

УДК 543.612 + 543.061

**ВІЗУАЛЬНЕ БІНАРНЕ ТЕСТУВАННЯ ДОМІШОК МЕТАНОЛА
В ЕТИЛОВОМУ СПИРТІ****Н.О. Нікітіна^{*,a}, О.О. Решетняк^{*,b}, О.С. Чернишова^{†,c}, Г.С. Власенко^{†,d},
А.О. Беля^{*,e}, А.В. Пантелеймонов^{*,f}**

** Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, хімічний факультет, майдан Свободи, 4, Харків, 61002, Україна*

† Державна наукова установа "Науково-технологічний комплекс "Інститут монокристалів" НАН України, пр. Науки, 60, Харків, 61072, Україна.

- | | | |
|----|--|---|
| a) | ✉ nikitina@karazin.ua | ORCID https://orcid.org/0000-0002-8792-4403 |
| b) | ✉ reshetnyak@karazin.ua | ORCID https://orcid.org/0000-0002-6826-2790 |
| c) | ✉ chernysheva.oks@gmail.com | ORCID https://orcid.org/0000-0001-6981-5310 |
| d) | ✉ annavlasenko@gmail.com | ORCID https://orcid.org/0000-0002-4317-6044 |
| e) | ✉ artem.belya2@gmail.com | ORCID https://orcid.org/0000-0001-5253-327X |
| f) | ✉ panteleimonov@karazin.ua | ORCID https://orcid.org/0000-0003-0265-1264 |

В роботі запропоновано спосіб контролю домішки метанолу в етиловому спирті-ректифікаті і в алкогольних напоях, заснований на візуальному бінарному тестуванні з застосуванням одного зразка порівняння. Для скринінгу спиртовмісних зразків на вміст метанолу обрали індикаторну реакцію взаємодії формальдегіду (продукту окиснення метанолу) з хромотроповою кислотою. Умови проведення індикаторної реакції аналогічні відомій методиці спектрофотометричного визначення метанолу: метанол окислювали перманганатом калію в кислому середовищі до формальдегіду; формальдегід потім реагував з хромотроповою кислотою в присутності гарячої концентрованої сульфатної кислоти з утворенням продукту фіолетового кольору (колір продукту стабільний протягом 12 годин). Встановлено, що спектр поглинання продукту реакції не змінюється при переході від етанольних (96%) до водно-етанольних розчинів з об'ємною часткою етанолу 40%, максимум світлопоглинання відповідав довжині хвилі 570 нм. Всі подальші дослідження проводили у водно-етанольних розчинах з об'ємною часткою етанолу 40%.

Згідно нормативних документів, гранично допустимий вміст метанолу в етиловому спирті сорту "Люкс" (найбільш поширеному в алкогольній промисловості) і алкогольних напоях на його основі ($c_{\text{гран}}$) становить 0.01% об. в перерахунку на безводний етиловий спирт. Зразок порівняння – розчин забарвленого продукту індикаторної реакції – повинен був відповідати концентрації метанолу ($c_{\text{порів}}$) нижче значення $c_{\text{гран}}$ настільки, щоб ризик помилкових негативних результатів тестування не перевищив 5%.

Для оцінювання порогової концентрації ($c_{\text{порів}}$) в зразку порівняння застосовували статистику спостережень. З цією метою готували розчин забарвленого продукту, який відповідав нормованій концентрації метанолу $c_{\text{гран}}=0.01\%$ об. (нормований зразок) і зразки порівняння з меншими концентраціями метанолу. Спостерігачі виявили інтервал ненадійності – область концентрацій метанолу, в якій частота виявлення відмінностей в кольорі зразків порівняння і нормованого зразка, $P(c)$, змінювалася від 0 до 1 – від 0.0072 до 0.010% об. метанолу в перерахунку на безводний спирт.

Виявлений діапазон розбили на 8 концентрацій з кроком $\Delta c=0.0004\%$ об. Приготували три серії розчинів і для кожної концентрації отримали по 48 спостережень. Отриману експериментальну криву ефективності (усереднену залежність $P(c)$) перевірили на відповідність математичним функціям відомих розподілів: нормального, логістичного, логнормального, експоненціального та функції розподілу Вейбула, використовуючи статистичні критерії χ^2 і Колмогорова-Смирнова λ . Криву ефективності описали теоретичні функції логнормального розподілу та розподілу Вейбула. Обчислене при довірчій ймовірності 0.95 значення порогової концентрації метанолу в зразку порівняння склало 0.0073% об. в перерахунку на безводний етиловий спирт. Візуальне бінарне тестування домішки метанолу провели в зразках алкогольних напоїв. Правильність тестування підтвердили методом газової хроматографії.

Ключові слова: метанол, етиловий спирт, алкогольні напої, візуальне бінарне тестування, формальдегід, хромотропова кислота.

Вступ

Першочерговим забруднювачем етилового спирту, що є сировиною для виробництва алкоголю, вважають метанол, який відомий своєю токсичною дією на організм людини навіть при низьких концентраціях. Метаболіти метанолу в організмі людини можуть викликати важкі ме-

таболічні та неврологічні побічні ефекти, які можуть призвести до коми і навіть смерті. Тому контроль вмісту метанола в горілчаних виробах є обов'язковим.

Найбільш поширеними інструментальними методами визначення метанола в етиловому спирті є газо-рідинна хроматографія та молекулярна абсорбційна спектроскопія, хоча є повідомлення й про визначення за допомогою методів Раманівської спектроскопії [1] або фотоелектрохімії [2].

Більшість методик селективного фотометричного визначення метанола базується на ферментативних реакціях за участю алкогольоксидази, формальдегіддегідрогенази, каталази, метанолоксидази [3-10]. В результаті хімічних перетворень послідовно утворюються мурашина кислота, пероксид водню та формальдегід. Перекис водню потім можна визначати за допомогою пероксидази [5]. Межа визначення метанола в такий спосіб є 0.00012-0.00015% об. Поєднання ферменту метанолоксидази та барвника основного фуксину було використано при визначенні вмісту метанола в свіжих фруктових соках з кавуну, моркви, дині, томатів тощо [6]. Але етанол, вміст якого був більшим за 0.01% об., вступав у конкуруючі взаємодії та уповільнював реакцію метанола з ферментом.

