

УДК 543.062: 543.23: 544.42 :57.037

DOI 10.29039/2413-1725-2024-10-4-274-287

## КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Устименко В. Н.<sup>1</sup>, Пономарёва Т. Г.<sup>2</sup>, Ходаков Г. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Крымский инженерно-педагогический университет имени Февзи Якубова, Симферополь, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

<sup>3</sup>Агротехнологическая академия ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия  
E-mail: uvn\_@mail.ru

Впервые кинетический метод анализа (метод тангенсов) применен для количественного определения глюкозы в водных растворах с использованием метиленового синего как вещества-индикатора при pH 9–11. Получены уравнения калибровочных графиков в координатах «тангенсы углов наклона индикаторных прямых–концентрация глюкозы» и «концентрация глюкозы – тангенсы углов наклона индикаторных прямых» в области концентраций глюкозы  $3,47 \cdot 10^{-3}$  –  $2,22$  моль/л. Определены параметры формального кинетического уравнения ( $1,88 \cdot 10^{-7}$  для эффективной константы скорости, порядки реакции по реагентам: первый для глюкозы и  $-0,5$  для метиленового синего).

**Ключевые слова:** глюкоза, метиленовый синий, формальная кинетика, эффективная константа скорости, калибровочный график, статистические критерии, уравнение регрессии.

### ВВЕДЕНИЕ

В работах [1, 2] дан обзор методов определения глюкозы: титриметрических, гравиметрического, ферментативного (глюкозооксидазного), редуктометрического (феррицианидного), колориметрического (орто-толуидинового) и других. Отмечено, что инструментальные методы анализа наиболее селективные, но они достаточно трудоёмкие и затратные. Метод гравиметрический (по Бертрону) наиболее прост и экономичен, оценивается относительной погрешностью не менее 10 %. Известные титриметрические методы требуют дорогих реактивов и достаточно трудоёмки. Например, в объёмном методе прямого титрования Лейна-Эйнона, в отличие от метода Бертрона, титрование определённого объёма раствора Фелинга производят испытуемым раствором с глюкозой (сушлом или вином) при кипячении до полного восстановления окиси меди в закись, применяя в качестве индикатора метиленовый голубой, который восстанавливается редуцирующими сахарами (в частности, глюкозой) и превращается в бесцветное лейкосоединение [3].

Определение глюкозы в продукции сельскохозяйственных производств, как и в растительном сырье, по-прежнему актуально. Особенно это относится к исследованиям динамики фотосинтеза [3, 4], а также к исследованиям продуцирования терпеновых углеводов в растениях-эфироносках с участием

глюкозы и изопрена [5]. Особенностью исследований динамики продуцирования глюкозы в растительном сырье является оперативность получения и расшифровки аналитического сигнала в рабочих пробах «в полевых условиях» вследствие затруднений в процедурах консервации растительных проб либо экстрактов из них. Стационарные лаборатории обеспечивают требуемое качество арбитражного анализа, но по-прежнему актуальны простые и надёжные методики к нему.

Целью настоящей работы является применение кинетического метода к расчётам содержания глюкозы в водных растворах как наиболее чувствительных методов химического анализа [6] и разработка процедуры анализа, приемлемого для исследований «в полевых условиях».

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Готовились три серии растворов глюкозы (декстрозы) объёмами 10 мл, 50 мл и 100 мл с концентрациями (моль/л): 2,22;  $1,11 \cdot 10^{-1}$ ;  $1,11 \cdot 10^{-2}$ ;  $5,56 \cdot 10^{-2}$ ;  $2,78 \cdot 10^{-2}$ ;  $2,08 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,39 \cdot 10^{-2}$ ;  $1,04 \cdot 10^{-2}$ ;  $6,94 \cdot 10^{-3}$ ;  $3,47 \cdot 10^{-3}$ . Растворы готовились последовательным разбавлением водой раствора глюкозы из ампул (раствор для внутривенного введения 400 мг/мл в пересчёте на безводную, ампулы 10 мл, 10 шт. ПЭТ Фармакотерапевтическая группа), где концентрация декстрозы составляла 2,22 моль/л. Для подщелачивания в каждый раствор добавлялась навеска гидроксида калия так, чтобы его концентрация составляла 0,01 моль/л. Растворы термостатировались при температуре 40 °С.

