dem in Abb. 97 aufgeführten Stereoisomer sind weitere Produkte möglich, da a) an C2 ein neues Chiralitätszentrum entstehen kann und b) die Carbonylgruppe auch „abwärts wandern“ kann, wodurch eine 3-Keto-Verbindungen neu entstehen könnte. Nach ihrem Entdecker aus Kiel nennt man eine derartige Verbindung eine Heyns-Verbindung (Wrodnigg, T., Stütz, A. 1999; Heyns und Beilfuß 1973).

Als Vorgriff auf die spätere Diskussion darf an dieser Stelle gesagt werden, dass eine Heyns-Umlagerung für den Mechanismus der Wöhlk-Probe und des Fearon-Tests gegenüber der Amadori-Umlagerung als wahrscheinlicher angesehen werden muss, da die Ketosen Lactulose und Maltulose eine wesentlich raschere Farbreifung zeigen.

5.6 Fazit der Überlegungen zum Reaktionsverlauf

Nach allen bisher erörterten Sachverhalten wird klar, dass es sich bei der Wöhlk-Probe und beim Fearon-Test um eine recht komplizierte Kombination verschiedener Reaktionsmechanismen handeln muss:

- Durch experimentelle und logische Schlussfolgerungen ist es sehr eindeutig, dass die Bildung einer Ketose durch die Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung einen sehr wichtigen -und zwar wahrscheinlich den initialen- Schritt darstellen muss (Geschwindigkeitsvergleich Ketose-Aldose) (Ruppersberg et al. 2019).
- Als zweiter Schritt wäre eine Heyns-Umlagerung denkbar (s.o.).
- Der hohe pH-Wert kann in Verbindung mit hohen Temperaturen *auch* zur Eliminierung von Wassermolekülen und somit zur Bildung von Doppelbindungen führen, aber *vor allem* zum Bruch und Abbau des Kohlenhydratskeletts (Belitz et al. 2008). Dabei ist die Abspaltung von Ameisensäure, Essigsäure usw. möglich, wodurch erklärt werden kann, warum während der Reaktion der pH-Wert absinkt.
- Einige Fragmente aus dem Abbau des Kohlenhydratskeletts reagieren bei der Wöhlk-Probe mit dem Überschuss von Ammoniak-Molekülen höchstwahrscheinlich zu einem primären Amin (oder mehreren). Dadurch erklärt sich, warum die Wöhlk-Probe länger dauert als der Fearon-Test, der von vornherein mit einem primären Amin startet. Dieses hypothetische „Wöhlk-Amin“ müsste eine Spacer-Gruppe besitzen und ein Sauerstoff-Atom, das für die „Blauverschiebung“ von 541 nm (Methylamin) nach 527 nm („Wöhlk-Farbstoff“) verantwortlich ist.
- Die Schutzgruppe am Kohlenstoffatom C4 der geschützten Glucosen bzw. die 1,4-Verknüpfung bei Lactose, Maltose usw. ist am Anfang der Reaktion wichtig, um die Bildung einer Carbonylgruppe an C4 zu vermeiden. Schon 2007 berichteten Pischetsrieder und Severin über eine „Weichenstellung“ (Pischetsrieder und Severin 2007), nämlich die Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen und 2,3-

Dicarbonylverbindungen, wohingegen *die typischen Monosaccharid-Intermediate 1,4-, 2,4- und 3,4-Dicarbonylverbindungen nicht gebildet werden.*

Diesen Zusammenhang greift auch Kanzler (Kanzler 2017) auf (siehe Abb. 98, Namen der Moleküle v.l.n.r.: Maltoson, 3-Desoxyoson der Maltose, 1-Desoxyoson der Maltose).

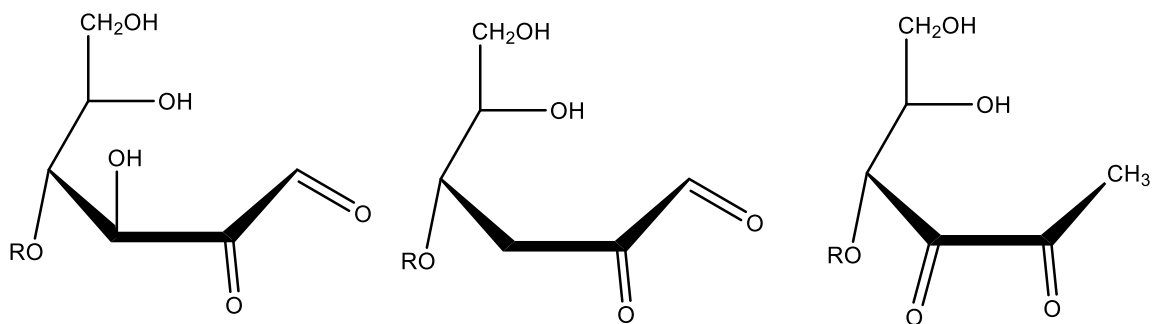


Abbildung 98: α -Dicarbonylverbindungen, die beim Abbau von Maltose gebildet werden

- Im weiteren Verlauf der Reaktion wird die Schutzgruppe an C4 bzw. das 1,4-verknüpfte Galactosid (bei Lactose) bzw. Glucosid (bei Maltose) abgespalten. Dies ist durch den Geruch der abgespaltenen Schutzgruppe bzw. durch das Auffinden von Galactose bzw. Glucose im Reaktionsgemisch³¹ erkennbar.
- Das Oson der Maltose bildet vorwiegend Furfural (Kanzler 2017), siehe Abb. 99.

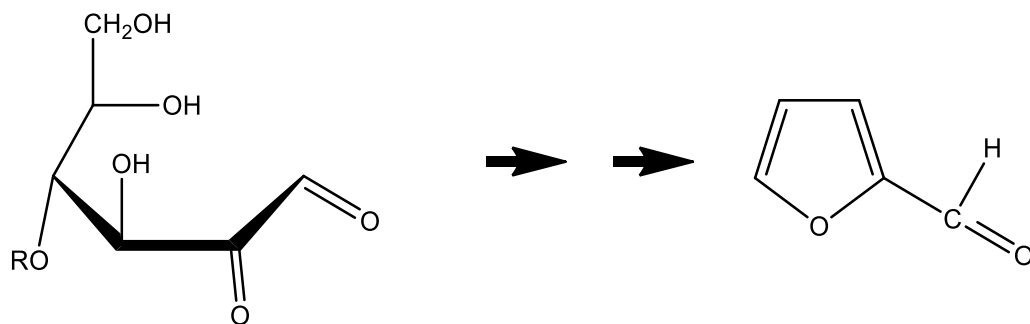


Abbildung 99: Bildung von Furfural aus dem Oson der Maltose

- Das 3-Desoxyoson und das 1-Desoxyoson der Maltose bilden neben Sauerstoffheterocyclen wie z. B. Hydroxymethylfurfural (HMF), Furaneol, Maltol auch Stickstoffheterocyclen wie z. B. 2-Acetylpyrrol und 2-Methyl-3-hydroxypyridinon (siehe Abbildung unten) (Seite 10 in (Kanzler 2017)).

³¹ Nachgewiesen durch Dünnschichtchromatographie

Hiervon ist insbesondere letzteres interessant, da Pischetsrieder und Severin schon 2007 von instabilen roten Pyridiniumbetainen berichten (Pischetsrieder und Severin 2007).

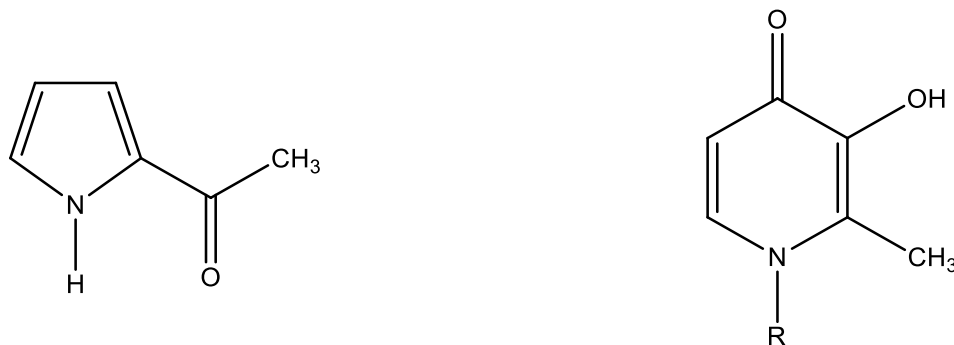


Abbildung 100: 2-Acetylpyrrol (li.) und 2-Methyl-3-hydroxypyridinon (re.)

Während von 2-Acetylpyrrol (Abb. 100 links) keine Bildung eines farbigen Moleküls zu erwarten ist, liegen Pyridone (Abb. 100 rechts) im stark alkalischen Bereich oftmals als farbige Betaine mit intramolekularer Ladungsverteilung vor, und zwar befindet sich die positive Ladung am Stickstoffatom, während im selben Molekül eine oder zwei negative Ladungen an den Sauerstoffatomen der deprotonierten Hydroxygruppen befinden (siehe Abbildung 101). Betaine können im Gegensatz zu zwitterionischen Aminosäuren ihre Ladungen nicht durch intramolekulare Protonenwanderung ausgleichen (König und Butenschön 2007).

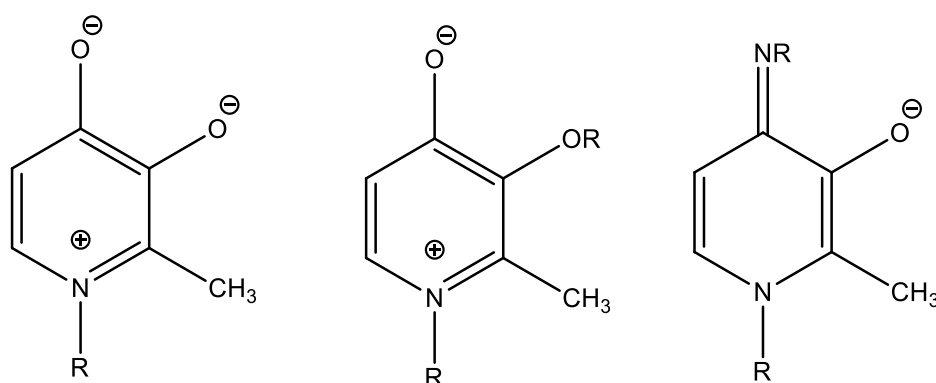


Abbildung 101: Bildung von Pyridiniumbetainen nach Abb. 7 in (Pischetsrieder und Severin 2007)

Weitere Aspekte, die in die Überlegungen einbezogen werden müssen, sind:

- Bei der Bildung des roten Farbstoffes aus Lactulose und 1,6-Diaminohexan reicht Raumtemperatur aus.

- Das eingesetzte primäre Amin kann nicht beliebig ausgetauscht werden; z.B. Isopropylamin führt nicht zum roten Farbstoff. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Substituent am Stickstoffatom für den eingeschlagenen Reaktionsweg verantwortlich ist; so ist die Reaktion mit keinem (Ammoniak) oder einem einfach verbundenen C-Atom (Methylamin, Ethylamin, Ethanolamin, ...) möglich, beim Fehlen einer CH₂-Gruppe jedoch nicht.

Aufgrund dieser vielen Tatbestände kristallisieren sich als mögliche Strukturformel für den roten Farbstoff einige Strukturen als besonders geeignet heraus. Diese werden im folgenden Abschnitt erörtert.

5.7 Überlegungen zu möglichen Strukturformeln des roten Farbstoffs

Obwohl die Testreaktionen auf Lactose und Maltose gemäß Wöhlk (1904) und Fearon (1942) schon lange bekannt sind, gab es für das Chromophor der beiden Farbstoffe bis 2015 weder eine Struktur noch war der Mechanismus zu dessen Bildung bekannt.

Aufgrund des UV Vis Spektrums (Ruppersberg (2017a)), das eine breite, wenig strukturierte für den Farbeindruck verantwortliche Bande mit sehr geringer Intensität bei 527 nm (Wöhlk) resp. 541 nm (Fearon) zeigt, kann eine cyanin- oder merocyaninartige Struktur auf jeden Fall ausgeschlossen werden (Kussler und Ruppersberg 2019).

Da derartige Farbbanden oftmals aus einem Charge-Transfer resultieren und bei betainartigen Verbindungen mit Ladungsseparation auftreten, ist daher zu vermuten, dass den Farbstoffen ebenfalls die Struktur eines Betains zukommen könnte, wobei bevorzugt von einem Pyridiniumbetain auszugehen war (Kussler und Ruppersberg 2019).

Da die beiden Farbstoffe nur im stark alkalischen Milieu (pH 12 -13) einigermaßen stabil sind und auch nicht mit einem geeigneten Lösungsmittel ausgeschüttelt werden konnten, wurde versucht, anhand von in der Kohlenhydratchemie bekannten Reaktionen eine Konstitution zu entwickeln,

- die sich mit den in zahlreichen experimentellen Befunden von Ruppersberg (Ruppersberg und Hain 2016, 2017; Ruppersberg et al. 2019; Kussler und Ruppersberg 2019) vereinbaren lässt,
- die die für ein Chromophor erforderlichen Merkmale aufweist und
- ein entsprechendes UV Vis Spektrum erwarten lässt.

Weiterhin wurde versucht, den Reaktionsverlauf bei drei Reaktionen mit verschiedenen Sacchariden und Aminen mittels H-NMR zu verfolgen und so zu Informationen zur Farbstoffstruktur zu gelangen (Sönnichsen 2018, 2018). Zwar wurde bei Experimenten mit 4,6-O-Ethylidenglucose und Methylamin³² eine Vielzahl von Signalen im olefinischen und (hetero-) aromatischen Bereich zwischen δ 5.3 und 8.6 gefunden, die für das Chromophor relevant sein könnten, aber eine konkrete Zuordnung wäre ohne korrekte Struktur rein spekulativ. Aufgrund der fehlenden Kopplungskonstanten > 7 Hz lässt sich auf jeden Fall festhalten, dass im Chromophor keine orthoständigen Protonen enthalten sind (Sönnichsen 2018).

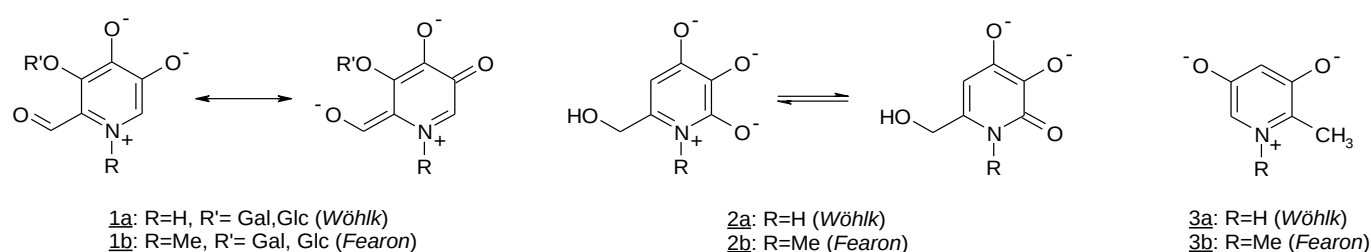


Abbildung 102: Überlegungen zur Struktur des roten Farbstoffs (aus cti (CC-BY))

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass bei dem Wöhlk- und Fearon-Test auf Lactose und Maltose Ammoniak bzw. Methylamin mit der C₁-Formylgruppe zur Schiffbase reagieren und nach Abspaltung der C₅-Hydroxylgruppe als Wasser in einer electrocyclischen Reaktion zu einem partiell gesättigten Pyridinring führen.

Die Oxydation der 6-Hydroxymethylgruppe zur Formylgruppe führt letztendlich zu Betain 1, wobei die Formylgruppe für die Ausbildung des Chromophors essentiell ist.

Da bei der Einwirkung von Alkalilauge auf reduzierende Zucker zunächst Endiolat(di)anionen entstehen, die bei weiterer Einwirkung von Alkali unter Aldolspaltung in Trioseredukton und andere kleine Bruchstücke fragmentieren können, wurde deshalb angenommen, dass das zweite Zuckermolekül in der C₄ Position quasi als Schutzgruppe diese Fragmentierung verhindert und somit nicht als Austrittsgruppe fungiert, also für die Farbstoffbildung essentiell ist.

³² Beschränkung auf die kleinstmöglichen verfügbaren Edukte, um Störungen und Nebenprodukte weitestgehend auszuschließen.

Dieser Aspekt wurde noch dadurch verstärkt, dass sich eine 4,6-O-Ethyliden- und 4,6-O-Benzyliden-Schutzgruppe auf die Farbstoffbildung ebenfalls positiv auswirken (Kussler und Ruppertsberg 2019).

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen ließen jedoch Zweifel an der angenommenen Struktur der beiden Farbstoffe aufkommen, da diese nicht ohne weiteres mit der vorgeschlagenen Konstitution und dem Bildungsmechanismus in Einklang zu bringen waren. So war es nicht zu verstehen, warum Ketosen schneller reagieren als die korrespondierenden Aldosen, falls der Ringschluss tatsächlich über die Formylgruppe verlaufen sollte.

Ebenso war es überraschend, dass die 4,6-O-Ethyliden-geschützte Glucopyranose in beiden Testreaktionen nochmals schneller reagiert als die Ketosen und ebenfalls den roten Farbstoff ergibt, obwohl die geschützte 6-Hydroxymethylgruppe nicht ohne weiteres zur Formylgruppe oxidiert werden kann.

Nachdem bei der analogen ebenfalls positiv verlaufenden Umsetzung mit 4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose auch noch der Geruch von Benzaldehyd wahrzunehmen war, war klar, dass die Schutzgruppe doch abgespalten wird und die angenommene Konstitution nicht mehr zu halten ist.

Für das Auffinden einer den neuen Ergebnissen angepassten Struktur wurde daher angenommen, dass im alkalischen Milieu Lactose und Maltose, aber auch die 4,6-O-geschützten Glucopyranosen in einer Lobry-De Bruyn-Van Ekenstein-Umlagerung leicht in die entsprechenden Ketosen übergeführt und die Hydroxymethylgruppe in der 1-Position des Saccharids zur Carboxylgruppe oxydiert wird.

Das durch erneute Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung entstehende korrespondierende 2,3-Dioxido-1-carboxylat cyclokondensiert mit Ammoniak bzw. Methylamin unter Eliminierung von Wasser sowie des zweiten Zuckermoleküls bzw. Abspaltung der Schutzgruppe zu Chromophor 2 (Alkalisalz von 6-Hydroxymethyl-pyridin-1-ium-2,3,4-trisolat). Weitere Details zum Reaktionsablauf und Mechanismus sind in der Publikation (Ruppertsberg et al. 2019) enthalten.

Jedoch wurde kurze Zeit später auch diese Konstitution wieder in Frage gestellt, da zum einen die Struktur an sich, zum anderen aber auch der angenommene Reaktionspfad nicht erklären konnten, warum die kirschrote Farbbildung beim Fearon-Test mit Isopropyl-, sec.-Butyl- und tert.-Butylamin ausbleibt und bei der adäquaten Testreaktion mit n-Propyl-, n-Butyl- und

Isobutylamin positiv verläuft. Dies bedeutet, dass sich eine Methylgruppe als Abstandhalter (Spacer) benachbart zum Stickstoffatom befinden muss.

Eine Begründung für diese Spacer-Regel konnte bisher nicht gefunden werden, aber sie konnte bei allen neu getesteten Aminen bestätigt werden.

Einen weiteren Aspekt gegen diese Strukturannahme schienen die an der TU Dresden durchgeführten Messungen von einigen Fearon-Farbstoffen mittels HPLC-MS zu liefern. Allerdings konnte die Trennung mittels HPLC gerätebedingt³³ nicht mit den stark alkalischen Proben erfolgen, sondern nur mit den zuvor neutralisierten Lösungen, in den die nur im stark alkalischen Bereich stabilen Farbstoffe zerfallen.³⁴

Aus den Molekülpeaks der Messungen ergab sich für die verschiedenen Fearon-Farbstoffe eine homologe Reihe mit der empirischen Formel $C_6H_6O_2(NAlk)$, d.h., nach der Reaktion mit dem primären Amin erfolgt formal die Abspaltung der zweiten Zuckerkomponente bzw. der Schutzgruppe sowie weiterer zwei Moleküle Wasser. Eine Oxidation hätte demzufolge nicht stattgefunden. Als mögliche Struktur wurde für die Fearon-Farbstoffe daher die Konstitution 3 (Alkalisalz von 2-Methylpyridinium-3,5-diolat) angenommen.

Weitere Überlegungen zum Reaktionsablauf und Mechanismus sind in der Publikation (Ruppersberg et al. 2019) enthalten.

Wie die anschließend an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen der ausschließlich im alkalischen Milieu vorliegenden Farbstoffe mit ESI (pos. und neg.) jedoch zeigten, trifft auch diese Struktur offenbar nicht zu.

Auch in Gießen wurde wie bereits in Dresden mit verschiedenen Aminen eine homologe Reihe gefunden, die jedoch zwei Moleküle des eingesetzten Amins, aber nur noch fünf Kohlenstoffatome des eingesetzten Saccharids enthält.

Außerdem enthält der gefundene Molekülpeak eine für ein durchkonjugiertes System um m/e 2 zu große Masse. Obwohl in den Massenspektren eine Vielzahl von Molekülpeaks detektiert werden konnten, gibt es keinen Hinweis auf die in Dresden gefundene homologe Reihe mit $m/e \pm H$ resp. $+ Na$. Daher ist anzunehmen, dass die beiden gefundenen homologen Reihen nichts miteinander zu tun haben.

³³ Die stark alkalischen Lösungen könnten den Geräten schaden und die Matrix der HPLC-Säule zersetzen.

³⁴ Eine Rücktitration in den stark alkalischen Bereich erbrachte keine Wiederkehr der roten Farbe.

Möglicherweise ist in den Massenspektren der Molekülpeak des Wöhlk- und Fearon-Farbstoffs noch nicht einmal enthalten. Diese Annahme begründet sich vor allem auf die ESI (pos. und neg.) Messungen der Testreaktion von Lactulose und Glucose mit GABA und β -Alanin.

Obwohl der Fearon-Farbstoff nur im Fall von Lactulose gebildet wird während die Reaktionslösung von Glucose hingegen weitgehend farblos bleibt, zeigen die jeweiligen ESI Messungen der alkalischen Reaktionslösungen von Lul/Glc mit GABA bzw. mit β -Ala weitgehend die gleichen Peaks, die jedoch ausschließlich auf Cluster der eingesetzten Aminosäure mit Natriumionen zurückzuführen sind, aber keine Peaks, die aus der Reaktion der Aminosäuren mit den Sacchariden selbst bzw. mit irgendwelchen aus den Sacchariden herrührenden Fragmenten stammen könnten.

Ausblickend bleibt festzuhalten, dass die bisher auf der Basis von Pyridiniumbetainen angenommenen Strukturen 1-3 als Chromophor weder bestätigt noch hinreichend widerlegt werden konnten (Ruppersberg et al. 2019).

6 Lactose und Maltose im Unterricht

Im schulischen Kontext kommen Lactose und Maltose in mehreren Jahrgangsstufen vor, je nach Schultyp und –curriculum in den Fächern Biologie, Chemie oder im integriert unterrichteten Fach „Naturwissenschaften“:

- Zunächst werden in den **Jahrgangsstufen 5-6** die Säugetiere, Milchviehhaltung, gesunde Ernährung des Menschen, Geburt und Ernährung eines Babys mit Muttermilch behandelt (siehe z.B. (Dobers 2011)). Die Begriffe Milchzucker oder Lactose können hierbei schon Erwähnung finden; eine genauere Betrachtung des Sachverhalts erfolgt auf dieser frühen Stufe des Wissenserwerbs jedoch im Allgemeinen nicht.
- In den **Jahrgangsstufen 7-10** gibt es sehr unterschiedliche Curricula, was einerseits der Ausrichtung der Schule (sprachlich, musisch-künstlerisch, mathematisch-naturwissenschaftlich) geschuldet ist und andererseits dem Angebot an real verfügbaren Fachlehrkräften, bedingt durch Lehrkräftemangel. So gibt es teilweise sehr fachlichen naturwissenschaftlichen Unterricht mit anspruchsvollen biochemischen Experimenten, bei denen Lactose als Bestandteil von Milch und Milchprodukten und Maltose als Zwischenprodukt des Stärkeabbaus auftauchen - jedoch bei Fachlehrermangel oder bei nicht naturwissenschaftlicher Ausrichtung können genauere Betrachtungsweisen und chemische Experimente auch gänzlich entfallen.³⁵ Anstelle des Begriffs „Lactose“ wird in den unteren Jahrgangsstufen üblicherweise das „leichtere“ Wort Milchzucker benutzt; anstelle von „Maltose“ wird der Begriff Malzzucker verwendet.

Maltose alias Malzzucker ist Kindern von den Malzbonbons bekannt und kommt im Unterricht als Abbauprodukt von Stärke vor. In einem Standardexperiment zum Stärkeabbau wird üblicherweise Speichelamylase („Spucke“) eingesetzt; manche Lehrkräfte verwenden auch käufliche Amylasen (Markl 2015; Hohmann 2008; Freundner-Huneke et al. 2016). Die Tiefe der Betrachtung ist sehr unterschiedlich und hängt stark vom Leistungsvermögen der Lernenden (und der Lehrkraft) ab: Als bloßes *Phänomen* eignet sich das langsame Kauen eines Stücks Weißbrot oder Brötchen im Mund, als Beobachtung wird dazu ein süßer Geschmack erwähnt, der nach längerem

³⁵ Aus diesem Grund ist der Nachqualifizierung von Lehrkräften, die sich für Fort- und Weiterbildung im naturwissenschaftlichen Bereich interessieren, eine hohe Bedeutung zu widmen.

Kauen im Mund zustande kommt. Es gibt aber auch Klassen, die ein *biochemisches Experiment* durchführen, indem sie eine zuvor hergestellte Iod-Stärke-Einschlussverbindung mit Speichelamylase versetzen und das „Verschwinden“ der blauen Farbe beobachten (siehe z. B. (Freundner-Huneke et al. 2016; Hohmann 2008; Markl 2015)). Den Lernenden wird dann erklärt, dass der süße Geschmack durch Maltose entsteht. Zu dem an dieser Stelle eigentlich erforderlichen experimentellen Nachweis der Maltose kommt es üblicherweise nicht. Auch der Lactoseintoleranz wird bereits Aufmerksamkeit gewidmet (siehe z. B. (Groth, H., Knippenberg, A., Leiding, U. 2016)). Üblicherweise wird der experimentelle Nachweis von Lactose in Milchprodukten mangels Bekanntheit einer geeigneten Reaktion nicht durchgeführt.

- Im Unterricht der **gymnasialen Oberstufe** kommen Lactose und Maltose im Rahmen des Biologieunterrichts bei chemischen Grundlagen, Enzymatik, Zellstoffwechsel und Humangenetik vor (Weber 2015), im Rahmen des Chemieunterrichts bei den Kohlenhydraten (siehe z. B. (Fischedick et al. 2018)). Seit 2018 gibt es erstmalig ein Lehrbuch für Chemie in der Sekundarstufe II, in welchem die Wöhlk-Probe zum Lactosenachweis benutzt wird (van Nek, R. et al. 2018), ansonsten sind keinerlei spezifische Nachweise für Lactose und Maltose vorgesehen (siehe Kapitel 2.1: Übliche Kohlenhydratnachweise in gängigen Schulbüchern).

Bei der Überprüfung von Milchprodukten oder Stärkeabbau-Reaktionen liegt eine starke Verknüpfung mit dem Alltag der Schülerinnen und Schüler vor. Das Lernen in sinnstiftenden Kontexten, auch Kontextorientierung genannt, bedeutet eine starke Motivation und ein großes Interesse an chemischen Sachverhalten (Parchmann et al. 2006; Parchmann et al. 2001). Die Ideen zur Kontextorientierung wurden in den Folgejahren von Bildungsinstitutionen wie der KMK stark aufgegriffen und finden ihren Ausdruck in den aktuellen Bildungsstandards, wo z. B. die Sachkompetenz zum Thema Kohlenhydrate mit weiteren wichtigen Kompetenzen verwoben wird, z. B. Erkenntnisgewinnungskompetenz, Kommunikationskompetenz und Bewertungskompetenz (KMK 2020).

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird aufgezeigt, welchen Mehrwert die Nachweise von Lactose und Maltose für den Experimentalunterricht in Chemie, Biologie, Projektgruppen usw. haben, oder mit anderen Worten, warum es für die Lernenden und die Lehrenden motivierend, hilfreich, sinnvoll und mit anderen Methoden nicht erreichbar ist, sich im Unterricht mit Lactose, Maltose und deren Nachweisreaktionen zu befassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Experimente zur Thematik der Lactose und Maltose sowie deren Nachweisreaktionen entwickelt, die im Folgenden detailliert dargestellt werden.

6.1 Experimente zum Nachweis von Lactose und Maltose im Chemieunterricht

Ein typisches Merkmal des Chemieunterrichts ist die Erkenntnisgewinnung durch Experimente. Im Zusammenhang mit Lactose und Maltose stellt sich zunächst die Frage, auf welche Weise diese beiden Kohlenhydrate von anderen Kohlenhydraten unterschieden werden können, denn beim ersten Anblick handelt es sich bei den Reinstoffen lediglich um weiße Pulver, denen man einen Unterschied nicht ansehen kann. Allerdings haben viele Schülerinnen und Schüler schon von Lactoseintoleranz gehört, etliche haben auch schon am eigenen Leibe erfahren, wie unangenehm es ist, einen Stoff zu sich zu nehmen, den man nicht vertragen kann (Ruppersberg et al. 2017a). Zur Unterscheidung, in diesem Zusammenhang zum Nachweis von Lactose, steht als Experiment zunächst die klassische Wöhlk-Probe mit einer Adaptation an den Unterricht zur Verfügung (Wöhlk 1904; Ruppersberg und Hain 2016). Auch der Fearon-Test (Fearon 1942) und das 2019 entwickelte 1,6-Diaminohexan-Verfahren (Ruppersberg und Klemeyer 2020; Ruppersberg 2020a) sind anwendbar.

Zur Fachkompetenz in Chemie gehören das Verstehen und Anwenden von chemischen Formeln, die für chemische Laien abschreckend wirken können; hiervon werden auch Schülerinnen und Schüler negativ beeinflusst. Jedoch gibt es auch in anderen Fachwissenschaften (Musik, Jura) und sogar im Sport (Tennis, Fußball) sehr abstrakte Symbole und Regeln, die nicht zu einer Begrenzung des Interesses führen. Deshalb sollte die Fachwissenschaft Chemie selbstbewusst mit ihren Eigenarten umgehen und chemische Formeln dosiert, aber zielstrebig anwenden. Zum Verständnis der farbenfrohen, motivierenden und aussagekräftigen Experimente zum Nachweis von Lactose und Maltose sind in erster Näherung nur vier Formeln nötig (Abb. 103).

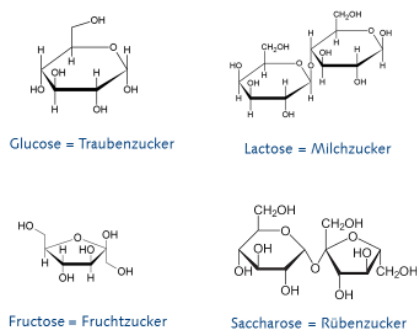


Abbildung 103: Zum Verständnis der Experimente (l.) sind nur vier Formeln (r.) nötig

Die vier benötigten Strukturformeln von Zuckern in Abb. 103 zeigen im Uhrzeigersinn Glucose, Lactose, Saccharose und Fructose. Zur besseren Verständlichkeit sind auch noch die deutschen Begriffe Traubenzucker, Milchzucker, Rübenzucker und Fruchtzucker aufgeführt. Stark abstrahierend kann man sagen, dass es sich bei den Formeln letztlich um Fünf- und Sechsecke handelt; deren Kombination „alleine“ oder „zu zweit“ ein Mono- oder Disaccharid ausmachen. Nur dann, wenn in der vereinfachten Lesart „zwei Sechsecke“ kombiniert werden, ergibt sich bei der Nachweisreaktion eine rote Farbe.

Dieser Art der Erklärung liegt eine starke didaktische Reduktion zugrunde, die einer möglichst breiten Schülerschaft die richtige Deutung eines Lactose-Nachweises ermöglichen soll und vielleicht „Appetit auf mehr“ macht. Eine Erhöhung des Lernniveaus ist bei Interesse und Leistungsfähigkeit der Lerngruppe jederzeit möglich; hierfür steht das in Kapitel 10 aufgeführte Material zur Verfügung (in großen Teilen als OpenAccess-Material).

6.1.1 Überlegungen zur Sicherheit am Arbeitsplatz

Bei der Durchführung von Experimenten im Unterricht ist es zwingend erforderlich, zuvor eine Gefährdungsbeurteilung und eine Ersatzstoffprüfung und eine Ersatzverfahrensprüfung vorzunehmen (Ruppersberg 2020b; RiSU-Kommission der KMK 14.06.2019; Ruppersberg 2020b). Bieten sich für die Erreichung eines Ziels mehrere Vorgehensweisen an, so ist gemäß § 7.3 Gefahrstoffverordnung dem Verfahren mit der geringsten Gefährdung der Vorzug zu geben (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 01.12.2010). Die Durchführung derartiger Überlegungen wird im nächsten Abschnitt beschrieben, allerdings sind zwei Vorbemerkungen erforderlich:

- Mit ausreichender Begründung, z. B. bestimmte Chemikalien sind nicht vorhanden oder ein veraltetes Verfahren wird aus historischen Gründen durchgeführt, lassen sich auch „schlechtere“ Vorgehensweisen rechtfertigen, allerdings sind dann besondere Sicherheitsvorkehrungen zu treffen (Arbeit im Abzug, Lehrerexperiment), ein Unfall würde sicherlich nicht ohne juristische Folgen bleiben (Ruppersberg 2015, 2016d, 2020b).
- Bei Beginn der Ausarbeitungen zu dieser Arbeit war der Fearon-Test noch nicht für die Anwendung im Unterricht beschrieben, das 1,6-Diaminohexan-Verfahren existierte noch nicht einmal. Daher wird im Folgenden auch die noch leicht „schlechtere“ klassische Wöhlk-Probe beschrieben, bei der Ammoniak zum Einsatz kommt. Für jede

Wöhlk-Probe gilt, dass sie durch einen Fearon-Test oder das 1,6-Diaminohexan-Verfahren ersetzbar ist.