В роботі китайських авторів [11] запропоновано визначати метанол за реакцією з нітропруридидом натрію у лужному середовищі з утворенням продукту реакції блакитного кольору. В такий спосіб мінімальна визначувана кількість метанола становила 0.0015% об. Хоча запропонована методика проста, але не може бути застосована до об'єктів аналізу, які містять етанол, бо останній конкурує в реакції з нітропруридидом і чинить заважаючий вплив.

Більшість реакцій візуального виявлення метанола базується на його окисненні до формальдегіду та визначенні останнього за допомогою кольорових реакцій. Найвідомішими є реакції з хромотроповою кислотою, з метиловим фіолетовим, з фуксинсірчистою кислотою (реактивом Шиффа), з кодеїном, з реактивом Фелінга [12].

Ці ж реакції лежать в основі методик напівкількісного та кількісного визначення метанола в етанолі, запропонованих Міжнародною організацією по стандартизації [13,14] та національним стандартом України [15]. Візуальний колориметричний метод використовують для контролю метанола в діапазоні концентрацій 0.10-1.50% об. за реакцію формальдегіду з реактивом Шиффа з утворенням хіноїдного барвника синьо- або червоно-фіолетового кольору. Напівкількісне визначення проводять, використовуючи колірну шкалу порівняння [13]. Для фотометричного визначення метанола в діапазоні концентрацій 0.01-0.20% об. рекомендовано застосовувати реакцію взаємодії формальдегіду з хромотроповою кислотою з утворенням продукту фіолетового забарвлення з максимумом поглинання при довжині хвилі близько 570 нм [14,15].

З перерахованих вище реакцій лише реакція з хромотроповою кислотою є специфічною до метилового спирту, з іншими реагентами окрім формальдегіду в реакції можуть вступати деякі інші альдегіди.

Механізм кольорової реакції між хромотроповою кислотою (4,5-дигідроксинафтален-2,7-дисульфоною кислотою) та формальдегідом у сильноокислому середовищі досі повністю не відомий. Реакційний шлях, який вважається найбільш ймовірним, включає двоступеневий процес (рис. 1) [16]. Сульфатна кислота бере участь в обох стадіях як дегідрант, а в останній - ще як окисник, відновлюючись до сульфітної кислоти.

Недоліками виконання цього класичного методу є використання великого об'єму гарячої концентрованої сульфатної кислоти, вимога кропіткої обробки мурашиної кислоти, яка утворюється в процесі окиснення, та довготривалість виконання методики в цілому. Подальші зусилля вчених були спрямовані на усунення або зменшення цих недоліків: додавання пропанала прискорило процес окиснення метанола [17], модифікування методики скоротило витрати реагентів [18,19] та суттєво зменшило витрати часу [20].

Розглянута індикаторна реакція була обрана нами для візуального бінарного тестування домішки метанола в етиловому спирті, призначеному для виготовлення алкогольних напоїв.

Використання візуального бінарного тестування із застосуванням одного зразка порівняння при скринінгу великої кількості досліджуваних зразків значно спрощує процедуру та скорочує час отримання результату: нема потреби витрачати реагенти та час на проведення градування або приготування кольорової шкали. Зіставляють аналітичні сигнали від зразка порівняння та зразка, що досліджують (контрольного зразка). Варіантами відповідей спостерігачів можуть бути: вміст метанола «більше – менше» нормованої (граничної, небезпечної) концентрації

($c_{\text{гран}}$). Якщо вміст метанолу в зразку буде вище граничного значення, то необхідний кількісний аналіз з використанням підтверджуючих методик; негативний результат буде вважатися правильним і остаточним.

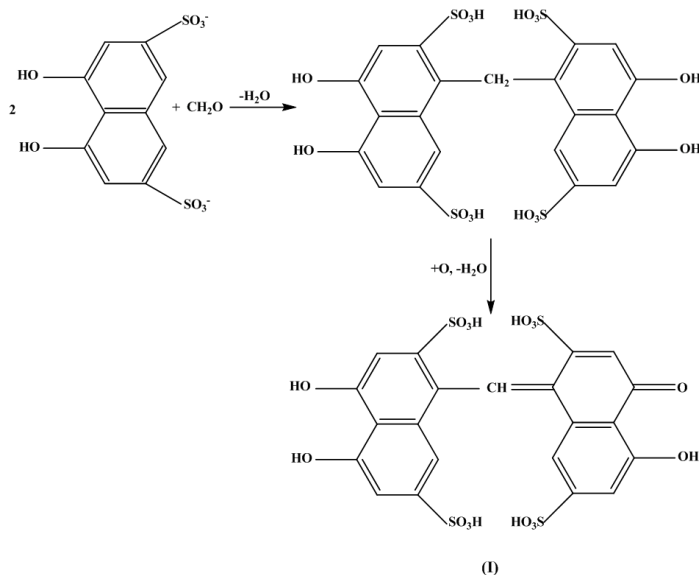


Рисунок 1. Схема реакції взаємодії хромотропової кислоти з формальдегідом [16].

Відповідно до [21,22], в залежності від сорту ректифікованого етилового спирту нормований гранично допустимий вміст метанолу ($c_{\text{гран}}$) коливається від 0.005 до 0.03% об. в перерахунку на безводний етиловий спирт. В етиловому спирті сорту “Люкс” і горілчаних напоях, виготовлених з цього спирту, значення $c_{\text{гран}}$ метанолу становить 0.01% об. в перерахунку на безводний спирт. Оскільки сорт спирту “Люкс” є найпоширенішим у промисловому виготовленні горілчаних напоїв, то саме на це значення $c_{\text{гран}}$ ми орієнтувалися в роботі.

