

Mykhailo V. Gonchar, Marcin Strzelczyk, Mykola M. Maidan, January Bień, Andrei A. Sibirny

Zastosowanie metody enzymatycznej do analizy formaldehydu w roztworach wodnych

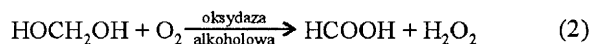
Światową produkcję formaldehydu szacuje się na miliony ton [1]. W związku z taką ilością kontakty z tą toksyczną substancją stają się nieuniknione i powszechne. Znaczne ilości formaldehydu można spotkać w artykułach spożywczych. Wydziela się on również przy rozkładzie wielu mas plastycznych, stanowiąc poważne zagrożenie dla otoczenia. Formaldehyd podrażnia śluzówkę ust, nosa i gardła, wywołuje raka nosa u myszy i szczurów. U małych przebywających w środowisku zawierającym formaldehyd w ilościach, z jakimi styka się człowiek na co dzień, wywołuje zmiany komórkowe podobne do wczesnego stadium raka dróg oddechowych. Stwierdzono także, że formaldehyd wywołuje mutacje u wielu mikroorganizmów [2]. Badania wykazały, że zamrożone produkty rybne mogą zawierać powyżej 200 mg formaldehydu na 1 kg wilgotnej masy, co jest związane z enzymatycznym rozkładem tlenku trimetyloaminy, naturalnego składnika mięsa ryb, który zachodzi nawet w ujemnych temperaturach [3].

Stosowane metody analizy formaldehydu nie są dostatecznie dokładne i czułe, wymagają specjalnych odczynników albo drogich urządzeń, np. chromatografów cieczowych lub gazowych, są też czasochłonne.

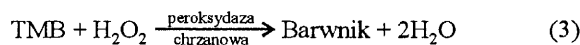
W krajach Europy Środkowoschodniej obserwuje się wzmożone zapotrzebowanie na tanie i proste w obsłudze urządzenia (zestawy analityczne lub czujniki) do oznaczania formaldehydu w ściekach, powietrzu oraz w artykułach spożywczych. Do dziś zestawy enzymatyczne do analizy formaldehydu nie zostały jeszcze opracowane. Wykorzystanie dehydrogenazy formaldehydowej nie jest w pełni skuteczne, ze względu na niestabilność tego enzymu i konieczność stosowania dwóch drogich preparatów, tj. glutationu i dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego – NAD.

Jedną z metod oznaczania metanolu, etanolu i formaldehydu opiera się na wykorzystaniu biosensorów komórkowych skonstruowanych na bazie komórek drożdży metylotroficznych o genetycznie zmienionym metabolizmie [4–7]. Niestety okazało się, że biosensory charakteryzują się niską stabilnością.

Innym podejściem do oznaczania formaldehydu było opracowanie zestawów analitycznych, opartych na wykorzystaniu oksydazy alkoholowej, enzymu wyizolowanego z drożdży metylotroficznych. Enzym ten jest niezbyt specyficzny i oprócz pierwotnych alkoholi (metanol, etanol) może utleniać również formaldehyd, który ulega spontanicznej hydratacji w roztworach wodnych, wytwarzając kwas mrówkowy i nadtlenek wodoru wg reakcji:



Nadtlenek wodoru w reakcji peroksydazowej utlenia chromofor w barwnik wg reakcji:



Oksydaza alkoholowa nie wymaga dodatkowych substancji i jest enzymem stabilniejszym, w porównaniu do dehydrogenazy formaldehydowej. Chociaż teoretycznie możliwość wykorzystania oksydazy alkoholowej do analizy formaldehydu jest uzasadniona, to do tej pory nie zostały podjęte kompleksowe prace badawcze, zmierzające w tym kierunku.

Celem badań omówionych w niniejszej pracy było opracowanie metody wykorzystania oksydazy alkoholowej drożdży metylotroficznych, jako składnika zestawu enzymatycznego ALCOTEST [8], do oznaczania zawartości formaldehydu w roztworach wodnych.

