

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.062.088.8

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ МЕТАНОЛА В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ

У. М. Мизгунова, А.Е. Тескер, Е.А. Краснослободцева, И.Ф. Долманова

(кафедра аналитической химии)

Изучено влияние мешающих компонентов (тяжелых спиртов, альдегидов и карбоновых кислот) на определение примесей метанола в водно-этанольных растворах с использованием алкогольоксидазного окисления спиртов. Разработана методика определения малых количеств метанола в водных растворах этанола (10–40 об.%) с использованием новой системы – алкогольоксидазного окисления спиртов и сопряженной индикаторной реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода (C_n метанола 2 об.%).

Ферментативные методы определения метанола в смеси с этанолом основаны на алкогольоксидажном окислении этих спиртов, протекающему по схеме



В основу определения положены либо различие в скорости образования соответствующих альдегидов [1–3], либо использование второго фермента (формальдегиддегидрогеназы), катализирующего дальнейшее превращение образующегося формальдегида [4]. Однако в указанных работах практически не изучено влияние на определение метанола веществ, часто сопутствующим низшим алифатическим спиртам в реальных объектах. Этими веществами могут быть, например, другие низшие алифатические спирты, альдегиды и кислоты, соответствующие определяемым спиртам, а также целый ряд других карбоновых кислот, присутствующих в винах [5]. Выяснению влияния этих веществ на определение метанола и этанола в их смеси посвящена настоящая статья.

Экспериментальная часть

В работе использовали жидкий препарат алкогольоксидазы из дрожжей *Pichia Pinus* («Синтезбелок», Москва) с активностью 1000 Е/см³ и твердый препарат пероксидазы из хрена (*Reanal*, Венгрия) с активностью 400 Е/мг (RZ=0.6). Раствор алкогольоксидазы с активностью 10 Е/см³ готовили ежедневно разбавлением исходного препарата фосфатным буферным раствором (рН 6.86). Раствор пероксидазы с содержанием фермента $n \cdot 10^{-6}$ моль/л готовили растворением препарата в боратном буферном растворе (рН 7.0), содержащем для повышения устойчивости фермента и поддержания постоянной ион-

ной силы раствора 20 об.% 0.1 моль/л NaNO₃ («ос.ч»). Точную концентрацию раствора пероксидазы устанавливали спектрофотометрически ($\epsilon_{403} = 9.4 \cdot 10^4$). Растворы с меньшим содержанием фермента готовили ежедневно разбавлением исходного раствора боратным буферным раствором (рН 7.0). Исходный препарат алкогольоксидазы хранили в холодильнике при температуре –18°C; исходный препарат пероксидазы и все растворы хранили в холодильнике при температуре +4°C. Метанол, этанол, пропанол, бутанол очищали перегонкой. Точную концентрацию раствора формальдегида устанавливали титриметрически сульфитным методом [6]. Фосфатный буферный раствор (рН 6.86) готовили из фиксаналов (РИАП, Киев). Боратный буферный раствор готовили смешением 0.05 моль/л раствора тетрабората натрия («ос.ч») и 0.2 моль/л раствора борной кислоты («ос.ч»). Использовали пероксид водорода («ос.ч»), точную концентрацию которого устанавливали титриметрически [7]. *n*-Фенилендиамин («ч») и *o*-дианизидин («ч») перекристаллизовывали из водных растворов соляной кислоты (2:1 и 1:3 соответственно). Использовали муравьиную, уксусную, лимонную, винную и молочную кислоты («ч.д.а.»). Для приготовления всех водных растворов и перекристаллизации реагентов использовали воду после ионообменной очистки с удельной электропроводностью не более 1.5 Ом.