Концентрація метанолу в тест-зразку порівняння ($c_{\text{порів.}}$) називається пороговою. Її величина повинна бути задана нижче $c_{\text{гран}}$ настільки, щоб ймовірність пропуску зразків горілчаних напоїв з вмістом метанолу вище $c_{\text{гран}}$ (небажаних результатів) не перевищувала задану, наприклад, 5%. Процедура оцінювання порогової концентрації в зразку порівняння заснована на статистиці спостережень, її алгоритм і приклади застосування наведені в наших попередніх публікаціях [23-26].

Експериментальна частина

Використовували реактиви кваліфікації х.ч. і ч.д.а., розчини яких готували на дистильованій воді. 2%-ий розчин динатрієвої солі хромотропової кислоти; кислий 1.5%-ий розчин KMnO_4 і 20%-ий розчин Na_2SO_3 готували та зберігали згідно методик, наведених у [15]. Етиловий спирт, 99.6% об., перед використанням додатково очищували за допомогою перегонки та зневоднювали із подальшим застосуванням молекулярних сит з синтетичних цеолітів типу NaA з розміром пор 4.2 Å [27]. Чистоту отриманого після перегонки та зневоднення етилового спирту, 99.85% об., перевіряли методом газової хроматографії.

Метилловий спирт, 99.0% об., застосовували без додаткової очистки. Вихідні розчини із змінним вмістом метанолу готували шляхом внесення аліквоти розведеного водного розчину метанолу потрібної концентрації в мірні колби місткістю 1 мл, додавали 0,4 мл очищеного етилового спирту та доводили до мітки дистильованою водою. В усіх приготованих розчинах об’ємна частка етанолу дорівнювала 40%.

Всі випробування методом хроматографії проводили, застосовуючи газовий хроматограф Agilent 7890A GC System з маселективним детектором Agilent 5975C, автосамплером G4513A; колонкою Varian CP7723CP-WAX 52CP довжиною 50 м, внутрішнім діаметром капіляра 0.25 мм, шаром стаціонарної фази 0.2 мкм, з нерухою фазою 100%-го поліетиленгліколю, виробництва США. Вимірювання проводили за наступних умов: швидкість потоку газу-носія

1.0 мл/хв; початкова температура колонки 50°C, далі нагрівання до 100°C зі швидкістю 5°C/хв і до 250°C зі швидкістю 40°C/хв; температура інжектора 250°C; температура детектора 250°C; коефіцієнт поділу потоку 1:10; об'єм проби 1 мкл.

Індикаторну реакцію (рис. 1) в розчинах виконували згідно зі схемою [15]: у скляні пробірки з пришліфованими корками послідовно вносили по 2 мл вихідного кислого розчину KMnO_4 , 0.2 мл вихідного розчину метанола потрібної концентрації, вміст пробірок перемішували і витримували 3 хв. Потім вносили по 0.4 мл вихідного розчину Na_2SO_3 (для знебарвлення реакційного середовища), перемішували, додавали по 4 мл концентрованої сульфатної кислоти, одразу ж перемішували та пробірки поміщали на 2-3 хв в баню з холодною водою для охолодження розчинів до кімнатної температури. Далі в кожну пробірку вносили по 0.1 мл вихідного розчину динатрієвої солі хромотропової кислоти, вміст пробірок ретельно перемішували і поміщали у баню з киплячою водою на 5 хв. Потім пробірки виймали і охолоджували до кімнатної температури в бані з холодною водою протягом 8-10 хв.

У випадку аналізу проб горілчаних напоїв приготування забарвленого розчину проводили в такий же самий спосіб, але замість аліквоти одного з вихідних розчинів метанола вносили 0.2 мл горілчаного напою.

При непрямому фотометричному визначенні метанола, що міститься в етиловому спирті, градуювальні розчини готували аналогічно описаній вище процедурі, а світлопоглинання кожного з забарвлених розчинів вимірювали на фотоколориметрі КФК-3 при $\lambda=570$ нм в кюветах товщиною 0.5 см відносно розчину холостого зразка. Холостим зразком був етиловий спирт, який точно не містив метанола, та пройшов абсолютно всі стадії підготовки, як і градуювальні розчини [15].

Газохроматографічне визначення вмісту метанола в горілчаних напоях проводили згідно рекомендацій [28]. Вміст метанола оцінювали за отриманою градуювальною залежністю: $S = (3.63 \pm 0.13) \cdot 10^8 \text{ с}$ ($R^2=0.995$). Градуювальні розчини містили 0.005, 0.01, 0.02 і 0.03% об. метилового спирту в перерахунку на безводний етиловий спирт. Для приготування градуювальних розчинів аліквоти 0.1, 0.2, 0.4 і 0.6 мл метилового спирту з концентрацією 0.02% об. вносили до мірної колби місткістю 1.0 мл, додавали відповідно 0.5, 0.4, 0.2 і 0.0 мл дистильованої води та доводили до мітки очищеним безводним етиловим спиртом. Досліджувані зразки горілчаних напоїв вводили у інжектор хроматографа без будь-якої обробки.

При візуальному тестуванні пробірки з приготованими забарвленими розчинами фіолетового кольору з різною інтенсивністю розташовували в штативі. Спостереження проводили “на просвіт” при боковому денному розсіяному освітленні на фоні аркуша білого паперу, який розміщували під кутом 45 градусів до світла, що падав; очі спостерігачів знаходились від штатива з пробірками на відстані 30-40 см.

Оцінку порогової концентрації метанола у зразках порівняння проводили, спираючись на алгоритм [26]:

- 1) Готували тест-зразок (забарвлений розчин продукту індикаторної реакції), що відповідав $c_{\text{гран}}(\text{метанола})=0.01\%$ об. в перерахунку на безводний етиловий спирт. Цей тест-зразок назвали нормованим зразком.
- 2) Готували тест-зразки, що відповідають меншим концентраціям метанола (зразки порівняння).
- 3) 7-10 спостерігачів виявляли інтервал ненадійності – область концентрацій метилового спирту, в якій частота виявлення розбіжностей у забарвленні зразків порівняння та нормованого зразка, $P(c_i)$, змінювалась від 0 до 1. Верхня межа інтервалу відповідала значенню $c_{\text{гран}}$, нижня межа інтервалу відповідала об'ємній частці метилового спирту в індикаторному розчині, розбіжність в забарвленні якого по відношенню до нормованого зразка встановили всі спостерігачі.
- 4) Виявлений інтервал ненадійності розбивали на декілька рівнів концентрацій (k) з рівним концентраційним кроком Δc . Для кожної концентрації c_k за допомогою 15-17 незалежних спостерігачів одержували близько 50 результатів спостережень з трьох експериментальних серій (тричі готували всі зразки порівняння).
- 5) Розраховували частоти виявлення розбіжностей в забарвленні зразків для концентрацій c_k в кожній серії $P(c_k) = n_k / N_k$, де n_k – число позитивних відповідей спостерігачів, N_k – загальна

кількість випробувань в серії. Усереднювали значення частоти за серіями, розраховуючи $\overline{P(c_k)}$ та стандартне відхилення частоти.