Для каждой серии опытов в химические ёмкости подходящих размеров приливали порциями соответствующий объём аликвоты глюкозы. Ёмкости перед анализом термостатировали 5 мин. Затем мерной пипеткой в ёмкость подливали соответствующий объём раствора титранта (метиленового синего) концентрацией 1 ммоль/л с учетом номера опыта и включали секундомер. Отсчёт времени прекращался при обесцвечивании содержимого ёмкости (время экспозиции). Опыт для каждой аликвоты проводился от 5-ти до 10-ти кратной повторяемости.

Концентрация метиленового синего пересчитана на его разбавление в анализируемой пробе согласно формуле:

$$C(\text{Mc}) = \frac{i \cdot C_0(\text{Mc}) \cdot V_i}{V_{\text{al}} + i \cdot V_i}, \quad (1)$$

где  $C(\text{Mc})$  – общая концентрация добавленного метиленового синего ( $\text{Mc}$ );  $i$ ,  $V_i$  – номер и объём приливаемого раствора  $\text{Mc}$ ;  $V_{\text{al}}$  – объём исследуемой аликвоты.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ был разделен на серии опытов из-за необходимости выявления аналитических границ определения глюкозы в аликвоте, размеров самой аликвоты, а также приемлемых соотношений концентраций метиленового синего и определяемой глюкозы. Исследовались три серии аликвот растворов глюкозы различного объёма, к каждой из которых добавлялись многократно (6–10 раз) одни

и те же объёмы раствора метиленового синего и регистрировалось время их обесцвечивания.

Процедура кинетического анализа отличалась от известных методов отслеживания количественных изменений реагентов во времени с помощью регистрирующих приборов, поскольку интенсивное окрашивание аликвоты Мс, играющего роль реагента-индикатора, затрудняла регистрацию приборами её ослабления со временем по ходу реакции. Напротив, использовалось положение об инерционном протекании сложных реакций с наличием лимитирующей стадии [7], – добавление реагента-индикатора порциями инициировало накопление в растворе продуктов реакции глюкозы с метиленовым синим. Накопление бесцветных форм продуктов реакции синхронно соответствовало полному расходованию окисленной формы Мс, – графики на рисунках 1–3 и уравнения регрессий в таблице 1 отобразили динамику изменения скорости соответствующих процессов. Сама процедура анализа напоминала «титрование во времени» (или «кинетическое титрование»). Ход кривых показывает замедление процесса восстановления глюкозой метиленового синего по мере накопления продуктов реакции, причём, это не могло быть связанным с расходом самой глюкозы, взятой в избытке на несколько порядков (в сто и более раз). Такая кинетика объясняется: а) многостадийностью механизма реакции, б) наличием замедленной стадии и в) ингибированием процесса продуктами реакции [6].

Для сложных реакций согласно [9] применим любой способ линеаризации получаемого аналитического сигнала. Оказалось, что степенная функция от концентрации метиленового синего (в степени 1,5) достаточно эффективно превращает нелинейные графики в линейные, как показано на рисунках 1–3 и соответствующими уравнениями регрессий согласно таблице 1.

Рисунки 1–3 отображают функциональную связь наблюдаемых времён экспозиции с концентрациями индикаторного реагента (Мс): А – в степени один и Б – в степени 1,5.

Именно тангенсы углов наклона прямых на рисунках 2Б, 3Б, 4Б зависимы от величины концентраций глюкозы в начальных аликвотах и использовались далее для построения калибровочных графиков к определению глюкозы в соответствующих сериях растворов.

Линии графиков на рисунках 1–3 для всех одиннадцати исследованных растворов получены с помощью прикладных пакетов MS Excel как «линии тренда» [8] с отображением уравнений регрессии и значений коэффициентов детерминации  $R^2$ , представленных в таблице 1. Коэффициенты при переменных в таких линейных уравнениях (столбец 2) представляют собой искомые тангенсы наклона соответствующих прямых линий к оси времён.

Данные таблицы 1 (столбец 2) позволили применить метод тангенсов [6] для построения калибровочных графиков «С(Гл)–тангенс угла наклона линии регрессии» для каждой серии испытанных растворов глюкозы (рис. 4).