6.1.2 Substitution von Ammoniak durch weniger gefährdende Stoffe

Der Geruch von Ammoniak ist nicht nur im Chemieraum, sondern auch bei der Zersetzung von Harnstoff in Ställen und Toilettenanlagen zu bemerken. Er wirkt auf viele Menschen abschreckend; man möchte die Flucht ergreifen oder ganz schnell ein Fenster öffnen. Dieses Verhalten ist durchaus sinnvoll, denn Ammoniak ist giftig beim Einatmen und kann mit Luft explosionsfähige Gemische erzeugen (Berufsgenossenschaft RCI - GisChem).

Der Arbeitsplatz-grenzwert (AGW) beträgt 14 mg/m^3 , die Geruchsschwelle liegt bei $1\text{--}5 \text{ mg/m}^3$, d.h. man riecht es deutlich, bevor es gefährlich werden kann.

Beim Erwärmen auf $60\text{--}70^\circ\text{C}$ gasst Ammoniak im relevanten Umfang aus seiner wässrigen Lösung aus, weshalb die Wöhlk-Probe bei guter Durchlüftung oder am Abzug durchzuführen ist.

Aufgrund der erwähnten Eigenschaften muss gemäß Richtlinie zur Sicherheit im Unterricht (RiSU) eine Substitution von Ammoniak überlegt werden (RiSU-Kommission der KMK 14.06.2019): Stehen ein Ersatzstoff oder ein Ersatzverfahren zur Verfügung?³⁶

Tatsächlich steht mit dem Fearon-Test ein zweites Verfahren zur Auswahl, das nicht nur bessere Ergebnisse liefert, sondern auch weniger gefährlich ist (Fearon 1942; Jessop 1961; Ruppertsberg 2016b; Ruppertsberg et al. 2019). Gemäß Gefahrstoffverordnung § 7 Absatz 3 muss das Verfahren mit der geringeren Gefahr gewählt werden (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 01.12.2010).

Die durch die Mischung von Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) mit Methylamin-Hydrochlorid zubereitete alkalische Lösung von Methylamin, die Fearon's Reagenz genannt wird, ist im Vergleich zur Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$) deutlich weniger gefährlich (siehe Tabelle 18).

Fearon's Reagenz kann Augen und Haut lediglich reizen; man trägt aber üblicherweise eine Schutzbrille und vermeidet Hautkontakt, auch das Tragen von Handschuhen ist möglich.

Die verdünnte Lösung kann zudem selbst bei einer Temperatur von 70°C nur im vernachlässigbaren Umfang gesundheitsschädliches Methylamin ausgasen (Klemeyer 2018). Sollte eine Schule –wie üblich– nur Salmiakgeist (wässrige Ammoniaklösung, $\omega = 10\%$)

³⁶ Wenn es einen guten Grund gibt, z. B. eine historisierende Vorgehensweise, dann darf gemäß RiSU auch das gefährlichere Verfahren verwendet werden, sofern geeignete Vorsichtsmaßnahmen (Abzug, Lüftung) getroffen werden können.

bevorraten, so stellt die Beschaffung von Methylamin-Hydrochlorid (kleine, weiße Kristalle; 100 g unter 20 Euro) für die Schulsammlung keine ernst zu nehmende Hürde dar.

In der Original-Publikation von 1942 beschreibt Fearon auch noch die Methode, das Testreagenz kurz über der Flamme aufzukochen (Fearon 1942). Hiervon ist -insbesondere in Anwesenheit von Schülerinnen und Schülern- dringend abzuraten, da alkalische Lösungen zu Siedeverzügen neigen (Brock 1997).

Anzuraten ist die Durchführung im Wasserbad, weil sie nicht nur gefahrloser ist, sondern auch zuverlässiger und wegen des gleichzeitigen Starts mehrerer Reagenzgläser auch bzgl. der Geschwindigkeit besser beobachtbar.

Es gibt aber eine weitere, noch bessere Möglichkeit, die aus den Ersatzstoffprüfungen gemäß Tabelle 18 hervorgeht und im folgenden Abschnitt erläutert wird.

Tabelle 18: Ersatzstoffprüfungen (aus (Ruppersberg und Klemeyer 2020), Liz. 4927610889805)

wässrige Lösungen (Gemische)		Gefahren durch Ausgasen								
Name	ZVG	CAS	physikalisch-chemische Gefahren	Freisetzungsverhalten (Ausgasen) bei 60°C	Gefahr beim Einatmen	Chronische Gesundheitsgefahren	Gefahr bei Hautkontakt	Gefahr bei Augenkontakt	Gefahr beim Verschlucken	Umweltgefahren
NH ₃ 10%ige Lösung	1750.004	7664-41-7	sehr hohe Gefahr H221 H290	hohe Gefahr T (2hPa) < 0°C T (10hPa) = 11°C T (50hPa) = 46°C T (250hPa) = 84°C	hohe Gefahr H331 EUH071	vernachlässigbare Gefahr	hohe Gefahr H314		vernachlässigbare Gefahr	sehr hohe Gefahr H400 WGK2
NH ₂ CH ₃ 0,025 mol/L	16060.002	74-89-5	sehr hohe Gefahr H220	vernachlässigbare Gefahr T (2hPa) = 65°C T (10hPa) > 100°C	mittlere Gefahr H332 H335	vernachlässigbare Gefahr	geringe Gefahr H315	mittlere Gefahr H318	mittlere Gefahr H302	vernachlässigbare Gefahr
1,6-Diaminohexan 0,025 mol/L	14670	124-09-4	vernachlässigbare Gefahr	vernachlässigbare Gefahr	geringe Gefahr H335	vernachlässigbare Gefahr	mittlere Gefahr H312 H314		mittlere Gefahr H302	geringe Gefahr WGK1

6.1.3 1,6-Diaminohexan-Verfahren (2019)

Auch das Diamin 1,6-Diaminohexan (alias Hexamethylendiamin) ergibt analog zum Fearon-Test einen roten Farbstoff (siehe Tabelle 17). Gemäß Ersatzstoffprüfung (siehe Tabelle 18) schneidet eine Lösung von 1,6-Diaminohexan (c = 0,025 mol/L) noch besser ab als eine Methylamin-Hydrochlorid-Lösung gleicher Konzentration.

Da der seit Jahren schulübliche Stoff 1,6-Diaminohexan aufgrund der langen Lagerung meistens verklumpt vorliegt und schlecht mit dem Spatel entnommen werden kann, bietet sich ein Erwärmen des Vorratsgefäßes und die Entnahme per Pipette zur Herstellung einer Fertiglösung an (siehe 7.3.4).

Die 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung (c = 0,025 mol/L) kann auf mehrere Weisen verwendet werden:

- a) Für **Reagenzgläser** im 65 °C heißen Wasserbad: je 2 mL für dasselbe Volumen
Milchprodukt oder Zuckerlösung (5% bis 0,1%) oder
- b) Für **vier** 100 mL-**Bechergläser** (oder Kristallisierschalen) in der Haushalts-**Mikrowelle**,
Einstellung **400 Watt**, Zeit: **60 Sekunden**: je 5 mL Fertiglösung und 5 mL Milchprodukt
oder Zuckerlösung ($\omega = 5\%$ bis 0,1%) oder
- c) Im heizbaren **Küvettenhalter** eines UV-Vis-Spektrometers: wie a), jedoch nur für
Zuckerlösung (5% bis 0,1%), Vis-Maximum: 550 nm; bei zu hoher Konzentration mit
1 mm-Küvette arbeiten.

Die Reaktion eignet sich für qualitative und semiquantitative Untersuchungen, jedoch nicht für streng quantitative Untersuchungen: Eine Kalibrationsgerade („Eichkurve“) aufzustellen ist schwierig bis unmöglich, da die Farbintensität einer Probe innerhalb von 40 Minuten immer weiter zunimmt (siehe Abbildung 104). Während der Wert des ersten Messpunktes gemessen wird, erhöhen sich die Intensitäten der weiteren Proben.

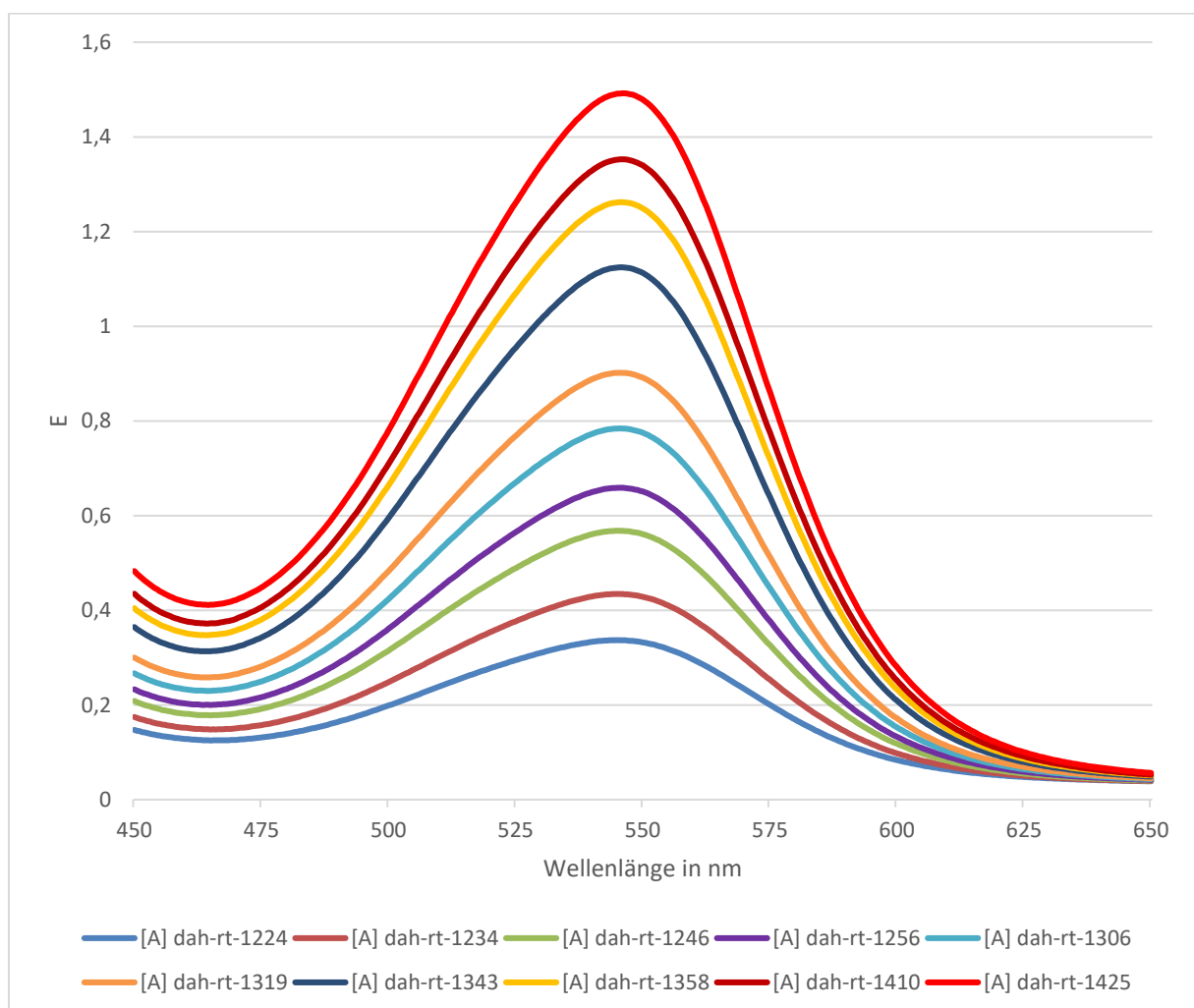


Abbildung 104: Farbentwicklung Diaminohexan/Lactulose (RT) in 270 Minuten

Zusätzlicher Vorteil des Verfahrens: Reduzierende Monosaccharide werden durch eine Gelbfärbung nachgewiesen, Lösungen mit nichtreduzierenden Zuckern bleiben farblos. Somit ist das 1,6-Diaminohexan-Verfahren aussagekräftiger und weniger gefährlich als die kupferhaltigen Nachweismethoden nach Fehling, Benedict, Trommer usw.

Ähnliche Farbreaktionen: Die in Kap. 4.2 aufgeführten Alkylamine und Derivate wie Ethylamin, 1-Propylamin, Cadaverin, Ethanolamin, GABA, ... ergeben ähnlich Farbreaktionen, die jedoch für den Gebrauch in Schulen nicht zu empfehlen sind, da diese Stoffe teilweise schwierig zu beschaffen sind bzw. teilweise ein hohes Gefährdungspotential besitzen.

6.2 Anfertigung von haltbaren Fertiglösungen für den Schul- und Lehrbetrieb

Da es für spektroskopische Reihenuntersuchungen hinderlich, störend und ungenau ist, immer wieder ein paar Tropfen Kalilauge oder Natronlauge zu den Testlösungen hinzu zu träufeln, welche einen pH-Wert von ca. 12,7 sicherstellen (Nickerson et al. 1976), bietet es sich an, hierfür fertig vorbereitete Fertiglösungen herzustellen.

Auch für den Schul- und Lehrbetrieb, wo Veranstaltungen oft im strengen Zeittakt stattfinden, sind Fertiglösungen hervorragend geeignet, da hierdurch das Arbeiten unter Zeitdruck sowie unnötige Pipettierfehler vermieden werden können.

Die Fertigreagenzien dürfen keine Kohlenhydrate enthalten, da letztere mit den alkalischen Inhaltsstoffen durch die bereits erwähnten Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerungen bereits während der Aufbewahrung zu einem undefinierbaren Produktgemisch reagieren würden (Bruyn und van Ekenstein 1895).

Bei der herzustellenden Gesamtmenge an Fertiglösung ist zu berücksichtigen, dass man maximal den Bedarf für ca. sechs Monate herstellen sollte (Etikett mit Herstellungsdatum versehen).

Weiterhin ist zu empfehlen, dass die Fertiglösungen in einer Braunglasflasche mit Schraubdeckelverschluss³⁷ gelagert werden sollten; falls möglich, in einem handelsüblichen Kühlschrank, der jedoch nicht für Lebensmittel, sondern ausschließlich für Feinchemikalien benutzt wird.

Der Verfall der Fertiglösungen ist an Trübungen, Ausflockungen und unerwarteten Reaktionsergebnissen zu erkennen.

³⁷ Schliffstopfen sind obsolet, da sie sich mit der Zeit festsetzen.

6.2.1 Verwendete Stoffe und Mengen

Je Test werden üblicherweise 2 mL Fertigreagenz benötigt; zusammen mit 2 mL Kohlenhydratlösung ergeben sich 4 mL Gesamtmenge. Eine 250 mL-Flasche reicht somit rechnerisch für 125 Einzelproben. Geht man von sechs Reagenzgläsern pro Schülerexperiment aus und 5 Experimentiergruppen pro Schulklasse, so sind ca. drei bis vier Durchläufe möglich. Zur Erzielung von optisch gut vergleichbaren Ergebnissen und UV-Vis-Kurvenverläufen hat es sich bewährt, für die Herstellung von Proben in den 4-mL-Küvetten an Kohlenhydrat 8 mg für Disaccharide und 4 mg für Monosaccharide auf 2 mL Probenmenge einzuwiegen, dies entspricht einer 0,2%igen Lösung *vor* der Zugabe der Aminlösung und 0,1% *nach* der Zugabe der Aminlösung. In der Küvette im Spektrometer befinden sich also jedes Mal 0,1%ige Zuckerlösungen, die eine Konzentration von etwa 0,006 mol/L aufweisen.

6.2.2 Mengenangaben bei Wöhlk (1904) und Malfatti (1905)

In der Originalliteratur (Wöhlk 1904) lassen sich folgende Angaben finden:

- Lactoselösung ($\omega=5\%$) (Kuhmilch hat auch ca. 5% Lactosegehalt), dies entspricht 139 mmol/L, entspricht 100 mg pro 2 mL Probenansatz, entspricht 0,28 mmol in 2 mL.
- 10 mL Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$), dies entspricht 5,62 mol/L.

Die originale Wöhlk-Probe wurde durch Malfatti (1905) mit 5 Tropfen Kalilauge verbessert:

- 5 Tropfen Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$) entsprechen 250 μL , diese enthalten $0,25 \text{ mL} \times 56 \text{ g/mol} = 14 \text{ mg KOH}$; diese Menge wird in der Original-Literatur angewendet auf 5 mL Probenansatz, d.h. auf 100 mL werden 280 mg KOH gegeben. Enthält der Feststoff wie üblich nur 80% reine KOH, dann ist die Einwaage auf 350 mg zu erhöhen.

6.2.3 Herstellung von Fearon's Reagenz als Fertiglösung

Von den verschiedene Anleitungen zum Fearon-Test wurde die Version aus (Jessop 1961) ausgesucht, da sie die letzte von Fearon selbst bearbeitete und somit wohl auch ausgereifteste Version darstellt (siehe (Tabelle 5: Varianten des Fearon-Tests von 1942 bis 2000)). Hierzu mussten einige Nachberechnungen durchgeführt werden:

Die verwendeten Zuckerlösungen hatten eine Konzentration von $0,1\% < \omega < 1,0\%$, dies entspricht bei Lactose 2,8 - 28 mmol/L, bzw. 4 – 40 mg Lactose pro 4 mL Probenansatz.

Bei Einwaage von 28 mg Lactosemonohydrat entspricht dies einer Stoffmenge von 78 μmol auf 4 mL und einer Stoffmengenkonzentration 19,5 mmol/L, bei Einwaage von 28 mg Lactulose-Monohydrat entspricht dies einer Stoffmenge von 82 μmol auf 4 mL und einer Stoffmengenkonzentration 20,5 mmol/L.

Berechnung der Stoffmenge aus einer Mengenangabe in Tropfen:

Obwohl die Größe eines Tropfens sehr unterschiedlich sein kann und in Wirklichkeit von vielen Parametern abhängt (Viskosität, Dichte, Druck, Temperatur, Oberflächenbeschaffenheit, ...), geht man allgemein davon aus, dass 1 Tropfen als altes Apothekermaß einer Menge von 50 μL entspricht (Wikipedia).

Methylamin-Hydrochlorid-Lösung:

3-4 Tropfen einer 5%igen wässrigen Methylamin-Hydrochlorid-Lösung:

5% entsprechen 50 g **Methylamin-Hydrochlorid** in 1000 mL, dies sind 0,74 mol/L.

4 Tropfen = 0,2 mL dieser Lösung entsprechen 0,148 mmol

Diese Menge wird angewendet auf eine Gesamtmenge 4 mL,

d.h. auf 1000 mL werden $250 \times 0,148 \text{ mmol} = 37 \text{ mmol}$ angewendet,

das entspricht 2,5 g Methylamin-Hydrochlorid auf 1 L.

Natriumhydroxid-Lösung:

3-5 Tropfen einer 20%igen **Natriumhydroxid-Lösung** (entspricht 6,09 mol/L).

In 1000 mL Lösung befinden sich 200 g NaOH, 200 μL entsprechen 40 mg NaOH;

diese Menge wird angewendet auf einen Probenansatz von insgesamt 4 mL;

d.h. auf 1000 mL werden 10 g NaOH angewendet, dies entspricht 0,25 mol.

Umrechnung wegen späterer Zugabe desselben Volumens an Zuckerlösung:

Da die zu untersuchende Lösung jeweils zur einen Hälfte aus Zuckerlösung und zur anderen Hälfte aus Fearon's Reagenz besteht, muss die Konzentration in der Fertiglösung doppelt so groß sein; daher müssen sich in 1000 mL Fearon's Reagenz 5 g Methylamin-Hydrochlorid und 20 g NaOH befinden.

Haltbarkeit und Berechnung der Reichweite der Fertiglösung:

Aufgrund experimenteller Erfahrungen ist bei Aufbewahrung in einer Braunglasflasche bei Raumtemperatur an einem Ort ohne direkte Sonneneinstrahlung mit einer Haltbarkeit von sechs Monaten zu rechnen. Geht man davon aus, dass sich im Chemiesaal sechs Gruppentische befinden, die jeweils eine Arbeitsgruppe darstellen, und dass jeweils 10 Reagenzgläser mit Fearon's Reagenz befüllt werden, dann benötigt man für einen Durchgang $6 \times 10 \times 2 \text{ mL} = 120 \text{ mL}$.

Bei 4 Parallelkursen benötigt man also Fearon's Reagenz für 4 Durchgänge im Halbjahr, dies entspricht 480 mL. Deshalb folgt hier eine Anleitung für ein Volumen von 500 mL:

Herstellung von Fearon's Reagenz als Fertiglösung für den Chemieunterricht

Für eine schulübliche Menge an Fertiglösung werden in eine austarierte Braunglasflasche (500 mL, Schraubdeckelverschluss), die auf einer Laborwaage steht, 2,5 g Methylamin-Hydrochlorid sowie 10 g Natriumhydroxid eingewogen und anschließend mit 500 mL demin. Wasser aufgefüllt. Die Lösung ist ca. ein Jahr haltbar. Das Etikett ist mit dem Piktogramm GHS05 (metallkorrosiv), H290, dem Gefahrwort „Achtung“ und dem Herstellungsdatum zu versehen.

6.2.4 Herstellung einer 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung

Für experimentelle Arbeiten mit Schülerinnen und Schülern ist die Verwendung des 1,6-Diaminohexan-Verfahrens anzuraten, da dieses bei der Ersatzstoffprüfung gegenüber der klassischen Wöhlk-Probe und dem Fearon-Test am besten abschneidet (Ruppersberg und Klemeyer 2020).

Gemäß Reichweitenberechnung in 6.2.3 erfolgt auch hier die Anleitung für ein Volumen von 500 mL an Fertiglösung.

Berechnung der benötigten Mengen für 500 mL 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung:

0,025 mol 1,6-Diaminohexan ($M = 116,21 \text{ g/mol}$) wiegen 2,91 g; die Hälfte davon sind 1,46 g (aufgerundet). Bei einer Dichte von $0,89 \text{ g/cm}^3$ benötigt man also 1,64 mL (aufgerundet).

Herstellung einer 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung für den Chemieunterricht

Unter dem Abzug wird die Vorratsflasche mit dem üblicherweise verklumpten 1,6-Diaminohexan für ca. eine Stunde in ein genügend großes Becherglas mit ca. 60°C heißem Wasser gestellt, ähnlich wie man es auch bei auskristallisiertem Honig durchführt. Dabei wird ein Teil des Feststoffes flüssig.

Mit einer Plastikspritze oder Einmalpipette zieht man ca. 2 mL der noch warmen Flüssigkeit auf und gibt sofort 1,46 g in eine austarierte 500 mL-Braunglasflasche (Schraubdeckelverschluss), die nebenan auf einer Laborwaage steht.

Anschließend gibt man 500 mL Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) hinzu, verschließt die Flasche mit dem Schraubdeckel und vermischt vorsichtig und gründlich.

Die Lösung ist ca. ein halbes Jahr haltbar. Das Etikett ist mit dem Piktogramm GHS05 (metallkorrosiv), H290, dem Signalwort „Achtung“ und dem Herstellungsdatum zu versehen.

Auf diese Weise erhält man eine Vorratslösung, die auf pH 13 voreingestellt ist. Die Reaktion verläuft nur im Bereich zwischen pH 12,7 und 12,9 zufriedenstellend (Nickerson et al. 1976), ggf. mit pH-Meter kontrollieren).

Die Konzentration von $c = 0,025 \text{ mol/L}$ an 1,6-Diaminohexan hat sich in eigenen Versuchen für die Arbeit mit Zuckerkonzentrationen von 0,1% bis 5% bewährt. Die Fertiglösung ist aufgrund experimenteller Erfahrungen in einer Braunglasflasche bei Raumtemperatur an einem Ort ohne direkte Sonneneinstrahlung ca. sechs Monate haltbar (Ruppersberg und Klemeyer 2020).

6.3 Experimente zum Lactosegehalt von Milchprodukten

Für Experimente zum Lactosegehalt von Milchprodukten sind außer den üblichen Laborchemikalien mehrere Lebensmittel nötig, die den Lernenden aus dem Supermarkt und von den Mahlzeiten bekannt sind. Die im folgenden Beispiel in der klassischen Wöhlk-Probe zum Einsatz kommenden Produkte können auch andere, regional erhältliche Produkte verwendet werden. Wichtig für einen Vergleich ist, dass die Produkte *unterschiedlich verarbeitet* wurden, z. B. *bakteriellen Abbauprozessen* unterliegen (Joghurt, Kefir) oder *Anreicherungsprozesse* zurückgelegt haben (Buttermilch, Kaffeesahne).

Wegen der Verwendung von Ammoniak sollte geprüft werden, ob der Test nicht besser mit dem 1,6-Diaminohexan-Verfahren³⁸ oder mit Fearon's Reagenz³⁹ durchgeführt wird. Bei dem im Folgenden beschriebenen Experiment waren die beiden Ersatzverfahren noch nicht bekannt.

Geräte:

1 Heizplatte, die sich auf 65 °C regulieren lässt, 1 Becherglas (1000 mL, wird zu 300 mL mit demin. Wasser befüllt), 12 Reagenzgläser, 1 Thermometer (Messbereich muss 65 °C ermöglichen), Feinspatel, Einmalpipetten, 1 wasserfester Stift zum Beschriften der Reagenzgläser und Pipetten.

Chemikalien:

1. Normale Vollmilch
2. Lactosefreie Milch („-L“)
3. Buttermilch
4. Kefir
5. Naturjoghurt (wichtig: ohne Zusätze von Zucker und Farbstoffen)
6. Kaffeesahne (auf Milchbasis, kein „pflanzlicher Kaffeeweißer“)
7. Saure Sahne

Als Vergleich zu den vorgenannten Produkten werden als Referenz folgende Zucker als gelöste Reinsubstanzen hinzugezogen:

8. Lactose
9. Fructose
10. Glucose

³⁸ Herstellung einer Fertiglösung siehe 6.5.4.

³⁹ Hierzu ist Methylamin-Hydrochlorid nötig; 100 g kosten unter 20 Euro.

11. Galactose

12. Saccharose

Desweiteren: Ammoniaklösungen ($\omega = 10\%$), Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser.

Durchführung: Jeweils 2 mL der vorgenannten Produkte bzw. Lösungen der genannten Zucker in Wasser werden zusammen mit 2 mL Ammoniaklösung ($\omega=10\%$) und 3 Tropfen Kalilauge ($c = 1 \text{ mol/L}$) in ein nummeriertes Reagenzglas gegeben und für ca. 20 Minuten in ein 65 °C heißes Wasserbad gestellt (Abb. 105).



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 105: Wöhlk-Proben im Wasserbad (Beginn)

Beobachtung: Während der ersten Minuten sind keine Veränderungen sichtbar (Abb. 104), jedoch dann kommt eine rapide Farbentwicklung in verschiedenen Gelb-, Rosa- und Rottönen zustande (Abb. 106, 107).

Die Schülerinnen und Schüler sollen ermutigt werden, die Farbentwicklung mit dem Smartphone oder mit dem Schul-Tablet zu dokumentieren; ggf. lässt sich auch ein Zeitrafferfilm erstellen.



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 106: Wöhlk-Proben im Wasserbad (Ende) mit Produktprobensortiment

Wenn sich alle Farben gut entwickelt haben, werden die Reagenzgläser aus dem Wasserbad entnommen und in einem Reagenzglasständer aufgereiht, um die Ergebnisse festzuhalten.

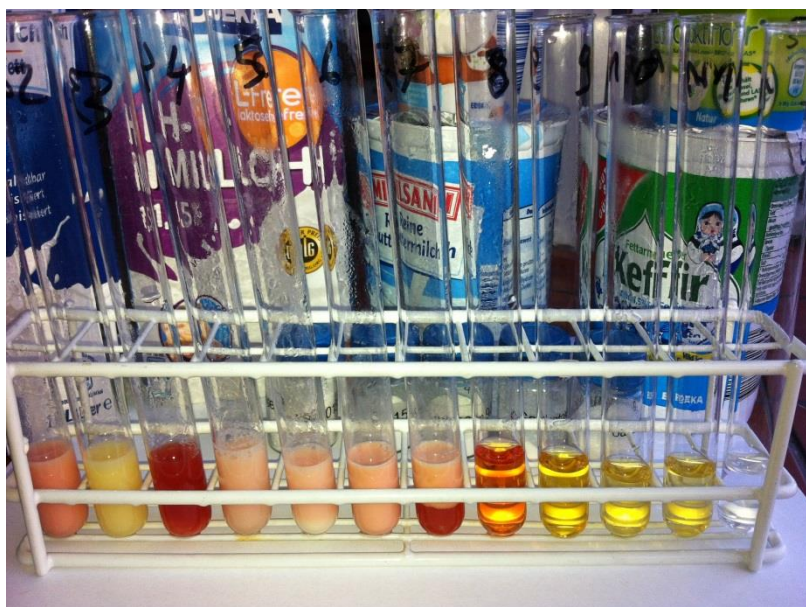


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 107: Ergebnis der Wöhlk-Proben nach Tab. 19

Tabelle 19: Auswertung der Wöhlk-Proben aus Abb. 107		
Reagenzglas Nr.	Inhalt	Farbe
1	Normale Vollmilch	Rosa
2	Lactosefreie Milch, -L	Gelb
3	Buttermilch	Dunkelrot
4	Kefir	Hellrosa
5	Naturjoghurt	Zwei Phasen: hellrosa/weiß
6	Kaffeesahne	Rosa
7	Saure Sahne	Zwei Phasen: rosa/rot
8	Lactose	Lachsrot
9	Fructose	Dunkelgelb
10	Glucose	Hellgelb
11	Galactose	Hellgelb
12	Saccharose	Farblos

Ziel: Die Schülerinnen und Schüler können aus diesem Experiment lernen, dass unterschiedliche Milchprodukte unterschiedlich viel Lactose beinhalten können. Je nach Verarbeitung kann die Lactose aufkonzentriert (Sahne) oder von Mikroorganismen wie Milchsäurebakterien sogar gänzlich verstoffwechselt (Joghurt) worden sein.

Fakultativ kann durch ein Experiment mit einem Gemisch von Glucose und Galactose gezeigt werden, dass die bis 2015 verbreitete Theorie, Lactose werde zu Beginn der Reaktion hydrolysiert und Galactose würde über das Salz der Schleimsäure (Ammoniummucat) zu Pyrrolrot oxidiert (Fleiss 2013; Grob 2000), falsch ist.

Weiterhin wird durch die klar interpretierbaren Farben (Rottöne, Gelbtöne, farblos) deutlich, dass die Wöhlk-Probe in der Lage ist, reduzierende Mono- und Disaccharide zu unterscheiden. Somit ist die Wöhlk-Probe nachweistechisch der Fehling-Probe und anderen auf Kupfer(II)-Ionen basierenden Kohlenhydratnachweisen überlegen (siehe hierzu auch Tabelle 3).

Materialien: Weitere Informationen zu diesem Experiment und weiterführendes Arbeitsmaterial (Aufgaben und Lösungen) sind in folgenden Publikationen verfügbar: (Ruppersberg und Hain 2016; Ruppersberg et al. 2017a, 2017b).

6.4 Anwendungen des neuen 1,6-Diaminohexan-Verfahrens im Unterricht

Bei systematischen Untersuchungen zur Wöhlk-Probe wurde im Januar 2019 vom Autor entdeckt, dass ein fast identischer Nachweis auch mit 1,6-Diaminohexan (DAH) durchgeführt werden kann (Ruppersberg und Klemeyer 2020).

1,6-Diaminohexan ist eine in Schulen häufig vorhandene Chemikalie, weil es für ein bekanntes Experiment namens „Nylon-Seil-Trick“ verwendet wird, bei dem ein Nylonfaden an einer Grenzfläche erzeugt wird (Verband der Chemischen Industrie e.V. o.J.).

Besonders günstig sind beim 1,6-Diaminohexan-Verfahren die niedrige Konzentration (0,025 mol/L), das geringe Ausgasungsverhalten und das insgesamt wesentlich geringere Gefährdungspotential (Kap. 6.1.3, 6.2.4). Ein weiterer Vorteil ist, dass der entstehende rote Farbstoff nicht so schnell verblasst wie bei den vorgenannten Tests.

6.4.1 Kohlenhydratnachweis mit 1,6-Diaminohexan im Wasserbad

Geräte: Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), 800-mL-Becherglas, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge (c = 0,1 mol/L), demin. Wasser, DAH-Fertiglösung (siehe 6.2.4), Kohlenhydrate gemäß Tabelle 20).

Tabelle 20 : Kohlenhydratnachweis mit 1,6-Diaminohexan			
Proben-Nr.	Substanz, Abkürzung	Menge in mg	Farbe
1	Lactose, Lac	8	rot
2	Lactulose, Lul	8	rot
3	Maltose, Mal	8	rot
4	Cellobiose, Cel	8	rot
5	4,6-O-Benzylidenglucose, BGlc	4	rot
6	4,6-O-Ethylidenglucose, EGlc	4	rot
7	Glucose, Glc	4	gelb
8	Fructose, Fru	4	gelb
9	Galactose, Gal	4	gelb
10	Gemisch Gal + Glc	2+2	gelb
11	Saccharose, Sac	8	farblos

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Dann werden die Lösungen 1-11 gemäß Tabelle 20 zubereitet und gleichzeitig in das 65 °C heiße Wasserbad gestellt.

Beobachtung: Die Ergebnisse sind in Abbildung 108 zu sehen.

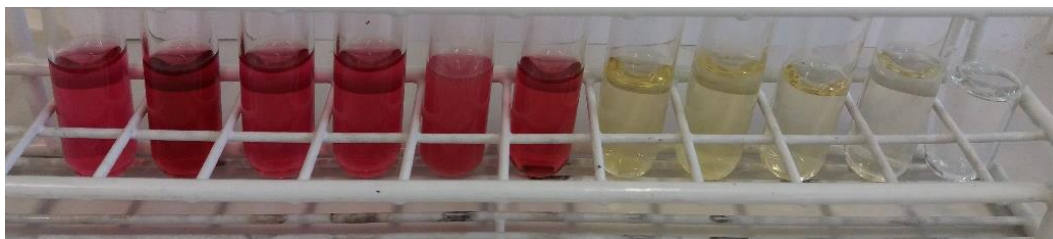


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 108: Reagenzgläser 1-11 mit Diaminohexan gemäß Tab. 20

Ergebnis: Die roten Farbstoffe der Proben 1, 3 und 4 (Lactose, Maltose und Cellobiose) haben sich später entwickelt als bei den Proben 2, 5 und 6 (Lactulose, BGlc, EGlc). Die Probe mit Saccharose (ganz rechts) bleibt farblos. Probe 5 ist trübe und riecht nach Benzaldehyd. Probe 6 riecht stechend nach Acetaldehyd. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Schutzgruppen der geschützten Glucosen während der Reaktion abgespalten worden sind.