- 6) Використовуючи статистичні критерії χ^2 та Колмогорова-Смирнова λ , перевіряли відповідність емпіричної залежності $\overline{P(c_k)}$, так званої кривої ефективності, математичним функціям відомих розподілів (нормального, логістичного, логнормального, експоненціального, Вейбула).
- 7) Обравши вид розподілу, при довірчій ймовірності $P(c)=0.95$ розраховували значення порогової концентрації $c_{\text{порів}}$.

Результати та їх обговорення

На підставі дослідження оптичних властивостей продукту реакції як в 96%-му етанолі, так і в 40%-их водно-етанольних розчинах, встановили: положення смуги поглинання не змінювалось, значення λ_{max} відповідали діапазону 570-575 нм (рис. 2 (а)); інтенсивність світлопоглинання продукту реакції пропорційно зростала зі збільшенням концентрації метилового спирту в досить широкому інтервалі, до якого потрапляло значення $c_{\text{гран}}=0.01\%$ об. (рис. 2 (б)); колір продукту та значення λ_{max} були стабільними протягом 12 годин.

Градувальну залежність описало рівняння $A = (19.74 \pm 0.19) c$ із коефіцієнтом кореляції $R^2 = 0.992$.

Надалі усі дослідження проводили у водно-етанольних розчинах з об'ємною часткою етанолу 40%.

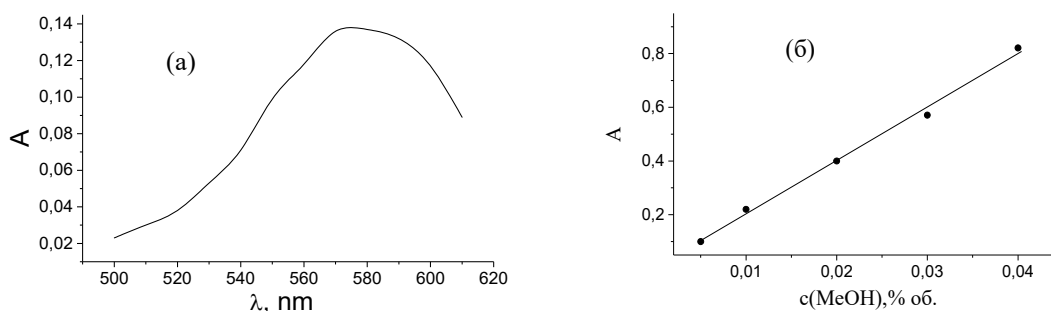


Рисунок 2. (а) – спектр поглинання продукту індикаторної реакції фіолетового кольору при $c(\text{CH}_3\text{OH}) = 0.01\%$ об. та $\varphi(\text{EtOH}) = 40\%$; (б) – графік градувальної залежності в 40%-ому водно-етанольному розчині при $\lambda=570$ нм.

Оцінка порогової концентрації метанолу у зразку порівняння

Згідно описаного вище алгоритму, виявили інтервали ненадійності – від 0.0072 до 0.010% об. метанолу в перерахунку на безводний спирт. Його відносна ширина, розрахована як відношення різниці верхньої та нижньої меж до значення нижньої межі концентрації інтервалу, дорівнює 0.39. Дане значення ширини інтервалу ненадійності менше одиниці, що вказує на стійкість обраної індикаторної реакції до зовнішніх впливів. З іншого боку, для такого вузького інтервалу було достатньо набрати 45-50 результатів спостережень для статистичної оцінки $c_{\text{порів}}$ [29].

Виявлений інтервал ненадійності розбили на 8 концентрацій з кроком $\Delta c = 0.0004\%$ об. Приготували три серії розчинів та для кожної концентрації c_k отримали по 48 спостережень. У кожній серії розраховували частоти виявлення спостерігачами відмінностей в інтенсивності забарвлення розчинів відносно нормованого зразку, усереднили значення частот за серіями та розраховували їх стандартні відхилення (табл. 1).

Перевірили відповідність експериментальної залежності $\overline{P(c_k)}$ в інтервалі ненадійності математичним функціям відомих розподілів: нормального, логістичного, логнормального, експоненціального та функціям розподілу Вейбула, Лапласа і Пуассона, використовуючи статистичні критерії χ^2 і Колмогорова-Смирнова λ (табл. 2). Розрахункові значення $\chi^2_{\text{експ}}$ і $\lambda_{\text{експ}}$ зіставляли з

5%-ми точками теоретичних розподілів χ^2 і λ при числі ступенів свободи $f = n - Z$ (n – число концентрацій, Z – число параметрів функції розподілу). Вид експериментальної кривої ефективності відповідає тому чи іншому виду розподілу, якщо $\chi^2_{\text{експ}} < \chi^2_{P,f}$, $\lambda_{\text{експ}} < \lambda_{P,f}$.

Таблиця 1. Усереднені значення частот та їх стандартні відхилення в інтервалі ненадійності

$c(\text{CH}_3\text{OH}), \% \text{ об.}$	0.0100	0.0096	0.0092	0.0088	0.0084	0.0080	0.0076	0.0072
$\overline{P(c_k)}$	0.000	0.124	0.248	0.373	0.559	0.746	0.872	1.000
$s_k \cdot 10^2$	0.000	0.061	0.244	0.143	0.209	0.477	0.458	0.000

Як випливає з даних таблиці, значення обчислених критеріїв для всіх досліджених видів розподілу менше критичних, але перевагу віддали розподілам з найменшими значеннями обчислених критеріїв – логнормальному та розподілу Вейбула. Обчислене при довірчій ймовірності $P(c)=0.95$ значення $c_{\text{порів.}}$ в зразку порівняння становить 0.0073% об.