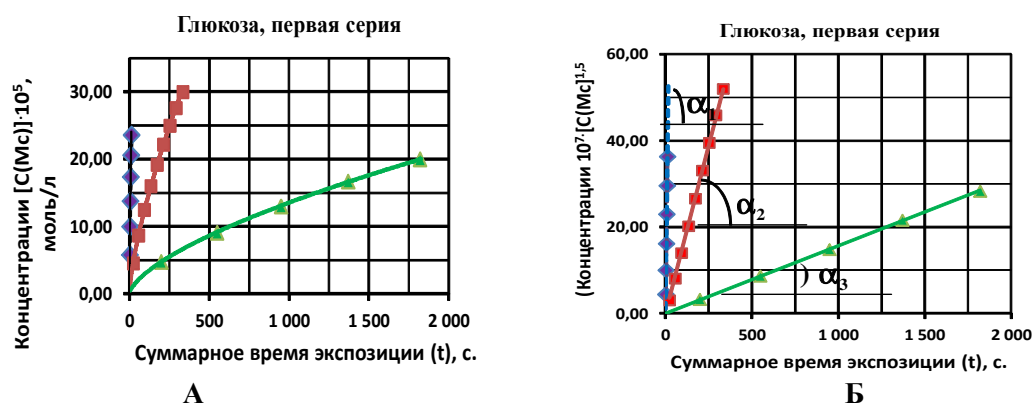


Рис. 1. Графические исследования кинетики восстановления метиленового синего в аликвотах глюкозы первой серии объёмом 10,0 мл с концентрациями (моль/л):  $\blacklozenge$  2,22;  $\blacksquare$   $1,11 \cdot 10^{-1}$ ;  $\blacktriangle$   $1,11 \cdot 10^{-2}$ , причём А – результаты прямых измерений времени и задаваемой концентрации вещества-индикатора и Б – связь прямых измерений времени со степенной функцией концентрации

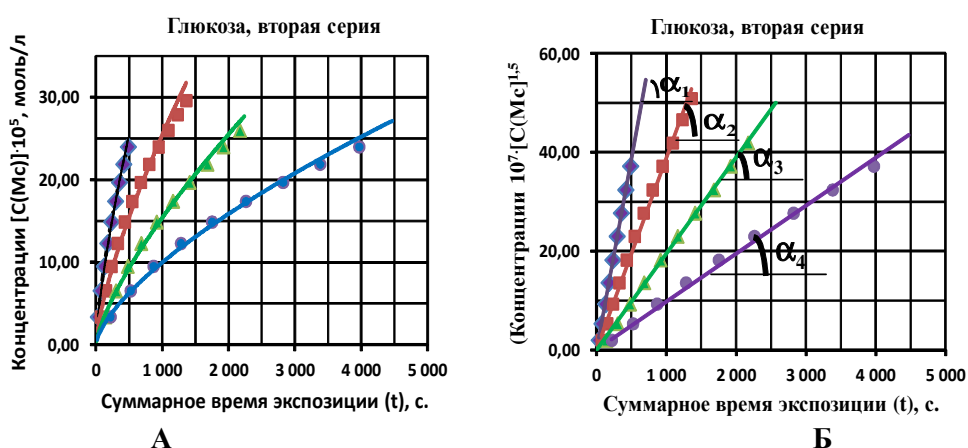


Рис. 2. Графические исследования кинетики восстановления метиленового синего в аликвотах глюкозы второй серии объёмом 50,0 мл с концентрациями (моль/л):  $\blacklozenge$   $5,55 \cdot 10^{-2}$ ;  $\blacksquare$   $2,78 \cdot 10^{-2}$ ;  $\blacktriangle$   $1,39 \cdot 10^{-2}$ ;  $\bullet$   $6,94 \cdot 10^{-3}$ , причём А – результаты прямых измерений времени и задаваемой концентрации вещества-индикатора и Б – связь прямых измерений времени со степенной функцией концентрации