Die Schülerinnen und Schüler können aus diesem Experiment lernen, dass kritische Stoffe wie zum Beispiel Ammoniak durch einen Ersatzstoff substituiert werden können. Verfahren zu hinterfragen und zu verbessern ist eine ganz typische Aufgabe von Naturwissenschaftlern (Stichwort NOS – Nature of Science).

Weiterhin kann bei Verwendung der geschützten Glucosen, nämlich 4,6-O-Benzylidenglucose und/ oder 4,6-O-Ethylidenglucose⁴⁰ erarbeitet werden, a) was eine Schutzgruppe ist und b) dass sie ein geändertes Reaktionsverhalten bewirken kann.

Außer mit einem Wasserbad, wie schon bei der Wöhlk-Probe und beim Fearon-Test, lässt sich das 1,6-Diaminohexan-Verfahren auch mit einer Haushaltsmikrowelle (vorzugsweise mit Inverter-Technologie) durchführen. Das Verfahren wird im Folgenden beschrieben.

6.4.2 Lactosenachweis mit 1,6-Diaminohexan in der Inverter-Mikrowelle

Aufgrund ihres geringen Ausgasungsverhaltens eignet sich die 1,6-Diaminohexan-Fertiglösung für eine Anwendung in handelsüblichen Haushalts-Mikrowellengeräten, vorzugsweise einer Inverter-Mikrowelle (Ruppertsberg und Klemeyer 2020). Das Ergebnis wird hierbei wesentlich

⁴⁰ 10 g kosten ca. 80 Euro, ggf. gibt eine nahegelegene Universität gerne Praktikums-Präparate ab.

schneller erreicht, da Mikrowellen in der Lage sind, Reaktionen, an denen polare Teilchen beteiligt sind, wesentlich zu beschleunigen (Dallinger 2013).

Die Anwendung von Haushalts-Mikrowellengeräten im Unterricht ist schon länger bekannt, wurde bisher aber eher mit Hochtemperatur-Chemie in Verbindung gebracht (Lühken und Bader 2001). Im vorliegenden Beispiel geht es jedoch um die Beschleunigung einer Reaktion, die bei einer Temperatur unterhalb des Siedepunktes von Wasser stattfindet.

Bei „früher“ (und heute noch) üblichen getakteten Geräten, erkennbar am höheren Geräuschpegel bei Einsetzen des Magnetrons, wird die Leistungsverminderung lediglich durch Pausieren des Magnetrons „geregelt“, d.h. das Gerät arbeitet 30 Sekunden mit voller Leistung (800 W) und pausiert dann 30 Sekunden (0 W), das sind zwar im Durchschnitt 400 W; empfindliche Speisen wie z.B. Fisch sind dann aber lokal verbrannt oder kleine Flüssigkeitsmengen übergekocht, verspritzt oder verdampft.

Dies lässt sich durch vorsichtigen Einsatz einer präzise regelbaren Inverter-Mikrowelle (Abb. 109) verhindern. Inverter-Mikrowellen lassen sich oft nur durch gezielte Suche finden, da die Vorteile dieser Geräte in Elektro-Märkten kaum beworben werden. Sie sind schon unter 100 Euro erhältlich und sind meist recht unauffällig mit „inverter technology“ beschriftet. Die Geräte werden mit und ohne Drehteller angeboten. Da die Energieverteilung im Garraum sehr ungleichmäßig erfolgt (vom „Schatten“ bis zum „Hotspot“), sollte auf einen Drehteller nicht verzichtet werden. Dieser sollte sich während des Reaktionsablaufs mindestens einmal komplett drehen (Ruppersberg und Klemeyer 2020).

Ganz allgemein sollten in Mikrowellengeräten keine Reagenzgläser verwendet werden, sondern nur breite Gefäße wie Kristallisierschalen oder Bechergläser. Dadurch können Überkochen und Zufallsergebnisse (Schatten oder Hotspot) verhindert werden.

Die benötigte Zeit und die gewählte Leistung hängen von der Füllung des Garraumes ab. An dieser Stelle ist mindestens ein Probelauf erforderlich. Im vorgestellten Beispiel wurden für viermal 10 mL Flüssigkeit die Einstellungen 60 Sekunden und 400 W gewählt; bei mehr Proben im Garraum wird eine höhere Leistung benötigt. Eine kürzere Laufzeit und höhere Leistung erbrachten nur eine ungenügende Farbreifung.

Mit dem hier vorgestellten Gerät, einer Inverter-Mikrowelle (siehe Abbildung 109) der Firma LG, Typ LG MS 23 NECBW (Kaufdatum 11.1.2019, Preis: 99,00 Euro) ist es möglich, die abgegebene Leistung kontinuierlich auf 400 W zu beschränken und einen Lactose-Schnelltest in 60 Sekunden durchzuführen.



Liz. Wiley 4927610889805

Abbildung 109: Inverter-Mikrowelle, Einstellung 400 W

Eine Ammoniaklösung als Reagenz ist für die Inverter-Mikrowelle ungeeignet und gefährlich, denn sie gast beim Erhitzen stark aus und dem Experimentator käme beim Öffnen des Garraumes ein giftiger und ätzender Ammoniak-Schwall entgegen.

Eine Lösung von 1,6-Diaminohexan hat sich als sehr vorteilhaft herausgestellt, Methylamin-Hydrochlorid aus dem Fearon-Test (Fearon 1942) wäre auch geeignet.



Liz. Wiley 4927610889805

Abbildung 110: Garraum der Inverter-Mikrowelle (Details siehe Text)

In Abbildung 110 ist der Garraum der Inverter-Mikrowelle gezeigt, in den die unten beschriebenen Gefäße gestellt wurden.

Geräte, Chemikalien: Inverter-Mikrowelle, wasserfester Stift zum Beschriften der Gefäße, vier baugleiche Bechergläser oder Kristallisierschalen: A) Vollmilch, B) lactosefreie Milch, C) Lactose-Lösung, $\omega = 1\%$, D) Glucose-Lösung, $\omega = 1\%$, jeweils 5 mL, zusammen mit je 5 mL alkalischer 1,6-Diaminohexan-Lösung, $c = 0,025 \text{ mol/L}$.

Durchführung: Die Gefäße werden symmetrisch in den Garraum gestellt, die Mikrowelle wird mit den Einstellungen 400 W und 60 Sekunden gestartet. Nach Ablauf der 60 Sekunden werden die Gefäße mit einer Tiegelfzange oder einem Handschuh aus dem Garraum entnommen und für die Lernenden gut sichtbar aufgestellt (siehe Abb. 111).



Liz. Wiley 4927610889805

Abbildung 111: Gefäße nach 60 Sekunden bei 400 Watt (siehe Text)

Beobachtung: Die Gefäßen A und C (siehe Abbildung 111) zeigen eine Rotfärbung, B und D eine Gelbfärbung.

Ergebnis: Die Rotfärbung zeigt die Anwesenheit von Lactose an; andere 1,4-verknüpfte Kohlenhydrate können an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Die Gelbfärbung zeigt reduzierende Monosaccharide wie z. B. Glucose und Galactose an.

Experimente im Chemieunterricht unterliegen aufgrund des verbreiteten 45-Minuten-Rasters oft einem gewissen Zeitdruck. Mit einer Mikrowelle lassen sich –wie auch im professionellen Labor– Reaktionen beschleunigen. Allerdings sollten wässrige Lösungen möglichst nicht mit einer getakteten Mikrowelle, sondern mit einer Inverter-Mikrowelle erwärmt werden, weil diese präziser regulierbar ist. Außerdem sollten breite Gefäße wie Bechergläser und

Kristallisierschalen anstelle von (schmalen) Reagenzgläsern verwendet werden. Ausgasende Stoffe wie z.B. Ammoniak, sind zu vermeiden.

Die Schülerinnen und Schüler können aus diesem Experiment lernen, dass die Verwendung eines Mikrowellengerätes neben Bunsenbrennerflamme und Heizplatte/ Wasserbad ein weiteres Verfahren ist, mit dem Stoffe erhitzt werden können. Weiterhin können die Schülerinnen und Schüler die Beschleunigung der Reaktion von fast 30 Minuten bei der klassischen Wöhlk-Probe auf 60 Sekunden bei der Verwendung eines Mikrowellengerätes als zusätzlichen Vorteil kennenlernen.

6.5 Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau durch Speichelamylase

Da es in dieser Arbeit bislang fast ausschließlich um Milch, Milchprodukte und Milchzucker gegangen ist, muss an dieser Stelle ein Abschnitt über den Nachweis von Maltose eingeschoben werden, der vom Prinzip her auf dieselbe chemische Nachweisreaktion eingeht, aber einen völlig anderen Zusammenhang aufweist: Seit Jahrzehnten haben Lehrkräfte im Biologie- oder Chemieunterricht den Zerfall der Iod-Stärke-Einschlussverbindung mit Hilfe von zugefügtem Speichel durchgeführt (siehe Abbildung 112). Käufliche Pankreas-Amylasen, die bei wissenschaftlichen Untersuchungen vorwiegend aus Standardisierungs- und Vergleichbarkeitsgründen gewählt werden, sind im Schulunterricht nicht nötig und für die direkte Anschauung sogar hinderlich.

Unterrichtsstunden mit experimentellem Schwerpunkt sollten ohnehin in der vorangehenden Unterrichtsstunde gedanklich vorbereitet werden, dabei sollten der Einsatz von Speichel und die sachgemäße Durchführung angesprochen werden. Gegebenenfalls sollte auch die Verwendung von Stoppuhren (Smartphone) angedacht werden, denn beim Menschen gibt es verschiedene Speichelamylasen, die unterschiedlich schnell sind (siehe unten).

Eine weitere Variante wäre, dass Schülerinnen und Schüler in einem Parallelversuch (außerhalb der Experimentierräume!) ein Stück von einem frischen Brötchen (Wecken, Schrippe) bekommen, sowie die Aufgabe, das Gekaute nicht sofort herunterzuschlucken, sondern solange auf der Zunge zu bewahren, bis es süß schmeckt. Es stellt einen zusätzlichen Anreiz dar, dies mit mehreren Probanden durchzuführen und dabei die Zeit zu stoppen, bis ein anfänglicher süßer Geschmack wahrgenommen werden kann. Die Geschwindigkeit verschiedener Speichelamylasen und die Wahrnehmung des süßen Geschmacks können genetisch bedingt unterschiedlich sein.



Foto: Ruppertsberg

Abbildung 112: Standardexperiment Stärkelösung und Speichel

Der Abbau der Stärke-Makromoleküle lässt sich im Schulexperiment anschaulich zeigen, weil die charakteristische Farbe der Iod-Stärke-Einschlussverbindung nach der Zugabe von Speichel „verschwindet“, da die Stärke in kleinere Bruchstücke zerlegt wird, welche mit Iod keine Färbung erzeugen (Abb. 112-113).

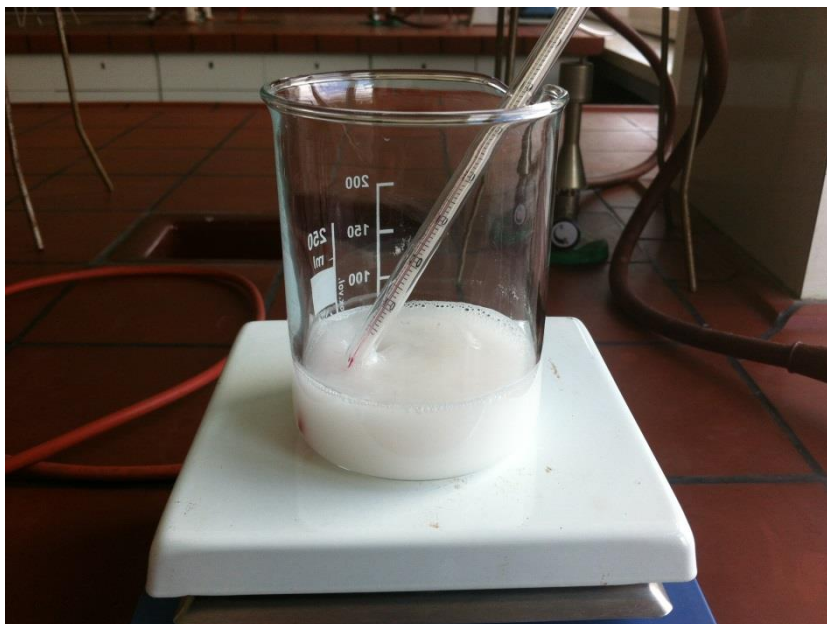


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 113: Produktlösung aus der vorigen Abbildung nach 1 h Einwirkzeit

Das Standard-Experiment „Stärkeabbau durch Speichelamylase ist in zahlreichen Lehrbüchern aufgeführt (Freundner-Huneke et al. 2016; Hohmann 2008; Markl 2015).

Die dabei entstandene „Produktlösung“ (Abb. 113) wird bei dem hier aufgezeigten Versuchsablauf nicht -wie üblich- verworfen, sondern noch genauer untersucht.

Doch zuvor wird einigen theoretischen Fragen nachgegangen.

6.5.1 Wie wirkt Speichelamylase?

Die Speichelamylase des Menschen, lautmalerisch auch „Ptyalin“ genannt, benötigt Calcium- und Chloridionen als Kofaktoren (Ramasubbu et al. 2003). Daher ist die Verwendung von demineralisiertem Wasser bei Experimenten mit Speichelamylase nicht nur unsinnig, sondern kontraproduktiv.

Die Speichelamylase des Menschen ist eine **Endo**-Hydrolase; sie trennt α -1,4-glycosidische Bindungen **aus dem Inneren** des spiraligen Amylose-Moleküls auf, indem **Zweier-Einheiten (Maltose-Moleküle)** herausgetrennt werden. Dabei entstehen nach dem Zufallsprinzip geradzahlige und ungeradzahlige Reststücke.

Bei den ungeradzahligen Reststücken bleibt beim Abbau von **Zweier-Einheiten (Dimeren)** eine **Einer-Einheit (Monomer, i. e. Glucose)** übrig, z. B.:

$$3 = 2 + 1$$

Aber auch beim Abbau eines geradzahligen Zwischenprodukts wie einem Hexamer können beim willkürlichen Heraustrennen **eines Maltose-Moleküls** **Glucose-Moleküle** entstehen:

Anstelle von **drei Maltosemolekülen (Dimere)** können auch **ein Maltotriose-Molekül (Trimer), ein Maltosemolekül (Dimer) und ein Glucosemolekül (Monomer)** entstehen:

$$6 = 2 + 2 + 2 \quad \text{oder auch}$$

$$6 = 3 + 2 + 1$$

Somit ist die Bildung von Glucose beim willkürlichen Heraustrennen von Maltose-Stücken aus Stärke kein Widerspruch, sondern eine logische Folge.

Die α -1,6-glycosidischen Bindungen, durch die die Verzweigungen des Amylopektins entstehen, können durch die Speichelamylase nicht aufgespalten werden. Die hierdurch entstehenden Reststücke werden als Dextrine bezeichnet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Speichelamylase die α -1,4-glycosidischen Bindungen im Inneren der Polysaccharide Stärke und Glycogen hydrolytisch aufspaltet. Dadurch entstehen Dextrine, Maltose und Glucose (Hofmann 2006).

6.5.2 Nachweis der Endprodukte des Stärkeabbaus

Auf manchen Internetseiten zum Stärkeabbau durch Speichel sind leider Angaben zu finden, die die Maltose-Glucose-Problematik völlig unreflektiert lassen (Hergt 2010; Blume 2018; Landesbildungsserver - Redaktion Biologie 2019).

Bei letzterer Quelle wird Glucose pauschal durch die Fehling-Probe nachgewiesen, was bei Anwesenheit von anderen reduzierenden Zuckern falsch ist: Die Fehling-Probe weist Glucose und Maltose, aber auch den Ketozucker Fructose allesamt mit einem roten Ergebnis nach und ist somit für die hier vorliegende Fragestellung ungeeignet.

Zudem können bei der Durchführung der Fehling-Probe (Fehling 1848) mit einem Gasbrenner vermeidbare Risiken in Form von gefährlichen Siedeverzügen auftreten, sodass ihre Durchführung im Schulunterricht nicht zu empfehlen ist.

Die Benedict-Probe (Benedict 1909) ist durch die Verwendung von Natriumcarbonat anstelle von Natriumhydroxid weniger alkalisch und daher bei gleichem Ergebnis der Fehling-Probe vorzuziehen. Im vorliegenden Fall ist sie aber ebenfalls ungeeignet, da auch sie Glucose und Maltose nicht unterscheidet.

Auch die Tollens-Probe (Tollens 1882) ist ungeeignet, da sie wie die beiden anderen Proben eigentlich nur ein Aldehyd-Nachweis ist. Außerdem kann es bei unsachgemäßer Entsorgung von Resten zur Bildung von explosivem Silbernitrid (Ag_3N) kommen.

Von den in Tabelle 3 beschriebenen Nachweismethoden sind lediglich die Wöhlk-Probe und ihre Abwandlungen in der Lage, Maltose nachzuweisen. Sie können nicht nur einen qualitativen Maltose-Nachweis erbringen, sondern auch einen semiquantitativen mittels Kolorimetrie.

Für einen streng quantitativen Nachweis durch eine photometrische Konzentrationsbestimmung mit einer Kalibrationsgeraden sind beide Verfahren nicht geeignet, weil sich die Intensität der Farbe bei ein und derselben Probe im Laufe von bis 270 Minuten immer weiter verstärkt, bevor sie wieder abnimmt (siehe 4.2.6.2, Abb. 64), jedoch ist eine kolorimetrische Konzentrationsbestimmung möglich, wenn die Vergleichsproben **zum selben Zeitpunkt** in das auf 65 °C aufgeheizte Wasserbad gestellt werden.

Dieses Verfahren wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

6.5.3 Anwendung der Wöhlk-Probe zur Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau

Geräte: 12 Reagenzgläser, 1 wasserfester Stift zum Beschriften der Reagenzgläser, 1 Reagenzglasständer, 1 Becherglas 500 mL gefüllt mit 200 mL Wasser, 1 Heizplatte, 1 Thermometer (um 65 °C zu messen), 1 Messpipette (um 2 mL abzumessen).

Chemikalien: 2 mL Produktlösung (50 mL Stärkelösung ($\omega = 2\%$), die ca. 60 Min. zuvor mit 2 mL Speichel versetzt wurde und bei ca. 37 °C langsam gerührt wurde), 2 mL Stärkelösung ($\omega = 2\%$) ohne Speichelamylase, 40 mg Maltose, 40 mg Glucose, 40 mg Fructose, demin. Wasser, Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$), Kalilauge ($c = 1\text{ mol/L}$), GOD-Teststäbchen aus der Apotheke.

Durchführung: Zur Erstellung einer Farbskala werden acht Reagenzgläser mit Maltose befüllt (Feinwaage!), und zwar in folgenden Milligramm-Mengen: 80, 40, 32, 24, 16, 8, 4, 2.

Alle acht Reagenzgläser werden mit 2 mL demin. Wasser aufgefüllt und bekommen dann noch 2 mL Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$) und 3 Tropfen Kalilauge ($c = 1\text{ mol/L}$).

[Zum Nachrechnen: 80 mg Maltose befinden sich dann in insgesamt 4 mL Lösung, das entspricht einer Konzentration von $\omega = 2\%$. Die Farbskala kann je nach Präferenz des Experimentators auch nach anderen Berechnungen, z.B. mit dem Verdünnen einer Stammlösung hergestellt werden.]

Ebenso werden 40 mg Fructose und 40 mg Glucose angesetzt.

2 mL der Produktlösung (s.o.) werden in einem Reagenzglas (Pr.) mit 2 mL Ammoniaklösung ($\omega = 10\%$) und 3 Tropfen Kalilauge ($c = 1\text{ mol/L}$) versetzt.

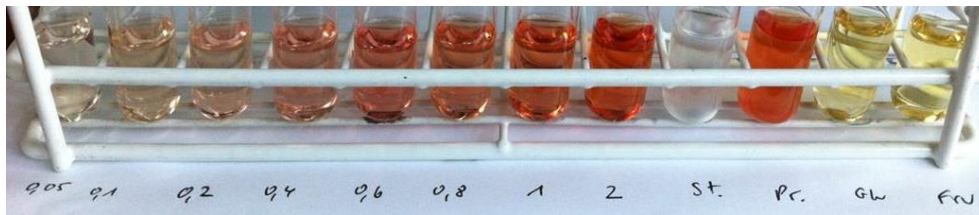
Ebenso werden 2 mL Stärkelösung ($\omega = 2\%$) angesetzt.

Die insgesamt 12 Reagenzgläser werden mit einem wasserfesten Stift beschriftet und in das 65 °C warme Wasserbad gesetzt.

Die Testlösungen werden für das Experiment in 6.5.5 aufbewahrt.

6.5.4 Beobachtungen bei den Experimenten

Nach 15 Minuten und guter Farbentwicklung, spätestens nach 30 Minuten, werden die Reagenzgläser aus dem Wasserbad entnommen und im Reagenzglasständer miteinander verglichen (siehe Abbildung 114).



Ruppersberg

Abbildung 114: Wöhlk-Probe als kolorimetrischer Maltose-Nachweis

Die Reagenzgläser aus der obigen Abbildung zeigen im linken Bereich die Vergleichsproben mit bekannter Maltose-Konzentration in Gewichtsprozent. Das Reagenzglas „Pr“ zeigt eine lachsrote Färbung, die ungefähr den Reagenzgläsern mit der Bezeichnung 1 und 2 aus der Farbskala entspricht. Damit ist Maltose in der Produktlösung nachgewiesen, und zwar mit einer Konzentration von etwa 1,5%. Dies war beim Einsatz von Stärkelösung mit $\omega = 2,0\%$ durchaus zu erwarten. Reagenzglas „St“ zeigt, dass die Färbung ohne die Wirkung der Speichelamylase nicht zustande kommt. Die Reagenzgläser Glc und Fru zeigen eine in Nuancen unterschiedliche Gelbfärbung, die bei der Wöhlk-Probe typisch für Monosaccharide ist.

6.5.5 Überprüfung der Produktlösung mit GOD-Teststäbchen

Geräte, Chemikalien: 5 Uhrgläser, 5 GOD-Teststäbchen (Diabur®), je 1 mL Produktlösung, Stärkelösung, Glucoselösung, Maltoselösung aus 6.3.5, örtliches Leitungswasser.

Durchführung: Die Lösungen werden mit je einem GOD-Teststäbchen geprüft (Abb. 115).

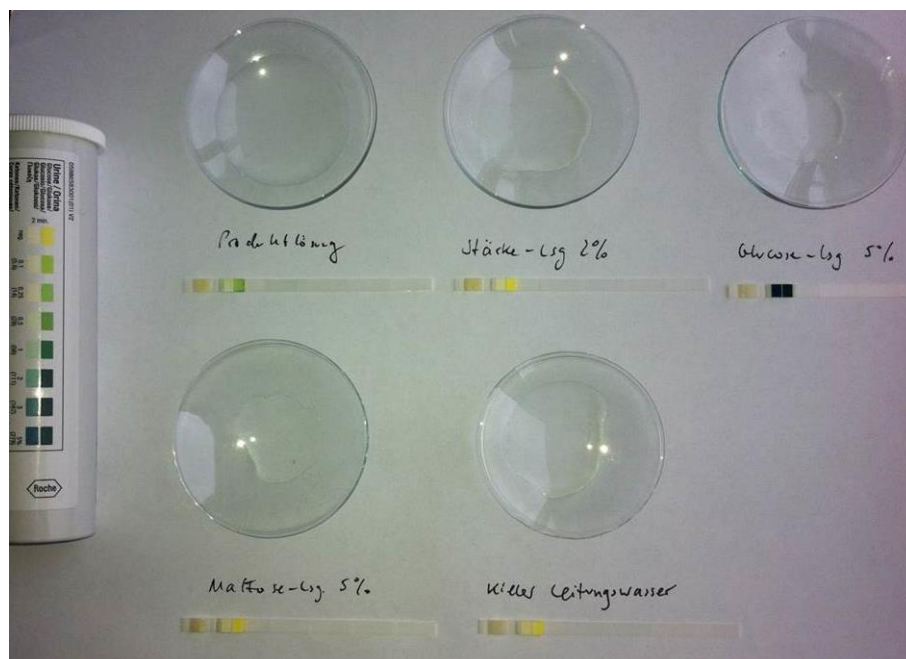


Foto: Ruppersberg

Abbildung 115: Überprüfung der Produktlösung mit GOD-Teststäbchen

Beobachtung: Bei der Überprüfung mit GOD-Teststäbchen ergibt sich durch deutliche Grünfärbung des Testfeldes.

Ergebnis: Durch die Grünfärbung des GOD-Teststäbchens ist nachgewiesen, dass die Produktlösung auch Glucose enthält.

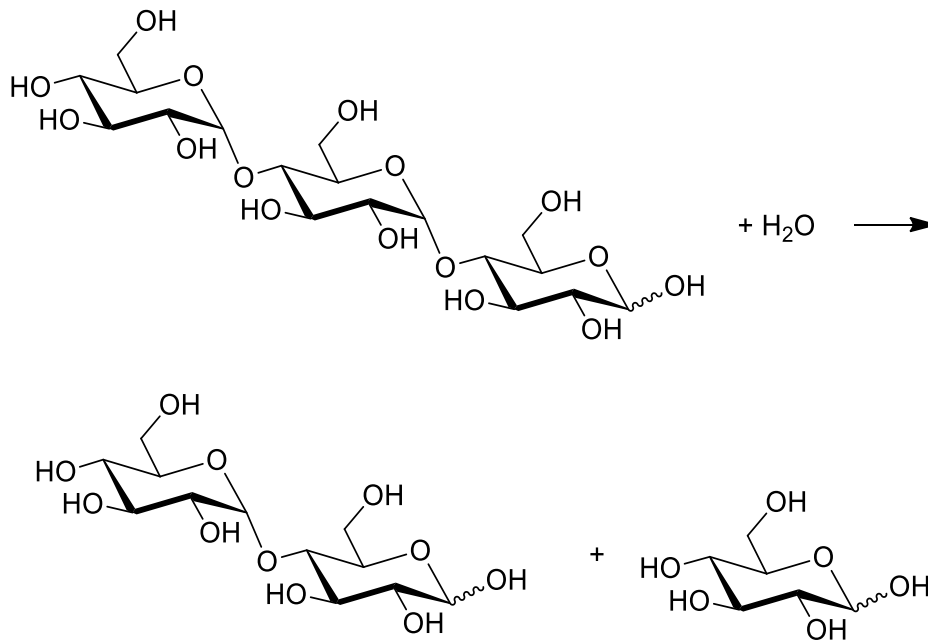


Abbildung 116: Aus Maltotriose und Wasser entstehen Maltose und Glucose

Erklärung: Bislang war die Entstehung von Glucose beim Stärkeabbau durch Speichelamylase unklar oder zumindest umstritten, erscheint aber nun logisch: Da die Speichelamylase eine Endo-Amylase ist, trennt sie zwar immer Maltose aus dem Strang heraus, jedoch entstehen rein statistisch gesehen auch ungeradzahlige Oligosaccharide als Reststücke, z. B. Maltotriose (Abb. 116). Beim weiteren Abtrennen von „Zweier-Einheiten“ bleibt eine „Einer-Einheit“ übrig – das Monosaccharid Glucose.

6.5.6 Fazit der Endproduktbestimmung beim Stärkeabbau

Die enzymatische Hydrolyse von Stärke durch Speichel-Amylase bekommt mit der Wöhlk-Probe auf Maltose und dem GOD-Test auf Glucose einen größeren Sinn, da der bislang unterbliebene Nachweis der Endprodukte gelingt. Durch die beiden halbquantitativen Nachweisreaktionen, die mit einfachen Mitteln leicht durchführbar sind, bekommt das gesamte Experiment einen runden Abschluss. Die in Schul- und Fachbüchern häufig

vorzufindende Darstellung der Stärkehydrolyse durch Speichelamylase muss wie folgt verbessert werden:

- Amylose $\rightarrow$ Oligosaccharide $\rightarrow$ Maltose als Hauptprodukt und Maltotriose als Zwischenprodukt aus der Spaltung ungeradzahligter Oligosaccharide
- Maltotriose $\rightarrow$ Maltose und Glucose
- Bei Amylopektin ergeben sich als zusätzliche Nebenprodukte Isomaltose und Grenzdextrine, da die α -1,6-glycosidischen Verzweigungsstellen durch Speichelamylase nicht gespalten werden können.

Die Schülerinnen und Schüler können aus diesem Experiment lernen, dass Speisestärke bereits im Mund ihrem ersten Verdauungsschritt unterzogen wird, sofern lange genug gekaut wird.

Mit Hilfe der Iod-Stärke-Einschlussverbindung kann im in-vitro-Experiment belegt werden, dass Stärke zunächst vorhanden ist, dann aber durch Speichelamylase abgebaut wird.

Mit der Wöhlk-Probe kann erstmalig belegt werden, dass beim Polymer-Abbau Zweier-Einheiten entstehen; der Name des Dimeren ist Maltose.

Je nach Leistungsfähigkeit und Tiefe der Betrachtung kann auch das zufällige Entstehen von ungeradzahligten Spaltprodukten aufgegriffen werden, die letztlich das Auftreten des Monomeren –Glucose- zur Folge haben. Letztere kann mit GOD-Teststäbchen nachgewiesen werden. Sehr leistungsstarke Gruppen können bei dieser Gelegenheit die Funktion eines kombinierten Enzym-Schnelltests erlernen.

6.6 Besondere Anknüpfungspunkte für Lactosenachweise im Chemieunterricht

Die Begriffe „Milchzucker“ bzw. „Lactose“ führen bei Schülerinnen und Schülern je nach Vorwissen und individueller Betroffenheit zu sehr unterschiedlichen Assoziationen. Im Folgenden sollen daher keine Vorschläge im Sinne eines Unterrichtskonzepts unterbreitet werden, sondern vielmehr mögliche Zugänge oder Anknüpfungspunkte aufgezeigt werden, welche den Schülerinnen und Schülern die Bearbeitung der Fachinhalte erleichtern können. Die Nachweisreaktionen für Lactose (und Maltose) stellen für den experimentellen Chemieunterricht nicht nur interessante Ergänzungen, sondern fundamental wichtige Erneuerungen dar, weil sie Schülerinnen und Schülern den Zugang zu naturwissenschaftlichen Fragestellungen auf mehrfache Weise ermöglichen:

- Interesse an Experimenten: Wie kann man mit einfachen, anschaulichen und ausdrucksstarken Experimenten den Chemieunterricht bereichern? In welchen Lebensmitteln ist Lactose enthalten und wie kann man das aussagekräftig nachweisen?
- Interesse an historischen Personen, die an Lactosenachweisen geforscht haben: Professor Nersess Umikoff, N. Sieber alias Nadeschda Olimpiowna Ziber-Shumova, Alfred Wöhlk, Hans Malfatti, William Robert Fearon.
- Interesse an Humangenetik: Wie konnte eine Mutation dazu führen, dass Milch nach dem Kleinkindalter noch vertragen werden kann? Was hat es mit Milchezucker(un)verträglichkeit auf sich und welche Alltagsrelevanz gibt es hierfür?
- Interesse an Grundlagenforschung: Wie funktioniert der Reaktionsmechanismus dieser Nachweisreaktion? Welche Molekülstruktur besitzt der rote Farbstoff?

Diese Punkte werden im Folgenden genauer erörtert. Weiterhin steht zu diesem Unterrichtsprojekt ein Grundlagenartikel zur Verfügung (Ruppersberg et al. 2017a), der um Aufgaben und Lösungen erweitert wurde (Ruppersberg et al. 2017b).

6.7 Interesse an historischen Personen, die an Lactosenachweisen geforscht haben

Forscher aus mehreren europäischen Staaten trugen dazu bei, dass eine praxistaugliche, aussagekräftige Nachweismethode für eine bestimmte Gruppe von Kohlenhydraten entstand, zu denen auch Lactose gehört.

In den hier maßgeblichen Jahren 1896 bis 1942 gab es noch keine elektronischen Medien, weswegen die Kommunikation der Wissenschaftler fast ausschließlich über wissenschaftliche Zeitschriften und Tagungen stattfand.

Hierzu bieten sich im weiteren Verlauf Literaturrecherchen und Rollenspiele an, bei denen die Lernenden die Rolle einzelner Wissenschaftler übernehmen und sich mit Hilfe der Originalartikel (siehe Literaturhinweise) oder mit Ausschnitten davon (siehe Faksimiles in den folgenden Abschnitten) auf ihre Rollen vorbereiten.

Eine derartige Vorgehensweise erfordert die Bereitschaft der beteiligten Lehrkräfte, sich auf Projektarbeit und/ oder offenen Unterricht einzulassen. Ein Beispiel hierfür wird in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

6.7.1 Interesse an der Person „Professor Umikoff“

Im Jahr 1896 publiziert Professor Nersess S. Umikoff, Arzt im Laboratorium des kaiserlichen Findelhauses zu St. Petersburg, die Entdeckung einer „roth-violetten Farbe“ bei der Untersuchung von Muttermilch, die im damaligen Sprachgebrauch „Frauenmilch“ genannt wurde (siehe auch 3.2).

Dass Kuhmilch eine solche Verfärbung nicht zeigte, ist leider eine falsche Beobachtung, denn die Färbung beruht, wie sich später zeigte, auf der Anwesenheit von Lactose.

Lactose ist ein Zucker, der nur in der Milch von Säugetieren auftritt; beim Rind sind es 4,7 g auf 100 mL Milch, und beim Menschen sind es 7,2 g auf 100 mL Milch (Höffeler 2009). Eventuell sind der geringere Lactosegehalt und unterschiedliche pH-Wert Gründe, die zu Umikoffs Fehlschluss führten.

Aber auch wenn Umikoff in diesem Punkt irrte, so ist er dennoch der erste, der die aufgetretene Färbung zum Zwecke eines Nachweises gebrauchte.

Schülerinnen und Schüler können hieraus lernen, dass wichtige Entdeckungen nicht immer auf Anhieb richtig erkannt werden und dass auch ein Irrtum weiterführen kann, wenn das Problem weiter bearbeitet wird.

IX.

Zur differentiellen chemischen Reaction der Frauen- und Kuhmilch und über die Bestimmung der Lactationsdauer der Frauenbrust.

Aus dem chemischen Laboratorium des kaiserl. Findelhauses zu St. Petersburg.

Von

Dr. NERSESS UMIKOFF.

(Der Redaction zugegangen den 4. April 1896.)

Beim Arbeiten über die Eiweisskörper der Kuh- und Frauenmilch war es mir für einige Zwecke nothwendig, die Einwirkung des Ammoniaks auf die Milchkügelchen unter dem Mikroskop kennen zu lernen. Ich bemerkte beim Einwirken verschiedener Mengen Ammoniaks auf Kuh- und Frauenmilch, und zwar beim Stehenlassen der Mischungen der Milch mit Ammoniak auf kürzere oder längere Dauer, dass die Frauenmilch dabei stets eine roth-violette Farbe annahm, während die Kuhmilch unter denselben Bedingungen nie solch eine Verfärbung zeigte.