Таблиця 2. Параметри математичних функцій для об'єднаної вибірки (значення критеріїв при $P=0.95$ та $f = 6$: $\chi^2_{\text{крит.}} = 12.6$; $\lambda_{\text{крит.}} = 1.36$)

Функція розподілу	Параметри функції	$\chi^2_{\text{експ.}}$	$\lambda_{\text{експ.}}$	$c_{\text{порів.}}$ % об.
нормального	$m = 0.00857$ $s = 0.00087$	0.24	0.053	0.0073
логнормального	$m = 0.00855$ $s = 0.10174$	0.11	0.035	0.0073
експоненційного	$a = 0.00748$ $b = 0.00128$	5.44	0.199	0.0075
логістичного	$a = 0.00857$ $b = 0.00052$	0.27	0.047	0.0070
Вейбула	$a = 0.00672$ $b = 0.00213$ $k = 2.3578$	0.13	0.031	0.0073

Результати бінарного тестування домішок метанолу

Для приготування тест-зразка порівняння спочатку готують вихідний водно-етанольний розчин метанолу з концентрацією 0.0073% об. у перерахунку на безводний етиловий спирт. Для цього в мірну колбу місткістю 1 мл вносять 0.29 мл водного розчину метанолу з об'ємною часткою 0.01%, 0.40 мл очищеного етилового спирту та доводять до мітки дистильованою водою.

Потім у скляну пробірку з пришліфованим корком послідовно вносять 2 мл розчину KMnO_4 , 0.2 мл приготованого вихідного розчину метанолу з концентрацією 0.0073% об., а далі виконують всі дії, зазначені вище для приготування індикаторних розчинів.

Бінарне тестування домішки метанолу провели в пробах горілки «Воздух» та самогону домашнього виробництва. Правильність тестування підтвердили методом газової хроматографії (табл. 3).

Таблиця 3. Результати бінарного тестування та хроматографічного визначення метанолу у пробах горілчаних виробів

Об'єкт аналізу	Вміст метанолу, % об. в перерахунку на безводний етиловий спирт	
	Бінарне тестування	Газова хроматографія ($n=3$; $P=0.95$)
Горілка «Воздух», ТМ «Національна горілчана компанія»	< 0.01	$(9.1 \pm 0.6) \cdot 10^{-4}$
Напій домашнього виробництва (самогон)	< 0.01	$(17 \pm 2) \cdot 10^{-4}$

Висновки

Представленні в статті результати підтверджують можливість рекомендувати методику візуального бінарного тестування з використанням лише одного зразка порівняння для контролю вмісту метанолу як в горілчаних напоях, так і в етиловому спирті сорту “Люкс”. Статистичним методом оцінено значення порогової концентрації метанолу у зразку порівняння для бінарного тестування – 0.0073% об. у перерахунку на безводний етиловий спирт. Оскільки для сортів етилового спирту “Екстра” та “Вищої очистки” нормований гранично допустимий вміст метанолу є вищим, ніж для сорту “Люкс”, та складає 0.02 та 0.03% об. в перерахунку на безводний спирт, відповідно [21], то за необхідності запропонована тест-система може застосовуватись також і для контролю вмісту метанолу в цих сортах спирту. Газохроматографічним методом доведено, що візуальне бінарне тестування метанолу в зразках горілчаних напоїв забезпечує правильні результати.

Якщо в результаті бінарного тестування спостерігачі встановлять, що: а) вміст метанолу в об'єкті аналізу більше величини $c_{\text{гран}}$ або б) інтенсивність кольору продукту індикаторної реакції практично збігається з кольором зразка порівняння, то необхідно провести кількісний аналіз з використанням підтверджуючих методик, наприклад, застосувати методику визначення метанолу методом газової хроматографії.

Література

1. Vaskova H. Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. <https://www.researchgate.net/publication/288094399>
2. Barroso J., Diez-Buitrago B., Saa L., Möller M., Briz N., Pavlov V. Specific bioanalytical optical and photoelectrochemical assays for detection of methanol in alcoholic beverages. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *101*, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.022>
3. Klavons J.A., Bennett R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *34*, 597-599. <https://doi.org/10.1021/jf00070a004>
4. Garcia de Maria Ch., Manzano T., Duarte R., Alonso A. Selective flow-injection determination of methanol using immobilized enzyme reactors. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 241-250. <https://doi.org/10.1021/ac00260a031>
5. Mangos T.J., Haas M.J. Enzymatic Determination of Methanol with Alcohol Oxidase, Peroxidase, and the Chromogen 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and Its Application to the Determination of the Methyl Ester Content of Pectins. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2977-2981. <https://doi.org/10.1021/jf960274z>
6. Min-Chang Wu, Chii-Ming Jiang, Yen-Yi Ho, Szu-Chuan Shen, Hung-Min Chang. Convenient quantification of methanol in juices by methanol oxidase in combination with basic fuchsin. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.017>
7. Sibiraj W., Grabek-Lejko D., Gonchar M. The Use of Enzymes for Ethanol, Methanol, Formaldehyde Determination in Food Products. *J. Microbiol Biotech Food Sci.* **2015**, *4* (5), 393-397. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.5.393-397>
8. Anthon G.E., Barrett D.M. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and the methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.042>
9. Migunova U.M., Zolotova G.A., Dolomanova O.F. Enzymic Method for the Determination of Ethanol and Methanol with Spectrophotometric Detection of the Rate of the Process. *Analyst* **1996**, *121*, 431-433. <https://doi.org/10.1039/AN9962100431>
10. Anthon G.E., Barrett D.M. Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methyltransferase. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3749-3753. <https://doi.org/10.1021/jf035284w>
11. Yan-Yan Zhana, Yan Zhang, Quan-Min Lia, Xin-Zhen Duc. A Novel Visible Spectrophotometric Method for the Determination of Methanol Using Sodium Nitroprusside as Spectroscopic Probe. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2010**, *57*, 230-235. <https://doi.org/10.1002/jccs.201000035>
12. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія: Підруч.: Пер. з рос. К.: Вища шк.: 1995; с. 114-119.