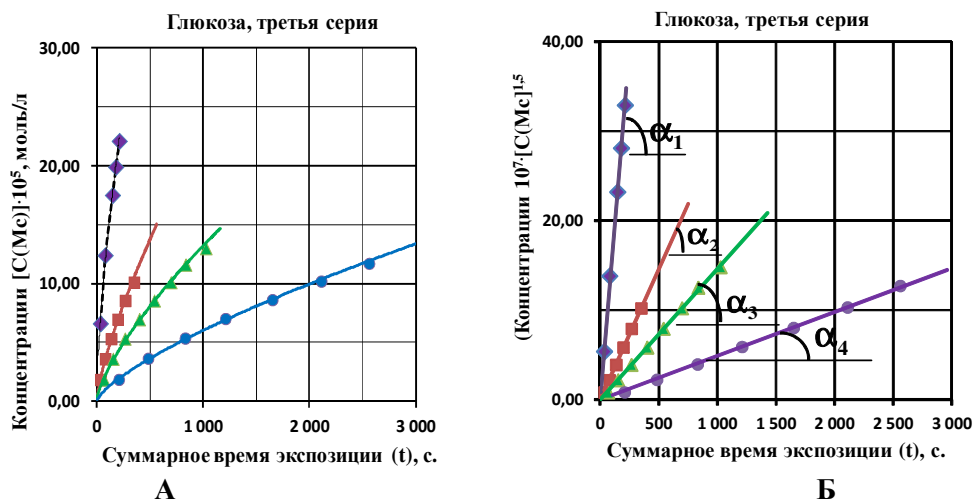


Рис. 3. Графические исследования кинетики восстановления метиленового синего в аликвотах глюкозы третьей серии объёмом 100,0 мл с концентрациями (моль/л):  $\blacklozenge$   $1,11 \cdot 10^{-1}$ ;  $\blacksquare$   $2,08 \cdot 10^{-2}$ ;  $\blacktriangle$   $1,04 \cdot 10^{-2}$ ;  $\bullet$   $3,47 \cdot 10^{-3}$ , причём А – результаты прямых измерений времени и задаваемой концентрации вещества-индикатора и Б – связь прямых измерений времени со степенной функцией концентрации

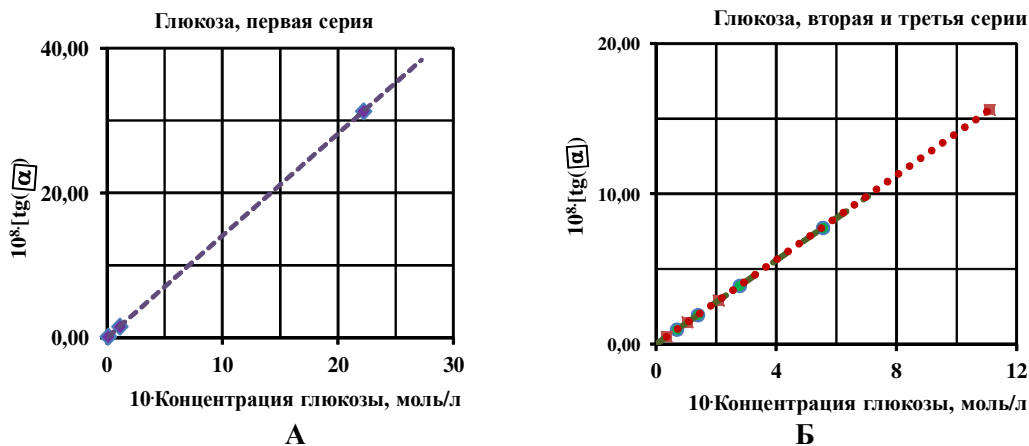


Рис. 4. Калибровочные графики для соотношения величин тангенсов наклона (рис. 2–4) с содержанием глюкозы в аликвотах: А–для первой серии растворов; Б– для второй серии растворов  $\blacksquare$  и третьей серии растворов  $\bullet$

Таблица 1

Уравнения регрессии и коэффициенты детерминации  $R^2$  для графических исследований кинетики восстановления метиленового синего в растворах глюкозы

Концентрация глюкозы в аликвоте, моль/л	Уравнения линейных графиков «время экспозиции – $[C(Мс)]^{1,5}$ »	Коэффициенты детерминации $R^2$
1	2	3
<b>При анализе растворов первой серии</b>		
2,22	$[C(Мс)]^{1,5} = (3,13 \cdot 10^{-7}) \cdot t$	$R^2 = 0,997$
$1,11 \cdot 10^{-1}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (1,56 \cdot 10^{-8}) \cdot t$	$R^2 = 0,999$
$1,11 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (1,56 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 1,000$
<b>При анализе растворов второй серии</b>		
$5,55 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (7,74 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 0,999$
$2,78 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (3,88 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 0,994$
$1,39 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (1,94 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 0,999$
$6,94 \cdot 10^{-3}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (9,73 \cdot 10^{-10}) \cdot t$	$R^2 = 0,994$
<b>При анализе растворов третьей серии</b>		
$1,11 \cdot 10^{-1}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (1,56 \cdot 10^{-8}) \cdot t$	$R^2 = 0,997$
$2,08 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (2,91 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 0,998$
$1,04 \cdot 10^{-2}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (1,46 \cdot 10^{-9}) \cdot t$	$R^2 = 0,999$
$3,47 \cdot 10^{-3}$	$[C(Мс)]^{1,5} = (4,89 \cdot 10^{-10}) \cdot t$	$R^2 = 0,999$