Bei allen meinen Versuchen gebrauchte ich 5 ccm der zu untersuchenden Milch, fügte 2,5 ccm einer 10%igen Ammoniaklösung hinzu und erwärmte die Mischung auf dem Wasserbade bis 60° C. 15—20 Minuten lang. Das Erwärmen geschah, um das Erscheinen der Reaction zu beschleunigen, aber die erwähnte Verfärbung erscheint auch bei gewöhnlicher Temperatur.

Die Technik ist, wie oben beschrieben, ausserordentlich einfach und überall leicht ausführbar. Es ist nicht unbedingt nothwendig, eine 10%ige Ammoniaklösung zu gebrauchen, aber die Vergleichsversuche müssen natürlich mit einer Lösung von ein und demselben Procentgehalt ausgeführt werden.

Abbildung 117: Faksimile aus (Umikoff 1896, S. 356)

Weiterhin ergibt sich als Kontext, dass es am Ende des 19. Jahrhunderts große soziale und medizinische Probleme gab, insbesondere bei der Versorgung von ausgesetzten Neugeborenen.

6.7.2 Interesse an einer Detektivgeschichte um die Person „N. Sieber“

In Bezug auf den Artikel von Nersess S. Umikoff gibt einen weiteren Artikel, der auf die erste Publikation Bezug nimmt (siehe hierzu auch 3.3).

Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch.

Von
N. Sieber.

(Aus dem Laboratorium von M. Nencki in St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1900.)

In den Veröffentlichungen der Aerzte des Petersburger Findelhauses, Jahrgang 1898, hat Dr. N. Z. Umikoff¹⁾ eine Reaction beschrieben, mittelst welcher man im Stande ist, das Alter der Frauenmilch, von Beginn der Lactation ab gerechnet, zu bestimmen. Die Reaction besteht darin, dass eine bestimmte Menge, etwa 5 ccm. der zu untersuchenden Milch, mit dem halben Volumen, also 2,5 ccm. 10 %igen wässerigen Ammoniaks versetzt und 15 bis 20 Minuten lang im Wasserbade auf 60° erwärmt wird. Die Milch nimmt dabei eine violett-röthliche Färbung an, und die Nüance ist um so intensiver, je älter die Milch, seit Beginn der Lactation, ist. Kuhmilch, verschiedenen Alters, in gleicher Weise behandelt, nimmt eine gelbe, höchstens gelblichbraune Färbung an, so dass durch diese einfache Reaction sofort die Frauenmilch von der Kuhmilch unterschieden werden kann. Es war nun von Interesse, zu erfahren, durch welchen specifischen Bestandtheil der Frauenmilch diese charakteristische Reaction bedingt ist und ob, ausser der Kuhmilch, die Milch anderer Thierspecies diese Reaction nicht gibt.

Dank der Liebenswürdigkeit des dirigirenden Arztes des Petersburger Findelhauses, Dr. M. D. van Puteren, der mich auf diese Reaction aufmerksam machte und mir Frauenmilch

¹⁾ Trudy Wratschej St. Petersburgskaogo wospitatelnaogo doma 1898.

Abbildung 118: Faksimile aus (Sieber 1900, S. 101)

Der historische Text (Abb. 118) enthält im Original keinen vollständigen Namen, sondern ist nur mit N. Sieber gekennzeichnet. Diesen vollständigen Vornamen herauszufinden, ist eine spannende Detektivarbeit, die über den Gebrauch verschiedener Schriften in Deutschland und Russland zur Rolle der Frau im frühen 20. Jahrhundert und zu Gepflogenheiten bei der Publikation wissenschaftlicher Texte zu tun hat.

Bei dem nun folgenden Abschnitt ist es nützlich, aber nicht erforderlich, über Kenntnisse der kyrillischen Schrift und der Sütterlin-Schrift zu verfügen; aber auch, wenn dies nicht der Fall ist, lässt sich über Assoziation von ähnlich aussehenden Buchstaben aus den beiden genannten Alphabeten die richtige Spur finden. Durch das Auffinden einer Doktorarbeit aus Bern wurde offenbar, dass es sich um eine Frau handelte (Sieber 1880).

Je nach Schreibweise hieß sie manchmal „Nadine“ oder „Nadina“, auch der Druckfehler „Nadira“ lässt sich auffinden.

Da der Artikel von N. Sieber aus St. Petersburg (Russland) stammt, ist es naheliegend, die russische Schreibweise (kyrillische Schrift) auszuprobieren und von dort zur damals gebräuchlichen Kurrent-Schrift (ähnlich der 1911 entwickelten Sütterlin-Schrift) zu wechseln. Weil im Russischen aus dem deutschen gedehnten „ie“ ein einfaches „i“ wird, entsteht zunächst die Schreibweise „Надина Зибер“.

In der Sütterlin-Schrift sieht das Z dem gesummten russischen S („З“) sehr ähnlich, und so entsteht die Schreibweise „Ziber“ (Abb. 119).



Abbildung 119: Siber/Ziber-Schreibweisen kyrillisch / Sütterlin

Bei der Suche nach der Schreibweise „Nadina Ziber“ findet sich eine Internet-Seite der Sächsischen Akademie der Wissenschaften Leipzig, die einen erstaunlichen Lebenslauf offenbart (Fischer 2013).

Durch die Internetseite der Sächsischen Akademie der Wissenschaften wird die vollständige Identität von Nadine Sieber alias Nadeschda Olimpiowna Ziber-Shimova offenbar, die in Samara geboren wurde, bei Mendeleeff Kurse belegt hatte, in Bern Medizin studierte, promovierte und schließlich Russlands erste weibliche Laborleiterin wurde, nämlich im Nencki-Institut in St. Petersburg.

Dieser Zusammenhang ermöglicht einen Zugang über Gender-Fragen (Creese 1998). In diesem Zusammenhang lässt sich auch diskutieren, ob Nadine Sieber ihren Artikel aus dem Jahre 1900 absichtlich nur unter „N. Sieber“ publizierte: Nach damaliger Vorstellung war die Bildung einer Frau darauf auszurichten, dass sie ihren Pflichten als Ehefrau und Mutter gerecht wurde. Ein wissenschaftlicher Artikel entsprach nicht dieser Vorstellung. Eine Frau musste daher befürchten, dass ihr Artikel nicht veröffentlicht wurde. Aus diesem Grunde verwendeten

manche Frauen männliche Pseudonyme (Pseudoandronyme) für ihre schriftstellerischen oder wissenschaftlichen Tätigkeiten (Schulz et al. 2016).

Die Schülerinnen und Schüler können in diesem Abschnitt lernen, dass es um 1900 etwas ganz Besonderes war, als Frau eine führende Stellung in einem Labor zu bekleiden.

6.7.3 Interesse an Alfred Wöhlk und William Robert Fearon

Historische Dokumente wie Fotos und Faksimiles stellen eine weitere Herangehensweise an Nachweisreaktionen für Lactose dar. Viele Menschen, nicht nur geschichtlich interessierte, sehen sich gerne alte Fotos oder alte Schriften an und bewundern die Formulierungen und das Aussehen in vergangener Zeit (Matuschek, C., Jansen, W 1985).

Von Alfred Wöhlk (siehe 3.4) und William Robert Fearon (siehe 3.9) konnten historische Fotos aufgefunden werden, die einen Einblick in deren gesellschaftlichen Umstände ergeben.



Abbildung 120: Historische Abbildungen als Zugang für geschichtlich Interessierte

Das linke Foto in der obigen Abbildung zeigt Alfred Wöhlk im Kreise seiner Mitarbeiter in der Trianglen-Apotheke in Kopenhagen. Diese Apotheke existiert auch heute noch; der derzeitige Inhaber war so freundlich, das Foto in Abb. 120 links zur Verfügung zu stellen.

Das rechte Foto stammt aus dem Archiv der Universität Dublin und zeigt William Robert Fearon ganz oben rechts im Bild.

Der folgende Textausschnitt (Abb. 121) von Alfred Wöhlk, der in Dänemark in deutscher Sprache publizierte, charakterisiert einen Forscher, der mit all seiner Kraft nach etwas sucht, Misserfolge in Kauf nimmt, weiterarbeitet und durch genaues Beobachten etwas herausfindet, was ein oberflächlicher Mensch verworfen hätte.

Verhalten des Ammoniaks unter ähnlichen Umständen. — Nach mehreren vergeblichen Versuchen verschiedener Art, die nicht zum Ziele führten, prüfte ich deshalb das Verhalten des Traubenzuckers Ammoniak gegenüber.

Ich löste zirka $\frac{1}{2}g$ Milchzucker in etwa 15 cc 10-prozentigem Ammoniak auf und erhitze sofort bis zum Sieden. Es trat keine Farbenänderung ein, und ich hätte beinahe auch das Weiterverfolgen dieses Versuchs aufgegeben, besonders da ein gleichzeitiger Versuch mit gewöhnlichem Traubenzucker (roh und etwas gelblich) keine besondere Farbenänderung gab. Nach Verlauf einer halben Stunde beobachtete ich die Reagensgläser, und es zeigte sich dann, dass die eine Flüssigkeit von einer prachtvollen, lebhaft roten Farbe war. Beim Wiederholen des Versuches ergab es sich bald, dass der Milchzucker die rote Farbe veranlasst hatte. Man erkennt noch deutlich die rote Farbe, die beim

Abbildung 121: Faksimile aus (Wöhlk 1904, S. 671)

Der dargestellte Textausschnitt eignet sich auch gut für ein Rollenspiel oder ein Schultheater zum Thema Forschen. Letzteres gilt auch für den folgenden Textausschnitt von William Robert Fearon, wobei die Worte „erratic and untrustworthy“ die Pointe des Rollenspiels darstellen könnte:

Umikoff's reaction was studied by Sieber,⁴ who concluded that citrate is necessary for colour development. Wöhlk, on the other hand, found that maltose gave a similar reaction, and that both the lactose and maltose colour obtained on prolonged heating with strong ammonium hydroxide was inhibited by citrate.

I have found these ammonium hydroxide tests erratic and untrustworthy. When positive, they are probably due to the formation of an amine (by interaction between an aldehyde broken off from the sugar and the ammonia), and subsequent reaction between the amine and the carbohydrate.

Abbildung 122: Faksimile aus (Fearon 1942, S. 132)

Schülerinnen und Schüler lernen an den beiden Textbeispielen etwas zum Thema „Was ist Forschen?“ / Nature of Science (Krüger et al. 2018) und über Emotionen von Wissenschaftlern – auf der einen Seite die begeisternden Worte von Wöhlk („prachtvolle, lebhaft rote Farbe“, (Wöhlk 1904)) und auf der anderen Seite der Verriss von Fearon („erratic and untrustworthy“ (Fearon 1942)).

6.7.4 Interesse an der Person des Urologen Hans Malfatti

Das nachfolgende Faksimile von Hans Malfatti, Urologieprofessor aus Innsbruck, verdeutlicht den Nutzen der Wöhlk-Probe für die Medizin. An dieser Stelle wird gleich der nächste Zugang offenbar: Viele Menschen sind auch an medizinischen Fakten und Problemstellungen interessiert. Der altmodische Sprachstil „Über den Nachweis von Milchzucker im Harne“ übt eine weitere Faszination aus (siehe auch 3.5).

Über den Nachweis von Milchzucker im Harne.

Von

Dr. Hans Malfatti.

Gar nicht selten tritt an den Harnanalytiker die Frage heran, ob eine reduzierende Substanz im Harne Milchzucker oder Traubenzucker sei, oder mit anderen Worten: ob sich im konkreten Falle im Verlaufe der Schwangerschaft Diabetes entwickelt habe, oder ob nur ein harmloser Fall von Laktosurie vorliegt. Im wohleingerichteten Laboratorium ist die Beantwortung dieser Frage gerade keine schwere Aufgabe; die Reindarstellung des Kohlehydrates, das Verhalten im Polarisationsapparat, die Nichtvergärbarkeit mit Apiculatus-Hefe, die Bildung charakteristischer Laktosazone und der Schleimsäure geben Anhaltspunkte genug. Aber schnell und leicht ausführbare und dabei doch zuverlässige klinische Reaktionen auf Milchzucker gibt es bis jetzt nicht. In der Praxis begnügte man sich gewöhnlich mit Anstellung der Gärungsprobe, wobei Milchzucker mit guter Hefe oft mehr als einen Tag lang im warmen Zimmer der Vergärung widersteht. Manche unreine Hefen des Handels aber greifen auch Milchzucker ziemlich rasch an, und wenn neben dem Milchzucker auch etwas Dextrose sich findet, so wird der Nachweis des Milchzuckers oft sehr schwierig. Da nun nach den Untersuchungen von Ch. Porcher und Commandeur¹⁾ vor der Entbindung häufig eine Glykosurie sich findet, die dann allmählich in die Laktosurie nach der Entbindung übergeht, so ist ein solches Vorkommen nicht allzu selten zu erwarten.

In jüngster Zeit hat nun Alfred Woehl²⁾ eine neue, sehr interessante Reaktion auf Milchzucker angegeben, die darauf beruht,

¹⁾ Compt. r. d. l'Acad. des Sciences 138, pag. 862.

²⁾ Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. 43, S. 670.

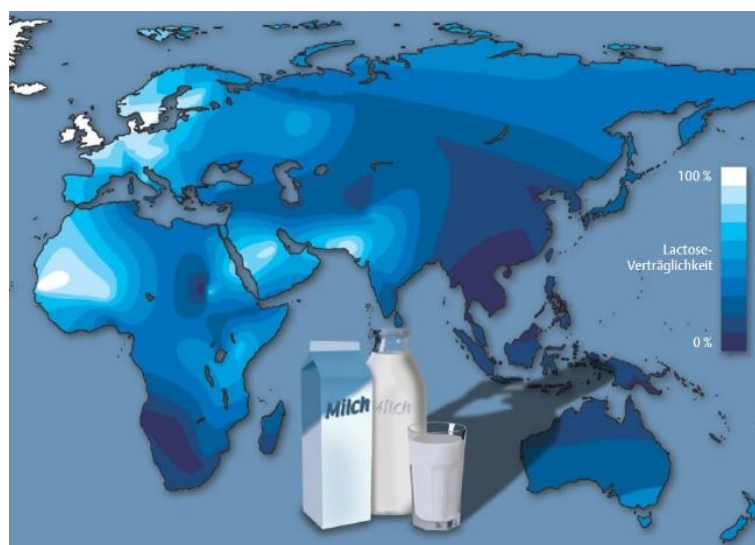
Abbildung 123: Faksimile aus (Malfatti 1905, S. 68)

6.8 Interesse an Humangenetik

Warum vertragen einige Menschen nach dem Kleinkindalter noch Milch, andere hingegen nicht? Aus Kenntnis der Molekularbiologie geht hervor, dass es hierfür eine genetische Ursache gibt. Gene können im Laufe des Lebens je nach Notwendigkeit an- oder abgeschaltet werden.⁴¹

Das Gen für die Produktion des Enzyms β -Galactosidase, welches auch oft vereinfachend „Lactase“ genannt wird, wird bei den meisten Menschen nach Ende der Stillzeit abgeschaltet. Milch ist Baby- oder Kleinkindernahrung; nach dieser Lebensphase ist Milch normalerweise kein Nahrungsmittel mehr (Höffeler 2009; Ruppertsberg et al. 2017a). Nur in wenigen Populationen weltweit, ausgehend von wenigen, lokal eingrenzbaeren Mutationen im menschlichen Genom, vertragen Erwachsene nach dem Kleinkindalter noch Milch.

Um dies zu erklären, werden ein Artikel aus „Biologie in unserer Zeit“ und „Chemkon“ als Arbeitsmaterial hinzugezogen (Höffeler 2009; Ruppertsberg et al. 2017a, 2017b).⁴²



Wiley, Lic. 4957031476130

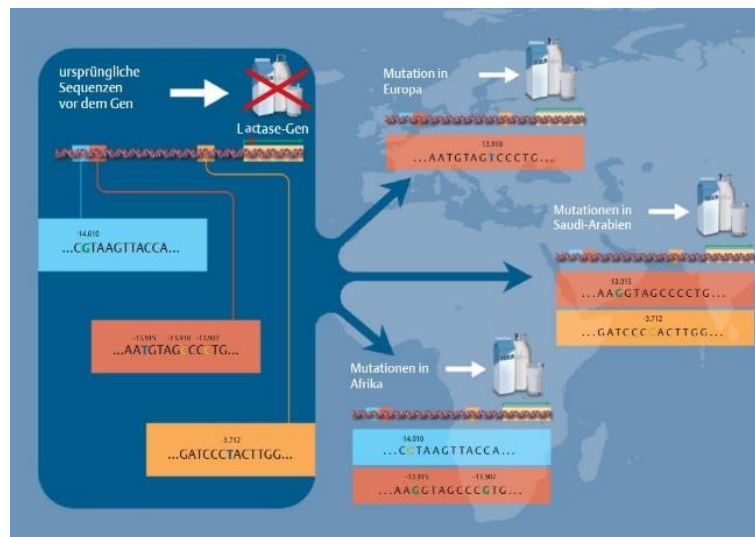
Abbildung 124: Lactose(in)toleranz geografisch aus (Höffeler 2009)

In Kürze ergibt sich hieraus Folgendes: Dass Erwachsene Lactose vertragen, wird von vielen Nordeuropäern als selbstverständlich hingenommen, jedoch geografisch betrachtet ergibt sich genau der umgekehrte Sachverhalt (siehe Abbildung 124).

Der Grund besteht in einer Mutation des Lactase-Gens (siehe Abbildung 124).

⁴¹ Hierfür gibt es Steuerungsmechanismen, die Gegenstand eines Biologie-Kurses sein können, auf die aber an dieser Stelle aus Platzgründen nicht eingegangen wird.

⁴² Die Abbildungen werden mit freundlicher Genehmigung des Wiley-Verlages, Lic. 4957031476130 vom 27.11.2020, verwendet.



Wiley, Lic. 4957031476130

Abbildung 125: Lactose-(in-)toleranz - genetisch bedingt aus (Höffeler 2009)

Eine Mutation, also eine Änderung der Abfolge der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, erfolgt zufällig; ein Zweck steckt nicht dahinter (siehe z. B. (Markl 2015; Baack et al. 2016; Weber 2015)).

Erst im Nachhinein ergibt sich, ob eine Mutation eine Nonsense-Mutation war, eine stumme Mutation (die Gen-Änderung wird nicht bemerkt), eine letale Mutation (das Individuum stirbt) oder ob eine Mutation einen Selektionsvorteil im Kampf ums Überleben bewirkt.

Dieser Selektionsvorteil lässt sich besonders leicht bei der nordeuropäischen Gruppe von milchvertragenden Individuen erklären: Wer während der Jungsteinzeit Haustiere auf seiner Wanderschaft nach Skandinavien mitführte, die Milch gaben, hatte im nordeuropäischen Winter frische, vitamin- und energiereiche Nahrung zur Verfügung (Höffeler 2009; Ruppertsberg et al. 2017a, 2017b).

Unter diesen Bedingungen hatten Erwachsene, die **nach der Kindheit** noch Milch vertrugen, eine **bessere Überlebenschance**.

Erwachsene, die nicht Träger des mutierten Gens waren, starben entweder auf der anstrengenden Wanderung an Vitamin- und Nahrungsmangel oder im Kampf aufgrund eines geschwächten Körpers, eventuell begleitet von heftigen Bauchschmerzen, Durchfall und Übelkeit nach dem Genuss der unverträglichen Milch.

Bei Interesse und Leistungsfähigkeit der Lerngruppe lässt sich an dieser Stelle ein fächerübergreifendes Projekt ermöglichen, bei dem die Bereiche Biologie, Humanbiologie, Genetik, Humangenetik, Geschichte, Jungsteinzeit, Migration, Anthropologie, Evolution, Ernährungswissenschaft, Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie angesprochen werden können. Ausgearbeitete Lehrmaterialien hierzu befinden sich in (Ruppertsberg et al.

2017a), die Musterlösungen hierzu befinden sich in (Ruppersberg et al. 2017b); beide Publikationen sind auch über den Dokumentenserver pedocs.de als OpenAccess-Variante erhältlich (48 Seiten).

6.9 Interesse an Grundlagenforschung

Aus dem Interesse an farbenfrohen und aussagekräftigen Experimenten geht bereits hervor, dass nur ein reduzierendes Disaccharid mit einer 1,4-Verknüpfung den roten Farbstoff bilden kann – aber welche Struktur hat dieser Farbstoff und nach welchem Mechanismus wird er gebildet? Schon Alfred Wöhlk hatte versucht, dies herauszufinden, war aber ebenso wie viele nach ihm daran gescheitert, dass sich der rote Farbstoff nicht isolieren lässt und somit nicht genauer untersucht werden kann. Dennoch gibt es viele Hinweise auf die Entstehung und die Struktur des roten Farbstoffs: Bei der Arbeit mit primären Aminen ist aufgefallen, dass n-Propylamin in der Lage ist, mit 1,4-verknüpften reduzierenden Zuckern einen roten Farbstoff zu bilden, das strukturisomere iso-Propylamin (2-Aminopropan) hingegen nicht.



Abbildung 126: Strukturisomere: n-Propylamin (links), Isopropylamin (rechts)

Bei der Überprüfung mit den isomeren Butylaminen, dem Aromatenpaar Anilin-Benzylamin (siehe 11.1.2) u. a. wurde die Hypothese bestätigt, dass das erste C-Atom, welches auf die Aminogruppe folgt, ein sekundäres oder primäres C-Atom sein muss, während ein tertiäres C-Atom⁴³ nach der Aminogruppe die Bildung eines roten Farbstoffes verhindert. Da die CH₂-Gruppe wie ein Abstandhalter wirkt, entstand die Bezeichnung „Spacer-Regel“.

Weiterhin wurden begründete Hypothesen für eine mögliche Strukturformel aufgestellt. Je nach Ausstattung der Schule und Verbindung zu einer Hochschule (ggf. mit einem Schülerlabor) kann hier Interesse an Grundlagenforschung gefördert werden, was für die Bildung des wissenschaftlichen Nachwuchses und für die Berufswahl der Schülerinnen und Schüler von großer Wichtigkeit sein kann.

⁴³ Stickstoffatome werden bezüglich der Einteilung primär, sekundär, tertiär wie C-Atome behandelt.

Wie bereits erwähnt, sind einige der mit verschiedenen Aminen durchgeführten Experimente nicht für die Durchführung mit Schülerinnen und Schülern geeignet. Eine Schule mit naturwissenschaftlicher Orientierung und entsprechender Ausstattung oder ein Schülerforschungslabor könnten jedoch ohne weiteres vergleichende Experimente mit Aminosäuren (4.2.7), GABA, α - und β -Anilin (4.2.8) oder sogar mit den beiden isomeren Propylaminen (4.2.3) durchführen. Zu letzterem sollten Mikroliterpipetten und eine entsprechende Anleitung und Aufsicht durch Fachpersonal zur Verfügung stehen. Bezüglich der Kohlenhydrat-Komponenten gibt es keine Sicherheitseinschränkungen, jedoch ist zu berücksichtigen, dass Feinchemikalien wie 10 g 4,6-O-Ethylidenglucose ca. 80 Euro kosten und aufgrund experimenteller Erfahrungen nur ca. zwei Jahre haltbar sind.

6.10 Fazit der unterrichtlichen Behandlung von Lactose und Maltose

Die Schülerinnen und Schüler haben die Möglichkeit, mit Hilfe von neuartigen, schulgerechten Experimenten Lebensmittel aus ihrem Alltag genauer zu untersuchen und kennenzulernen. Anknüpfend an Alltagsphänomenen wie z. B. „Lactose-Intoleranz“ können komplexe Sachverhalte wie z. B. Mutationen im menschlichen Genom oder die Besiedelung Skandinaviens und höherer Alpenregionen am Ende der Jungsteinzeit vor ca. 8000 Jahren erarbeitet werden.

Die Schülerinnen und Schüler lernen, dass normalerweise nur Säuglinge und Kleinkinder Lactose vertragen. Dass auch Erwachsene Lactose vertragen, ist eine Besonderheit, die geografisch gesehen nur an wenigen Orten vorkommt.

Sie lernen europäische Forscher (Umikoff, Sieber, Wöhlk, Malfatti, Fearon) kennen, die Lactosenachweise entwickelten.

Diese Tests dienen der medizinischen Diagnostik und sind in Europa längst durch chromatografische Verfahren ersetzt worden.

Im Chemieunterricht bewirkt die Wöhlkprobe einen anschaulichen Nachweis für den unterschiedlichen Lactosegehalt von Milch und Milchprodukten.

Lactose ist ein reduzierendes Disaccharid mit einer 1,4-Verknüpfung, während Glucose und Fructose reduzierende Monosaccharide sind; Saccharose ist ein nicht-reduzierendes Disaccharid mit einer 1,2-Verknüpfung.

Der Mechanismus zur Entstehung und die Struktur des roten Farbstoffs sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Zur Anwendung der hier beschriebenen Nachweisverfahren lässt sich sagen:

1. Alle drei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Verfahren (Wöhlk-Probe, Fearon-Test, 1,6-Diaminohexan-Verfahren) sind unter schulischen Bedingungen einfach, wirkungsvoll und motivierend anwendbar und stellen einen Schlüssel zu den oben beschriebenen zahlreichen Anknüpfungsmöglichkeiten dar, durch die bei Schülerinnen und Schülern Interesse erweckt und der Zugang zu Fachinhalten erleichtert wird.
2. Die Möglichkeit, Lactose und Maltose im Unterricht experimentell nachzuweisen, stellt eine enorme Bereicherung und Ausweitung der Experimentierkultur in der Kohlenhydratchemie dar, die bislang von der fehler- und missverständnisbehafteten Fehling-Probe und ähnlichen Nachweisen mit Kupfer(II)-Ionen dominiert wurde.
3. Die Möglichkeit zum Maltosenachweis schließt die logische Lücke des bislang unterlassenen Endproduktenachweises beim Stärkeabbau.
4. Die semiquantitative, kolorimetrische Prüfung von Milch und Milchprodukten auf das unterschiedlich starke Vorhandensein von Lactose ermöglicht lebensnahes schulisches Forschen an Alltagsprodukten bei gleichzeitiger Kontextorientierung am Phänomen „Lactose(in)toleranz“.
5. Die Option, bei allen Verfahren photometrische Messungen durchzuführen und/oder UV-Vis-Spektrometrie anzuwenden, stellt eine stärkere Orientierung zur Wissenschaft dar.
6. Die Entdeckung der Spacer-Regel und die Tatsache, dass nach vielfältigen Versuchen über viele Jahrzehnte hinweg nun begründete Hypothesen für Struktur und Entstehung der roten Farbstoffe aufgestellt werden konnten, kann Schülerinnen und Schüler für Grundlagenforschung interessieren und sie stärker an wissenschaftliche Arbeitsweisen heranführen.
7. Das neu entwickelte 1,6-Diaminohexan-Verfahren ist bei der Gefährdungsbeurteilung wesentlich günstiger einzustufen als die Verfahren mit Ammoniak und Methylamin.

7 Fazit und Ausblick

Ausgehend von den historischen Vorbildern „Wöhlk-Probe 1904“ und „Fearon's Test 1942“ wurden in dieser Arbeit die Reaktionen von Kohlenhydraten mit Ammoniak und Aminen im stark alkalischen Bereich ausführlich untersucht.

Viele Parallelen zwischen den beiden historischen Reaktionen sowie neue Ergebnisse zum Reaktionsverhalten analoger Kohlenhydrate und Amine führten zu der Erkenntnis, dass nicht nur 1,4-verknüpfte Disaccharide einen roten Farbstoff ergeben, sondern auch Glucose, wenn sie eine Schutzgruppe in Position 4 aufweist.

Somit wurde bewiesen, dass die Wöhlk-Probe und der Fearon-Test nicht nur Nachweismethoden für 1,4-verknüpfte Disaccharide wie Lactose, Maltose, Cellobiose sowie deren Umlagerungsprodukte Lactulose, Maltulose, Cellobiulose sind, sondern auch für Maltotriose und Glucosen mit einer Schutzgruppe in Position 4, also z. B. 4,6-O-Ethylidenglucose und 4,6-O-Benzylidenglucose.

Weiterhin konnten Regeln für die Amino-Komponenten aufgestellt werden, mit denen die Bildung eines roten Farbstoffes gelingt. Dies ist immer dann der Fall, wenn auf die Aminogruppe eine vicinale CH_2 -Gruppe folgt, welche als Abstandhalter (Spacer) bezeichnet werden kann. Die Entdeckung der „Spacer-Regel“ kann als eine wichtige Erkenntnis bezeichnet werden.

Alle oben genannten Kohlenhydrat-Komponenten ergeben mit einem geeigneten Amin einen roten Farbstoff, sofern die Spacer-Regel befolgt wird. Weiterhin müssen für zusätzliche funktionelle Gruppen Mindestabstände eingehalten werden, z. B. eine zweite Carboxygruppe darf sich frühestens am 5. C-Atom befinden.

Die Wahl der Amino-Komponente bestimmt die Wellenlänge der maximalen Absorption im Vis-Bereich, während die Wahl der Kohlenhydrat-Komponente keinen Einfluss darauf hat.

Auf der Suche nach weiteren Autoren konnten historische Arbeiten von Friedrich Karl von Krüger aus Tomsk, später Braunschweig und Albert Morel, Claude Gautier und Renée Rochat aus Lyon gefunden werden, welche bislang noch unbekannt waren.

Somit waren in Europa nicht nur die bislang bekannten Wissenschaftler Wöhlk, Malfatti und Fearon an Lactosenachweisen beteiligt, sondern auch van Leent, Umikoff, Sieber, Krüger, Gautier, Morel, Rochat sowie Nickerson in Kalifornien/USA, sowie wahrscheinlich weitere, die entweder nicht publiziert haben oder so publiziert haben, dass ihre Arbeiten entgegen aller Bemühungen gegenwärtig nicht auffindbar sind.

Trotz Zusammenarbeit mit Fachinstituten im Bereich Lebensmittelchemie und Organischer Chemie konnte die Struktur des roten Farbstoffs noch nicht endgültig determiniert werden, weil immer wieder unüberwindliche Hindernisse auftraten: Der rote Farbstoff kann nicht mit anderen Lösungsmitteln extrahiert werden und er ist nur zeitlich begrenzt sowie nur in einem sehr engen pH-Bereich stabil. Aus letzterem Grund scheidet HPLC als Untersuchungsmethode aus, weil die Matrix der HPLC-Säure durch den stark alkalischen pH-Wert zerstört würde. Die Untersuchung mit ESI-MS war ebenso wenig erfolgreich wie NMR, weil aufgrund der Fragmentierungen des alkalischen Zuckerabbaus eine große Zahl verschiedener Moleküle im Produktgemisch vorhanden ist, die kein klares Bild erlaubt. Immerhin konnten sinnvolle Postulate erstellt werden, die in die Richtung betainartiger Pyridiniumderivate zeigen.

Darauf aufbauend, könnten zukünftige Untersuchungen weiterführen, wenn

- Methoden angewendet werden, die unempfindlich gegen stark alkalische pH-Werte sind (eine derartige Methode ist mit ESI-MS schon gefunden),
- Metaboliten des alkalischen Zuckerabbaus gefunden werden, die die Zahl der möglichen „chemischen Weichenstellungen“ auf dem Weg zum Farbstoff eingrenzen,
- der rote Farbstoff mit möglichst wenigen Verunreinigungen erhalten werden könnte, damit NMR-Spektren interpretierbar werden.

In Bezug auf den kontextorientierten Chemieunterricht bleibt festzuhalten, dass prinzipiell alle drei Verfahren für die Anwendung in Schulen geeignet sind, dass jedoch durch die Substitution von Ammoniak durch Methylamin oder 1,6-Diaminohexan nun leistungsfähige experimentelle Unterrichtsverfahren zur Verfügung stehen, die bis zu 30mal schneller als die Wöhlk-Probe funktionieren und im Rahmen einer üblichen Unterrichtsstunde zeitlich wesentlich besser behandelt werden können.

Bei der obligatorischen Gefährdungsbeurteilung für Schulexperimente stellt das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte 1,6-Diaminohexan-Verfahren mit der Inverter-Mikrowelle ein gutes Beispiel für eine gelungene Ersatzstoffprüfung und Ersatzverfahrensprüfung dar.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren zum Lactose- und Maltosenachweis bringen inhaltlich den Gewinn, dass

- a) beim Stärkeabbau durch Speichelamylase nun erstmalig der Endproduktnachweis für Maltose gelingt und
- b) erstmalig der sehr unterschiedliche Lactosegehalt von Milchprodukten anschaulich in schülergerechten Experimenten gezeigt werden kann.

Weiterhin kann ein starker Bezug zur Lebenswelt der Schülerinnen und Schüler hergestellt werden. Durch diese Kontextorientierung und durch weitere Einstiegsmöglichkeiten wie Medizin, Ernährungswissenschaften, historische Chemie, Experimente, Genderfragen, Detektivgeschichte, eignen sich die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Schülerexperimente und Arbeitsmaterialien für eine starke Aktivierung der Schülerinnen und Schüler und dienen dem Ziel, mehr Interesse für den naturwissenschaftlichen Unterricht zu erwecken.