13. ISO 1388-8:1981. Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 8: Determination of methanol content (methanol contents between 0.10 and 1.50 % (V/V)) — Visual colorimetric method
14. ISO 1388-8:1981. Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 7: Determination of methanol content (methanol contents between 0.01 and 0.20 % (V/V)) — Photometric method
15. Спирт етиловий ректифікований. Спирт етиловий-сирець. Правила приймання і методи випробування: ДСТУ 4181:2003 – [Введено 2004-03-01] Київ. : Держстандарт України, 2004. – 34 с.
16. Fagnani E., Melios C.B., Pezza L., Pezza H.R. Chromotropic acid-formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. *Talanta* **2003**, *60*, 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00121-8)
17. Igarashi S. Improved method on the determination of methanol using chromotropic acid. *Japan Analyst* **1973**, *22*, 444-446. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.22.444>
18. Matsukawa M., Hamano M., Ito K., Tanaka T. Simplification of the Colorimetric Method to Detect Methanol Contamination in the Cambodian Local Rice Liquor. *International Journal of Environmental and Rural Development* **2017**, *8-1*, 150-155. https://doi.org/10.32115/ijerd.8.1_150
19. Ghadirzadeh M.R., Rafizadeh A., Fattahi A., Mirtorabi S.D., Nazari H., Rafizadeh M. Introducing a New Kit based on Modified Chromotropic Acid Method for Easy Determination of Methanol. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **2019**, *14 (1)*, 1-6. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2019.1.6>
20. Saadat F., Rafizadeh A. Rapid Determination of Methanol In Herbaceous Distillates For Their Safety Evaluation by A New Modified Chromotropic Acid Method. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2019**, *18 (2)*, 696-703. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100661>
21. Спирт етиловий ректифікований. Технічні умови: Зміна № 1 ДСТУ 4221:2003 – [Введено 2018-06-06] Київ. : ДП «УкрНДНЦ», 2018. – 8 с.
22. Горілки і горілки особливі. Технічні умови: ДСТУ 4256:2003 – [Введено 2004-10-01] Київ. : Держстандарт України, 2004. – 9 с.
23. Решетняк О.О., Німець Н.М., Асмолов В.Е., Пантелеймонов А.В., Холін Ю.В. Спосіб візуального бінарного тестування сульфат-іонів в пробах зворотних супутньо-пластових вод. Пат. на корисну модель №57810. Україна № u 2010 10731; Заявлено 06.09.2010; *Бюл.* 10.03.2011, 5, 6.
24. Решетняк Е.А., Немец Н.Н., Чернышѐва О.С., Пантелеймонов А.В., Островская В.М. Визуальное бинарное тестирование сероводорода, растворенного в возвратных попутно-пластовых подземных водах нефтегазоконденсатных месторождений. *Методы и объекты химического анализа* **2019**, *14 (3)*, 146-152.
25. Решетняк О.О., Німець Н.М., Кравець П.О., Тітова Н.П., Пантелеймонов А.В. Спосіб візуального бінарного тестування Fe(II, III) в наземних та підземних водах. Пат. на корисну модель № 131970. Україна № u 2018 08134; Заявлено 23.07.2018; *Бюл.* 11.02.2019, 3, 5.
26. Решетняк Е.А., Солоха А.Ю., Хаджикова А.А., Пантелеймонов А.В. Образцы сравнения для визуального бинарного тестирования примеси *n*-хлоранилина в субстанции хлоргексидина. *Методы и объекты химического анализа* **2017**, *12 (3)*, 123-129.
27. Дубинин М.М. Синтетические цеолиты. М.: 1962; с. 86.
28. Горілки, спирт етиловий та водно-спиртові розчини. Газохроматографічний метод визначення вмісту мікрокомпонентів: ДСТУ 4222:2003 – [Введено 2004-10-01] Київ. : Держстандарт України, 2004. – 12 с.
29. Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Логинова Л.П., Островская В.М. Предел обнаружения в тестовых методах анализа с визуальной индикацией: влияющие факторы. *Журн. Анал. Химии* **2005**, *60(10)*, 1102-1109.

References

1. Vaskova H. Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks. <https://www.researchgate.net/publication/288094399>
2. Barroso J., Díez-Buitrago B., Saa L., Möller M., Briz N., Pavlov V. Specific bioanalytical optical and photoelectrochemical assays for detection of methanol in alcoholic beverages. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *101*, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.022>