Обозначения в таблице 1:  $R^2$  – коэффициент детерминации регрессионного уравнения согласно уравнению (2) [8, С. 248]:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i \{ [C(Мс)]^{1,5}_i - [C(Мс)]^{1,5}_p \}^2}{\sum_i \{ [C(Мс)]^{1,5}_i - [C(Мс)]^{1,5} \}^2}, \quad (2)$$

где  $[C(Мс)]^{1,5}_i$  – опытная (задаваемая) величина концентрации реагента-индикатора (в степени 1,5);  $[C(Мс)]^{1,5}_p$  – концентрация реагента-индикатора (в степени 1,5), рассчитываемая из уравнения регрессии согласно наблюдаемому времени экспозиции (столбец 3 в таблице 1);  $[C(Мс)]^{1,5}$  – среднее значение всех

величин  $[C(Мс)]^{1,5}$  вдоль оцениваемой линии регрессии. Чем ближе значение  $R^2$  к единице, тем больше уравнение регрессии статистически значимо.

Калибровочным прямым линиям на рисунке 4 соответствуют уравнения регрессии:

в первой серии растворов (рис. 5А)  $tg(\alpha) = 1,41 \cdot 10^{-7} \cdot C(Гл) (R^2 = 1,000)$ ;

во второй серии растворов  $tg(\alpha) = 1,39 \cdot 10^{-7} \cdot C(Гл) (R^2 = 1,000)$ ;

в третьей серии растворов  $tg(\alpha) = 1,40 \cdot 10^{-7} \cdot C(Гл) (R^2 = 1,000)$ .

Из данных рисунка 4 сделано предположение, что угловые коэффициенты калибровочных линий регрессии имеют близкие значения, а лежащие на них экспериментальные точки статистически принадлежат к одной генеральной совокупности вычисляемых величин [9].

Для проверки сравнивались дисперсии локальных величин  $tg(\alpha)/[C(Гл)] \equiv h_n$  вдоль калибровочных линий регрессии как показано в таблице 2 (столбцы 3–5).

**Таблица 2**

**Расчётные значения тангенсов наклона прямых линий  $tg(\alpha) = d[C(Мс)]^{1,5}/dt$  из таблицы 4 и соотношение их с концентрациями глюкозы в соответствующих сериях растворов согласно рис. 5**

Тангенсы наклона прямых для растворов глюкозы из таблицы 4 (столбец 2)		Отношения $tg(\alpha)/[C(Гл)] \equiv h_n$		
		Серии исследованных растворов		
К-ция Гл, моль/л	$tg(\alpha) \cdot 10^9$	Серия 1	Серия 2	Серия 3
1	2	3	4	5
$3,47 \cdot 10^{-3}$	0,49			$1,41 \cdot 10^{-7}$
$6,94 \cdot 10^{-3}$	0,97		$1,40 \cdot 10^{-7}$	
$1,04 \cdot 10^{-2}$	1,46			$1,40 \cdot 10^{-7}$
$1,11 \cdot 10^{-2}$	1,56	$1,40 \cdot 10^{-7}$		
$1,39 \cdot 10^{-2}$	1,94		$1,40 \cdot 10^{-7}$	
$2,08 \cdot 10^{-2}$	2,90			$1,39 \cdot 10^{-7}$
$2,78 \cdot 10^{-2}$	3,88		$1,40 \cdot 10^{-7}$	
$5,56 \cdot 10^{-2}$	7,74		$1,39 \cdot 10^{-7}$	
$1,11 \cdot 10^{-1}$	15,70	$1,41 \cdot 10^{-7}$		
$1,11 \cdot 10^{-1}$	15,56			$1,40 \cdot 10^{-7}$
2,22	312	$1,41 \cdot 10^{-7}$		
<b>Средние, <math>\bar{h}</math></b>		<b><math>1,41 \cdot 10^{-7}</math></b>	<b><math>1,40 \cdot 10^{-7}</math></b>	<b><math>1,40 \cdot 10^{-7}</math></b>
<b>Дисперсии, <math>s^2</math></b>		<b><math>3,03 \cdot 10^{-19}</math></b>	<b><math>2,09 \cdot 10^{-19}</math></b>	<b><math>5,97 \cdot 10^{-19}</math></b>

Получены три ряда таких значений (столбцы 3–5) и значения соответствующих им дисперсий ( $s^2$ ) относительно среднего по формуле (3) [9]:

$$s^2 = \frac{\sum_{n} (h_n - \bar{h})^2}{n-1}, \quad (3)$$

где  $h_n$  – расчётные величины  $\text{tg}(\alpha)/[C(\text{Гл})] \equiv h_n$  в каждой серии растворов,

$\bar{h}$  – средние значения для серии;  $n$  – номер аликвоты.