8 Literaturverzeichnis

- Aebi, Hugo (1965): Einführung in die praktische Biochemie für Studierende der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie und Biologie. Frankfurt a. M.: Akademische Verlagsgesellschaft.
- Ahluwalia, V. K.; Dhingra, Sunita (2000): Comprehensive practical organic chemistry. Qualitative analysis. Hyderabad (India): Universities Press.
- Ahrens, G. (1966): Die Urinanalyse. Leipzig: Joh. Ambrosius Barth.
- Akademie für Lehrerfortbildung und Personalplanung (Hg.) (2020): Chemie - aber sicher! Experimente kennen und können. Akademiebericht 475. 5. Aufl. Dillingen an der Donau, zuletzt geprüft am 02.03.2020.
- Altmayer, W. et al. (Hg.) (2012): Salters Chemie - Chemical ideas. Theoretische Grundlagen. Braunschweig: Schroedel (Salters Chemie, Schülerband).
- Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. (2000): Rapid Determination of Lactulose in Milk Using Seliwanoff's Reaction. In: *Analytical Letters* 33 (1), S. 125–135. DOI: 10.1080/00032710008543041.
- Ammon, Felix (2017): Neuartige Farbstoffe mit erweiterten π -Systemen auf Basis von Pyrrol. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen-Nürnberg, zuletzt geprüft am 15.04.2021.
- Analytik Jena (o.J.): Instrumentation und Techniken der UV VIS Spektroskopie - Grundlagen. Jena, zuletzt geprüft am 26.06.2020.
- Arnold, Karin et al. (2011): Chemie Oberstufe. Gesamtband. [Westliche Bundesländer, Neubearb.], 1. Aufl., 2. Dr. Berlin: Cornelsen.
- Asselborn, Wolfgang (Hg.) (2013): Chemie heute. Braunschweig: Schroedel.
- Baack, Katharina; Becker, Andrea Claudia; Ekebrecht, Detlef (2016): Natura Oberstufe. Biologie für Gymnasien. 1. Auflage. Stuttgart, Leipzig: Ernst Klett Verlag.
- Bankar, Sandip B.; Bule, Mahesh V.; Singhal, Rekha S.; Ananthanarayan, Laxmi (2009): Glucose oxidase--an overview. In: *Biotechnology advances* 27 (4), S. 489–501. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- Barfoed, C. (1873): Ueber die Nachweisung des Traubenzuckers neben Dextrin und verwandten Körpern. In: *Fresenius, Zeitschrift f. anal. Chemie* 12 (1), S. 27–32. DOI: 10.1007/BF01462957.
- Beckmann, Johann (1786): Beyträge zur Geschichte der Erfindungen. Zweyten Bandes erstes Stück. 2., etwas verb. Aufl. Leipzig: Paul Gotthelf Kummer.

- Bee, U. et al. (2019): Elemente Chemie Oberstufe. Schülerbuch Klassen 11-13 (G9), 10-12 (G8). Stuttgart: Klett.
- Beer (1852): Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. In: *Ann. Phys. Chem.* 162 (5), S. 78–88. DOI: 10.1002/andp.18521620505.
- Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, Peter (2008): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Aufl. (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>.
- Benedict, Stanley Rossiter (1909): A reagent for the detection of reducing sugars. In: *J. Biol. Chem.* (5), S. 485–487. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/5/5/485.full.pdf>, zuletzt geprüft am 22.02.2019.
- Bertsche, Ingo (2017): Königsblau statt krebserregend. In: *CHEMKON* 24 (2), S. 73–76. DOI: 10.1002/ckon.201710291.
- Berufsgenossenschaft RCI - GisChem: Ammoniak 2020. Online verfügbar unter www.gischem.de/download/01_0-007664-41-7-000000_1_1_887.PDF, zuletzt geprüft am 10.10.2020.
- Bibliothèque nationale de France (2020): Albert Morel (1875-1953) - Auteur - Ressources de la Bibliothèque nationale de France. Online verfügbar unter https://data.bnf.fr/fr/13447437/albert_morel/, zuletzt aktualisiert am 30.11.2020, zuletzt geprüft am 30.11.2020.
- Biehlig, T. (2015): Die Lügen der Lebensmittelindustrie - was uns alles schmeckt. Hamburg: Verlag Thomas Biehlig.
- Blume, Ruediger (2018): Prof. Blumes Medienangebot: "Stärke, Zucker und Zahngesundheit". Eine Unterrichtseinheit für die Grundschule. Online verfügbar unter <http://www.chemieunterricht.de/dc2/grundsch/staerke/>, zuletzt aktualisiert am 30.12.2018, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
- Blume, Ruediger (2019): Nachweis von Cellulose. Online verfügbar unter <https://www.chemieunterricht.de/dc2/haus/v067.htm>, zuletzt aktualisiert am 30.12.2019, zuletzt geprüft am 21.04.2020.
- Bode, Lars (2012): Human milk oligosaccharides. Every baby needs a sugar mama. In: *Glycobiology* 22 (9), S. 1147–1162. DOI: 10.1093/glycob/cws074.
- Bohrmann-Linde, Claudia; Kröger, Simone; Krollmann, Patrick; Tausch, Michael; Wachtendonk, Magdalene von; Wambach-Laicher, Judith; Krees, Simone (2014): Chemie 2000+ NRW Sek

- II/Chemie 2000+ Qualifikationsphase. Bamberg: CC Buchners Verlag (Chemie 2000+ NRW Sek II).
- Bredereck, Hellmut (1931): Zur Molisch-Reaktion. In: *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* 64 (11), S. 2856–2859. DOI: 10.1002/cber.19310641119.
- British Medical Journal (1960): Obituary. W. R. Fearon, M.B., Sc.D. In: *BMJ* 1 (5167), S. 205. DOI: 10.1136/bmj.1.5167.205.
- Brock, Thomas H. (1997): Sicherheit und Gesundheitsschutz im Laboratorium. Die Anwendung der Richtlinien für Laboratorien. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59163-1>.
- Bruyn, C. A. Lobry de; van Ekenstein, W. Alberda (1895): Einwirkung von Alkalien auf Kohlenhydrate. Wechselseitige Umwandlung von Glucose, Fructose und Mannose in einander. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 28 (3), S. 3078–3082. DOI: 10.1002/cber.189502803140.
- Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz (01.12.2010): § 7 GefStoffV - Einzelnorm. Online verfügbar unter https://www.gesetze-im-internet.de/gefstoffv_2010/__7.html, zuletzt geprüft am 09.10.2020.
- Bunn, H., Higgins, P. (1981): Reaction of Monosaccharides with Proteins. Possible Evolutionary Significance. In: *Science* (213), S. 222–224, zuletzt geprüft am 12.06.2019.
- Campani, Giovanni (1872): Nachweisung von Trauben- und Milchzucker. In: *Fresenius J. Anal. Chem.* 11 (1), S. 321. DOI: 10.1007/BF01588490.
- Carl Roth GmbH + Co KG (2019): Sicherheitsdatenblatt: Jod-Kaliumjodidlösung nach Lugol. Online verfügbar unter <https://www.carlroth.com/medias/FSDb-N052-DE-DE.pdf>, zuletzt geprüft am 12.05.2020.
- Creese, M. (1998): Early Women Chemists in Russia. Anna Volkova, Iuliia Lermontova and Nadezhda Ziber-Shumova. In: *Bull. Hist. Chem.* 21, S. 19–25. Online verfügbar unter http://acshist.scs.illinois.edu/bulletin_open_access/num21/num21%20p19-24.pdf, zuletzt geprüft am 18.01.2019.
- Dallinger, Doris (2013): Mikrowellen in der Organischen Synthese. In: *Chem. Unserer Zeit* 47 (6), S. 356–366. DOI: 10.1002/ciuz.201300610.
- Demuth, R., Parchmann, I., Ralle, B. (Hg.) (2009): Chemie im Kontext - Sekundarstufe II. Kontexte, Medien, Basiskonzepte. [Westliche Bundesländer], 1. Aufl., [Nachdr.]. Berlin: Cornelsen.
- Deutscher Apotheker Verlag (Hg.) (2014): Europäisches Arzneibuch 8. Amtliche deutsche Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

- Deutscher Apotheker-Verein (1922): Reagentien zum Nachweis von Holzstoff in Papier. In: *Vierteljahresschrift für praktische Pharmazie* 19 (https://publikationsserver.tu-braunschweig.de/receive/dbbs_mods_00066956), S. 29–30. DOI: 10.24355/DBBS.084-201104210944-0.
- Dobers, Joachim (2011): Biologie heute aktuell 1. Ein Lehr- und Arbeitsbuch (5/6). Unter Mitarbeit von Dobers, Groth, Katzenmaier, Knippenberg, Leiding, Lorbach, Ruppertsberg, Schulz, Schulz. [Hessen], Dr. A. Braunschweig: Schroedel.
- Dornblüth, Otto (1899): Kompendium der Inneren Medizin. Leipzig: Verlag von Veit Comp.
- Eisner, W. et al. (Hg.) (2000): Elemente - Chemie II. Unterrichtswerk - Gesamtband. 1. Aufl., [Nachdr.]. Stuttgart: Klett.
- Eisner, Werner (2011): Elemente Chemie 2. [Neubearb., Allg. Ausg.], 1. Aufl. Stuttgart, Leipzig: Klett.
- Farnum, D. et al. (1974): Attempted Reformatskii Reaction of Benzonitrile, 1,4-Diketo-3,6-diphenylpyrrolo(3,4-c)pyrrole, a Lactam of Pentalene. In: *Tetrahedron Letters* (29), S. 2549–2552, zuletzt geprüft am 25.02.2019.
- Fearon, William Robert (1942): The detection of lactose and maltose by means of methylamine. In: *The analyst* 67 (793), S. 130–132. Online verfügbar unter DOI: 10.1039/AN9426700130.
- Fehling, H. (1848): Quantitative Bestimmung des Zuckers im Harn. In: *Arch phys. Heilkunde* (7), S. 64–73. Online verfügbar unter <https://jbc.bj.uj.edu.pl/dlibra/plain-content?id=129767>.
- Fischedick, Arno; Fleischer, Holger; Hofheinz, Volker; Kohl-Krug, Stefanie; Lehmann-Eser, Franziska; Lüttgens, Uwe et al. (2018): Fokus Chemie. Sekundarstufe II, Gesamtband. 1. Aufl. 2018. Berlin: Cornelsen Verlag (Fokus Chemie - Sekundarstufe II).
- Fischer, Marta (2013): Biobibliographisches Lexikon der Biochemiker zwischen Deutschland und Russland im 19. Jahrhundert. Lebendige Verbindungen. Hg. v. Sächsische Akademie der Wissenschaften. Aachen. Online verfügbar unter <http://drw.saw-leipzig.de/31165>, zuletzt aktualisiert am 02.08.2016, zuletzt geprüft am 30.04.2021.
- Fischler, F.; Schlemmer, Ferdinand (1960): Anleitung zur Harnuntersuchung. Vierte, Verbesserte Auflage. Munich: J.F. Bergmann-Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-53815-5>.
- Flack, H. D. (2009): Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work. In: *Acta Cryst A* 65 (5), S. 371–389. DOI: 10.1107/S0108767309024088.

- Fleischer, Holger (2017): Fehlinterpretation der Fehling-Probe auf reduzierende Zucker - Von der Beobachtung im Chemieunterricht zur Evidenz gegen die Oxidation der Aldehydgruppe. In: *CHEMKON* 24 (1), S. 27–30. DOI: 10.1002/ckon.201610283.
- Fleiss, Christina Magdalena (2013): Kohlenhydrate im Chemieunterricht. In: *PLUS LUCIS* (1-2), S. 40–41. Online verfügbar unter <https://pluslucis.univie.ac.at/PlusLucis/131/s40.pdf>, zuletzt geprüft am 18.01.2019.
- Frandrup-Kuhr, O. (2004): Einfluss der Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen auf die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine. Frandrup-Kuhr_Dissertation_971865906-2. Münster.
- Frerichs, G.; Arends, G.; Zörnig, H. (1938): Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Für Apotheker, Arzneimittelhersteller Drogisten, Ärzte und Medizinalbeamte Zweiter Band. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-90729-6>.
- Freundner-Huneke, Imme; Möllers, Ralph; Schulz, Siegfried; Zeeb, Annely (2016): Erlebnis Biologie. Ein Lehr- und Arbeitsbuch. Baden-Württemberg, differenzierende Ausgabe, Druck A. Braunschweig: Schroedel.
- Gallas, Katharina; Pototschnig, Gerit; Adanitsch, Florian; Stütz, Arnold E.; Wrodnigg, Tanja M. (2012): The Amadori rearrangement as glycoconjugation method. Synthesis of non-natural C-glycosyl type glycoconjugates. In: *Beilstein journal of organic chemistry* 8, S. 1619–1629. DOI: 10.3762/bjoc.8.185.
- Gattermann, Ludwig; Wieland, Theodor; Sucrow, Wolfgang (1982): Die Praxis des organischen Chemikers. 43. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10599377>.
- Gautier, Claude (1910): Recherches sur le chromogène urinaire et la couleur d'origine skatolique. Thèse. Lyon, Université de Lyon. Online verfügbar unter <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/62368992>.
- Gautier, C., Morel, A. (1906): Sur une réaction colorée du lait. In: *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* LX, S. 376. Online verfügbar unter <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k64625717/f398.image>, zuletzt geprüft am 27.08.2020.
- Gautier, C., Morel, A. (1907): Réaction colorée du lait. In: *Bulletin de la Société chimique de France* (1), S. 183. Online verfügbar unter <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5469907d/f187.image.r=gautier>, zuletzt geprüft am 10.09.2020.

- Geneanet (2021): Familienstammbaum von Françoise Henriette Renée ROCHAT. Online verfügbar unter <https://gw.geneanet.org/patrick69?n=rochat&oc=&p=francoise+henriette+renee>, zuletzt aktualisiert am 24.02.2021, zuletzt geprüft am 24.02.2021.
- GESTIS-Stoffdatenbank (2020): 1-Naphthol. Online verfügbar unter http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates&fn=default.htm&vid=gestisdeu:sdbdeu, zuletzt aktualisiert am 17.09.2020, zuletzt geprüft am 17.09.2020.
- Glaum, Erwin; Flörke, Wilhelm; Wolff, Robert (Hg.) (1984): Kursthemen Chemie. Organische Chemie und Biochemie. 2., durchges. Aufl. Bonn: Dümmler (Dümmlerbuch, 4312).
- Gottwald, Wolfgang; Heinrich, Kurt Herbert (1998): UV/VIS-Spektroskopie für Anwender. Weinheim: Wiley-VCH (Die Praxis der instrumentellen Analytik).
- Grob, Peter (2000): Einfache Schulversuche zur Lebensmittelchemie. 2., überarb. und erw. Aufl. Köln: Aulis Verlag (Unterrichtshilfen Naturwissenschaften).
- Groth, H., Knippenberg, A., Leiding, U. (Hg.) (2016): Biologie heute aktuell - Gesamtband. Ein Lehr- und Arbeitsbuch, S I, Rheinland-Pfalz. Schroedel Verlag GmbH. Braunschweig: Schroedel.
- Haase, Tobias (2017): Schiffsche Probe. Jugend forscht. Albert-Schweitzer-Gymnasium. Crailsheim.
- Habermehl, Gerhard G. K.; Hammann, Peter E.; Krebs, Hans Christoph; Ternes, Waldemar (2008): Naturstoffchemie. Eine Einführung. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-73733-9>.
- Hallmann, Lothar (1952): Klinische Chemie und Mikroskopie. Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das medizinisch-klinische Laboratorium. 11., neubearb. Aufl. Leipzig: Thieme.
- Häusler, Karl; Rampf, Heribert (1976): 270 [Zweihundertsiebzig] chemische Schulversuche. Mit Einf. in d. Laborpraxis. 1. Aufl. München, Berlin, Bielefeld: Oldenbourg; Cornelsen-Velhagen und Klasing.
- Hayazg Enzyklopädie (2020): Умиков Нерсес Захарьевич — Энциклопедия фонда «Хайазг». Umikoff, Nersess Sacharewitsch. Online verfügbar unter http://ru.hayazg.info/Умиков_Нерсес_Захарьевич.
- Hebbink, G., Peters, H. (2012): Measurement of Lactose from Dry Powder Inhalers in Impactors. DFE Pharma. Borculo, Niederlande, 2012. Online verfügbar unter <https://www.dfepharma.com/-/media/documents/technical-documents/technical-posters/measurement-of-lactose-from-dpi-in-impactors.pdf>, zuletzt geprüft am 20.02.2019.
- Heimann, Werner (1969): Grundzüge der Lebensmittelchemie. 1. Aufl. Dresden: Steinkopff.

- Hellwig, Michael; Henle, Thomas (2014): Backen, Altern, Diabetes. Eine kurze Geschichte der Maillard-Reaktion. In: *Angew. Chem.* 126 (39), S. 10482–10496. DOI: 10.1002/ange.201308808.
- Hergt, Johannes (2010): Entfärbung von Iod-Stärke-Lösung mit Speichel. Praktikum zur Organischen Chemie für Studierende des Lehramts. Philipps-Universität Marburg. Chemisches Institut. Online verfügbar unter https://www.chids.de/dachs/praktikumsprotokolle/PP0397Gruppe_9_Entfaerbung_von_Iod_Staerke_Loesung_Johannes_Hergt_WiSe_10_11.pdf, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
- Herzfeld, A. (1883): Ueber Maltose. In: *Ann. Chem. Pharm.* 220 (1-2), S. 206–224. DOI: 10.1002/jlac.18832200110.
- Heyns, Kurt; Beilfuß, Wolfgang (1973): Die Umlagerung von Ketosylaminen aus Ketozuckern und aromatischen Aminen. In: *Chem. Ber.* 106 (8), S. 2680–2692. DOI: 10.1002/cber.19731060833.
- Hodge, J. E. (1953): Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. In: *J. Agric. Food Chem.* 1 (15), S. 928–943. DOI: 10.1021/jf60015a004.
- Höffeler, Fritz (2009): Geschichte und Evolution der Lactose(in)toleranz. Das Erbe der frühen Viehzüchter. In: *Biol. Unserer Zeit* 39 (6), S. 378–387. DOI: 10.1002/biuz.200910405.
- Hofmann, Eberhard (2006): Biochemie systematisch. 4. Aufl. Bremen: UNI-MED Verl. (Klinische Lehrbuchreihe). Online verfügbar unter http://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?id=2781751&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Hohmann, Katrin (2008): Hydrolyse von Stärke mit Speicher. Organisches Grundpraktikum (LA). Hg. v. Ph. Reiß. Philipps-Universität Marburg. Marburg, zuletzt geprüft am 22.02.2021.
- House of Oireachtas (2020): William Robert Fearon – Houses of the Oireachtas. Dublin. Online verfügbar unter <https://www.oireachtas.ie/en/members/member/William-Robert-Fearon.S.1943-08-09/>.
- Huber, Heinz; Plankl, Verena (2010): Geschichte der Medizinischen Fakultät Innsbruck und der medizinisch-chirurgischen Studienanstalt (1673 - 1938). Wien: Böhlau.
- Jessop, William John Edward (1961): Fearon's Introduction to Biochemistry. 4th ed. Burlington: Elsevier Science. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1874866>.
- Kanzler, Clemens (2017): Furane, Furanone und Pyranone – ihr Beitrag zur Farbe und den antioxidativen Eigenschaften in der Maillard-Reaktion der Maltose. Dissertation. Berlin.
- Kanzler, Clemens (2019): Maillard-Zwischenprodukte. E-Mail, 2019. E-Mail an Klaus Ruppertsberg.

- Keilin, D.; Hartree, E. F. (1952): Specificity of glucose oxidase (notatin). In: *Biochemical Journal* 50 (3), S. 331–341. DOI: 10.1042/bj0500331.
- Kirschbaum, Ernst-Georg (2016): Grammatik der russischen Sprache. 1. Auflage, 5. Druck. Berlin: Cornelsen.
- Klemeyer, H. (2018): Sicheres Experimentieren - Das Ausgasen von Gefahrstoffen aus ihren wässrigen Lösungen und ihre Kennzeichnung. Universität Hamburg. Hamburg, 2018. Online verfügbar unter <https://www.biologie.uni-hamburg.de/einrichtungen/ihw/download/180913-hjklemeyer-2018-sicheres-experimentieren.pdf>, zuletzt geprüft am 19.02.2019.
- KMK (Hg.) (2004): Bildungsstandards im Fach Biologie für den Mittleren Schulabschluss. München: Wolters Kluwer, zuletzt geprüft am 23.03.2021.
- KMK (Hg.) (2020): Bildungsstandards im Fach Chemie für die Allgemeine Hochschulreife. Bonn und Berlin: Wolters Kluwer, zuletzt geprüft am 23.03.2021.
- König, Burkhard; Butenschön, Holger (2007): Organische Chemie. Kurz und bündig für die Bachelor-Prüfung. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2909681&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Kramhoeller, B., Pischetsrieder, M., Severin, Th. (1993): Maillard reactions of lactose and maltose. In: *J. Agric. Food Chem.* 41, S. 347–351.
- Krüger, Dirk; Parchmann, Ilka; Schecker, Horst; Peter Heering; Kerstin Kremer (Hg.) (2018): Theorien in der naturwissenschaftsdidaktischen Forschung. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, zuletzt geprüft am 19.04.2021.
- Krüger, Friedrich (1898): Kurzes Lehrbuch der medicinischen Chemie. Mit Einschluss der medicinisch-chemischen Methodik. Leipzig: Deuticke.
- Krüger, Friedrich (1907): Ueber eine eigentümliche Veränderung der Milch durch Natron- resp. Kalilauge. In: *Zeitschrift für physiologische Chemie* 50, S. 293–302. Online verfügbar unter <http://vlp.mpiwg-berlin.mpg.de/library/data/lit18445?>, zuletzt geprüft am 17.08.2020.
- Kuhn, R., Weygand, F. (1937): Die Amadori-Umlagerung. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 70, S. 769–772.
- Kussler, Manfred W.; Ruppertsberg, Klaus (2019): Der Farbstoff aus der Wöhlk-Probe. Eine Schutzgruppe in Position 4 der Glucose reicht, damit sich die alkalische Zuckerlösung mit Ammoniak oder Methylamin verfärbt. In: *Nachr. Chem.* 67 (2), S. 63–65. DOI: 10.1002/nadc.20194083855.
- Landesbildungsserver - Redaktion Biologie (2019): Stärkeverdauung - Experiment. Hg. v. Landesinstitut für Schulentwicklung (LS) des Landes Baden-Württemberg. Stuttgart. Online

- verfügbar unter http://www.schule-bw.de/faecher-und-schularten/mathematisch-naturwissenschaftliche-faecher/biologie/unterrichtsmaterialien/7-10/humanbio/ernaehrung-und-verdauung/verdauung/staerkeverdauung_versuchsanleitung.html, zuletzt geprüft am 22.01.2019.
- Ledl, Franz; Schleicher, Erwin (1990): Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. In: *Angew. Chem.* 102 (6), S. 597–626. DOI: 10.1002/ange.19901020604.
- Lehmann, T. (1997): UV/VIS-Spektroskopie. FU Berlin, Berlin. Institut für Chemie und Biochemie, zuletzt geprüft am 04.11.2019.
- Leibniz-Gemeinschaft (2015): Open-Access-Policy der Leibniz-Gemeinschaft 2016-2020. Berlin. Online verfügbar unter <https://www.leibniz-gemeinschaft.de/forschung/open-science-und-digitalisierung/open-access.html>, zuletzt geprüft am 04.11.2019.
- Lonergan, Mark (o.J.): Freeze-Pump-Thaw Degassing of Liquids. Washington.
- Lühken, Arnim; Bader, Hans Joachim (2001): Hochtemperaturchemie im Haushalts-Mikrowellenofen. In: *CHEMKON* 8 (1), S. 7–14. DOI: 10.1002/ckon.20010080103.
- Madhu, Sheri; Evans, Hayden A.; Doan-Nguyen, Vicky V. T.; Labram, John G.; Wu, Guang; Chabiny, Michael L. et al. (2016): Infinite Polyiodide Chains in the Pyrroloperylene-Iodine Complex. Insights into the Starch-Iodine and Perylene-Iodine Complexes. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (28), S. 8032–8035. DOI: 10.1002/anie.201601585.
- Maillard, L. C. (1912): Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. C. R. Acad. Sci. 1912, 154, 66–68. In: *Compt. Rend. Acad. Sci.* 154, S. 66–68.
- Malfatti, Hans (1905): Über den Nachweis von Milchzucker im Harn. In: *Centralblatt für die Krankheiten der Harn- und Sexualorgane*, S. 68–71. Online verfügbar unter <https://archive.org/stream/centralblattfrd03unkngoog#page/n110/mode/2up>.
- Marchetti, Giovanni (1897): Ueber den praktischen Werth der Umikoff'schen Reaktion und das Wesen derselben. In: *Maly's Jahresbericht*, S. 266–267.
- Markl, J. et al. (Hg.) (2015): Markl Biologie 2. 1. Aufl. Stuttgart: Klett (Markl Biologie).
- Matissek, Reinhard; Baltes, Werner (2016): Lebensmittelchemie. 8., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-47112-8>.

- Matissek, Reinhard; Steiner, Gabriele; Fischer, Markus (2014): Lebensmittelanalytik. 5., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34829-7>.
- Matuschek, C., Jansen, W (1985): Chemieunterricht und Geschichte der Chemie. In: *PdN Chemie in der Schule* 34 (2), S. 3–7.
- Micheel, Fritz; Dijong, Ingolf (1962): Der Mechanismus der Amadori-Umlagerung. In: *Justus Liebigs Ann. Chem.* 658 (1), S. 120–127. DOI: 10.1002/jlac.19626580111.
- Micheel, F., Frowein, A. (1957): Die Amadori-Umlagerung Aliphatischer N-Glykoside. In: *Chem. Berichte* 90, S. 1599–1605. Online verfügbar unter 10.1002/cber.19570900832, zuletzt geprüft am 27.01.2019.
- Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur des Landes Schleswig-Holstein: Fachanforderungen Chemie, Allgemein bildende Schulen Sekundarstufe I, Sekundarstufe II, zuletzt geprüft am 22.04.2020.
- Ministerium für Schule und Berufsbildung des Landes Schleswig-Holstein: Lehrplan für die Sekundarstufe I der weiterführenden allgemeinbildenden Schulen Hauptschule, Realschule, Gymnasium Chemie, zuletzt geprüft am 22.04.2020.
- Molisch, H. (1886): Zwei neue Zuckerreactionen. In: *Monatshefte für Chemie* 7 (1), S. 198–209.
- Montgomery, Edna M.; Hudson, C. S. (1930): Relations between rotatory power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. In: *J. Am. Chem. Soc.* 52 (5), S. 2101–2106. DOI: 10.1021/ja01368a060.
- Mundinger, E. (2013): ABC des Molkereilaboratoriums. Anleitung zur Durchführung der gebräuchlichsten Untersuchungsverfahren für Milch und Milcherzeugnisse. 2. verb. und erw. Aufl.; Softcover reprint of the hardcover 2nd ed. 1957. Berlin: Springer.
- Nickerson, T. A.; Vujicic, I. F.; Lin, A. Y. (1976): Colorimetric Estimation of Lactose and Its Hydrolytic Products. In: *Journal of Dairy Science* 59 (3), S. 386–390. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(76)84217-8.
- Niederländisches Institut für Militärgeschichte (2017): Frederik Hendrik van Leent. Den Haag, 2017. Brief an Klaus Ruppertsberg.
- Nötzold, H., Raddatz, H., Hellwig, A. et al. (2018): Methodensammlung zum Praktikum Lebensmittelchemie, Teil 1. 5. Fachsemester. Erarbeitet von der Professur für Lebensmittelchemie. Dresden.

- Nowopokrowsky, J. (1912): Über die Chlorzinkjod-Reaktion der Zellulose. In: *Botanisches Centralblatt* 28 (1), S. 90–93, zuletzt geprüft am 24.03.2021.
- O'Brien, J. (1997): Reaction chemistry of lactose: nonenzymatic degradation pathways and their significance in dairy products. In: P. F. Fox (Hg.): *Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, water, salts and vitamins*. Second edition. Boston, MA: Springer, S. 155–231.
- Ochei, John; Kolhatkar, Arundhati (2000): *Medical Laboratory Science: Theory And Practice*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing.
- Ohta, M., Iwasaki, M., Kouno, K., Ueda, Y. (1985): Mechanism of the Molisch reaction. In: *Chem. Pharm. Bull.* 33 (7), S. 2862–2865. DOI: 10.1248/cpb.33.2862.
- Österreichische HochschülerInnenschaft (Hg.) (2013): Österreichische Hochschulen im 20. Jahrhundert. "An alle deutschen Hochschulen". Zur Entziehung der Doktorwürde an der „Deutschen Alpen-Universität Innsbruck“, 1938–1945. Österreichische HochschülerInnenschaft. Wien: facultas wuv. Online verfügbar unter https://www.uibk.ac.at/universitaet/profil/geschichte/aberkennungen/files/santer_an-allen-deutschen-hochschulen-facultas.pdf, zuletzt geprüft am 05.04.2019.
- Österreichische Nationalbibliothek (1980): ANNO. Historische österreichische Zeitungen und Zeitschriften. Österreichische Nationalbibliothek. Online verfügbar unter <http://anno.onb.ac.at/cgi-content/anno-plus?aid=ztg&datum=1980&page=151>.
- Parchmann, Ilka; Demuth, Reinhard; Ralle, Bernd (2001): Chemie im Kontext - Begründung und Realisierung eines Lernens in sinnstiftenden Kontexten. In: *PdN Chemie in der Schule* 50, S. 2–7.
- Parchmann, Ilka; Gräsel, Cornelia; Baer, Anja; Nentwig, Peter; Demuth, Reinhard; Ralle, Bernd (2006): "Chemie im Kontext". A symbiotic implementation of a context-based teaching and learning approach. In: *International Journal of Science Education* 28 (9), S. 1041–1062. DOI: 10.1080/09500690600702512.
- Pawlowsky, Verena (2001): Mutter ledig - Vater Staat. Das Gebärd- und Findelhaus in Wien 1784 - 1910. Innsbruck: Studien-Verl. Online verfügbar unter <http://hsozkult.geschichte.hu-berlin.de/rezensionen/NG-2002-049>.
- Pischetsrieder, Monika; Severin, Theodor (1994): Maillard Reaction of Maltose - Isolation of 4-(Glucopyranosyloxy)-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-3(2H)-furanone. In: *J. Agric. Food Chem.* 42 (4), S. 890–892. DOI: 10.1021/jf00040a010.

- Pischetsrieder, Monika; Severin, Theodor (2007): The Maillard Reaction of Disaccharides. In: Theodore Peter Labuza (Hg.): Maillard reactions in chemistry, food and health. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, S. 37–42.
- Proske, Wolfgang; Walter, Frank (2013): Reagenzglasversuche zur Chemie der Kohlenhydrate. Skript zum Vortrag auf der MNU-Tagung Bremerhaven 2013. MNU. Bremerhaven, 19.11.2013.
- RAL (2021): RAL Violettöne (RAL Classic) | RALfarbpalette.de. Online verfügbar unter <https://www.ralfarbpalette.de/ral-classic/violettöne>, zuletzt aktualisiert am 25.02.2021, zuletzt geprüft am 25.02.2021.
- Ramasubbu, Narayanan; Rangunath, Chandran; Mishra, Prasunkumar J. (2003): Probing the Role of a Mobile Loop in Substrate Binding and Enzyme Activity of Human Salivary Amylase. In: *Journal of Molecular Biology* 325 (5), S. 1061–1076. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)01326-8.
- Rauen, H. M. Th; Rauen-Buchka, M. (1975): Physiologische Chemie. Begleittext zum Gegenstandskatalog für die Fächer der Ärztlichen Vorprüfung. Berlin, Heidelberg: Springer (Heidelberger Taschenbücher, 170). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-09354-2>.
- Reynolds, T. M. (1963): Chemistry of Nonenzymic Browning I. The Reaction between Aldoses and Amines. In: E. M. Mrak, George F. Stewart und C. O. Chichester (Hg.): Advances in food research, Bd. 12. New York: Academic Press (Advances in Food Research, v. 12), S. 1–52.
- RiSU-Kommission der KMK (14.06.2019): Richtlinie zur Sicherheit im Unterricht. RiSU, vom 2019, zuletzt geprüft am 26.08.2019.
- Rochat, Renée (1934): Contribution à l'étude d'une des Réactions des alpha-Amino-Acides sur les Glucides. Coloration rouge vif que prend le lait additionné de soude caustique concentrée (Réaction de A. Morel et Cl. Gautier). Dissertation, Univ. Lyon.
- Rubner, Max (1884): Ueber die Einwirkung von Bleiacetat auf Trauben- und Milchzucker. In: *Zeitschrift für Biologie* 20 (2), S. 397–413. Online verfügbar unter https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Über_das_MRI/Publikationen_Max_Rubner/1884_einwirk_bleiacetat_milchz.pdf, zuletzt geprüft am 04.05.2020.
- Ruppersberg, Klaus (2015): Hilfe - ich übernehme eine Chemiesammlung! In: *Chem. Unserer Zeit* 49 (4), S. 279–281. DOI: 10.1002/ciuz.201500704.
- Ruppersberg, Klaus (2016a): Benedict statt Fehling: sicherer, einfacher, haltbarer! In: *Naturwissenschaften im Unterricht: Chemie* 27 (156), S. 49–50.

- Ruppersberg, Klaus (2016b): Dem Milchzucker auf der Spur - eine europäische Detektivgeschichte. In: *PdN Chemie in der Schule* 65 (8), S. 30–33.
- Ruppersberg, Klaus (2016c): Stärkeverdauung durch Speichel: Was kommt eigentlich dabei heraus? In: *MNU Journal* 201 (5), S. 325–328. Online verfügbar unter urn:nbn:de:0111-pedocs-150973, zuletzt geprüft am 09.08.2019.
- Ruppersberg, Klaus (2016d): Wenn Experimente misslingen... Unfälle im Chemieunterricht und deren rechtliche Folgen. In: *Naturwissenschaften im Unterricht - Chemie* 27 (156), S. 47–48, zuletzt geprüft am 15.01.2021.
- Ruppersberg, Klaus (2018a): Die Wöhlk-Reaktion im schulischen Experimentalunterricht. Supplement zu Salmiakgeist und Milchzucker. In: *Nachr. Chem.* (6). Online verfügbar unter 10.1002/nadc.20184070505.
- Ruppersberg, Klaus (2018b): Salmiakgeist und Milchzucker. In: *Nachr. Chem.* 66 (6), S. 625–628. DOI: 10.1002/nadc.20184070505.
- Ruppersberg, Klaus (2020a): Maltose-Schnelltest mit der Mikrowelle. In: *Naturwissenschaften im Unterricht - Chemie* 31 (179), S. 49–50.
- Ruppersberg, Klaus (2020b): So viele Chemikalien in der Sammlung. In: *Nachr. Chem.* 68 (3), S. 16–20. DOI: 10.1002/nadc.20204095908.
- Ruppersberg, Klaus; Blankenburg, Janet (2018): 150 Years Alfred Wöhlk. In: *ChemViews*. DOI: 10.1002/chemv.201800002.
- Ruppersberg, Klaus; Hain, Julia (2016): Wie kann der Lactosegehalt von Milchprodukten im Schulexperiment sichtbar gemacht werden? In: *CHEMKON* 23 (2), S. 90–92. DOI: 10.1002/ckon.201610272.
- Ruppersberg, Klaus; Hain, Julia (2017): Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe. In: *Chemie in unserer Zeit* 51 (2), S. 106–111. DOI: 10.1002/ciuz.201600744.
- Ruppersberg, Klaus; Hain, Julia; Mischnick, Petra (2017a): Auf der Spur der roten Farbe. Ein historischer Lactose-Nachweis wiederentdeckt. In: *CHEMKON* 24 (4), S. 302–308. DOI: 10.1002/ckon.201790012.
- Ruppersberg, Klaus; Hain, Julia; Mischnick, Petra (2017b): Musterlösungen zu den Arbeitsblättern in Chemkon 4/2017. Online verfügbar unter <https://onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1002%2Fckon.201790012&file=ckon201790012-sup-0001-Musterloesungen.pdf>.