Всю использованную посуду предварительно очищали концентрированной перегнанной HNO₃, обрабатывали паром в течение 15 мин и тщательно промывали деионизованной водой. Скорость ферментативного процесса контролировали спектрофотометрически, характеризуя ее величиной оптической плотности раствора через определенный промежуток времени с момента начала реакции

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики методики определения метанола в водных растворах этанола с использованием алкогольоксидазного окисления спиртов и сопряженной индикаторной реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина

Содержание метанола в водном растворе этанола	Уравнение градуировочной прямой*	$C_{н}$, об. %	s_r
2–20 об. % метанола в 20 об. %-м этаноле	$y = 0.26 + 0.03x$	(2.00±0.02)	0.03
2–20 об. % метанола в 40 об. %-м этаноле	$y = 0.32 + 0.03x$	(2.00±0.01)	0.02

* x – $C_{метанола}$, об. %; $y = A_2$

(A_1). Оптическую плотность растворов во времени измеряли на фотоэлектроколориметре «КФК-2» (ЗОМЗ, Загорск). Анализ растворов и спиртных напитков проводили на приборе «Хроматограф» (модель 3700, Москва). Температура колонки 35°C, длина колонки $l=1$ м, $v=25$ мл/мин, неподвижная фаза – *Carbowax-4000*, твёрдый носитель – хроматон *AWDMCS*.

Обсуждение результатов

Для определения малых примесей метанола в водно-этанольных растворах ранее нами был разработан ферментативный метод, основанный на использовании сопряженной системы – алкогольоксидазного окисления спиртов и катализируемого образующимися альдегидами окисления *n*-фенилендиамина (ПФДА) пероксидом водорода в качестве индикаторной реакции [3]. Будем в дальнейшем называть ее система I. Для определения метанола в конкретных объектах – спиртных напитках (водках и винах) было необходимо выяснить влияние на определение метанола более тяжелых низших алифатических спиртов, в частности пропанола и бутанола, а также альдегидов и целого ряда карбоновых кислот, встречающихся в винах в наибольшем количестве. Поскольку ранее для определения метанола была использована система, в которой альдегиды априори влияют на индикаторную реакцию, катализируя ее, то для изучения влияния альдегидов на процесс ферментативного окисления спиртов необходимо было подобрать другую индикаторную реакцию. Для этих целей использовали сопряженную систему, состоящую из реакций алкогольоксидазного окисления спиртов и пероксидазного окисления *o*-дианизидина (ОДА) образующимся в первой реакции пероксидом водорода. Будем в дальнейшем называть ее система II.

Поскольку ранее эту систему не использовали для определения метанола в смеси с этанолом, нами была разработана методика такого определения. Оптимальные

условия протекания индикаторной реакции в системе II были взяты из работы [8], а оптимальная для окисления спиртов активность алкогольоксидазы была подобрана экспериментально. На основании изученной ранее кинетики алкогольоксидазного окисления спиртов с использованием системы II [9] было выбрано оптимальное время окисления смеси спиртов (2 мин). При таком режиме разница в количестве пероксида водорода, образовавшегося в результате окисления метанола и этанола, максимальна.

В выбранных условиях была изучена зависимость скорости ферментативного окисления спиртов от их концентраций (рисунок). Скорость процесса характеризовали величиной оптической плотности раствора через 2 мин после начала реакции (A_2). На рисунке показано, что разница в количествах образующихся продуктов окисления этанола и метанола максимальна в интервале концентраций 10–40 об. %. Для метанола при концентрациях до 15–20 об. % наблюдается линейная зависимость, позволяющая определять метанол в этом интервале концентраций с достаточной точностью.

Чтобы приблизить метод определения метанола в водно-этанольных растворах к анализу реальных объектов (водок и вин), готовили две серии модельных растворов метанола и этанола в воде таким образом, чтобы содержание этанола в водном растворе составляло 40 об. % (серия 1) и 20 об. % (серия 2), а содержание метанола в обеих сериях изменяли от 0 до 20 об. %. Определение метанола проводили с применением сопряженной системы, состоящей из реакций алкогольоксидазного окисления спиртов и пероксидазного окисления *o*-дианизидина образующимся в первой реакции пероксидом водорода.

Методика определения малых количеств метанола в водно-этанольных растворах. Перед определением исходные растворы разбавляют водой в 100 раз. Далее в кювету ($l=1$ см) последовательно вносят 3.5 мл фосфатно-

Т а б л и ц а 2

Влияние карбоновых кислот и альдегидов на процесс оксидазного окисления этанола и метанола с использованием различных способов индикации ($C_{\text{спирта}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