Проверка значимости сделанного предположения показала высокий уровень его достоверности согласно критерию Фишера  $F$  (4) [9, С. 63]:

$$F = \frac{S_{\max}^2}{S_{\min}^2} < F_{\text{критич.}}(f_1, f_2, \alpha). \quad (4)$$

Из трёх дисперсий (табл. 2) сравнивались наименьшая (столбец 4) и наибольшая (столбец 5) [9]:, именно :

$$F = 5,97 \cdot 10^{-19} / 2,09 \cdot 10^{-19} = 2,86 < F(3; 3; 0,5) = 9,28.$$

Согласно критерию Фишера, рассмотренные дисперсии однородны, и три различные калибровочные линии регрессии могут быть приведены к одной (рис. 5, б), т.е. результаты калибровки по каждой серии растворов равнозначны, и процедура анализа не зависима от условий приготовления и смешивания растворов реагентов при 40 °С.

По данным всех серий исследованных растворов глюкозы из таблицы 2 составлены обобщённые калибровочные графики в координатах «концентрация С(Гл) в аликвотах – тангенсы наклонов прямых временных зависимостей» и «тангенсы наклонов прямых временных зависимостей – концентрация С(Гл) в аликвотах», инвариантных друг другу (рис. 5, б).

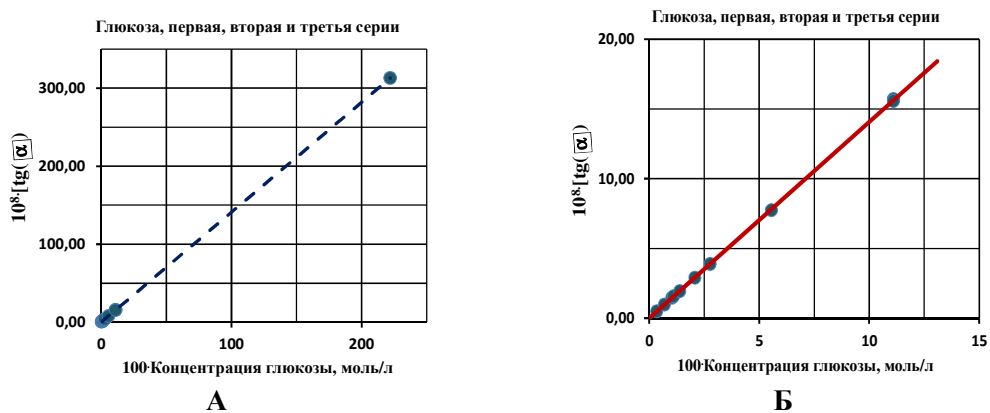


Рис. 5. Калибровочные графики к методу тангенсов по теме статьи: А – в широкой области концентраций глюкозы ( $3,47 \cdot 10^{-3} - 2,22$  моль/л) и Б – в области менее концентрированных растворов глюкозы ( $3,47 \cdot 10^{-3} - 1,11 \cdot 10^{-1}$  моль/л).

Полученным графикам соответствует обобщённое уравнение регрессии:



$$\operatorname{tg}(\alpha) = 1,41 \cdot 10^{-7} \cdot C(\text{Гл}) \quad (R^2 = 1,000) . \quad (3)$$

На практике более удобно уравнение с обратной зависимостью переменных:

$$C(\text{Гл}) = 7,11 \cdot 10^{+6} \cdot \operatorname{tg}(\alpha), \text{ моль/л}, \quad (4)$$

которому соответствует иной калибровочный график (рис. 6)



Рис. 6. Калибровочный график к методу тангенсов по теме статьи в области менее концентрированных растворов глюкозы ( $3,47 \cdot 10^{-3} - 1,11 \cdot 10^{-1}$  моль/л).

