

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 7 (73). 2021. № 2. С. 191–197.

УДК 543.94

ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ КАК АНАЛИТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ

Вяткина О. В., Изнаурова М. Д., Багуль Е. А.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: oksana_yuatkina@list.ru*

В статье представлены результаты апробации новой методики количественного определения фенола в водных растворах, основанной на фотоколориметрической идентификации продуктов его пероксидазного окисления. В качестве катализатора использовали пероксидазу, экстрагированную из корнеплода редьки черной фосфатным буфером с pH=7 без дополнительной очистки, иммобилизованную на силикагеле. По экспериментальным зависимостям оптической плотности окислительных систем от концентрации фенола был построен калибровочный график и проведена его статистическая обработка, что позволило оценить метрологические характеристики новой методики. Установлено, что в предложенном варианте методика может быть использована для полуколичественного определения фенола в водных объектах и для он-сайт анализа.

Ключевые слова: пероксидаза, ферментативная активность, фенол, калибровочный график.

ВВЕДЕНИЕ

Фенолы – экотоксиканты, поступающие в гидросферу как из промышленных источников, так и образующиеся в воде в естественных условиях. Среди фенолов, большей токсичностью обладают летучие с паром фенолы [1]. Превышение естественного фонового содержания фенолов в водоемах оказывает не только токсическое влияние на живые организмы, но и является причиной изменения режима биогенных элементов и растворенных газов, поэтому актуальным вопросом остается мониторинг веществ-загрязнителей.

В анализе фенолов существует ряд проблем, среди которых можно выделить сложность избирательного определения фенолов в смесях (а именно в таком виде они присутствуют в водных объектах, вследствие естественной трансформации). Высокой избирательностью обладают хроматографические методы (ГЖХ и ВЖХ), однако для определения требуется дорогостоящее стационарное оборудование, а погрешности превышают 20 % [2, 3]. Другой проблемой является определение малых концентраций фенолов, которое, как правило, многостадийно, включает стадии отгонки либо экстракции аналита, что приводит, в конечном итоге, при

реализации таких методов как спектрофотометрия, флуориметрия, электрофоретические методы к погрешности, превышающей пределы допустимые в количественных определениях (более 50 %) [4, 5]. Очистка сточных вод от фенолов происходит окислительным методом, что приводит к невозможности использования для оценки остаточного содержания фенолов, стандартных для большинства лабораторий фотоколориметрического метода и метода броматометрического титрования из-за химических взаимодействий аналитических реагентов с компонентами окислительных смесей [6]. Так же следует отметить невозможность определений значительных концентраций фенола (превышающих $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) вышеуказанными методами, а в ряде исследований, например, при определении эффективности многокомпонентных катализаторов в окислительных системах, разбавление аналита не является корректным.

Известно, что при пероксидазном окислении фенолов образуются окрашенные продукты реакции, что делает возможной визуальную и фотоколориметрическую их идентификацию. Легко окисляемыми субстратами растительных пероксидаз являются многоатомные фенолы. Пероксидазное окисление самого же фенола, не смотря на более низкую скорость, тем не менее, так же приводит к образованию окрашенных продуктов [6]. Поэтому целью нашего исследования была разработка простой в реализации и экспрессной методики определения количественного содержания фенола в водных растворах в концентрациях соизмеримых с ПДК и превышающих её, основанной на каталитическом окислении фенолов в присутствии ферментного препарата с пероксидазной активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся фенол (C_6H_5OH , чда, «ВИТАХИМ»). В качестве катализатора в окислительных системах использовали ферментный препарат с пероксидазной активностью. Препарат получали путем сорбции на силикагеле пероксидазы, экстрагированной фосфатным буфером из корнеплода реьдки черной [8]. Концентрацию фермента в растворе определяли фотоколориметрически ($\lambda=400$ нм, $l=2$ см, $\epsilon_{400}=9,6 \cdot 10^4 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$). Подложку

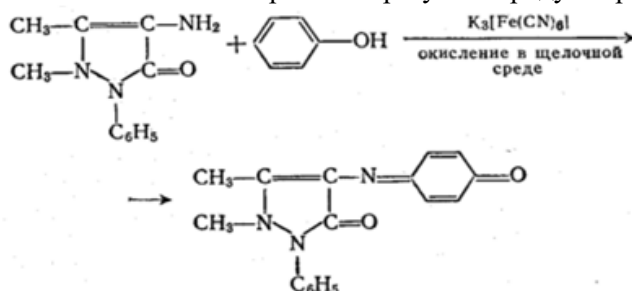
осаждали из силикатного клея «Жидкое стекло» (марка Б, силикатный модуль 2,6–3,0), добавляя по каплям 6М HCl до pH=10.