3. Klavons J.A., Bennett R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *34*, 597-599. <https://doi.org/10.1021/jf00070a004>
4. Garcia de Maria Ch., Manzano T., Duarte R., Alonso A. Selective flow-injection determination of methanol using immobilized enzyme reactors. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 241-250. <https://doi.org/10.1021/ac00260a031>
5. Mangos T.J., Haas M.J. Enzymatic Determination of Methanol with Alcohol Oxidase, Peroxidase, and the Chromogen 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and Its Application to the Determination of the Methyl Ester Content of Pectins. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2977-2981. <https://doi.org/10.1021/jf960274z>
6. Min-Chang Wu, Chii-Ming Jiang, Yen-Yi Ho, Szu-Chuan Shen, Hung-Min Chang. Convenient quantification of methanol in juices by methanol oxidase in combination with basic fuchsin. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.017>
7. Sibiraj W., Grabek-Lejko D., Gonchar M. The Use of Enzymes for Ethanol, Methanol, Formaldehyde Determination in Food Products. *J. Microbiol Biotech Food Sci.* **2015**, *4 (5)*, 393-397. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.5.393-397>
8. Anthon G.E., Barrett D.M. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and the methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.042>
9. Migunova U.M., Zolotova G.A., Dolomanova O.F. Enzymic Method for the Determination of Ethanol and Methanol with Spectrophotometric Detection of the Rate of the Process. *Analyst* **1996**, *121*, 431-433. <https://doi.org/10.1039/AN9962100431>
10. Anthon G.E., Barrett D.M. Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methyltransferase. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3749-3753. <https://doi.org/10.1021/jf035284w>
11. Yan-Yan Zhana, Yan Zhang, Quan-Min Lia, Xin-Zhen Duc. A Novel Visible Spectrophotometric Method for the Determination of Methanol Using Sodium Nitroprusside as Spectroscopic Probe. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2010**, *57*, 230-235. <https://doi.org/10.1002/jccs.201000035>
12. Kramarenko V.P. Toxicological Chemistry: Textbook: Per. from the Russians. Kyiv: Higher school: 1995; pp. 114-119. [in Ukr].
13. ISO 1388-8:1981. Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 8: Determination of methanol content (methanol contents between 0.10 and 1.50 % (V/V)) — Visual colorimetric method
14. ISO 1388-8:1981. Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 7: Determination of methanol content (methanol contents between 0.01 and 0.20 % (V/V)) — Photometric method
15. Rectified ethyl alcohol. Raw ethyl alcohol. Acceptance rules and test methods: DSTU 4181:2003 - [Introduced 2004-03-01] Kyiv. : Derzhstandart Ukrainy, 2004. - 34 p. [in Ukr].
16. Fagnani E., Melios C.B., Pezza L., Pezza H.R. Chromotropic acid-formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. *Talanta* **2003**, *60*, 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00121-8)
17. Igarashi S. Improved method on the determination of methanol using chromotropic acid. *Japan Analyst* **1973**, *22*, 444-446. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.22.444>
18. Matsukawa M., Hamano M., Ito K., Tanaka T. Simplification of the Colorimetric Method to Detect Methanol Contamination in the Cambodian Local Rice Liquor. *International Journal of Environmental and Rural Development* **2017**, *8-1*, 150-155. https://doi.org/10.32115/ijerd.8.1_150
19. Ghadirzadeh M.R., Rafizadeh A., Fattahi A., Mirtorabi S.D., Nazari H., Rafizadeh M. Introducing a New Kit based on Modified Chromotropic Acid Method for Easy Determination of Methanol. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **2019**, *14 (1)*, 1-6. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2019.1.6>
20. Saadat F., Rafizadeh A. Rapid Determination of Methanol In Herbaceous Distillates For Their Safety Evaluation by A New Modified Chromotropic Acid Method. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2019**, *18 (2)*, 696-703. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100661>
21. Rectified ethyl alcohol. Technical conditions: Change № 1 DSTU 4221:2003 - [Introduced 2018-06-06] Kyiv. : SE "UkrNDNC", 2018. - 8 p. [in Ukr].

22. Vodkas and vodkas are special. Technical conditions: DSTU 4256:2003 - [Introduced 2004-10-01] Kyiv. : Derzhstandart Ukrainy, 2004. - 9 p. [in Ukr].
23. Reshetnyak O.O., Nimets N.M., Asmolov V.E., Panteleimonov A.V., Kholin Yu.V. Method of visual binary testing of sulfate ions in samples of return concomitant formation waters. Utility model Pat. №57810. Ukraine № u 2010 10731; Claimed 06.09.2010; *Bull.* 10.03.2011, 5, 6. [in Ukr].
24. Reshetnyak E.A., Nemets N.N., Chernyshova O.S., Panteleimonov A.V., Ostrovskaya V.M. Visual Binary Testing of Hydrogen Sulfide Dissolved in Return Underground Local-Water of Oil and Gas Condensate Fields. *Methods and objects of chemical analysis* **2019**, 14 (3), 146-152 [in Russ]. <https://doi.org/10.17721/moca.2019.146-152>
25. Reshetnyak O.O., Nimets N.M., Kravets P.O., Titova N.P., Panteleimonov A.V. Method of visual binary testing of Fe (II, III) in terrestrial and groundwater. Utility model Pat. № 131970. Ukraine № u 2018 08134; Claimed 07.23.2018; *Bull.* 02.11.2019, 3, 5. [in Ukr].
26. Reshetnyak E.A., Solokha A.Yu., Khadzhikova A.A., Panteleimonov A.V. Samples of Comparison for Visual Binary Testing of p-Chloroaniline as Impurity in Substance Chlorhexidine Digluconate. *Methods and objects of chemical analysis* **2017**, 12 (3), 123-129 [in Russ]. <https://doi.org/10.17721/moca.2017.123-129>
27. Dubinin M.M. Synthetic zeolites. Moscow: 1962; p. 86. [in Russ].
28. Vodka, ethyl alcohol and water-alcohol solutions. Gas chromatographic method for determining the content of microcomponents: DSTU 4222:2003 - [Introduced 2004-10-01] Kyiv. : Derzhstandart Ukrainy, 2004. - 12 p. [in Ukr].
29. Reshetnyak E.A., Nikitina N.A., Loginova L.P., Ostrovskaya V.M. Limit of Detection in Test Methods of Analysis with Visual Indication: Affecting Factors. *J. Anal. Chem.* **2005**, 60(10), 982-989. <https://doi.org/10.1007/s10809-005-0221-8>

Надіслано до редакції 23 жовтня 2020 р.

Н.А. Никитина*, Е.А. Решетняк*, О.С. Чернышева†, А.С. Власенко†, А.А. Беля*, А.В. Пантелеймонов*. Визуальное бинарное тестирование примесей метанола в этиловом спирте.

* Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, химический факультет, пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина.

† Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины, пр. Науки, 60, Харьков, 61072, Украина.