Полученные калибровочные линии регрессии позволяют достаточно эффективно определять концентрацию глюкозы в аликвотах в пределах  $3,47 \cdot 10^{-3} - 1,11 \cdot 10^{-1}$  моль/л и  $3,47 \cdot 10^{-3} - 2,22$  моль/л (рис. 5, 6) с минимальными затратами реагентов и времени, – достаточно фиксировать суммарное время наблюдения синей окраски раствора при добавках к аликвоте (5–10 раз) по 0,5–2,0 мл раствора метиленового синего концентрацией 1,0 ммоль/л. Чувствительность метода составила 3,5–4,0 ммоль/л глюкозы или, в пересчёте на титр, около 0,72 мг/мл.

Для проверки чувствительности метода проводилось тестирование смеси растворов с разным содержанием глюкозы. **Тест № 1** – смешивались 1:1 растворы с глюкозой концентрацией  $1,39 \cdot 10^{-2}$  и  $2,78 \cdot 10^{-2}$  моль/л, а в **тесте № 2** –  $1,39 \cdot 10^{-2}$  и  $6,94 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

**Процедура анализа включала:** 1) нагрев аликвот до  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2) 10-разовое вливание в неё по 2,0 мл раствора метиленового синего концентрацией 1,0 ммоль/л, 3) наблюдение исчезновения синей окраски аликвоты с соответствующим фиксированием времени экспозиции, 4) расчёты изменений концентраций реагента-индикатора по мере разбавления его раствора в аликвоте согласно уравнению (1),

5) возведения их величин в степень 1,5; 6) построение графика в координатах «время экспозиции–[C(Мс)]<sup>1,5</sup>; 7) расчёт тангенса наклона полученной прямой линии к абсциссе, – он составил  $2,90 \cdot 10^{-9}$  в первом тесте и  $1,46 \cdot 10^{-9}$  во втором.

Подстановка значений этих тангенсов в обобщённое калибровочное уравнение регрессии (4) показала результаты:  $(7,11 \cdot 10^{+6}) \cdot (2,90 \cdot 10^{-9}) = 20,65 \cdot 10^{-3}$  и  $(7,11 \cdot 10^{+6}) \cdot (1,46 \cdot 10^{-9}) = 10,40 \cdot 10^{-3}$  моль/л для каждого теста. Тестируемые растворы изначально содержали  $20,62 \cdot 10^{-3}$  и  $10,48 \cdot 10^{-3}$  моль/л глюкозы.

Относительные погрешности анализа тестов здесь составили 0,14 % и 0,77 % соответственно. Приём смешивания растворов известной концентрации с анализируемым применяется в методе добавок и весьма эффективен при анализе растворов глюкозы с низкой её концентрацией, например, в экстрактах природного сырья.

**Примечание 1.** Графики в таблицах получены после исключения первых 1–2 времён экспозиции и, соответственно, исключением из расчётов первых 1–2 порций добавленного реагента-индикатора. Последнее связано с невозпроизводимостью времени индукционных периодов для первых порций реагента-индикатора. Однако, далее интервалы наблюдаемых времён обесцвечивания аликвот обеспечивали хорошую воспроизводимость рассмотренных тангенсов углов наклона, отмеченных во всех таблицах.

**Примечание 2.** Графики в таблицах строились после приведения времени экспозиции к температурным условиям 40 °С.

**Примечание 3.** При контроле температуры водяного термостата важно вести регулярную запись её изменений. Измерения можно не прерывать на установление её значения точно 40 °С, поскольку из массивов данных при регистрируемых колебаниях температуры была определена величина постоянной Вант-Гоффа согласно формуле (6):

$$\frac{t_2}{t_1} = \gamma^{(T_1 - T_2) \cdot 0,1}, \quad (5)$$

$$\text{откуда} \quad \gamma = \left( \frac{t_2}{t_1} \right)^{1/[(T_1 - T_2) \cdot 0,1]}, \quad (6)$$

где T – температура аликвоты, t – время экспозиции.

Всего было проведено 40 парных замеров времени экспозиции в интервалах 8,00–12,00–20,00–30,00–60,00–120,00 с. и диапазонах температур 35–40–55–65 °С.

Найдены значения температурного коэффициента Вант-Гоффа в пяти сериях измерений: 3,28; 3,36; 3,80; 3,65; 3,15. Принято его среднее значение  $3,45 \pm 0,01$  с доверительной вероятностью 80 %.

**Примечание 4.** Полученные данные позволили определить некоторые параметры формального кинетического уравнения процесса восстановления глюкозой метиленового синего в условиях большого молярного избытка глюкозы следующим образом.