Иммобилизацию пероксидазы на подложку проводили в системе, состоящей из 10 г силикагеля, 70 мл раствора пероксидазы в фосфатном буфере, 105 мл дистиллированной воды (молярная концентрация активных центров фермента в жидкой фазе сорбционной системы 248 нмоль/л) и оставляли на 60 минут. По истечении указанного времени раствор фильтровали и твердую фазу сушили на воздухе при комнатной температуре. В результате был получен материал, содержание активных центров фермента в 1 г которого по данным сорбционных исследований составляло 2,5 нмоль, который использовали в дальнейших исследованиях. Ранее было установлена высокая пероксидазная активность композитов, полученных указанным способом [9].

Для изучения возможности применения иммобилизованной на силикагеле пероксидазы редьки черной и количественного определения фенола в водных растворах, в химические стаканы помещали по 1 г препарата и добавляли водные растворы фенолов с различными концентрациями ($V=20$ мл), затем добавляли по 2,5 мл пероксида водорода ($C=0,05$ моль/л) – СИСТЕМА I. Время экспозиции серии составляло 10 мин. По истечению времени фермент инактивировали 1М H_2SO_4 . Окрашенные растворы фильтровали, после измеряли их оптические плотности при длине волны 470 нм, соответствующей максимуму поглощения окрашенных продуктов, в кювете с толщиной оптического слоя $l=2$ см. Строили калибровочные зависимости оптических плотностей фотометрируемых растворов от концентрации фенолов в водных растворах после каталитического окисления. Рассчитывали уравнения калибровочных прямых по методу наименьших квадратов и с использованием приложения Microsoft Excel. В тестовой серии из пяти растворов с одинаковыми концентрациями фенола, проводили определение содержания фенола по полученным калибровочным прямым и оценивали воспроизводимость методики. В качестве стандартной для сравнения метрологических характеристик использовали фотоколориметрическую методику определения фенола, основанную на образовании окрашенных соединений фенола с 4-аминоантипирином в присутствии гексацианоферрата(III) калия при $pH=10$ – СИСТЕМА II [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В реакции фенола с 4-аминоантипирином образуется продукт красного цвета [6]:



Поэтому регистрацию аналитического сигнала в аналитической серии растворов производили на приборе Эксперт-003 при длине волны $\lambda=470$ нм. Наблюдения показали, что интенсивное и устойчивое во времени красное окрашивание в системе образуется в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-5}$ – $9 \cdot 10^{-5}$ моль/л и появляется уже в течение первых 5 минут экспозиции, поэтому именно это время считали достаточным для фиксирования аналитического сигнала – оптической плотности D_{470} системы. Общее время проведения анализа составило 1 час. Полученная калибровочная прямая для ряда водных растворов фенола в указанном диапазоне концентраций представлена на рис. 1.

Было установлено отклонение линейности графических зависимостей оптической плотности аналитических систем (I) от концентрации фенола, при концентрациях аналита выше $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что делает невозможным определение высоких концентраций фенола. Вероятно, изменение угла наклона калибровочной

прямой связано с изменением состава продуктов окисления фенола. Так же следует отметить невозможность использования реакции фенола с 4-аминоантипирином как аналитической при контроле его содержания в системах с сильными окислителями, вследствие разрушения окрашенного продукта [10].

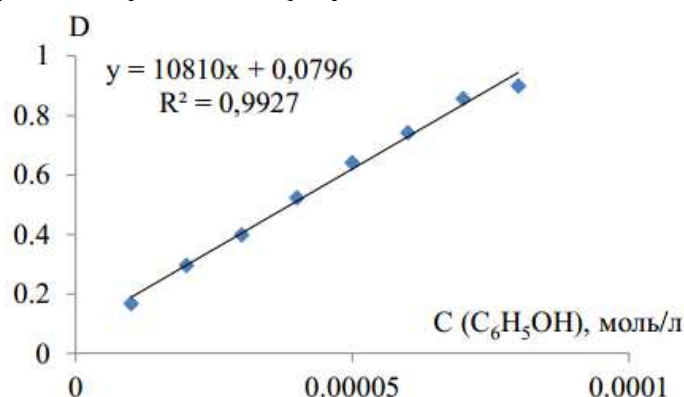


Рис. 1. Зависимость оптической плотности раствора (D) от концентрации C₆H₅OH (СИСТЕМА II)