В работе предложен способ контроля примеси метанола в этиловом спирте-ректификате и в алкогольных напитках, основанный на визуальном бинарном тестировании с применением одного образца сравнения. Для скрининга спиртосодержащих образцов на содержание метанола выбрали индикаторную реакцию взаимодействия формальдегида (продукта окисления метанола) с хромотроповой кислотой. Условия проведения индикаторной реакции аналогичны известной методике для спектрофотометрического определения метанола: метанол окисляли перманганатом калия в кислой среде до формальдегида; формальдегид затем реагировал с хромотроповой кислотой в присутствии горячей концентрированной серной кислоты с образованием продукта фиолетового цвета (цвет продукта стабилен в течение 12 ч). Установлено, что спектр поглощения продукта реакции не меняется при переходе от этанольных (96%) к водно-этанольным растворам с объемной долей этанола 40%, максимум светопоглощения соответствовал длине волны 570 нм. Все дальнейшие исследования проводили в водно-этанольных растворах с объемной долей этанола 40%.

Согласно нормативных документов, предельно допустимое содержание метанола в этиловом спирте сорта "Люкс" (наиболее распространенном в алкогольной промышленности) и алкогольных напитках на его основе ($C_{\text{пред}}$) составляет 0.01% об. в пересчете на безводный этиловый спирт. Образец сравнения – раствор окрашенного продукта индикаторной реакции – должен был соответствовать концентрации метанола ($C_{\text{сравн}}$) ниже значения $C_{\text{пред}}$ настолько, чтобы риск ошибочных отрицательных результатов тестирования не превысил 5%.

Для оценивания пороговой концентрации ($C_{\text{сравн}}$) в образце сравнения применяли статистику наблюдений. С этой целью готовили раствор окрашенного продукта, который отвечал нормируемой концентрации метанола $C_{\text{пред}}=0.01\%$ об. (нормируемый образец) и образцы сравнения с меньшими концентрациями метанола. Наблюдатели выявили интервал ненадежности – область концентраций метанола, в которой частота обнаружения различий в цвете образцов сравнения и нормируемого образца, $P(c)$, менялась от 0 до 1 — от 0.0072 до 0.010% об. метанола в пересчете на безводный спирт.

Выявленный диапазон разбили на 8 концентраций с шагом $\Delta c = 0.0004\%$ об. Приготовили три серии растворов и для каждой концентрации получили по 48 наблюдений. Полученную экспериментальную кривую эффективности (усредненную зависимость $P(c)$) проверили на соответствие математическим функциям известных распределений: нормального, логистического, логнормального, экспоненциального и функции распределения Вейбула, используя статистические критерии χ^2 и Колмогорова-Смирнова λ . Кривую эффективности лучше описали теоретические функции логнормального распределения и распределения Вейбула. Вычисленное при доверительной вероятности 0.95 значение пороговой концентрации метанола в образце сравнения составило 0.0073% об. в пересчете на безводный этиловый спирт. Визуальное бинарное тестирование примеси метанола провели в образцах алкогольных напитков. Правильность тестирования подтвердили методом газовой хроматографии.

Ключевые слова: метанол, этиловый спирт, алкогольные напитки, визуальное бинарное тестирование, формальдигид, хромотроповая кислота.

N.A. Nikitina*, E.A. Reshetnyak*, O.S. Chernyshova†, H.S. Vlasenko†, A.A. Bielia*, A.V. Panteleimonov*. Visual binary testing of methanol contained in ethyl alcohol.

* V.N. Karazin Kharkiv National University, School of Chemistry, 4 Svobody sqr., 61022 Kharkiv, Ukraine

† SSI "Institute for Single Crystals" NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave, 61072 Kharkiv, Ukraine

A method for control of methanol traces in rectified ethyl alcohol and alcoholic drinks based on visual binary testing using one reference sample was proposed. An indicator reaction of formaldehyde interaction (product of methanol oxidation) with chromotropic acid disodium salt was chosen for methanol screening. The conditions of indicator reaction proceeding are analogous as for the spectrophotometric technique of methanol determination: methanol was oxidized to formaldehyde with potassium permanganate in an acidic medium; the formaldehyde then reacts with chromotropic acid in the presence of hot concentrated sulfuric acid and forms a violet product (color of this product is stable for 12 hours). It was established that the absorption spectrum of the reaction product does not change on going from 96% ethanol to aqueous-ethanol solutions with a volume fraction of 40% ethanol. The maximum light absorption of the reaction product corresponded to 570 nm. All further studies were carried out in water-ethanol solutions with a volume fraction of ethanol of 40%.

According to regulatory documents the normalized limiting content of methanol (c_{lim}) in ethyl alcohol of the "Lux" grade (the most common in the alcoholic industry) and alcoholic beverages is 0.01% by volume counted upon anhydrous alcohol. The comparison sample (the solution of colored reaction product of indicator reaction) had to be less than the normalized level on the value which providing the risk of false-negative test result not more than 5%.

To determination the threshold concentration of methanol in the comparison sample was applied the statistics of observation. For the aim the solution of colored product corresponding to the normalized limiting methanol concentration $c_{lim} = 0.01\%$ by volume was prepared and comparison samples with lower methanol concentrations were also prepared. The interval of unreliability was discovered with the help of observers. The frequency of detecting of the difference in the color of comparison samples and normalized sample ($P(c)$) changed from 0 to 1 in this interval. The value of methanol concentration 0.0072% by volume counted upon anhydrous alcohol was taken for the lower boundary of the interval and the value of methanol concentration 0.01% by volume counted upon anhydrous alcohol was chosen the upper border of the interval.

This interval was divided on eight concentrations with step $\Delta c = 0.0004\%$ by volume. Three parallel series of solutions were prepared and 48 observations for each concentration were received. The experimental efficiency curve obtained was checked for compliance with the mathematical functions of the known distributions: normal, logistic, lognormal, exponential and Weibull distribution function using the statistical criterions χ^2 and Kolmogorov-Smirnov λ . The efficiency curve was described by the theoretical functions of the lognormal and Weibull distributions. Calculated at a confidence level of 0.95 estimation of the threshold concentration for the comparison sample was 0.0073% by volume fraction corresponding to anhydrous alcohol. The visual binary testing of methanol trace in alcoholic drinks was carried out. The accuracy of visual binary testing of methanol was confirmed by gas chromatography.

Keywords: methanol, ethyl alcohol, alcoholic drinks, visual binary testing, formaldehyde, chromotropic acid.