Изученная реакция или система	Вводимые в систему компоненты	С, М				Примечания
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	
$\text{ОДА} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ \rightarrow продукты	пропанол					АО – алкогольоксидаза, ПХ – пероксидаза хрена ОДА – <i>o</i> -дианизидин, ПФДА – <i>n</i> -фенилендиамин, акт – ускоряет скорость процесса инг – замедляет скорость процесса, пустая клетка – отсутствует влияние при данной концентрации
	бутанол					
	формальдегид				инг	
	ацетальдегид					
	муравьиная кислота			инг		
	уксусная кислота				инг	
	лимонная кислота				инг	
	винная кислота				инг	
$\text{ПФДА} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ \rightarrow продукты (R=H, CH ₃)	пропанол					
	бутанол					
	формальдегид	акт				
	ацетальдегид		акт			
	муравьиная кислота			инг		
	уксусная кислота				инг	
	лимонная кислота				инг	
	винная кислота				инг	
$\text{ОДА} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ \rightarrow продукты $\text{RCH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow$ $\rightarrow \text{RCHO} + \text{H}_2\text{O}_2$ (R=H, CH ₃)	пропанол					
	бутанол					
	формальдегид					
	ацетальдегид					
	муравьиная кислота			инг		
	уксусная кислота				инг	
	лимонная кислота				инг	
	винная кислота				инг	
молочная кислота				инг		

Т а б л и ц а 3

Правильность и воспроизводимость методик определения метанола в модельных растворах на основе водки «Столичная» ($P=0.95$, $n=3$)

Используемый метод	Введено, об. %	Найдено, об. %	s_r , %
Ферментативный (система I)	2.0	2.1	2.0
	5.0	5.0	2.1
	10.0	9.8	2.0
Ферментативный (система II)	1.0	1.1	2.3
	2.0	2.0	2.0
Газовая хроматография	1.0	1.0	2.8
	2.0	2.0	2.4
	5.0	4.8	2.1
	10.0	10.1	2.0

го буферного раствора (рН 6.86), 0.5 мл исследуемого раствора спиртов, 0.2 мл $5 \cdot 10^{-3}$ М раствора *o*-дианизидина, 0.2 мл $8 \cdot 10^{-7}$ М раствора пероксидазы и 0.2 мл раствора алкогольоксидазы с активностью 0.1 Е/см³. В момент добавления алкогольоксидазы включают секундомер. Содержимое кюветы перемешивают стеклянной палочкой и измеряют оптическую плотность раствора на «КФК-2» ($\lambda=490$ нм) через 2 мин после начала реакции. Метрологические характеристики методики определения метанола в водных растворах этанола с использованием системы II приведены в табл. 1.

Таким образом, было показано, что содержание этанола в водных растворах в интервале концентраций 10–40 об. % практически не влияет на определение метанола в водно-этанольных растворах. Однако предложенная методика менее чувствительна, чем методика, основанная на использовании индикаторной системы I, основанной на использовании в качестве индикаторной реакции окисления *n*-фенилендиамина пероксидом водорода, катализируемой альдегидами [3].

Для анализа конкретных объектов было необходимо выяснить влияние на определение метанола в водно-этанольных растворах более тяжелых низших алифатических спиртов, в частности пропанола и бутанола, а также альдегидов и целого ряда карбоновых кислот, встречающихся в наибольшем количестве в спиртных напитках. Влияние альдегидов на ферментативное окисление метанола изучали, используя только систему II, так как в системе I

альдегиды влияют на окисление *n*-фенилендиамина пероксидом водорода. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таким образом, проведенные исследования показали, что присутствие пропанола и бутанола в водно-этанольных растворах не влияет на определение метанола, а 10-кратные избытки муравьиной кислоты и 100-кратные избытки уксусной, винной, молочной и лимонной кислот по отношению к концентрации метанола не влияют на окисление этого спирта и его определение при использовании как системы I, так и системы II. Что касается формальдегида и ацетальдегида, то их 100-кратный избыток по отношению к концентрации метанола не влияет ни на процесс его ферментативного окисления, ни на его определение с использованием в качестве индикаторной реакции окисления ОДА пероксидом водорода (система II). Однако при использовании в качестве индикаторной реакции окисления ПФДА пероксидом водорода формальдегид при его концентрации в реакционной смеси $n \cdot 10^{-5}$ М и ацетальдегид при его концентрации $n \cdot 10^{-4}$ М начинают увеличивать скорость в системе I. Таким образом, используя систему I, определить метанол в водно-этанольных растворах в присутствии даже малых количеств альдегидов невозможно, что позволяет сделать вывод о более высокой селективности определения спиртов при использовании системы II.