- Ruppersberg, Klaus; Herzog, Stefanie; Kussler, Manfred W.; Parchmann, Ilka (2019): How to visualize the different lactose content of dairy products by Fearon's test and Woehlk test in classroom experiments and a new approach to the mechanisms and formulae of the mysterious red dyes. In: *Chemistry Teacher International* 0 (0), S. 1–11. DOI: 10.1515/cti-2019-0008.
- Ruppersberg, Klaus; Klemeyer, Horst (2020): Lactose-Schnelltest: Wie kann man in 60 Sekunden Milchzucker nachweisen? In: *CHEMKON* 27 (4), S. 199–202. DOI: 10.1002/ckon.201900064.
- Ruppersberg, Klaus; Proske, Wolfgang (2019): Spülmaschinentabs - ein Alltagsprodukt im Unterricht. In: *Chem. Unserer Zeit* 53, S. 180–186. DOI: 10.1002/ciuz.201800816.
- Schmid, Alexandra (2009): Bioaktive Substanzen in Fleisch und Fleischprodukten. In: *Fleischwirtschaft* 2009 (7), S. 83–91, zuletzt geprüft am 11.02.2021.
- Schönberg, A., Moubacher, R. (1952): The Strecker Degradation of α -Amino Acids. In: *Chem. Rev.* 50 (2), S. 261–277. Online verfügbar unter <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60156a002>.
- Schulz, Gabriele; Ries, Carolin; Zimmermann, Olaf; Brühem, Theresa; Haack, Barbara; Sandforth, Ruth; Wapler, Friederike (2016): Frauen in Kultur und Medien. Ein Überblick über aktuelle Tendenzen, Entwicklungen und Lösungsvorschläge. Unter Mitarbeit von Monika Grütters und Christian Höppner. 1. Auflage. Berlin: Deutscher Kulturrat.
- Schwedt, Georg (2019): Faszinierende chemische Experimente. Für Entdecker, Gesundheitsbewusste und Genießer.
- Seliwanoff, Th. (1887): Notiz über eine Fruchtzuckerreaction, In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 20, 181–182, DOI: 10.1002/cber.18870200144.
- Severin, Th.; Loidl, A. (1976): Bildung eines Pyridon-Derivates aus Maltose und Lactose. In: *Z Lebensm Unters Forsch* 161 (2), S. 119–124. DOI: 10.1007/BF01112854.
- Shuklov, Ivan A.; Boeck, Gisela (2015): Die Selivanov-Probe auf Fructose. In: *Chemie in unserer Zeit* 49 (2), S. 106–112. DOI: 10.1002/ciuz.201400666.
- Sieber, Nadine (1880): Beiträge zur Kenntnis der Schimmelpilze.
- Sieber, Nadine (1900): Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer physiologische Chemie* 30 (1/2), S. 101–112. Online verfügbar unter DOI: 10.1515/bchm2.1900.30.1-2.101.
- Siegfried GmbH (1962): Das Labor des Arztes. Säckingen.

- Sommer, Katrin; Wambach-Laicher, Judith; Pfeifer, Peter (Hg.) (2018): Konkrete Fachdidaktik Chemie. Grundlagen für das Lernen und Lehren im Chemieunterricht. 1. Auflage, vollständige Neubearbeitung. Seelze: Friedrich Aulis (Unterricht Chemie).
- Sönnichsen, Frank (2018): NMR-Untersuchungen. Kiel, 2018. Persönliche Mitteilung an Klaus Ruppertsberg.
- Souci, Siegfried Walter; Fachmann, Walter; Kraut, Heinrich; Andersen, Gaby (Hg.) (2016): Food composition and nutrition tables. Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie; Deutschland. 8th revised and completed edition - 8., revidierte und ergänzte Auflage - 8e édition, revue et complétée. Stuttgart: MedPharm Scientific Publishers an imprint of Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Spengler, O., Pfannenstiel, A. (1935): Ueber die Oxydation reduzierender Zucker durch Sauerstoff. In: *Ztschr. Wirtschaftsgruppe Zuckerind.* (85), S. 546–552, zuletzt geprüft am 27.05.2019.
- Staatsinstitut für Schulqualität und Bildungsforschung (Hg.) (2016): Empfehlungen für eine zeitgemäße Ausstattung des Chemiebereichs. München, zuletzt geprüft am 15.02.2019.
- Strecker, Adolph (1862): Notiz über eine eigenthümliche Oxydation durch Alloxan. In: *Ann. Chem. Pharm.* 123 (3), S. 363–365. DOI: 10.1002/jlac.18621230312.
- Struckmeier, Sabine (2003): Naturfarbstoffe. Farben mit Geschichte. In: *Chem. Unserer Zeit* 37 (6), S. 402–409. DOI: 10.1002/ciuz.200300275.
- Teichmann, W. (1980): Untersuchungen von Harn und Konkrementen. 2. Aufl. Berlin: Volk und Gesundheit.
- Telegdy Kováts, L.; Öörsi, F.; Rásky, K. (1970): Untersuchungen über die Kinetik der Milchsäurebildung bei Zersetzung von Glucose und Fructose im alkalischen Medium. In: *Nahrung* 14 (1), S. 9–12. DOI: 10.1002/food.19700140103.
- Tollens, B. (1882): Ueber ammon-alkalische Silberlösung als Reagens auf Aldehyd. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (15), S. 1635–1639. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/cber.18820150243>, zuletzt geprüft am 22.02.2019.
- Töpel, Alfred (2016): Chemie und Physik der Milch. 4. Aufl. Hamburg: Behr's Verlag.
- Umikoff, Nersess Sacharewitsch (1896): Zur differentiellen Reaction der Frauen- und Kuhmilch und über die Bestimmung der Lactationsdauer in der Frauenbrust. Aus dem chemischen Laboratorium des kaiserlichen Findelhauses in St. Petersburg. In: *Jahrbuch für Kinderheilkunde, Leipzig*, S. 356–359.

- United States Pharmacopeial Convention (Hg.) (2012): Lactose Monohydrate. o.O. Online verfügbar unter http://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/excipients/e24_current_webpage_stage_6_monograph_14_oct_2011.pdf, zuletzt geprüft am 26.02.2019.
- Universität Wien (2020): Geschichte Online - Erste Schritte im Kurrent-Lesen. Universität Wien. Wien. Online verfügbar unter <https://www.univie.ac.at/gonline/htdocs/upload/File/import/2543.pdf>, zuletzt geprüft am 23.12.2020.
- Universitätsbibliothek Rostock (2020): Krüger, Friedrich Karl von - Catalogus Professorum Rostochiensium. Online verfügbar unter <http://purl.uni-rostock.de/cpr/00003464>, zuletzt aktualisiert am 20.08.2020, zuletzt geprüft am 20.08.2020.
- University of California (1979): In Memoriam Thomas Andrew Nickerson. Davis. Online verfügbar unter http://texts.cdlib.org/view?docId=hb4q2nb2px&chunk.id=div00032&brand=calisphere&doc.view=entire_text.
- van Leent, Frederik Hendrik (1894): Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen. Dissertation. Universität Basel, Den Haag.
- van Nek, R. et al. (Hg.) (2018): Chemie heute. Sekundarstufe II Gesamtband. [Allgemeine Ausgabe, Gesamtschule, Gymnasium], S II, Druck A. Braunschweig: Westermann.
- Verband der Chemischen Industrie e.V. (o.J.): Textilchemie-Versuche. FCI_Textil_Versuche_131206_RZ. VCI. Frankfurt/M. Online verfügbar unter <https://www.vci.de/vci/downloads-vci/textilchemie-versuche.pdf>, zuletzt geprüft am 05.04.2019.
- Weber, Ulrich (Hg.) (2015): Biologie Oberstufe. Gesamtband S II. 3. neubearbeitete Auflage, [Allgemeine Ausgabe]. Berlin: Cornelsen.
- Wenck, Helmut; Brandl, Herbert; Glöckner, Wolfgang; Bader, Hans Joachim (Hg.) (2013): Handbuch der experimentellen Chemie. Sekundarbereich II. Köln: Aulis-Verl.
- Wieland, H., Scheuing, G. (1921): Die Fuchsinschweflige Säure und ihre Farbreaktion mit Aldehyden. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (10), S. 2527–2555, zuletzt geprüft am 22.02.2019.
- Wikipedia: Tropfen. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Tropfen>.
- Wilke, Timm; Bodensiek, Oliver; Ruppertsberg, Klaus (2018): Gold aus Elektronikschrott. In: *Chem. Unserer Zeit* 52 (5), S. 342–349. DOI: 10.1002/ciuz.201800861.

- Wöhlk, Alfred (1904): Über eine neue Reaktion auf Milchzucker (und Maltose). In: *Fresenius J. Anal. Chem.* 43 (11), 670 - 679. DOI: 10.1007/BF01520629.
- Wollrab, Adalbert (2014): Organische Chemie. Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten. 4. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-45144-7>.
- Wrodnigg, T., Stütz, A. (1999): Die Heyns-Umlagerung in neuem Licht: außergewöhnlich einfache Synthese von D-Lactosamin aus Lactulose. In: *Angew. Chem.* 111 (6), S. 854–856. Online verfügbar unter 10.1002/(SICI)1521-3757(19990315)111:6<854::AID-ANGE854>3.0.CO;2-W, zuletzt geprüft am 27.01.2019.
- Zaribnicky, F. (1942): Zur Kenntnis der Frauenmilch. In: *Z. Kinder-Heilk.* 63 (4), S. 543–554. DOI: 10.1007/BF02251184.
- Zervas, Leonidas (1931): Über Benzylidenglucose und ihre Verwendung zu Synthesen: 1-Benzoylglucose. In: *Chem. Ber.* 64, S. 2289–2296, zuletzt geprüft am 11.11.2019.

9 Weitere Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: D-Glucose wird zu D-Glucoson oxidiert	7
Abbildung 2: Zucker und Milchprodukte im 60 °C-Wasserbad mit Benedict-Reagenz.....	10
Abbildung 3: Etikett "Lugolsche Lösung" mit Piktogramm GHS 08.....	13
Abbildung 4: Stärkenachweis mit Iodlösung ($c = 0,025 \text{ mol/L}$)	14
Abbildung 5: Etikett „Iod-Lösung 0,025 mol/L“ ohne Gefahrenpiktogramm	15
Abbildung 6: Entstehung von 5-Hydroxymethylfurfural (oben) bzw. Furfural (unten)	16
Abbildung 7: HMF und α -Naphthol reagieren zu einem violetten Farbstoff (Ohta et al.)	17
Abbildung 8: Umstrittene Reaktion von Fuchsinchwefligsäure und Glucose (vereinfacht)	19
Abbildung 9: Reaktion von Ethylresorcin mit Fructose (nach Shuklov/Boeck 2015)	21
Abbildung 10: Reduktion von Silberionen durch einen Aldehyd	22
Abbildung 11: Vereinfachte Reaktionsgleichung zur Wöhlk-Reaktion mit Lactose	24
Abbildung 12: Nersess S. Umikoff, 1865-1956	33
Abbildung 13: Siber/Ziber-Schreibweisen kyrillisch/Sütterlin.....	35
Abbildung 14: Nadine Sieber alias Nadeschda O. Ziber-Shumova, ca. 1900	35
Abbildung 15: Farbreaktion von Milchzucker mit einem Aminosäuregemisch	36
Abbildung 16: Alfred Wöhlk im Kreise seiner Mitarbeiter in der Triangeln-Apotheke.....	37
Abbildung 17: Faksimile aus Gautier/Morel 1906, S. 376.....	41
Abbildung 18: Friedrich Karl von Krüger, 1862-1938	42
Abbildung 19: Strukturformeln von Ammoniak (links) vs. Methylamin (rechts)	45
Abbildung 20: William R. Fearon (ganz oben rechts) vor dem Trinity-College, Dublin.....	46
Abbildung 21: Thomas A. Nickerson, 1921-1978, Davis (Kalifornien/USA)	49
Abbildung 22: Strukturformel von Glycin (links neutrale, rechts zwitterionische Schreibweise).....	50
Abbildung 23: Pyrrolsynthese aus Ammoniummucate, nach (Gattermann et al. 1982)	55
Abbildung 24: Wöhlk-Probe gemäß obiger Auflistung im Text, Lizenz: Wiley 4927610665851.....	58
Abbildung 25: Strukturformeln von Lactose (links) und Saccharose (rechts) im Vergleich	59
Abbildung 26: Fearon-Test unter Sauerstoffausschluss, nach 10 Min., 16 Std., 30 Std. (siehe Text) ...	61
Abbildung 27: Wöhlk-Probe im wasserfreien Milieu (meth. Ammoniak, Rückflusskühlung)	62
Abbildung 28: UV-Vis-Spektrometer Specord 50 plus (Analytik Jena)	65
Abbildung 29: Temperierbares Wasserbad mit Schlauchpumpe und Stromversorgung.....	66
Abbildung 30: Temperierbarer Küvettenhalter im Innenraum des UV-Vis-Spektrometers	66
Abbildung 31: „Verrauschte“ Werte im UV-Bereich 10 Minuten nach Start mit 8 mg Lactulose.....	69
Abbildung 32: Vis-Messung 8 mg Lactulose (12 Min. nach dem Start der Reaktion)	70
Abbildung 33: Messungen mit 1 mg Benzylidenglucose in 4 mL Fearon-Reagenz, 0-15 min.	71

Abbildung 34: Methylglyoxal (links), 1-Aminopropanon (rechts)	74
Abbildung 35: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich (siehe Tabelle 7)	75
Abbildung 36: pH-Meter PCE-228, Hersteller: PCE-Instruments	76
Abbildung 37: pH-Abhängigkeit: Proben 1 bis 10 (v.l.n.r.) nach der Farbreifung	78
Abbildung 38: pH-Abhängigkeit: Proben n1 bis n10 im Vis-Bereich	78
Abbildung 39: Proben wie in Abb. 38, aber in dreifacher Verdünnung, UV-Vis, 1 mm-Küvette	80
Abbildung 40: Fearon-Test (Methylamin, Lactulose), Zahlengruppe = Uhrzeit	82
Abbildung 41: Reaktion von Ethylamin mit Ethylidenglucose, Max. (Vis.): 541 nm	84
Abbildung 42: Formel von Ethanolamin	85
Abbildung 43: 4,6-O-Ethylidenglucose mit 20 µL Ethanolamin, Max. (Vis.): 530 nm	86
Abbildung 44: Die beiden isomeren Propylamine: n-Propylamin (l.), Isopropylamin (r.)	87
Abbildung 45: 20 µL n-Propylamin und EGlc, UV-Vis, Max. (vis.): 544 nm	88
Abbildung 46: 20 µL Isopropylamin und 4 mg Ethylidenglucose, UV-Vis, klein: Vis-Bereich	89
Abbildung 47: Strukturformel von n-Butylamin	91
Abbildung 48: 20 µL n-Butylamin im zeitlichen Verlauf, Max. (Vis.): Max.: 545 nm	92
Abbildung 49: Strukturformel von iso-Butylamin (1-Amino-2-Methylpropan)	92
Abbildung 50: 20 µL Isobutylamin und 4 mg Lactulose, Max. (Vis.): 547 nm	93
Abbildung 51: Strukturformel von sec. Butylamin (2-Aminobutan)	93
Abbildung 52: 20 µL sec. Butylamin mit 4 mg Lactulose, UV-Vis: Kein roter Farbstoff	94
Abbildung 53: Formel von t-Butylamin (2-Amino-2-methylpropan)	95
Abbildung 54: 20 µL tert. Butylamin und 4 mg Lactulose, klein: Vis-Bereich, kein roter Farbstoff	95
Abbildung 55: Abbildung: Strukturformel von Amylamin (1-Pentylamin)	97
Abbildung 56: Pentylamin-Proben 21-26 v.l.n.r. nach 15 Min. im Wasserbad bei 65 °C	98
Abbildung 57: Proben gemäß Tabelle 10, Vis-Bereich, Maximum: 542 nm	99
Abbildung 58: 1,6-Diaminohexan, auch bekannt als Hexamethylendiamin	100
Abbildung 59: Lysin wird zu Cadaverin decarboxyliert	100
Abbildung 60: Zubereitung einer Fertiglösung von 1,6-Diaminohexan (DAH)	102
Abbildung 61: Reagenzgläser gemäß Tab. 12 mit DAH, 30 Min. Wasserbad	104
Abbildung 62: Messungen der Diaminohexan-Proben 1-12, Max. (Vis.): 550 nm	105
Abbildung 63: 1,6-Diaminohexan und Lactulose in Natronlauge (pH 13) bei Raumtemperatur	106
Abbildung 64: Farbentwicklung DAH/Lul bei Raumtemperatur in 270 Min.	107
Abbildung 65: Skelettformel von Cadaverin (1,5-Diaminopentan)	108
Abbildung 66: Reaktion von 1,5-Diaminopentan mit Lactulose, Max.(Vis.): 546 nm	109
Abbildung 67: Strukturformel von Putrescin (1,4-Diaminobutan)	109
Abbildung 68: Putrescin 4 mg und Ethylidenglucose, kein roter Farbstoff im Vis-Bereich	110

Abbildung 69: Skelettformel von 1,2-Diaminoethan	111
Abbildung 70: 20 µL 1,2-Diaminoethan mit 4 mg Lactulose, kein roter Farbstoff im Vis-Bereich.....	112
Abbildung 71: Strukturformel von Glycin (CH ₂ -Gruppe mittig).....	112
Abbildung 72: Reaktion von Lactulose mit Glycin in Kalilauge bei 65 °C nach 12 Min.	114
Abbildung 73: Strukturformeln von Lysin	115
Abbildung 74: Lysin-Varianten mit Lactulose, 5 min., UV-Vis-Bereich, pH 13	116
Abbildung 75: Mit allen drei Lysin-Varianten entsteht ein roter Farbstoff (10 min., Vis-Bereich)	117
Abbildung 76: Strukturformeln von GABA (links), α-Alanin (mittig), β-Alanin (rechts)	118
Abbildung 77: Vergleich von GABA, α-Alanin und β-Alanin (UV-Vis).....	119
Abbildung 78: Formeln verschiedener 1,4-verknüpfter Disaccharide	128
Abbildung 79: Lactose (links) und ihr Umlagerungsprodukt Lactulose (rechts)	128
Abbildung 80: Wöhlk-Probe mit Zuckerlösungen (ω = 1%).....	130
Abbildung 81: Strukturformel des Trisaccharids Maltotriose	131
Abbildung 82: Farbreaktionen von Maltotriose und Maltose, 5 Min.	132
Abbildung 83: Farbreaktionen von Maltotriose und Maltose, 60 Min.	133
Abbildung 84: Formeln der verwendeten geschützten Glucosen.....	134
Abbildung 85: Verschiedene Zuckerkomponenten bei der Wöhlk-Probe in zeitlicher Sukzession	135
Abbildung 86: 4,6-O-Benzylidenglucose mit Ammoniaklösung (Wöhlk-Probe).....	136
Abbildung 87: Mutarotation - Anomerisierung von Glucose).....	142
Abbildung 88: Beispiel einer Aldose-Ketose-Isomerisierung im Alkalischen	143
Abbildung 89: Formeln von Lactose und Maltose.....	144
Abbildung 90: Umlagerungsprodukte Lactulose und Maltulose.....	144
Abbildung 91: Durch Eliminierung von Wasser entsteht ein Enol (siehe Text).....	145
Abbildung 92: Bildung einer α-Dicarbonyl-Verbindung (hier: 3-Desoxyoson).....	146
Abbildung 93: Methylglyoxal reagiert unter reduktiven Bedingungen zu Aminopropanon.....	147
Abbildung 94: Vereinfachte Darstellung einer Benzilsäure-Umlagerung	147
Abbildung 95: Maillard-Zwischenprodukte Maltol (links) und Furaneol (rechts)	149
Abbildung 96: Amadori-Umlagerung (verkürzte Darstellung)	150
Abbildung 97: Heyns-Umlagerung (verkürzte Darstellung)	150
Abbildung 98: α-Dicarbonylverbindungen, die beim Abbau von Maltose gebildet werden	152
Abbildung 99: Bildung von Furfural aus dem Oson der Maltose	152
Abbildung 100: 2-Acetylpyrrol (li.) und 2-Methyl-3-hydroxypyridinon (re.).....	153
Abbildung 101: Bildung von Pyridiniumbetainen nach Abb. 7 in (Pischetsrieder und Severin 2007) 153	
Abbildung 102: Überlegungen zur Struktur des roten Farbstoffs (aus cti (CC-BY))	155
Abbildung 103: Zum Verständnis der Experimente (l.) sind nur vier Formeln (r.) nötig.....	161

Abbildung 104: Farbentwicklung Diaminohexan/Lactulose (RT) in 270 Minuten	165
Abbildung 105: Wöhlk-Proben im Wasserbad (Beginn).....	172
Abbildung 106: Wöhlk-Proben im Wasserbad (Ende) mit Produktprobensortiment	173
Abbildung 107: Ergebnis der Wöhlk-Proben nach Tab. 19	173
Abbildung 108: Reagenzgläser 1-11 mit Diaminohexan gemäß Tab. 20.....	176
Abbildung 109: Inverter-Mikrowelle, Einstellung 400 W	178
Abbildung 110: Garraum der Inverter-Mikrowelle (Details siehe Text).....	178
Abbildung 111: Gefäße nach 60 Sekunden bei 400 Watt (siehe Text).....	179
Abbildung 112: Standardexperiment Stärkelösung und Speichel.....	181
Abbildung 113: Produktlösung aus der vorigen Abbildung nach 1 h Einwirkzeit	181
Abbildung 114: Wöhlk-Probe als kolorimetrischer Maltose-Nachweis	185
Abbildung 115: Überprüfung der Produktlösung mit GOD-Teststäbchen	185
Abbildung 116: Aus Maltotriose und Wasser entstehen Maltose und Glucose	186
Abbildung 117: Faksimile aus (Umikoff 1896, S. 356).....	190
Abbildung 118: Faksimile aus (Sieber 1900, S. 101).....	191
Abbildung 119: Siber/Ziber-Schreibweisen kyrillisch / Sütterlin.....	192
Abbildung 120: Historische Abbildungen als Zugang für geschichtlich Interessierte	193
Abbildung 121: Faksimile aus (Wöhlk 1904, S. 671)	194
Abbildung 122: Faksimile aus (Fearon 1942, S. 132).....	194
Abbildung 123: Faksimile aus (Malfatti 1905, S. 68)	195
Abbildung 124: Lactose(in)toleranz geografisch aus (Höffeler 2009)	196
Abbildung 125: Lactose-(in-)toleranz - genetisch bedingt aus (Höffeler 2009)	197
Abbildung 126: Strukturisomere: n-Propylamin (links), Isopropylamin (rechts)	198
Abbildung 127: Strukturformel von n-Dodecylamin	234
Abbildung 128: Benzylamin-Proben 1-10 gemäß Tabelle 20, v.l.n.r.	237
Abbildung 129: Auswertung der Benzylamin-Proben 2-10 in der 1 mm-Küvette.....	237
Abbildung 130: Benzylamin, rote Proben 2-7 gemäß Tabelle 20, v.l.n.r.....	237
Abbildung 131: Benzylamin mit verschiedenen Kohlenhydraten	238
Abbildung 132: Anilin-Proben 11-20 gemäß Tabelle 21, v.l.n.r.	239
Abbildung 133: Auswertung der Anilin-Proben 11-20.	239
Abbildung 134: Wie vorige Abbildung, jedoch Proben 12-17 ohne 16 (Emulsion) separat.....	240
Abbildung 135: Aus p-Phenylendiamin und 4,6-O-Ethylidenglucose entsteht kein roter Farbstoff...	241
Abbildung 136: Benzylamin (l.) vs. Phenylhydrazin (r.)	242
Abbildung 137: Phenylhydrazin: Farben nach 5 Min. im Wasserbad bei 65 °C, (Tab. 21)	243
Abbildung 138: Phenylhydrazin-Werte aus den roten Lösungen, 1 mm-Küvette	244

Abbildung 139: Phenylhydrazin-Werte aus den gelben Lösungen, 1 mm-Küvette	245
Abbildung 140: Erwähnung von Taurin in Rochat 1934, S. 46	247
Abbildung 141: Strukturformel von Taurin (2-Aminoethansulfonsäure).....	247
Abbildung 142: Proben 01-10 (v.l.n.r.) gemäß Tabelle 24, nach 20 Min. im Wasserbad bei 65 °C	248
Abbildung 143: Taurin mit Kohlenhydraten gemäß Tabelle 23, Vis-Bereich	249
Abbildung 144: Fearon-Test mit anderweitig geschützten Glucosen (siehe Text)	250

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kohlenhydrat-Nachweise in einer Auswahl von verbreiteten Oberstufen-Lehrbüchern.....	5
Tabelle 2: Farbergebnisse bei Nachweisen nach Wöhlk und Fehling	23
Tabelle 3: Kohlenhydrat-Nachweise und Anforderungen an Experimente	28
Tabelle 4: Varianten der Wöhlk-Probe von 1904 bis 1980	40
Tabelle 5: Varianten des Fearon-Tests von 1942 bis 2000.....	48
Tabelle 6: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich	73
Tabelle 7: Wöhlk-Probe und Fearon-Test im Vergleich, Wasserbad, 70 °C	75
Tabelle 8: pH-Abhängigkeit der Farbausreifung beim Fearon-Test	77
Tabelle 9: Hypothesen zur Farbbildung der vier isomeren Butylamine.....	90
Tabelle 10: 1-Pentylamin (10 µL) mit diversen Zuckern in Natronlauge (c=0,1 mol/L)	98
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten primären Diamine.....	101
Tabelle 12: Reaktionen diverser Kohlenhydrate mit 1,6-Diaminohexan	103
Tabelle 13: Farbbildung verschiedener Lysin-Varianten	115
Tabelle 14: Reaktion von Lact(ul)ose mit verschiedenen stickstoffhaltigen Verbindungen	120
Tabelle 15: Farbreaktionen verschiedener Zucker mit Ammoniaklösung (Wöhlk 1904, S. 675)	125
Tabelle 16: Vergleich der Maltotriose- und Maltose-Reaktion mit Methylamin	131
Tabelle 17: Vis-Maxima (nm) der roten Farbstoffe je nach Testmethodet.....	138
Tabelle 18: Ersatzstoffprüfungen (aus (Ruppersberg und Klemeyer 2020), Liz. 4927610889805).....	164
Tabelle 19: Auswertung der Wöhlk-Proben aus Abb. 107	174
Tabelle 20 : Kohlenhydratnachweis mit 1,6-Diaminohexan	175
Tabelle 21: Jeweils 10 µL Benzylamin und Anilin zum Test der „Spacer-Theorie“	236
Tabelle 22: Phenylhydrazin mit diversen Zuckerkomponenten.....	243
Tabelle 23: Formeln und farbliche Ergebnisse der verwendeten Aromaten	246
Tabelle 24: Taurin (16 mg) mit diversen Zuckern in Natronlauge (c = 0,1 mol/L).....	248

9.3 Verzeichnis der Experimente

Experiment 1: Wöhlk-Probe mit verschiedenen Milchprodukten und Zuckern	57
Experiment 2: Ist für die Entstehung der roten Farbe Luftsauerstoff nötig?	60
Experiment 3: Findet die Wöhlk-Probe auch unter Wasserausschluss statt?	62
Experiment 4: Wie verläuft die Farbreifung im Zeitabschnitt von 10 Minuten?	68
Experiment 5: Sind Wöhlk-Probe und Fearon-Test dieselbe Reaktion?	74
Experiment 6: Welchen Einfluss hat der pH-Wert auf die Farbstoffbildung?	77
Experiment 7: Wie verhält sich Methylamin im Zeitrahmen von 20 Minuten?	81
Experiment 8: Wie reagiert Ethylamin?	83
Experiment 9: Wie reagiert Ethanolamin?	85
Experiment 10: Wie verhält sich n-Propylamin?	87
Experiment 11: Verhält sich Isopropylamin genauso wie n-Propylamin?	89
Experiment 12: Verhält sich n-Butylamin genauso wie n-Propylamin?	91
Experiment 13: Verhält sich Isobutylamin genauso wie n-Butylamin?	92
Experiment 14: Verhält sich sec. Butylamin wie n-Butylamin oder wie Isopropylamin?	93
Experiment 15: Verhält sich t-Butylamin genauso wie sec. Butylamin?	95
Experiment 16: Reagiert 1-Aminopentan wie 1-Aminobutan?	97
Experiment 17: Was passiert, wenn 1,6-Diaminohexan als Amin eingesetzt wird?	103
Experiment 18: Wie verläuft die Farbentwicklung mit DAH bei Raumtemperatur?	106
Experiment 19: Reagiert 1,5-Diaminopentan wie 1,6-Diaminohexan?	108
Experiment 20: Wie verhält sich 1,4-Diaminobutan?	109
Experiment 21: Wie verhält sich 1,2-Diaminoethan?	111
Experiment 22: Bildet auch Lysin einen roten Farbstoff?	115
Experiment 23: Wie reagieren GABA, α - und β -Alanin?	118
Experiment 24: Wie reagieren Lactose, Lactulose, Maltose und Cellobiose in der Wöhlk-Probe?	129
Experiment 25: Wie reagiert Maltotriose mit Fearon's Reagenz?	131
Experiment 26: Wie reagieren geschützte Glucosen im Wöhlk- und Fearon-Test?	134
Experiment 27: Bildet Benzylamin einen roten Farbstoff?	235
Experiment 28: Bildet Anilin einen roten Farbstoff?	238
Experiment 29: Bildet p-Phenylendiamin einen roten Farbstoff?	240
Experiment 30: Bildet Phenylhydrazin einen roten Farbstoff?	242
Experiment 31: Bildet Taurin einen roten Farbstoff?	247

9.4 Chemikalienverzeichnis

Zur besseren Übersicht wurden die Chemikalien wie folgt aufgegliedert:

9.4.1 Ammoniak und Derivate (Amino-Komponenten)

1,2-Diaminoethan (Ethylendiamin)

1,4-Diaminobutan (Putrescin)

1,5-Diaminopentan (Cadaverin)

1,6-Diaminohexan (Hexamethylendiamin)

Ammoniaklösung, 10%

Ammoniaklösung, 25%

Ammoniaklösung, methanolisch, wasserfrei

Ammoniumchlorid

Amylamin (1-Pentylamin)

Benzylamin

Ethanolamin (2-Aminoethanol)

Ethylamin-Hydrochlorid (Ethylammoniumchlorid)

Glycin (2-Aminoethansäure)

Hydrazin

Isobutylamin (1-Amino-2-methylpropan)

Isopropylamin (2-Aminopropan)

Lysin (2,6-Diaminohexansäure)

Methylamin-Hydrochlorid (Methylammoniumchlorid)

n-Butylamin (1-Aminobutan)

n-Dodecyl-1-amin

n-Propylamin (1-Aminopropan)

Ornithin (2,5-Diaminopentansäure, Abbauprodukt von Arginin)

Phenylhydrazin

p-Phenylendiamin (1,4-Diaminobenzol)

sec. Butylamin (2-Aminobutan)

Taurin (2-Aminoethansulfonsäure)

tert. Butylamin (2-Amino-2-methylpropan)

α -Alanin (2-Aminopropansäure), meist nur Alanin genannt

β -Alanin (3-Aminopropansäure)

γ -Aminobuttersäure (4-Aminobutansäure, GABA)

9.4.2 Kohlenhydrate und deren Derivate

1,2,3,4,6-Penta-O-Acetyl-D-Glucopyranose

2-Desoxyglucose

4,6-O-Benzyliden-D-Glucopyranose

4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose

Amylose (Stärke)

Arabinose (eine von vier Aldopentosen)

Cellobiose (4-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose)

Cellulose

Fructose (D-Fructofuranose)

Galactarsäure (Schleimsäure; Oxidationsprodukt von Galactose)

Galactose (D-Galactopyranose)

Glucose (D-Glucopyranose)

Lactose (Milchzucker), β -D-galactopyranosyl-(1,4)-D-Glucopyranose

Lactulose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose)

Maltol (Maillard-Produkt)

Maltose (Malzzucker, 4-O-(α -D-Glucopyranosyl)-D-Glucopyranose)

Maltotriose (O- α -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose)

Maltulose (4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructofuranose, Umlagerungsprodukt der Maltose)

Melibiose (D-Galacto-pyranosyl- α -(1,6)-D-glucopyranose)

Methylglyoxal (2-Keto-Propanal, Pyruvaldehyd; Fragment beim Zuckerabbau)

Palatinose (Disaccharid, 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose)

Rhamnose (Desoxyzucker, 6-Desoxymannose)

Ribose (eine von vier Aldopentosen)

Saccharose (engl. Sucrose, α -D-Glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranosid)

Sorbose (eine von vier Ketohexosen, Isomer von Fructose)

Xylose (eine von vier Aldopentosen)

9.4.3 Sonstige Chemikalien

Demin. Wasser

Ethanol

Kalilauge, $c = 1 \text{ mol/L}$

Kaliumhydroxid (Plätzchen)

Methanolische Ammoniaklösung

Natriumcarbonat

Natriumhydroxid (Plätzchen und Rotulis)

Natriumsulfit

Natronlauge, $c = 4 \text{ mol/L}$

Natronlauge, $c = 2,5 \text{ mol/L}$

Natronlauge, $c = 1 \text{ mol/L}$

Natronlauge, $c = 0,1 \text{ mol/L}$

Salzsäure, $c = 1 \text{ mol/L}$

Salzsäure, $c = 0,1 \text{ mol/L}$

10 Publikationen aus und zu dieser Arbeit

Zur Vermeidung des Vorwurfes „Autoplagiat“ wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass Teile dieser Arbeit bereits vom Autor, teilweise in unterschiedlichen Autor-Koautor-Kombinationen, publiziert sind.

Um die Übersichtlichkeit und den Lesefluss zu verbessern, wurden die Texte aus den Publikationen nicht wörtlich übernommen, sondern an Grammatik und Sinnzusammenhang bzw. ggf. an neue Erkenntnisse angepasst.

10.1 Zeitschriftenpublikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht und daher nur zitiert, wenn es zum Textverständnis nötig war. Sie sind im Literaturverzeichnis alphabetisch aufgeführt.

Eine *kursiv geschriebene Nummer* am Ende eines Eintrags ist ein Hinweis auf die jeweilige Lizenz, mit der „reproduction or reuse“ von Materialien vereinbart wurde, die bereits veröffentlicht wurden und dem Copyright eines Verlages unterliegen.