Materiały i metodyka badań

Do badań został wykorzystany chromogen 3,3',5,5'-tetrametylobenzidyna (TMB) produkcji firmy Sigma (Stany Zjednoczone) oraz następujące preparaty enzymatyczne: peroksydaza chrzanowa produkcji firmy Aster (Lwów, Ukraina) o wskaźniku czystości $R_z=0,4+0,6$ oraz oksydaza alkoholowa wyizolowana z cytoplazmy drożdży metylotroficznych K-105, nie zawierających katalazy [9], o aktywności właściwej 1+4 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Wszystkie odczynniki zostały wykorzystane jako składniki zestawu ALCOTEST [8] produkcji firmy UBT (Lwów, Ukraina).

Standardowy roztwór formaldehydu ($1 \text{ mol}/\text{dm}^3$) otrzymano przez hydrolizę paraformaldehydu, tj. mieszaniny polimerów formaldehydu zawierającej od 10 do 100 monomerów w jednej cząsteczce polimeru, w stałej objętości wody w temperaturze 105°C w ciągu 5 godzin, w specjalnie do tego celu przygotowanej ampule. Otrzymany w ten sposób hydrolizat następnie rozcieńczono.

Kalibracja została przeprowadzona według dwóch procedur:

– według standardowej instrukcji do zestawu ALCOTEST, odpowiadającej warunkowi niepełnej reakcji z jej zaprzestaniem, podczas niepełnego przekształcenia analizowanego związku (ok. 10%),

– według metody zmodyfikowanej z wykorzystaniem 5-krotnie wyższego stężenia enzymów, co odpowiadało warunkowi *plateau*, to znaczy praktycznie pełnemu przekształceniu analizowanego związku.

Kalibrowanie prowadzono na wodnych roztworach formaldehydu oraz na ściekach bytowo-gospodarczych z dodatkiem formaldehydu, z tym że w badaniach kalibracyjnych w warunkach niepełnej reakcji z jej zaprzestaniem roztwory modelowe formaldehydu były przygotowane przez rozcieńczenie stężonego roztworu formaldehydu ściekami. W warunkach *plateau* roztwory dodatkowo rozcieńczono wodą destylowaną, tzn. w ostatnim wypadku modelowe roztwory formaldehydu zostały przygotowane na bazie 10-krotnie rozcieńczonych ścieków. Następnie modelowe roztwory zostały poddane reakcji z kwasem trichlorooctowym według instrukcji do zestawu ALCOTEST.

Przeznaczenie zestawu ALCOTEST

Zestaw ALCOTEST służy do ilościowego oznaczania zawartości alkoholu oraz może być wykorzystany do oznaczania formaldehydu w płynach biologicznych nie zawierających alkoholi. Za pomocą zestawu można wykonać 100 analiz (przy objętości próbki 4 cm³). Temperatura przechowywania zestawu wynosi od +4 °C do +8 °C.

Zasady analizy

Formaldehyd w obecności oksydazy alkoholowej utlenia się do kwasu mrówkowego i nadtlenu wodoru, który w sprzężonej reakcji peroksydazowej utlenia TMB do barwnego związku.

Odczynniki

- sucha mieszanina TMB ze składnikami buforu fosforanowego (2,45 g),
- zawiesina oksydazy alkoholowej i peroksydazy chrzanowej w roztworze siarczanu amonu (0,5 cm³),
- roztwór formaldehydu (25 mmol/dm³, 0,75 g/dm³),
- roztwór kwasu trichlorooctowego do odbiaćzania (4%),
- roztwór kwasu solnego (0,8 mol/dm³).

Przygotowanie reagentów

– TMB: zawartość fiołki należy przenieść do kolby stożkowej o pojemności 0,5 dm³, dodać 350 cm³ wody destylowanej i ogrzać do całkowitego rozpuszczenia; przed dalszym użyciem schłodzić do temperatury pokojowej, roztwór przelać do zamkniętego naczynia i przechowywać w temperaturze od +8 °C do +20 °C bez dostępu światła (trwałość do 2 tygodni),

– zawiesina enzymów: po wstrząśnięciu fiołki należy przenieść jej zawartość do roztworu TMB (w temperaturze pokojowej) i wymieszać do całkowitego rozpuszczenia; reagent przygotowuje się i wykorzystuje w dniu analizy. W celu uzyskania reagentu, z uwzględnieniem liczby oznaczeń, należy zmieszać roztwór TMB z zawiesiną enzymów w stosunku 700:1 według wzoru:

$$V_{\text{TMB}} = 3,5 \times N \quad (4)$$

$$V_{\text{enz}} = 0,5 \times N/100 \quad (5)$$

gdzie:

0,5 – zalecana objętość zawiesiny enzymów, cm³

N – liczba analiz do wykonania w danym dniu, włącznie z próbą ślepa oraz standardami

V_{TMB} – objętość roztworu TMB, cm³

V_{enz} – objętość zawiesiny enzymów, cm³

– odczynnik do odbiaćzania: zawartość fiołki (10 cm³ 40% kwasu trichlorooctowego) należy rozcieńczyć 10-krotnie wodą.

Przebieg analizy

W celu odbiaćzania próbki do probówek wirówkowych dodaje się po 0,1 cm³ badanej próbki, a następnie po 0,9 cm³ 4% kwasu trichlorooctowego i dokładnie miesza. Analogicznie należy postąpić z próbą ślepa oraz roztworem standardowym. Próbkę pozostawia się na 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wiruje przy 3000 obr./min przez 10 min. Po odwirowaniu pobiera się po 0,1 cm³ sklarowanej cieczy. Do każdej serii badanych próbek (20+30) wprowadza się próbę ślepa oraz standardową. Reakcja rozpoczyna się w momencie dodania 3,5 cm³ reagentu w ściśle oznaczonym czasie, np. w przedziale 30 s pomiędzy poszczególnymi próbkami. Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej przerywa się reakcję przez dodanie do każdej z próbek 0,5 cm³ HCl o stężeniu 0,8 mol/dm³ w tej samej kolejności i przedziałach czasowych, w jakich dodawano reagent. Absorbancję w próbach oznacza się spektrofotometrycznie wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm. Próbki z formaldehydem przed dodaniem kwasu solnego mają błękitne zabarwienie, które po zakwaszeniu przechodzi w żółte.

Oznaczenia ilości formaldehydu w próbce poddanej analizie fotometrycznej (m, μmol) i jego początkowego stężenia (C, mmol/dm³) w każdej serii oznaczeń przeprowadza się wykorzystując wielkość absorbancji według następującej zależności:

$$m = 0,25 \times E_p/E_s \quad (6)$$

$$C = 10 \times m/0,1 = 100 m \quad (7)$$

gdzie:

0,25 – ilość formaldehydu w standardowej próbce, μmol

E_p – absorbancja próby badanej

E_s – absorbancja standardu

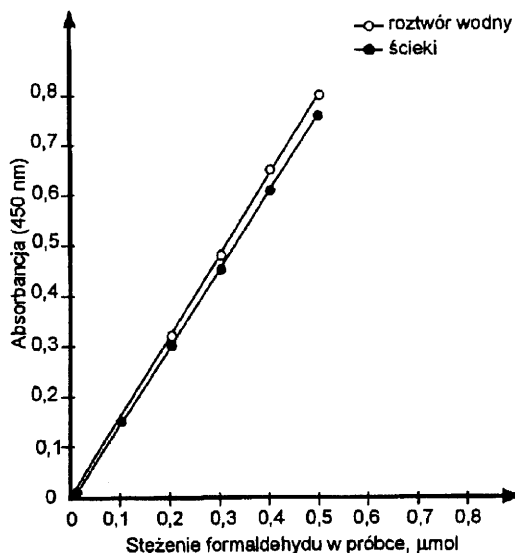
10 – współczynnik rozcieńczania próby przy dodawaniu kwasu trichlorooctowego