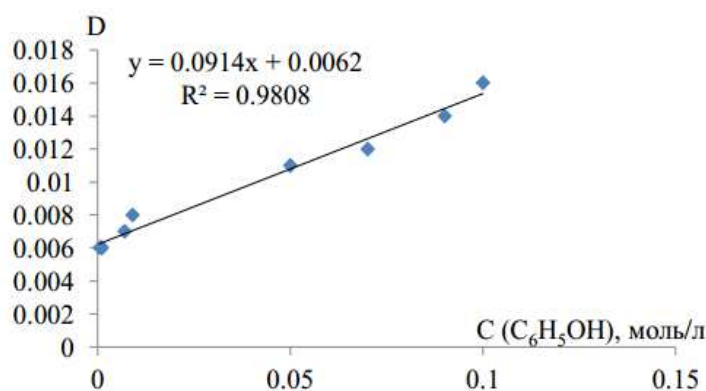


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (D) раствора от концентрации C₆H₅OH в системе с пероксидазой иммобилизованной на силикагеле, осажденном при pH=10, и пероксидом водорода ($\tau=10$ мин). (СИСТЕМА I)

Нами была проведена апробация методики определения концентрации фенолов с помощью ферментного препарата, в системах (I) (рис. 2). Окраска в исследуемых системах появлялась уже спустя 10 минут экспозиции, общее время проведения составляло 30 минут и полученная калибровочная прямая показана на рис. 2. Калибровочные кривые были аппроксимированы уравнениями типа $y=bx+a$. Значения параметров градуировочного графика а и b и их доверительные интервалы указаны в табл. 1.

Таблица 1
Параметры градуировочных графиков для методик фотоколориметрического определения фенола в воде ($\lambda=470$ нм.)

Система №	Параметры калибровочной прямой				$C_{(min)}$, моль/л
	a	ϵ_a	b	ϵ_b	
I (рис.2)	0,006	$2 \cdot 10^{-4}$	0,09	$4 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$
II (рис.1)	0,07	0,02	10800	481	$8,18 \cdot 10^{-6}$

Полученные градуировочные прямые использовали для определения оптической плотности в стандартных растворах, для оценки воспроизводимости методик. Каждая серия состояла из пяти определений. Статистическая обработка полученных результатов показана в табл. 2, откуда видно, что результат, полученный для тестовой серии в системе I характеризуется относительной погрешностью ($\Delta u_I=108$ %), что недопустимо в количественной фотоколориметрии, а в системе II имеет погрешность ($\Delta u_{II}=0,001$ %).

Таблица 2
Оценка точности определения концентрации фенола в тестовой серии растворов по стандартной и апробируемой методикам

Система №	\square , моль/л	Стандартный раствор	
		\bar{Y}_a	ϵ_y
I (рис.2)	$5 \cdot 10^{-3}$	0,008	$8,7 \cdot 10^{-3}$
II (рис.1)	$5 \cdot 10^{-5}$	0,49	$6 \cdot 10^{-6}$

Несмотря на более низкие значения воспроизводимости, чувствительности и более высокий предел обнаружения фенолов в методике, основанной на пероксидазном окислении фенола по сравнению со стандартной фотоколориметрической методикой, ее применение уместно для количественного определения высоких концентраций фенола, в том числе в системах, где присутствуют сильные окислители. Очевидно, что повышение чувствительности предложенной методики возможно при использовании пероксидазы с более высокой степенью очистки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сравнение метрологических характеристик двух апробированных методик показало, что классическая методика с 4-аминоантипирином чувствительнее, имеет более низкий предел обнаружения и более высокую воспроизводимость, однако не подходит для использования в окислительных системах и в системах с концентрацией фенола выше $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.
2. Предложенная методика, основанная на пероксидазном окислении фенола, работает в более широком диапазоне концентраций фенола по сравнению с классической экспрессная, проста в реализации и применима в качестве

полуколичественной методики или в виде тест-систем для он-сайт анализа на содержание фенола в водных системах.

Список литературы

1. Гн 2.1.5.689-98 Предельно допустимые концентрации (пдк) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования
2. Патент РФ, МПК 7 G01N30/04, G01N30/48. Способ хроматографического определения фенолов в сточных водах / К. Г. Боголицын, А. М. Айзенштадт, М. В. Богданов, В. В. Посох; патентообладатель Архангельский государственный технологический университет. – № 2234083; заявл. 25.04.2003; опубл. 10.08.2004.
3. Стыскин, Е. Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е. Л. Стыскин, Л. Б. Ициксон, Е. В. Брауде. – М.: Химия, 1986. – 284 с.
4. Соловьянов А. А. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации летучих фенолов в природных и очищенных сточных водах фотометрическим методом после отгонки водяным паром / А. А. Соловьянов. – М.: Государственный комитет РФ по охране окружающей среды, 1997. – 13 с.
5. Каплин В. Т. Методы анализа органических веществ в природных и сточных водах / В. Т. Каплин, И. Г. Фесенко. – М.: Химия, 1972. – 230 с.
6. Лурье Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова. – М.: Химия, 1974. – С. 275–276.
7. Применение ферментных препаратов с пероксидазной активностью для количественного определения гидрохинона в воде / О. В. Вяткина, А. Н. Кунык, М. В. Биба [и др.] // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2015. – Т. 1 (67), № 1. – С. 204–215.
8. Селибер Г. Л. Большой практикум по микробиологии / Г. Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492с.
9. Вяткина О. В. Влияние морфологии подложки на кинетику пероксидазного окисления гидрохинона в системе с иммобилизованным ферментом, экстрагированным из корнеплодов редьки черной / О. В. Вяткина, М. В. Аралкина, О. Л. Аралкин, [и др.] // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – Т. 4(70), № 2. – С. 183–192.
10. Вяткина О. В. Анализ проблемы определения активности ферментных препаратов / О. В. Вяткина, В. Ю. Бажин, Д. Д. Александрова // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т.5(71), № 4. – С. 248–261.