Das Symbol  bedeutet, dass der Artikel kostenfrei für jedermann zugänglich ist (Open-Access-Policy der Leibniz-Gemeinschaft (Leibniz-Gemeinschaft 2015)).

Ruppersberg, K., Hain, J. (2016), Das Experiment: Wie kann der Lactosegehalt von Milchprodukten im Schulexperiment sichtbar gemacht werden? Chemkon 23 (2) 90-92, DOI: 10.1002/ckon.201610272, URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-145962  (Ruppersberg und Hain 2016), 4927610665851

Ruppersberg, K. (2016), Stärkeverdauung durch Speichel - was kommt eigentlich dabei heraus? Ein einfacher Maltose-Nachweise am Ende der enzymatischen Hydrolyse von Amylose und die überraschende Anwesenheit von Glucose, MNU-Journal 69 (5) S. 325-328, URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-150973  (Ruppersberg 2016c)

Ruppersberg, K. (2016), Dem Milchzucker auf der Spur – eine europäische Detektivgeschichte. Praxis der Naturwissenschaften - Chemie in der Schule, 65 (8) 30 – 33, URN: urn:nbn:de:0111-pedocs-150938  (Ruppersberg 2016b)

Ruppersberg, K., Hain, J. (2017), Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe. Der geheimnisvolle lachsrote Farbstoff. Chemie in unserer Zeit, 51 (2) 106-111. DOI: 10.1002/ciuz.201600744 (Ruppersberg und Hain 2017), 4927150882529

- Ruppersberg, K., Hain, J., Mischnick, P. (2017), Auf der Spur der roten Farbe: Ein historischer Lactose-Nachweis wiederentdeckt. Chemkon 24 (4) 302-324. DOI: 10.1002/ckon.201790012  (Ruppersberg et al. 2017a), 4926580682681
- Ruppersberg, K., Hain, J., Mischnick, P. (2017), Auf der Spur der roten Farbe: Ein historischer Lactose-Nachweis wiederentdeckt. Online-Supplement zu Chemkon 24 (4), DOI: 10.1002/ckon.201790012  (Ruppersberg et al. 2017b)
- Ruppersberg, K., Blankenburg, J. (2018). 150 Years Alfred Wöhlk. Chemistry Views. DOI: 10.1002/chemv.201800002  (Ruppersberg und Blankenburg 2018)
- Ruppersberg, K. (2018), Salmiakgeist und Milchzucker, Nachrichten aus der Chemie 66 (6) 625-628, DOI: 10.1002/nadc.20184070505 (Ruppersberg 2018b),
- Ruppersberg, K. (2018), Die Wöhlk-Reaktion im schulischen Experimentalunterricht, Online-Supplement bei Nachrichten aus der Chemie zu DOI 10.1002/nadc.20184070505  (Ruppersberg 2018a)
- Kussler, M., Ruppersberg, K. (2019), Der Farbstoff aus der Wöhlk-Probe - Eine Schutzgruppe in Position 4 der Glucose reicht aus, damit Wöhlk- oder Fearon-Test erfolgreich verlaufen, Nachr. Chem., 67 (2) 63-65, DOI: 10.1002/nadc.20194083855 (Kussler und Ruppersberg 2019)
- Ruppersberg, K., Herzog, S., Kussler, M., & Parchmann, I. (2019), How to visualize the different lactose content of dairy products by Fearon's test and Woehlk test in classroom experiments and a new approach to the mechanisms and formulae of the mysterious red dyes, Chemistry Teacher International, DOI: 10.1515/cti-2019-0008  (Ruppersberg et al. 2019), CC BY
- Ruppersberg, K., Klemeyer, H. (2020), Lactose-Schnelltest: Wie kann man in 60 Sekunden Milchzucker nachweisen, Chemkon 27 (4) 199-202, DOI 10.1002/ckon.201900064 (Ruppersberg und Klemeyer 2020), 4927610889805 
- Ruppersberg, K. (2020), Maltose-Schnelltest mit der Mikrowelle, Naturwissenschaften im Unterricht - Chemie, 31(179), 49-50

10.2 Poster

Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe oder: Wie man auf einfache und anschauliche Weise den Lactosegehalt von Milchprodukten zeigen kann (Poster), 107. MNU-Bundeskongress, Leipzig, 20.-24. März 2016

Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe aus dem Jahr 1904 zum Lactosenachweis im Chemieunterricht, Klaus Ruppertsberg (Poster), 33. Fortbildungs- und Vortragstagung der Fachgruppe Chemieunterricht, Hannover, Deutschland, 15.-17. September 2016

Wie kann man im Chemieunterricht den Lactosegehalt von Milchprodukten sichtbar machen? (Poster), 108. MNU-Bundeskongress, Aachen, 6.-10. April 2017

Neue Erkenntnisse zur Wöhlk-Probe – Eine „Nachweisreaktion für Lactose (und Maltose)“ in neuem Licht, Klaus Ruppertsberg, Petra Mischnick (Poster), 34. Fortbildungs- und Vortragstagung der Fachgruppe Chemieunterricht, Berlin, Deutschland, 10.-14. September 2017

Sind Wöhlkprobe (1904) und Fearon's Test (1942) frühe Maillard-Reaktionen? Klaus Ruppertsberg (Poster), 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, 17.-19. September 2018

Neue Erkenntnisse zur Entstehung der roten Farbstoffe von Wöhlk-Probe und Fearon's Test, Klaus Ruppertsberg, Manfred W. Kussler (Poster), 36. Fortbildungs- und Vortragstagung der Fachgruppe Chemieunterricht, Aachen, Deutschland, 14. - 18. September 2019

10.3 Vorträge

Experimentalvortrag: Wie kann man mit einfachen Mitteln zeigen, wieviel Lactose in unseren Milchprodukten ist? Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe für den Chemieunterricht, Klaus Ruppertsberg (Vortrag (eingeladen)), 62. MNU-Tagung, Bremerhaven, 16.-17. November 2015

Experimentalvortrag: Dem Milchzucker auf der Spur - eine europäische Detektivgeschichte: Experimentalvortrag im Rahmen der Kieler Europawoche, Klaus Ruppertsberg (Vortrag), Europa-Woche Kiel, 02. Juni 2016

Experimentalvortrag: Ein einfacher Maltose- und Glucose-Nachweis am Ende der enzymatischen Hydrolyse von Stärke im Chemieunterricht, Klaus Ruppertsberg (Vortrag (eingeladen)), 33. Fortbildungs- und Vortragstagung der Fachgruppe Chemieunterricht, Hannover, 15.-17. September 2016

Experimentalvortrag: Stärkeverdauung durch Speichel mit Maltose- und Glucosenachweis, Klaus Ruppertsberg (Vortrag (eingeladen)), 63. Bremerhavener MNU-Tagung 2016, 14.-15. November 2016

Experimentalvortrag: Neues von der Wöhlk-Probe – ein über 100 Jahre altes Experiment im neuen Licht, Klaus Ruppertsberg (Vortrag (eingeladen)), 64. Bremerhavener MNU-Tagung 2017, 20.-21. November 2017

Experimentalvortrag: Wie kann man den sehr unterschiedlichen Lactosegehalt von Milchprodukten im Experimentalunterricht auf einfache Weise sichtbar machen? Klaus Ruppertsberg (Vortrag, eingeladen), 109. MNU-Bundeskongress, München-Garching, 26. März 2018

Workshop mit Impulsvortrag: Neues zur (Schul-) Chemie der Kohlenhydrate, Europa Universität Flensburg in Zusammenarbeit mit dem IQSH (Formix-Fortbildung CHE 0131), Flensburg, 06. März 2019

Experimentalvortrag: Neues von der Wöhlk-Probe – wie heißt der rote Farbstoff? Klaus Ruppertsberg (Vortrag, eingeladen), 110. MNU-Bundeskongress, Hannover, 21.-24. März 2019

Experimentalvortrag: Neue Experimente zur (Schul-) Chemie der Kohlenhydrate und deren Gefährdungsbeurteilung mit DeGINTU, Herbsttagung Kiel, 05. September 2019

Online-Vortrag: Lactose-Schnelltest mit dem neuen Diaminohexan-Verfahren – Eine verbesserte Wöhlk-Probe in nur 60 Sekunden und ohne Ammoniak! Klaus Ruppertsberg und Horst Klemeyer (Vortrag, eingeladen), MNU-Bundeskongress 2021, Berlin, 05. März 2021

11 Anhang

Abschnitte, die den Lesefluss bremsen oder langweilig werden könnten, dennoch aber für detailinteressierte Leser wichtig sein könnten, wurden aus den Hauptkapiteln herausgenommen und hier eingestellt.

11.1 Reaktionen mit weiteren Aminen

Außer den in Kapitel 4.2 untersuchten Aminen wurden im Laufe dieser Arbeit noch weitere Amine getestet, um durch deren Reaktionsverhalten weitere Kenntnisse zum Verlauf der Farbstoffbildung zu erhalten. Diese führten zwar nicht zum erwarteten Ziel, sind aber dennoch für die weitere Forschung über die Wöhlk-Probe und den Fearon-Test wichtig. Zur Erhaltung des Leseflusses in 4.2 wird über folgende Experimente hier im Anhang berichtet.

11.1.1 Reaktion von n-Dodecylamin mit Lactulose

Schon seit 1904 ist bekannt, dass sich der rote Farbstoff „nicht mittels neutraler Lösungsmittel (Äther, Benzol und so weiter) ausschütteln lässt“ (Wöhlk 1904). Daher ergab sich die Idee, nach Propyl- und Butylamin nun ein wesentlich lipophileres Amin zu testen, damit das farbige Endprodukt mit einem entsprechenden Lösungsmittel ausgeschüttelt werden kann. Leider ergab sich nur eine trübe orange-braune Lösung, aus der sich mit Dichlormethan und Heptan nichts ausschütteln ließ; daher konnte auch keine Messung stattfinden.

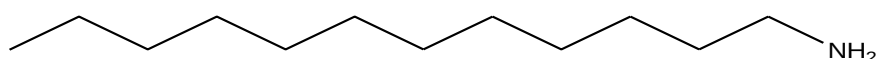


Abbildung 127: Strukturformel von n-Dodecylamin

Der Grund für das Ausbleiben der Farbstoffbildung könnte sein, dass Dodecylamin zu lipophil ist und in wässrigen Lösungen Mizellen aufbaut oder Kolloide entstehen, die die Entstehung eines Farbstoffmoleküls verhindern.

Im Grunde müsste nun eine Überprüfung mit weiteren Aminen (ab Aminopentan, insbesondere neo-Pentylamin, aufwärts bis Undecylamin) durchgeführt werden, die den genauen Grenzverlauf aufzeigt – dies würde aber den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

11.1.2 Reaktionsverhalten aromatischer Amine

Aromatische Systeme besitzen einen elektronenschiebenden Effekt (+I-Effekt). Es ist daher zu vermuten, dass rote Farbstoff entstehen, deren Vis-Maximum gegenüber dem mit Methylamin entstehenden Farbstoff rotverschoben ist, also größer als 541 nm ist.

Weiterhin ist zu vermuten, dass die Spacer-Regel auch für aromatische Amine gilt.

Im Folgenden werden Anilin, Benzylamin, p-Phenylendiamin und Phenylhydrazin untersucht (Strukturformeln siehe Tabelle 23).

11.1.2.1 Reaktionen von Benzylamin und Anilin („Spacer-Theorie“)

Benzylamin besitzt eine Spacergruppe, Anilin nicht (Strukturformeln siehe Tabelle 23). Aus diesem Grund wird erwartet, dass Benzylamin einen roten Farbstoff bildet, aufgrund des aromatischen, elektronenschiebenden Systems wahrscheinlich rotverschoben im Vergleich zu Methylamin (also > 540 nm); für Anilin hingegen wird keine Farbstoffbildung erwartet, weil die Spacergruppe fehlt.

Experiment 27: Bildet Benzylamin einen roten Farbstoff?

Berechnung: Mit einer Mikroliterpipette der Firma Roth werden für jedes Reagenzglas gemäß Tabelle 20 jeweils 10 µL abgemessen.

Benzylamin (Strukturformel siehe Tab. 23) hat eine Dichte von 0,981 g/mL und eine Molmasse von 107,15 g/mol.

10 µL in 2 mL entsprechen 5 mL auf 1 L, d.h. 4,9 g/L, d.h. 0,046 mol/L.

Anilin hat eine Dichte von 1,02 g/mL und eine Molmasse von 93,13 g/mol.

10 µL in 2 mL entsprechen 5 mL auf 1 L, d.h. 5,1 g/L, d.h. 0,056 mol/L.

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge (c = 0,1 mol/L), demin. Wasser, Benzylamin, Zucker gemäß Tabelle 21, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg bzw. 4 mg der Kohlenhydrate gemäß Tabelle 13 in einem Reagenzglas gelöst, 10 µL Benzylamin hinzugegeben (Abzug,

Schutzhandschuhe!) und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut vermischt hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben, nach guter Farbentwicklung herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Es bilden sich rote Farbstoffe, deren Maxima bei 551 nm liegen, sie sind damit im Vergleich zu Methylamin um ca. 10 nm rotverschoben.

Tabelle 21: Jeweils 10 µL Benzylamin und Anilin zum Test der „Spacer-Theorie“						
Zuckerkomponente	Nr.	Benzylamin	Farbeindruck	Nr.	Anilin	Farbeindruck
Keine (Blindprobe)	1	10 µL	farblos	11	10 µL	farblos
Lac, 8 mg	2	10 µL	kirschrot	12	10 µL	gelb
Lul 8 mg	3	10 µL	kirschrot	13	10 µL	gelb
Mal, 8 mg	4	10 µL	kirschrot	14	10 µL	gelb
Cel, 8 mg	5	10 µL	kirschrot	15	10 µL	gelb
BGlc, 4 mg	6	10 µL	Kirschrot, Emulsion	16	10 µL	Orange, Emulsion
EGlc, 4 mg	7	10 µL	kirschrot	17	10 µL	dunkelgelb
Glc, 4 mg	8	10 µL	farblos	18	10 µL	farblos
Fru, 4 mg	9	10 µL	Farblos	19	10 µL	farblos
Gal, 4 mg	10	10 µL	Farblos	20	10 µL	farblos

Benzylamin reagiert in den Proben 2-7 (Abb. 128-131) zu ausgeprägten kirschroten Farbstoffen, die so intensiv waren, dass die Messungen mit der 1 mm-Küvette durchgeführt werden mussten.

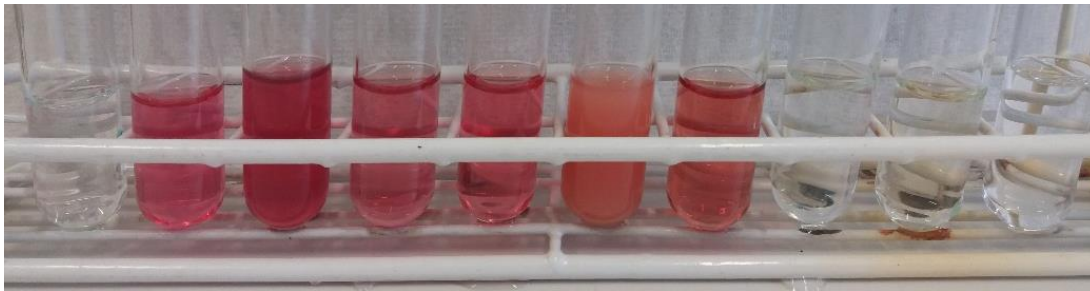


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 128: Benzylamin-Proben 1-10 gemäß Tabelle 20, v.l.n.r.

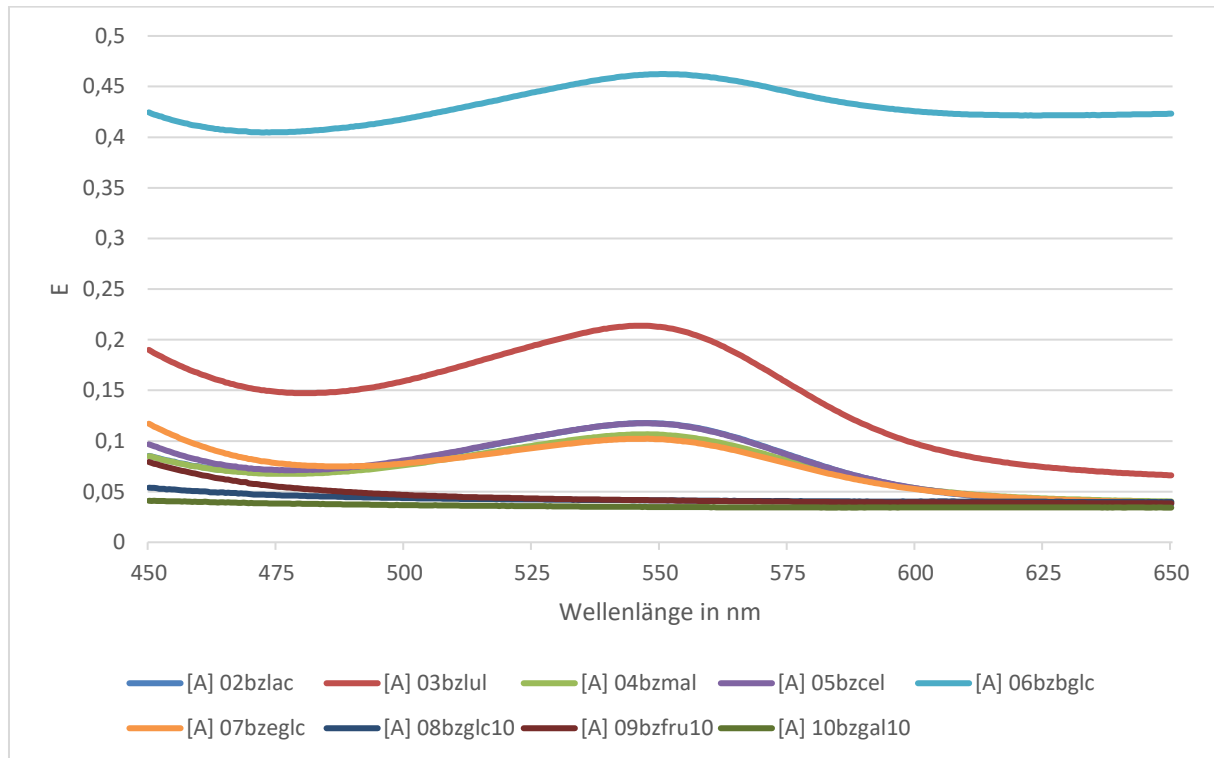


Abbildung 129: Auswertung der Benzylamin-Proben 2-10 in der 1 mm-Küvette.

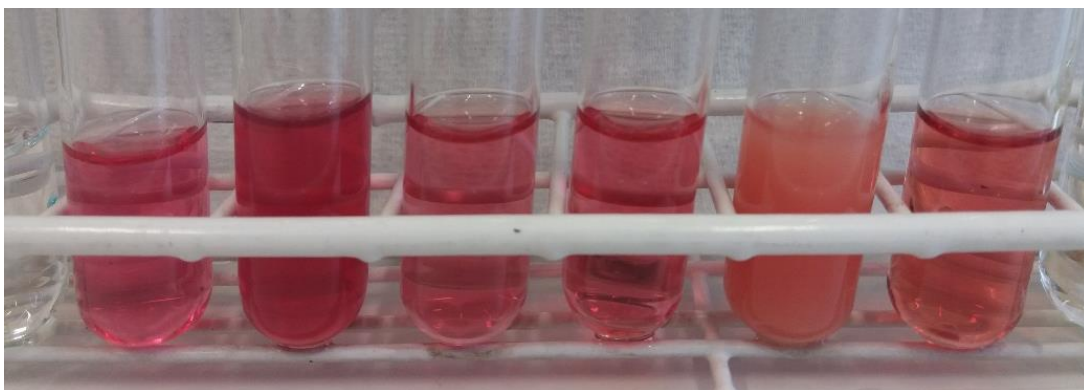


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 130: Benzylamin, rote Proben 2-7 gemäß Tabelle 20, v.l.n.r.

Probe 6 ist 4,6-O-Benzylidenglucose mit Benzylamin, hier ergab sich eine Emulsion, die nicht vermessen werden konnte.

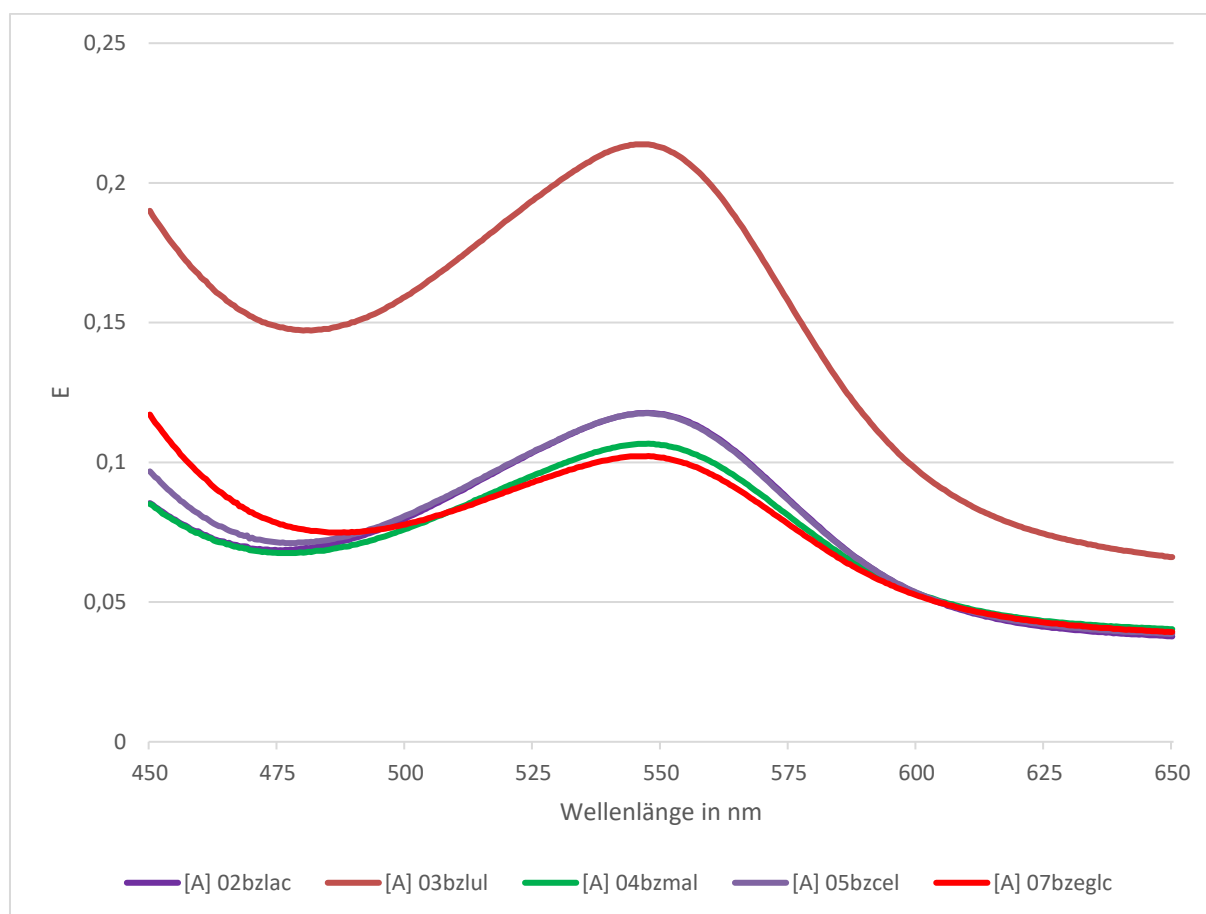


Abbildung 131: Benzylamin mit verschiedenen Kohlenhydraten

Experiment 28: Bildet Anilin einen roten Farbstoff?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, Anilin (Strukturformel siehe Tab. 22), Zucker gemäß Tabelle 21, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg bzw. 4 mg der Kohlenhydrate gemäß Tabelle 21 in einem Reagenzglas gelöst, jeweils 10 µL Anilin hinzugegeben (Abzug, Schutzhandschuhe!) und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut

vermischt hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben, nach guter Farbentwicklung herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Es ergibt sich *kein* roter Farbstoff. Dies war erwartet worden, da Anilin im Gegensatz zu Benzylamin keine CH_2 -Spacergruppe besitzt.

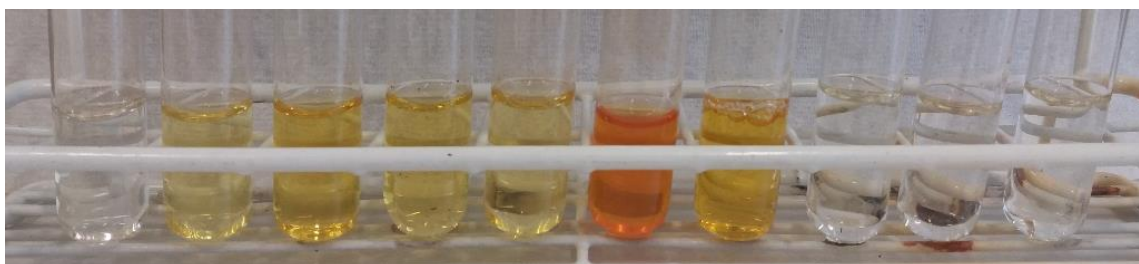


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 132: Anilin-Proben 11-20 gemäß Tabelle 21, v.l.n.r.

Probe 16 ist 4,6-O-Benzylidenglucose mit Anilin, hier ergab sich eine Emulsion.

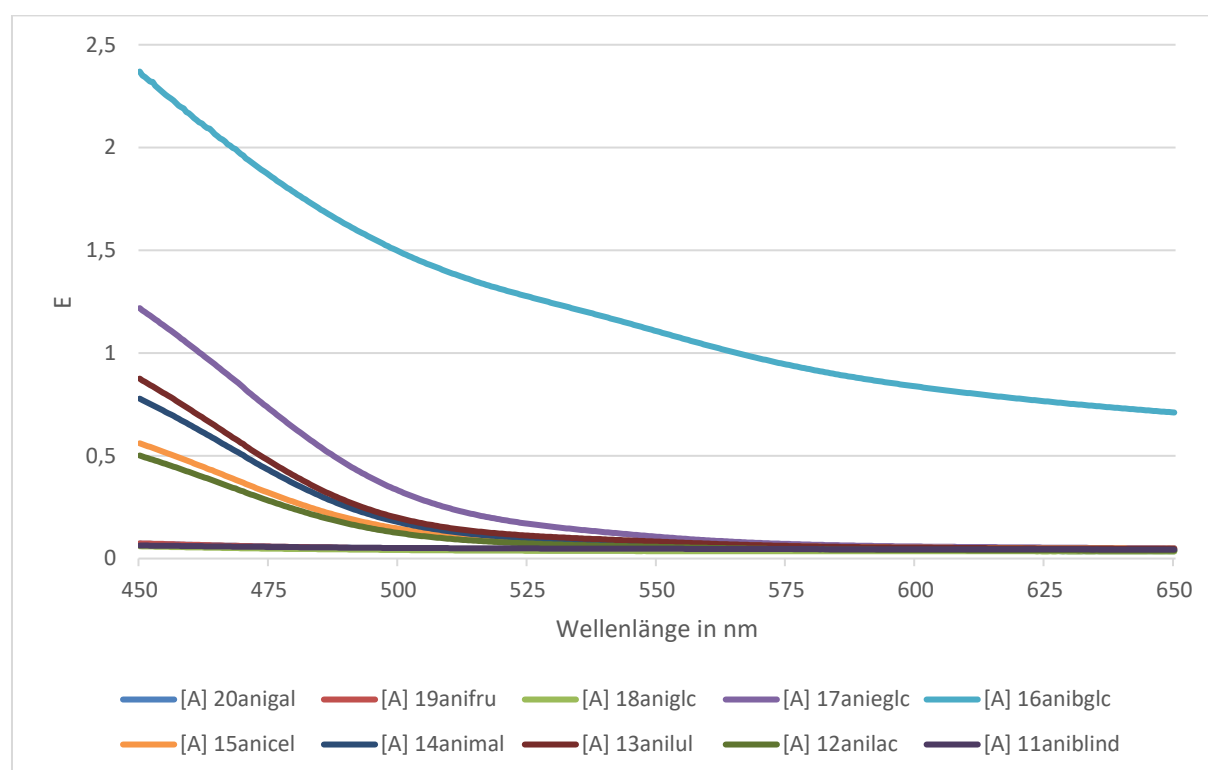


Abbildung 133: Auswertung der Anilin-Proben 11-20.

Alle Proben aus Abbildung 132 konnten in der normalen 10 mm-Küvette vermessen werden.

Probe 16 war eine Emulsion (Abspaltung von Benzaldehyd aus 4,6-O-Benzylidenglucose).

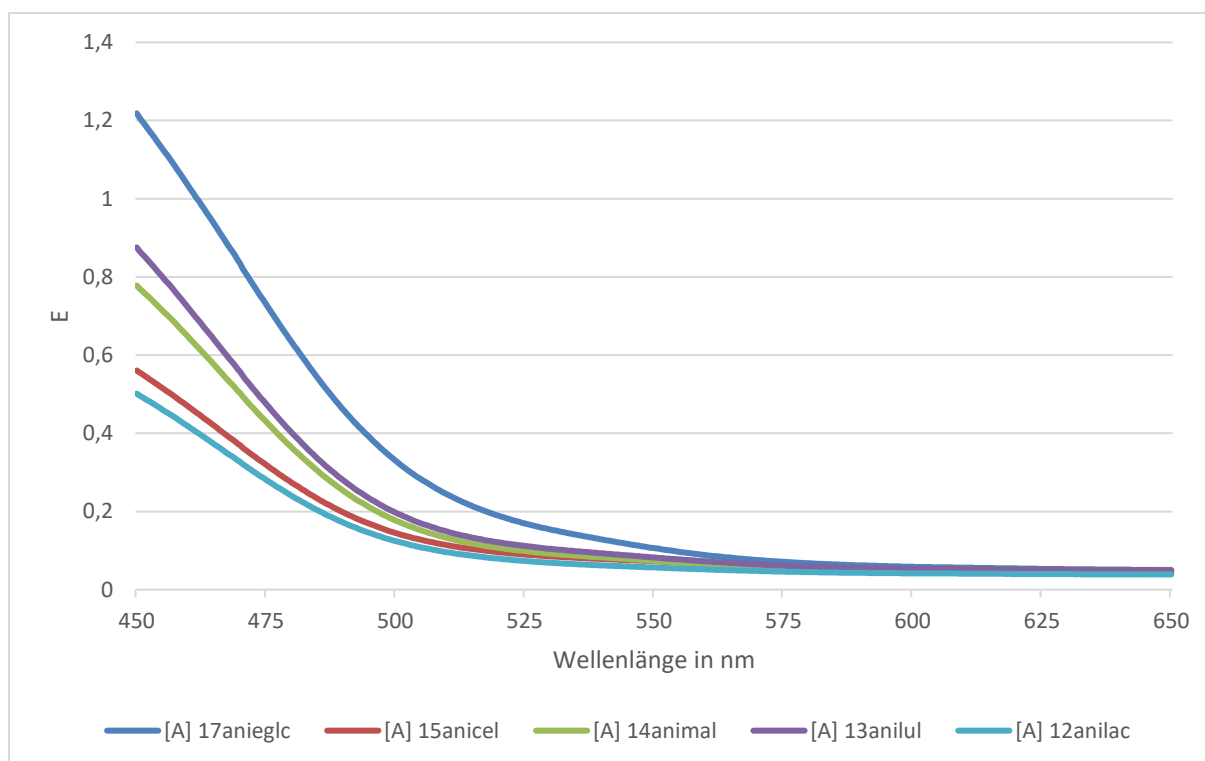


Abbildung 134: Wie vorige Abbildung, jedoch Proben 12-17 ohne 16 (Emulsion) separat

Ergebnis: Die Experimente bestätigen die „Spacer-Theorie“: Anilin und Benzylamin unterscheiden sich nur durch eine CH_2 -Gruppe. Diese entscheidet über die Bildung der roten Farbe.

11.1.2.2 Reaktion von p-Phenylendiamin (1,4-Diaminobenzol)

Da sich p-Phenylendiamin (Formel siehe Tabelle 23) schlecht löst, wurden 4 mg vorab in 2 mL Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) gegeben und im Wasserbad erwärmt. Dabei ergab sich schon vor der Zugabe zu 4,6-O-Ethylidenglucose von vornherein ein bräunlicher Eindruck der Lösung. Aufgrund der ausgeprägten Aromatenabsorption beginnen die Messungen bei 350 nm.

Experiment 29: Bildet p-Phenylendiamin einen roten Farbstoff?

Hypothese: Da die „Spacergruppe“ fehlt, wird kein roter Farbstoff erwartet.

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, heizbarer Küvettenhalter, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), zwei Bechergläser 500 mL, Schläuche, Schlauchpumpe, Transformator (6 Volt), Stromkabel, Quarzküvette 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Wischtücher.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), demin. Wasser, 4 mg p-Phenylendiamin (Strukturformel siehe Tab. 22), 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird die Apparatur gemäß Beschreibung in Abb. 30 ff. in Gang gesetzt und aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65°C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden 4 mg 4,6-O-Ethylidenglucose, Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und 4 mg Ethylamin-Hydrochlorid in einem Reagenzglas zusammengegeben und solange vorsichtig geschüttelt, bis alles gelöst ist. Die Lösung wird in eine 10 mm-Küvette gegeben; diese wird in den heizbaren Küvettenhalter eingesetzt. Im Abstand von ca. 1 Minute werden fortlaufend Messungen durchgeführt und abgespeichert.