На основании полученных данных можно заключить, что система II с использованием сопряженной индикаторной реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода более пригодна для определения примесей метанола в вине, так как в винах могут встречаться формальдегид и ацетальдегид, практически не влияющие на окисление спиртов и на скорость реакции окисления *o*-дианизидина. Система I с использованием сопряженной индикаторной реакции окисления *n*-фенилендиамина пероксидом водорода как более чувствительная пригодна для определения метанола в водке.

Для того чтобы проверить возможность определения метанола в реальных объектах, мы создали из промышленно выпускаемых водки «Столичная» и белого вина «Цинандали» (доказав предварительно методом газовой хроматографии отсутствие в них метанола в интервале концентраций, определяемых нашим методом) модельные растворы с разным содержанием в них метанола. Определение метанола в модельных растворах на основе водки вели по разработанной методике с использованием системы II, а также по разработанной ранее [3] методике определения метанола в водно-этанольных растворах с использованием системы I. В качестве независимого контролирующего метода применяли метод газовой хроматографии. Оценку правильности и воспроизводимости методик определения метанола в водке

Т а б л и ц а 4

Метрологические характеристики методик определения малых количеств метанола в модельных растворах на основе вина и водки ($P=0.95, n=3$)

Используемый метод	Модельная система	Уравнение градуировочной прямой*	C_H, M	s_r
Ферментативный (система I)	Белое вино «Цинандали»+ 2–20об.% метанола	$y = 0.26 + 0.01x$	(2.00±0.02)	0.01
Ферментативный (система I)	Водка «Столичная»+ 0.4–20 об.% метанола	$y = 0.42 + 0.01x$	(2.00±0.03)	0.04
Ферментативный (система II)		$y = 0.19 + 0.07x$	(0.40±0.02)	0.03
Газовая хроматография		$y = 0.28 + 0.34x$	(1.00±0.04)	0.06

* $x - C_{MeOH}, \text{ об.}\%$; $y = A_2$

проводили методом «введено-найдено». Результаты представлены в табл. 3.

Определение метанола в модельных растворах на основе белого вина проводили только по методике, основанной на использовании системы II. Результаты определения метанола в модельных растворах и метрологические характеристики методик приведены в табл. 4.

Таким образом, в результате проведенного исследования была показана возможность применения сопряженной системы II, основанной на реакции алкогольоксидазного окисления спиртов и пероксидазного окисления *o*-дианизидина образующимся в первой реакции пероксидом водорода для определения метанола в водно-этанольных растворах. Было показано, что разработан-

ную методику определения метанола в водно-этанольных средах можно применять для определения этого спирта в спиртных напитках.

Было также выяснено, что при определении метанола в водно-этанольных средах сопряженная индикаторная система II более селективна, но менее чувствительна, чем сопряженная индикаторная система I, состоящая из реакций алкогольоксидазного окисления спиртов и катализируемого образующимися альдегидами окисления *n*-фенилендиамина пероксидом водорода. На основании проведенного исследования методика определения метанола в спиртных напитках с использованием системы I предложена для анализа водки, а методика с использованием системы II – для анализа белых вин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maguieira A., Valcarcel M. // Microchem. J. 1987. **36**. P. 309.
2. Forster E., Silva M., Otto M., Perez-Bendit // Talanta. 1993. **40**. P. 855.
3. Mizgunova U.M., Zolotova G.A., Dolmanova I.F. // Analyst. 1996. **121**. P. 431.
4. Vinet B. // Clin. Chem. 1988. **34**. P. 1944.
5. Colloq. Sci int cafe. Montreux. 29 juin-3 juil. 1987. Paris, 1988. P. 238.
6. Кольтгоф И.М., Стенгер В.А. Объемный анализ. М., 1952. С. 275.
7. Кольтгоф Н., Сендел Е. Количественный анализ. М., 1948. С. 624.
8. Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Долманова И.Ф. // ЖАХ. 1993. **48**. С. 129.
9. Глазков В.В., Мизгунова У.М., Золотова Г.А., Долманова И.Ф. // ЖАХ. 1997. **52**. № 1. С. 80.

Поступила в редакцию 06.02.97