0,1 – objętość próbki odbieranej do analizy, cm³

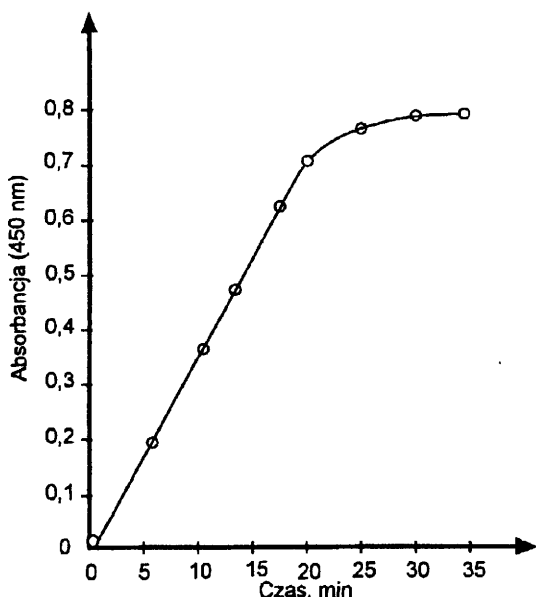
Należy podkreślić, że krzywa kalibracji zachowuje liniowość do 0,5 μmol (15 μg) formaldehydu w oznaczanej próbce, natomiast czas inkubacji może wynosić od 20 do 30 minut, jednakże konieczne jest zachowanie stałego – jednakowego – czasu dla wszystkich próbek. Przy wykonywaniu analizy niedopuszczalna jest obecność w powietrzu par metanolu lub etanolu, względnie innych lotnych rozpuszczalników organicznych oraz substancji utleniających.

Dyskusja wyników

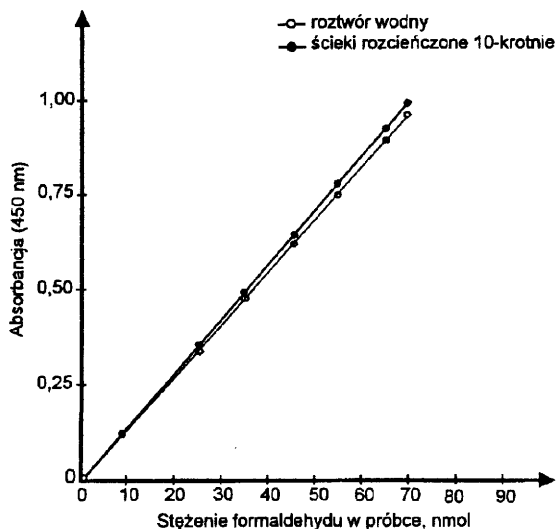
Jak wynika z rysunku 1, liniowość kalibrowanej krzywej, otrzymanej dla wodnych roztworów czystego formaldehydu, w warunkach wykorzystania standardowej instrukcji do zestawu ALCOTEST, utrzymuje się do stężenia formaldehydu 0,5 μmol w próbce oznaczanej fotometrycznie. W tych warunkach analiza odbywa się według schematu niepełnej reakcji z ustalonym czasem inkubacji, co odpowiada około 10% utlenieniu formaldehydu. Warunki *plateau* z praktycznie pełnym utlenieniem formaldehydu (rys.2) wprowadzono po 5-krotnym zwiększeniu stężenia enzymów (oksydazy alkoholowej i peroksydazy chrzanowej) w mieszaninie reakcyjnej, w porównaniu z metodą standardową. W tych warunkach czułość analizy była 10-krotnie wyższa, a liniowość utrzymywała się do stężenia formaldehydu równego 60 nmol w badanej próbce (rys.3).



Rys. 1. Krzywa kalibracyjna do oznaczania formaldehydu w warunkach niepełnego przekształcenia oraz zahamowania reakcji



Rys. 2. Kinetyka reakcji podczas oznaczania formaldehydu (50 nmol w próbce) przy 5-krotnie wyższym stężeniu enzymów niż na rys. 1



Rys. 3. Krzywa kalibracyjna do oznaczania formaldehydu w warunkach plateau przy 5-krotnie wyższym stężeniu enzymów niż na rys. 1

Ta metoda analizy jest jednak droższa, ponieważ wymaga większej ilości enzymów. Oznaczanie z niepełnym przekształceniem oraz zaprzestaniem reakcji jest tańsze i właśnie ta metoda najlepiej nadaje się do zastosowania podczas analizy dużej liczby próbek.