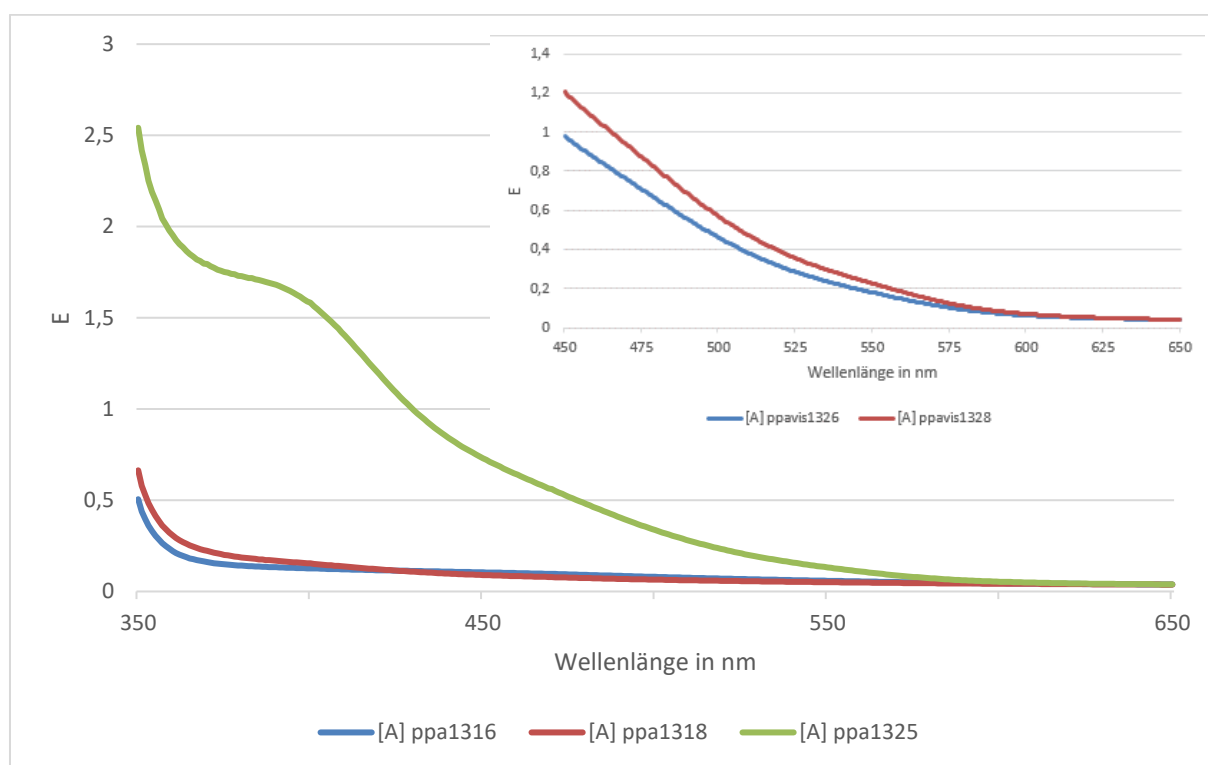


Abbildung 135: Aus p-Phenylendiamin und 4,6-O-Ethylidenglucose entsteht kein roter Farbstoff

Beobachtung: Bei Überlagerung der zeitversetzt aufgenommenen Spektren ergaben sich die Graphen in der Abb. 135.

Ergebnis: Es bildet sich kein roter Farbstoff. Die Hypothese, dass auch bei aromatischen Amine eine Spacergruppe vorhanden sein muss, um einen roten Farbstoff zu bilden, wurde bestätigt.

11.1.2.3 Reaktion von Phenylhydrazin

Phenylhydrazin ist isoelektronisch zu Benzylamin, lediglich die CH_2 -Gruppe ist durch eine NH -Gruppe ersetzt (Abb. 136).

Da in (Ruppersberg et al. 2017a) Phenylhydrazin mit einer roten Farbe vermerkt wurde, sollte dies noch einmal mit UV-Vis-Spektroskopie geprüft werden. Pro Reagenzglas wurden unter dem Abzug mit einer Mikroliterpipette 10 μL Phenylhydrazin in 2 mL 0,1 molare Natronlauge und 2 mL Zuckerlösung gegeben.



Abbildung 136: Benzylamin (l.) vs. Phenylhydrazin (r.)

Phenylhydrazin hat eine Dichte von 1,1 g/mL und eine Molmasse von 108,14 g/mol.

10 μL in 2 mL entsprechen 5 mL auf 1 L, d.h. 5,5 g/L, d.h. 0,05 mol/L.

Da Phenylhydrazin beim Stehenlassen an der Luft von selbst eine Rotfärbung hervorbringt, wurde zur Sicherheit eine Blindprobe mitgeführt (Tab. 22, Abb. 137).

Experiment 30: Bildet Phenylhydrazin einen roten Farbstoff?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm und 1 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Mikroliterpipette, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge ($c = 0,1$ mol/L), demin. Wasser, Anilin, Zucker gemäß Tabelle 22, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg bzw. 4 mg der Kohlenhydrate gemäß Tabelle 22 in einem Reagenzglas gelöst, jeweils 10 μL Phenylhydrazin hinzugegeben (Abzug, Schutzhandschuhe!) und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut vermischt hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben, nach guter Farbentwicklung herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.

Beobachtung: Es ergibt sich wie erwartet ein roter Farbstoff, der jedoch im Vergleich zu Methylamin blauverschoben ist.

Tabelle 22: Phenylhydrazin mit diversen Zuckerkomponenten			
Zuckerkomponente	Proben-Nr.	Phenylhydrazin	Farbe
Keine (Blindprobe)	1	10 µL	Minimal rötlich
Lac, 8 mg	2	10 µL	orangerot
Lul 8 mg	3	10 µL	Kräftig rot
Mal, 8 mg	4	10 µL	orangerot
Cel, 8 mg	5	10 µL	orangerot
BGlc, 4 mg	6	10 µL	Rotbraun, trüb
EGlc, 4 mg	6	10 µL	dunkelrot
Glc, 4 mg	8	10 µL	Zitronengelb
Fru, 4 mg	9	10 µL	Kräftig gelb
Gal, 4 mg	10	10 µL	Blass gelb

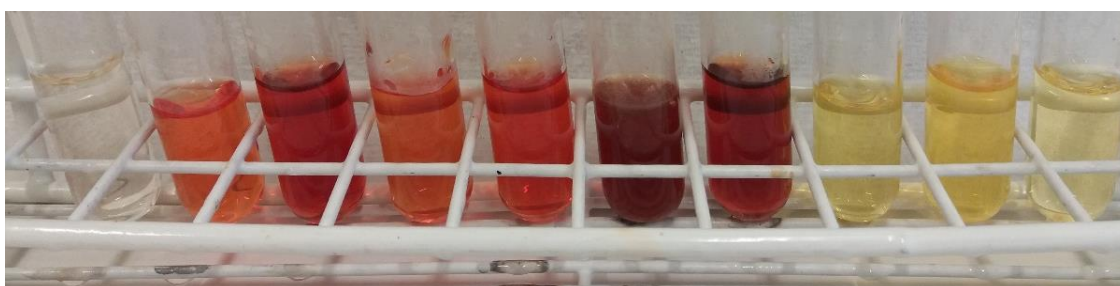


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 137: Phenylhydrazin: Farben nach 5 Min. im Wasserbad bei 65 °C, (Tab. 21)

Wegen der Aromatenabsorption wurde nur der Bereich von 350-650 nm gemessen.

Da bei der Messung der Probe 2 Lactose in der 10-mm-Küvette sofort Extinktionswerte über 1 erhalten wurden, wurden alle Folgemessungen in der 1-mm-Küvette durchgeführt.

Um etwas mehr Ordnung zu erkennen, wurden alle roten Werte aus der 1-mm-Küvettenmessung überlagert (Abb. 138).

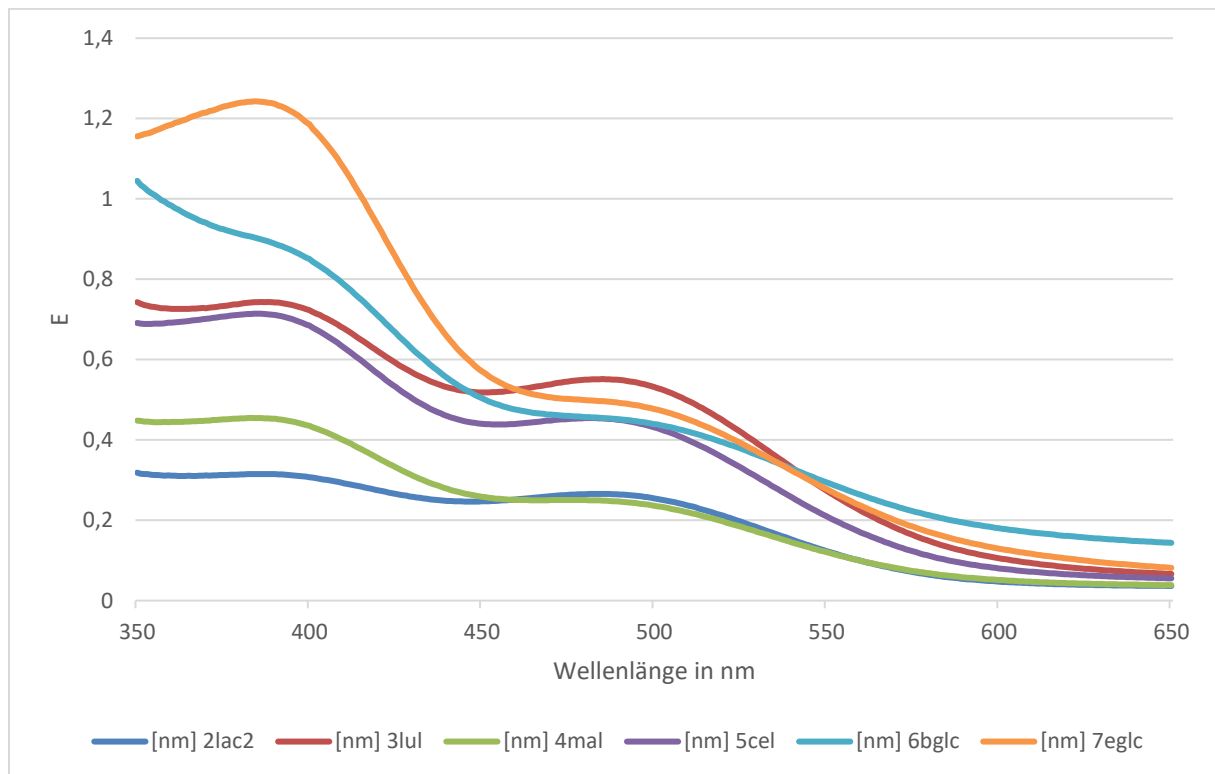


Abbildung 138: Phenylhydrazin-Werte aus den roten Lösungen, 1 mm-Küvette

Anschließend wurden alle Werte aus den gelben Lösungen überlagert; bei Fructose wurde eine zweite Messung mit einer Verdünnung auf die Hälfte durchgeführt.

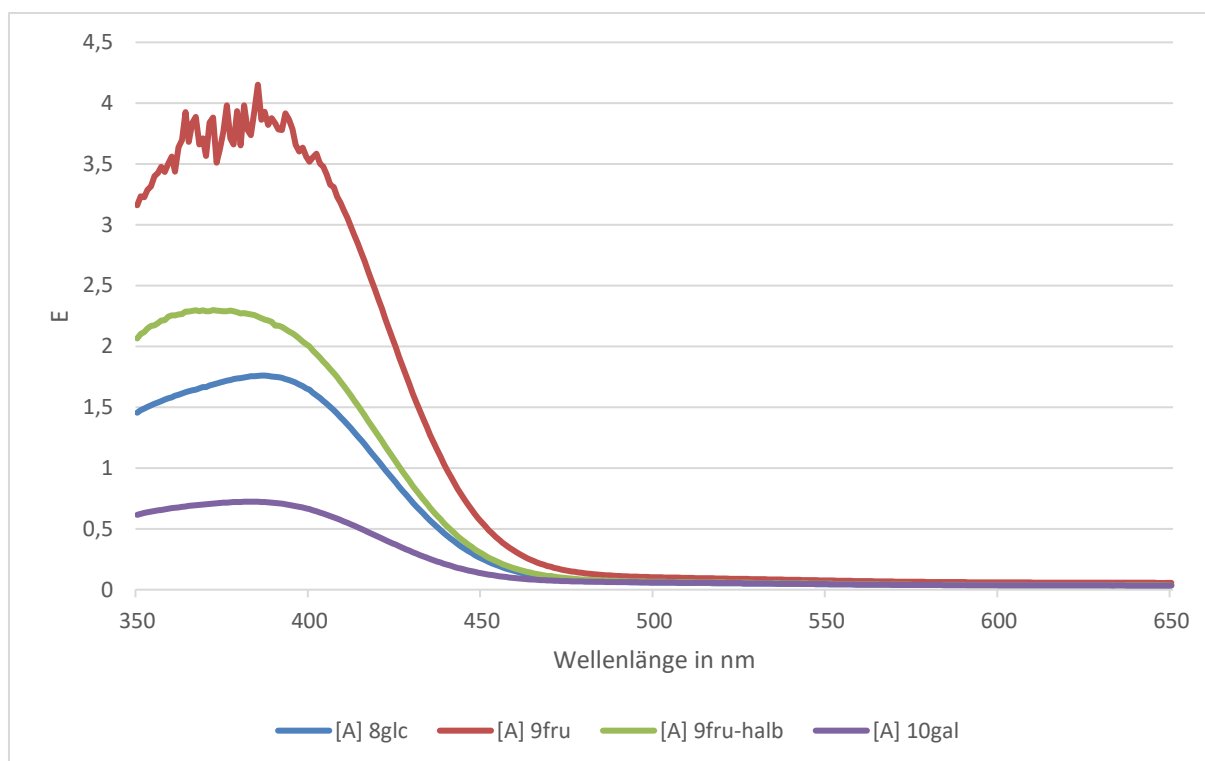


Abbildung 139: Phenylhydrazin-Werte aus den gelben Lösungen, 1 mm-Küvette

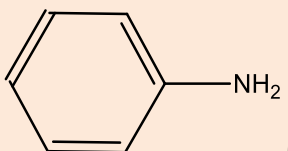
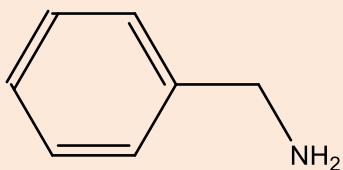
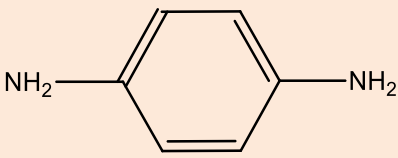
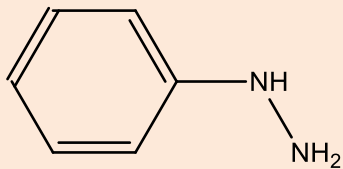
Da die Farbstoffe gelb und rot analog zur Wöhlk und Fearon entstehen, wäre zu überlegen, welche Analogien im Reaktionsmechanismus und im Farbstoffmolekül vorhanden sind.

Die Maxima für die roten Farbstoffe liegen bei 492-494 nm und sind gegenüber den Messungen des Fearon-Farbstoffes (mit Methylamin) deutlich blauverschoben, die Maxima für die gelben Farbstoffe liegen bei 391, 394 und 375 nm. Die Frage, ob die roten Farbstoffe eine ähnliche Konstitution wie der Fearon-Farbstoff besitzen, lässt sich zurzeit leider noch nicht beantworten.

11.1.2.4 Fazit zum Reaktionsverhalten aromatischer Amine

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Spacer-Regel auch für aromatische Amine gilt: Benzylamin ergibt einen roten Farbstoff und Wöhlk- und Fearon-Bedingungen, Anilin und p-Phenylendiamin hingegen nicht.

Phenylhydrazin stellt einen Sonderfall dar. Es ist isoelektronisch zu Benzylamin und ergibt einen roten Farbstoff, der jedoch stark blauverschoben ist. Hierzu müssten weitere Untersuchungen die Frage klären, inwiefern und ob überhaupt der Phenylhydrazin-Farbstoff mit den anderen Farbstoffen vergleichbar ist.

Tabelle 23: Formeln und farbliche Ergebnisse der verwendeten Aromaten		
Nr.	Aromatisches Amin	Entstehende Farbe
1	Anilin  (Aminobenzol)	gelb
2	Benzylamin 	Rot, 551 nm
3	p-Phenylendiamin  (1,4-Diaminobenzol)	gelb
4	Phenylhydrazin 	Rot, 494 nm

11.1.3 Reaktion von Taurin

Da in der Dissertation von Renée Rochat auch Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) getestet wurde (S. 46 in (Rochat 1934)), wurde es für wichtig erachtet, auch diesen Stoff zu überprüfen. Taurin ist ein Abbauprodukt der Aminosäure Cystein und u.a. in Vollmilch (ca. 24 mg in 1 L, (Schmid 2009)) enthalten; in der heutigen Zeit ist es als Lebensmittelergänzungstoff bekannt und kommt u.a. in Energie-Drinks vor.

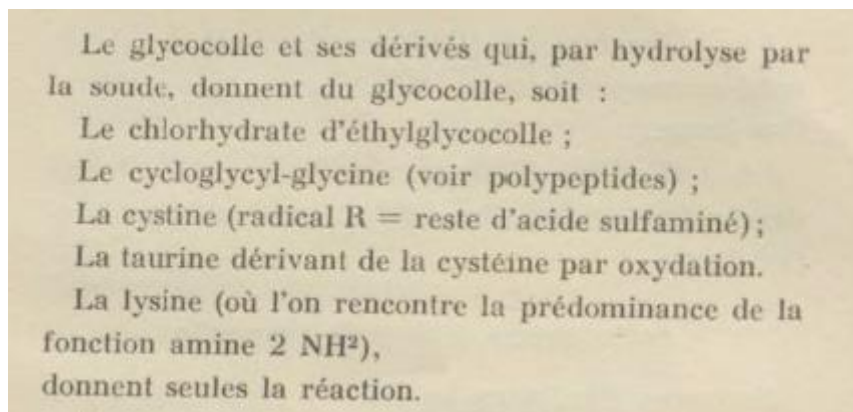


Abbildung 140: Erwähnung von Taurin in Rochat 1934, S. 46

Taurin verfügt über eine endständige Aminogruppe, auf die zwei Methylengruppen und eine Sulfonsäuregruppe folgen (siehe Abbildung 141). Gemäß der Spacerregel sollte hier ein roter Farbstoff gebildet werden.

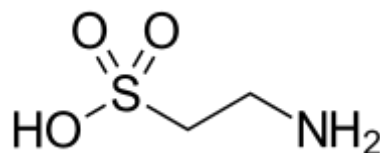


Abbildung 141: Strukturformel von Taurin (2-Aminoethansulfonsäure)

Experiment 31: Bildet Taurin einen roten Farbstoff?

Geräte: UV-Vis-Spektrometer, Heizplatte (auf 65 °C regulierbar), Quarzküvetten 10 mm, Einmalpipetten (3 mL), Reagenzgläser, Reagenzglasshalter, Wischtücher, Ethanol zum Säubern der Küvetten.

Chemikalien: Natronlauge (c = 0,1 mol/L), demin. Wasser, jeweils 16 mg Taurin, Zucker gemäß Tabelle 24, Ethanol zum Säubern der Küvette.

Tabelle 24: Taurin (16 mg) mit diversen Zuckern in Natronlauge (c = 0,1 mol/L)		
Probe	Zucker und Menge	Ergebnis
01	Lactose, 8 mg	orange
02	Lactulose, 8 mg	rot
03	Maltose, 8 mg	orange
04	Cellobiose 8 mg	orange
05	4,6-O-Ethylidengucose, 4 mg	hell-orange
06	4,6-O-Benzylidengucose, 4 mg	orange
07	Glucose 4 mg	gelb
08	Fructose 4 mg	gelb
09	Galactose 4 mg	gelb
10	Saccharose 8 mg	farblos

Durchführung: Zunächst wird das Wasserbad auf der Heizplatte aufgeheizt, bis eine Temperatur von 65 °C stabil gehalten werden kann. Das UV-Vis-Spektrometer wird eingeschaltet und kalibriert. Dann werden jeweils 8 mg bzw. 4 mg der Kohlenhydrate gemäß Tabelle 24 in einem Reagenzglas gelöst, jeweils 16 mg Taurin hinzugegeben und solange vorsichtig und sorgfältig geschüttelt, bis sich alles gut vermischt hat. Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad gegeben, nach guter Farbentwicklung (hier: 20 Min.) herausgeholt und in kaltem Wasser abgestoppt. Die erkalteten Lösungen werden in der 10 mm-Küvette vermessen.



Foto:

Abbildung 142: Proben 01-10 (v.l.n.r.) gemäß Tabelle 24, nach 20 Min. im Wasserbad bei 65 °C

Beobachtung: Es ergibt sich ein roter Farbstoff mit einem Maximum bei 540 nm im Vis-Bereich (Abb. 143), jedoch nur bei Lactulose (02). Die Proben 01, 03-06 bleiben trotz wiederholter Versuche hinter den Erwartungen zurück (Abb. 142).

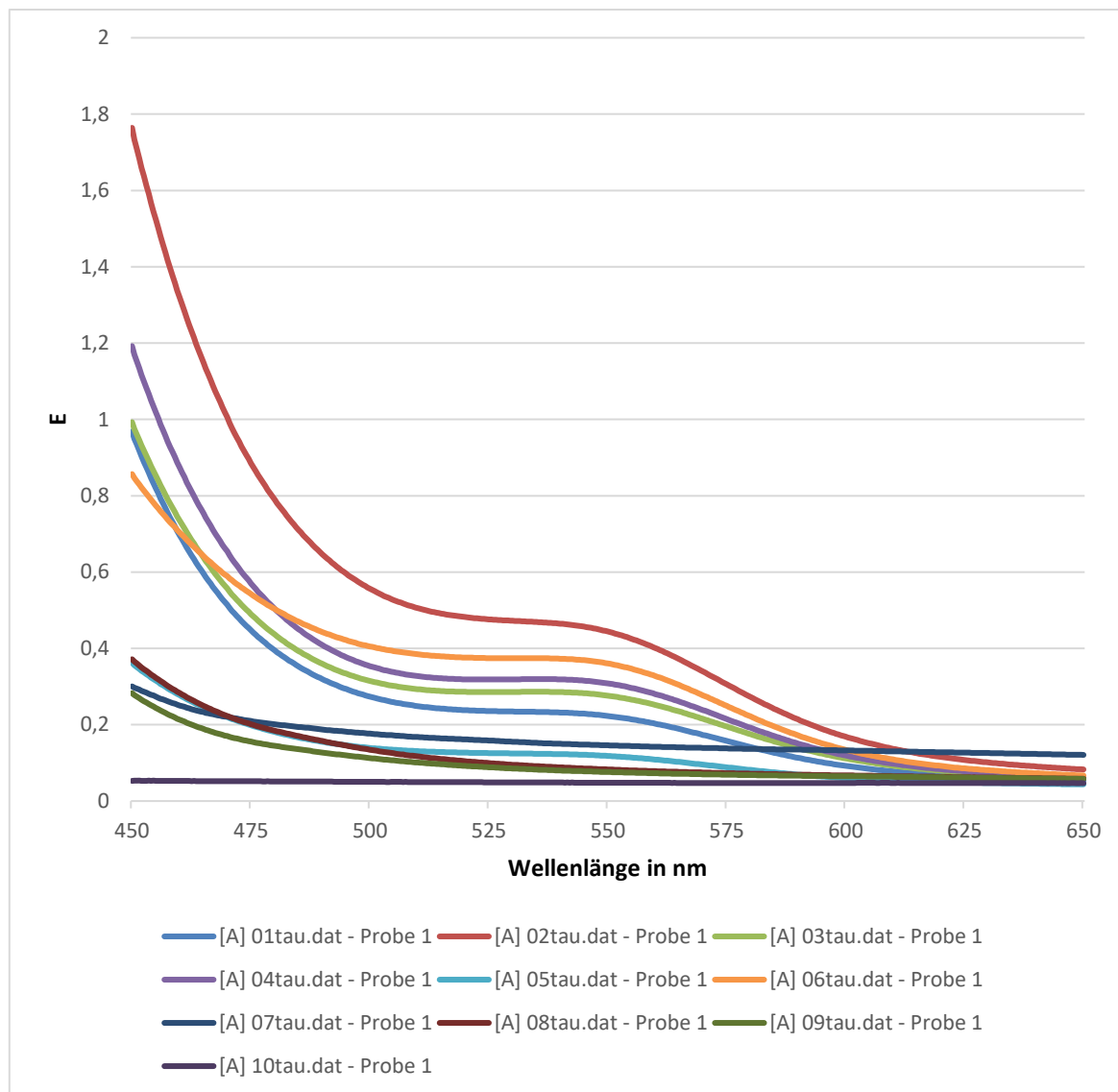


Abbildung 143: Taurin mit Kohlenhydraten gemäß Tabelle 23, Vis-Bereich

Ergebnis: Ansätze zur Bildung eines roten Farbstoffs sind sowohl mit bloßem Auge als auch bei der Messung zu erkennen, allerdings sind die Ergebnisse nicht so eindeutig und überzeugend wie bei anderen in diesem Zusammenhang getesteten Aminen.

Hypothese: Das unterschiedliche Verhalten ist eventuell auf das zusätzlich auftretende Schwefelatom zurückzuführen.

11.2 Reaktionen mit weiteren Kohlenhydraten

Zur Erhaltung des Leseflusses in Kapitel 4.3 wird über folgende Experimente hier im Anhang berichtet.

11.2.1 Überprüfung anderer als 1,4-Verknüpfungen

Weitere experimentelle Überprüfungen ergaben, dass Melibiose (D-Galacto-pyranosyl- α -(1,6)-D-glucopyranose) keinen roten, sondern lediglich einen gelben Farbstoff bildet, wie er auch mit reduzierenden Monosacchariden entsteht. Mit einer mehrfach geschützten Glucose, z.B. mit 1,2,3,4,6-Penta-O-Acetyl-D-Glucopyranose entsteht ebenfalls kein Farbstoff (Vollacetal, Abb. 143 links), mit 2,3,4,6-Tetra-O-Acetyl-Glucopyranose (Halbacetal) entsteht hingegen ein gelber Farbstoff (Abb. 144 rechts).

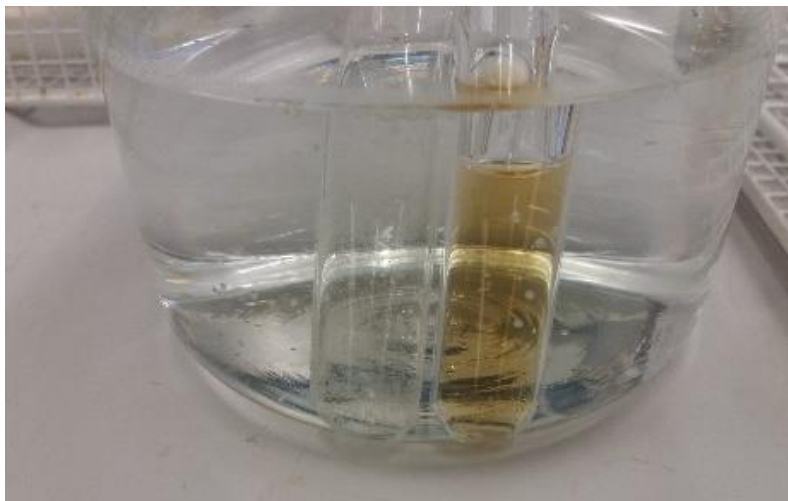


Foto: Ruppertsberg

Abbildung 144: Fearon-Test mit anderweitig geschützten Glucosen (siehe Text)

11.2.2 Experimente mit weiteren Zuckern und Zuckerderivaten

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass auch die Pentosen Arabinose, Ribose und Xylose getestet wurden, ebenso 2-Desoxyglucose, Palatinose, Rhamnose, Melibiose, sowie Maltol und Schleimsäure. Alle ergaben keinen roten Farbstoff und sind somit an dieser Stelle nicht weiter von Belang.

11.3 Weitere experimentelle Annäherungen

Außer den zahlreichen mit dem UV-Vis-Spektrometer durchgeführten Experimenten gab es weitere Versuche, der Konstitution des roten Farbstoffs mit modernen Analysemethoden auf die Spur zu kommen. Bislang war der gewünschte Erfolg leider noch nicht dabei, jedoch kommt es bei experimentellen Arbeiten durchaus vor, dass sich der gewünschte Erfolg erst mit Verzögerung einstellt. Im Folgenden werden die gesuchten Wege geschildert und deren – hoffentlich vorläufiger- Misserfolg erklärt

11.3.1 NMR

Am Institut für Organische Chemie an der Universität Kiel, Spektroskopische Abteilung, wurden zahlreiche NMR-Experimente durchgeführt, die jedoch aufgrund der Vielzahl der unterschiedlichen Moleküle im Produktgemisch eine derartige Vielfalt von Peaks aufwiesen, dass auch mit zweidimensionaler NMR kein Erfolg bei der Suche nach der Konstitution des roten Farbstoffs zu sehen war.

Bei anfänglichen Versuchen mit Ammoniak und Lactose wurde vermutet, dass der Farbstoff zu instabil ist und zu schnell zerfällt. Deswegen wurde die zu untersuchende Lösung in einem dem NMR benachbarten Labor hergestellt und nicht nur zeitnah, sondern direkt anschließend untersucht. In einer weiteren Steigerung wurde das Reaktionsgemisch in das NMR-Röhrchen gegeben und in situ erhitzt.

Ein weiterer Ansatz war, zur Verminderung der Anzahl unnötiger Nebenprodukte an Stelle von Lactose das Umlagerungsprodukt Lactulose zu verwenden, von dem ja schon bekannt ist, dass die Farbstoffbildung hiermit wesentlich schneller erfolgt als mit der Vorläuferverbindung Lactose. Dasselbe gilt für 4,6-O-Ethyliden-D-Glucopyranose. Auch diese Versuche verliefen leider erfolglos, weil immer noch zu viele Nebenprodukte neben dem Farbstoffmolekül in der Lösung vorliegen.

Deshalb wurde nach einer Methode gesucht, bei der das Produktgemisch chromatographisch aufgetrennt werden kann, bevor die einzelnen Bestandteile UV-Vis-spektrometrisch und massenspektrometrisch untersucht wird. Eine derartige Methode ist vor allem in der Lebensmittelchemie verbreitet, wo große Substanzgemische z. B. aus der Maillard-Reaktion, aber auch aus Naturprodukten wie Aromen und Pflanzenfarbstoffen an der Tagesordnung sind. Die dort angewendete Kombination von analytischen Methoden ist unter der Abkürzung HPLC-DAD-MS bekannt.

11.3.2 HPLC-DAD-MS

Für eine Untersuchung mit einer vorgeschalteten HPLC-Säule muss das Produktgemisch vorher neutralisiert werden, da eine stark alkalische Lösung die Matrix der HPLC-Säule hydrolysieren und somit zerstören würde. Da der gesuchte rote Farbstoff nur im stark alkalischen Bereich stabil ist, konnten nach der Neutralisation des Substanzgemisches nur Fragmente des Farbstoffs detektiert werden. Diese ließen leider keine Rückschlüsse auf das Chromophor zu. Die nächste Idee war daher, nach einer Untersuchungsmethode zu suchen, bei der der pH-Wert des Substanzgemisches keine Rolle spielt. Eine solche Methode ist durch ESI-MS gegeben.

11.3.3 ESI-MS

Bei der ESI-MS-Methode ist der pH-Wert der zu untersuchenden Lösung egal, wichtig ist jedoch, dass der gesuchte Stoff anionisch oder kationisch vorliegt. Durch eine Kapillare wird etwas Substanzgemisch auf eine Elektrode gezogen, die zunächst ein stark positives Potenzial besitzt und von der aus einzelne Ionen oder ionisierte Moleküle oder Fragmente durch einen Tunnel in Richtung negatives Potential „fliegen“, man könnte auch sagen: das Substanzgemisch wird gesprüht („Elektronen-Spray-Ionisation“).

Im nächsten Versuchsansatz wird die Polarisierung gewechselt, d. h. von einer stark negativ aufgeladenen Elektrode „fliegen“ Teilchen durch einen Tunnel zu einer negativen Elektrode und werden dort massenspektrometrisch (MS) detektiert.

Bei der Untersuchung wurden tatsächlich Moleküle gefunden, die in direktem Zusammenhang zu eingesetztem Amin und dem reagierenden Kohlenhydrat stehen. Jedoch enthielten alle gefundenen Ionen bzw. Moleküle keine farbgebende Struktur und konnten somit nicht der gesuchte Farbstoff sein.

Eidesstattliche Versicherung

Wortlaut gemäß Promotionsordnung der Europa-Universität Flensburg vom 30. Januar 2017:
„Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und andere als in der Dissertation angegebene Hilfsmittel nicht benutzt habe; die aus fremden Quellen (einschließlich elektronischer Quellen, dem Internet und mündlicher Kommunikation) direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind ausnahmslos unter genauer Quellenangabe als solche kenntlich gemacht. Zentrale Inhalte der Dissertation sind nicht schon zuvor für eine andere Qualifikationsarbeit verwendet worden. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe sogenannter Promotionsberaterinnen bzw. Promotionsberater in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Auf die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer, auch fahrlässigen, falschen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung und die Bestimmungen der §§ 156, 161 StGB bin ich hingewiesen worden.“

Flensburg, 3. Mai 2021

Klaus Martin Ruppertsberg

Lebenslauf (Kurzform)

Klaus Martin Ruppertsberg, geboren am 15.09.1959 in Köln-Lindenthal

- | | |
|-----------|--|
| 1978 | Abitur am Hölderlin-Gymnasium Köln-Mülheim |
| 1978-1979 | Pflichtwehrdienst in Wuppertal |
| 1979-1986 | Studium der Fächer Chemie und Biologie an der Albertus Magnus-Universität Köln für die Lehrämter an den Sekundarstufen II und I |
| 1986 | Erstes Staatsexamen für die Lehrämter an den Sekundarstufen II und I für die Fächer Chemie und Biologie, Staatliches Prüfungsamt, Köln |
| 1986-1988 | Professional Service Engineer for Dental Materials, 3M Medica GmbH, Neuss |
| 1988-1990 | European Product Manager for Dental Restoratives, DeTrey Dentsply AG, Konstanz |
| 1990-1992 | Studienreferendar an der Liebfrauenschule in Bensheim/Bergstraße |
| 1992 | Zweites Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien für die Fächer Chemie und Biologie, Studienseminar Bensheim/Bergstraße |
| 1992-1993 | Lehrer an der Rudolf Koch-Schule in Offenbach am Main (angestellt) |
| 1993-1998 | Realschullehrer in Nordrhein-Westfalen, Verbeamtung |
| 1998-2010 | Gesamtschullehrer in Nordrhein-Westfalen |
| Ab 2000 | Freier Autor (nebenberuflich, u. a. Schroedel-Verlag, ChemKon, PdN, Unterricht Chemie, MNU, NadC, ChiuZ, ChemViews, Chemistry Teacher International) |
| 2010-2014 | Oberstudienrat und Fachbereichsleiter Chemie an der Domschule in Schleswig, Versetzung nach Schleswig-Holstein |
| 2014-2021 | Abgeordnete Lehrkraft am IPN Kiel, Abt. Chemiedidaktik |
| 2020-2021 | Lehrbeauftragter für Experimentelle Schulchemie an der EUF Flensburg |
| 2021 | Promotion (EUF Flensburg/ IPN Kiel) |