PEROXIDASE OXIDATION AS AN ANALYTICAL REACTION FOR THE DETERMINATION OF PHENOL IN AQUEOUS OBJECTS

Vyatkina O. V., Iznairova M. D., Bagul E. A.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

The article represents the results of approbation of a new method for the quantitative determination of phenol in aqueous solutions. This method is based on the photocolorimetric identification of the products of its peroxidase oxidation.

Peroxidase was used as a catalyst. It was extracted from a black radish into phosphate buffer with pH=7 without using any additional purification, and it was immobilized on

silica gel. The substrate was deposited from silicate glue "Liquid Glass" (grade B, silicate modulus 2.6–3.0), with the addition of 6M HCl to pH=10. The enzyme was immobilized due to the method of physical sorption under static conditions. The introduction of the obtained catalyst and hydrogen peroxide into aqueous solutions with different phenol contents led to the emergence of a stable color within 10 minutes of exposure.

The experimental dependences of the optical density of oxidizing systems on phenol contributed to the construction of calibration straight lines. The statistical processing of these lines was carried out, which made it possible to evaluate the metrological characteristics of the new technique. A photocolometric method for the determination of phenol based on the formation of colored phenol compounds with 4-aminoantipyrine in the presence of potassium hexacyanoferrate(III) at pH=10 was used as a standard for comparison of metrological characteristics.

It has been found that our suggested method based on phenol peroxidase oxidation works in a wider range of analyte concentrations compared to the standard one, which is more expressive and easy to implement. However, the classical method is more sensitive, has a lower detection limit and higher reproducibility, but at the same time it is not suitable for being used in oxidizing systems and in systems with a phenol concentration above $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L. The suggested method can be used for semi-quantitative determination of phenol and in on-site analysis.

Keywords: peroxidase, enzyme activity, phenol, schedule of calibration.

References

1. *Maximum allowable concentrations (MACs) of chemicals in the water of water objects used for drinking and domestic-recreation purposes*, ss 2.1.5.689–98. (in Russ.)
2. Bogolitsyn K. G., Aisenstadt A. M., Bogdanov M. V., Posokh V. V. *Method of chromatographic determination of phenols in wastewater*. Patent RF, no. 2234083 (2004). (in Russ.)
3. Styskin E. L., *Practical high-performance liquid chromatography*, p. 284, (Chemistry, Moscow, 1986). (in Russ.)
4. Solovyanov A. A., *Quantitative chemical analysis of water. Method of measuring the mass concentration of volatile phenols in natural and treated wastewater by photometric method after steam distillation*, p. 13, (State Committee of the Russian Federation for Environmental Protection, Moscow, 1997). (in Russ.)
5. Kaplin V. T., *Methods for the analysis of organic substances in natural and waste water*, p. 230 (Chemistry, Moscow, 1972). (in Russ.)
6. Lurie Y. Y., Rybnikova A. I., *Chemical analysis of industrial wastewater*, p. 336 (Chemistry, Moscow, 1974). (in Russ.)
7. Vyatkina O. V., Kunyk A. N., Biba M. V., The use of enzyme preparations with peroxidase activity for the quantitative determination of hydroquinone in water, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **67** (1), 204 (2015) (in Russ.)
8. Seliber G. L., *A large workshop on microbiology*, p. 492, (Mir, Moscow, 1962). (in Russ.)
9. Vyatkina O. V., Aralkina M. V., Aralkin O. L., Substrate morphology influence on kinetics of hydroquinone oxidation by means of peroxydase in a system with immobilized enzyme, extracted from root crop of black radish, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **70** (4), 183 (2018) (in Russ.)
10. Vyatkina O. V., Bazhin V. U., Alexandrova D. D., Analysis of the problem of determining the activity of enzyme preparations, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, **71** (5), 248 (2019) (in Russ.)