Badania wpływu zanieczyszczeń zawartych w ściękach na oznaczanie formaldehydu w przygotowanych próbkach wykazały, że bez uprzedniego odbiałczenia ścięków kwasem trichlorooctowym następowało praktycznie całkowite zahamowanie reakcji. Przyczyny tego efektu nie są jeszcze znane, jednak ważne jest, że traktowanie ścięków kwasem trichlorooctowym prowadzi do istotnego zmniejszania stopnia inhibicji reakcji (do 90%) w warunkach niepełnego przekształcenia formaldehydu (rys.1). Inhibicja reakcji zostaje praktycznie całkowicie usunięta w warunkach pełnego utleniania formaldehydu dzięki większemu rozcieńczeniu ścięków (rys.3).

Podsumowanie

Próba użycia zestawu ALCOTEST do oznaczania formaldehydu w pomiarach kalibracyjnych, przeprowadzonych na ściękach komunalnych, wykazała możliwość zastosowania tego zestawu do ilościowej analizy formaldehydu w roztworach wodnych.

Dalsze badania zostaną ukierunkowane na poszukiwanie praktycznej i taniej metody przygotowania próbek ścięków do analizy, włącznie z przekształceniem formaldehydu w chemiczny kompleks, co pozwoliłoby jednocześnie na wyizolowanie tego związku z interferujących alkoholi (w wypadku ich obecności w ściękach).

LITERATURA

1. Annual review of the chemical industry, 1989. United Nations, New York 1991.
2. D. D. CHIRAS: Environmental science. The Benjamin/Cummings Publ. Co., Redwood City 1991.
3. H. REBHEIN et al.: Formaldehyd und Dimethylamin in tiefgekühlten Fischerzeugnissen aus dem Handel – eine Bestandsaufnahme. Archiv Lebensmittelhyg., 1995, Vol. 46, S. 122–124.
4. Y. I. KORPAN, M. V. GONCHAR, A. P. SOLDATKIN, N. F. STARODUB, A. I. SHULGA, A. A. SIBIRNY, A. V. ELSKAYA: Methylo-trophic yeast microbiosensor based on ion-selective field effect transistors for methanol and ethanol determination. Anal. Chim. Acta, 1993, Vol. 271, pp. 203–208.
5. Y. I. KORPAN, M. V. GONCHAR, N. F. STARODUB, A. I. SHULGA, A. A. SIBIRNY, A. V. ELSKAYA: A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylo-trophic yeast cells with genetically adjusted metabolism. Anal. Biochem., 1993, Vol. 215, pp. 216–222.
6. Y. I. KORPAN, M. V. GONCHAR, N. F. STARODUB, A. A. SIBIRNY, A. V. ELSKAYA: Methylo-trophic yeast cells as components of biosensors: a formaldehyde analyzer based on a pH-sensitive field effect transistor. Biochemistry (Moscow), 1994, Vol. 59, pp. 141–143.
7. M. V. GONCHAR, A. A. SIBIRNY, Y. I. KORPAN, N. F. STARODUB, A. V. ELSKAYA: Methylo-trophic yeast cells as a bioactive component for sensor development. I. Biochemistry of formaldehyde-induced acidification of the extracellular medium. Biochemistry (Moscow), 1994, Vol. 59, pp. 721–725.

8. M. V. GONCHAR, A. A. SIBIRNY, M. M. MAIDAN, M. M. POKRASION: Analytical kit for enzymatic determination of alcohol in biological liquids – ALCOTEST. Approved by Health Protection Ministry of Ukraine, 1994.

9. M. V. GONCHAR, Y. I. KORPAN, A. A. SIBIRNY: Quantitative photometric analysis of ethanol by means of purified alcohol oxidase and of the mutant cells of methylotrophic yeast. Ukr. Biochem. Zhurn., 1991, Vol. 64, pp. 62–67.

Analysis of Formaldehyde in Aqueous Solutions by the Enzymatic Method

A new sensitive analytical method was developed. The method enables quantitative analysis of formaldehyde (up to 0.75 nmol per 1 cm³ reaction mixture) in aqueous solutions and municipal sewage. For the purpose of the study, use was made of the non-carcinogenic chromogen, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), which is oxidized by hydrogen peroxide in the peroxidase

reaction to form a dye (which can be determined by photometry). The objective of the present study was to examine the efficiency of the enzymatic kit ALCOTEST (containing alcohol oxidase, peroxidase, chromogen and buffering components) when used for the determination of formaldehyde in water solutions and municipal sewage.