1. Преобразованием формулы формальной скорости реакции (7), именно:

$$v_p = -\frac{dC(\text{Mc})}{b \cdot dt} = k \cdot [C(\text{Гл})]^a [C(\text{Mc})]^b, \quad (7)$$

где  $a, b$  – порядки реакции по глюкозе и метиленовому синему (ещё не известные).

2. Поскольку  $C(\text{Гл})$  в аликвотах остаётся практически неизменной, потребуем, чтобы нашлось уравнение касательной к кривой скорости как постоянной величины:

$$\frac{d[C(\text{Mc})]^{(1-b)}}{(1-b) \cdot b \cdot dt} = -k \cdot [C(\text{Гл})]^a \cong \text{const.}, \quad (8)$$

$$\frac{d[C(\text{Mc})]^{(1-b)}}{dt} = -k \cdot [C(\text{Гл})]^a \cdot (1-b) \cdot b \cong \text{const.} \quad (9)$$

Но в эксперименте все тангенсы углов наклона прямых линий регрессии к оси времён (к абсциссе) описываются выражением:

$$\frac{d[C(\text{Mc})]^{1,5}}{dt} \cong \text{const. при } C(\text{Гл}) \square \text{const.} \quad (10)$$

3. Сопоставлением уравнений (9) и (10) получается, что  $1,5 = 1 - b$ , откуда  $b = -0,5$ . Получается рабочее выражение для наблюдаемых тангенсов углов наклона линий регрессии с положительным значением (11):

$$\frac{d[C(\text{Mc})]^{1,5}}{dt} = +0,75 \cdot k \cdot [C(\text{Гл})]^a \cong \text{const.} \quad (11)$$

4. Порядок реакции по  $C(\text{Гл})$  определить с помощью приборов не удаётся из-за сильной цветности растворов при избытке метиленового синего. Однако в условиях проводимого анализа эффективный порядок по глюкозе ( $a$ ) соответствует единице, как это и предусматривает используемый метод тангенса, – это подтверждается типом линий регрессии как калибровочных прямых [6].

5. Из уравнения (11) были рассчитаны значения эффективной константы скорости ( $k$ ), именно:

$$k = \frac{d[C(\text{Mc})]^{1,5}}{dt} / \{0,75 \cdot [C(\text{Гл})]^a\} = \frac{\text{tg}(\alpha)}{0,75 \cdot [C(\text{Гл})]}. \quad (12)$$

Из уравнений регрессии в таблице 1 (столбцы 2) и формулы (12) следует, что достаточно коэффициент обобщённого калибровочного уравнения ( $h_n$ ) поделить на число 0,75, чтобы найти значение константы скорости:

$$k = \frac{\text{tg}(\alpha)}{0,75 \cdot [C(\text{Гл})]} = \frac{h_n}{0,75} = \frac{1,41 \cdot 10^{-7}}{0,75} = 1,88 \cdot 10^{-7}. \quad (13)$$

6. Исследование механизма процесса восстановления глюкозой метиленового синего в щелочной среде в статье не предусматривалось.

В итоге нами предложена процедура хода анализа, именно: 1) нагрев аликвот до  $40^\circ\text{C}$ , 2) 6–10 раз вливание в неё по 2,0 мл раствора метиленового синего концентрацией 1,00 ммоль/л, 3) наблюдение исчезновения синей окраски аликвоты с соответствующим фиксированием времени экспозиции ( $t$ ), 4) расчёты изменений концентраций реагента-индикатора по мере разбавления его раствора в аликвоте

согласно уравнению (1), 5) возведения их величин в степень 1,5; 6) построение графика в координатах «время экспозиции  $t$  –  $[C(Mc)]^{1,5}$ »; 7) расчёт тангенса угла наклона полученной прямой линии к абсциссе  $\text{tg}(\alpha)$ , 8) подстановка значения этого тангенса в обобщённое уравнение регрессии (13):

$$C(\text{Гл}) = (7,11 \cdot 10^{+6}) \cdot \text{tg}(\alpha), \quad (13)$$

где 
$$\text{tg}\alpha = \left. \frac{d[C(Mc)]^{1,5}}{dt} \right|_{C(\text{Гл})=\text{const}} \quad (14)$$

при условии  $C(\text{Гл}) \gg C(Mc)$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые кинетический метод анализа (в частности, метод тангенсов) применен для количественного определения глюкозы в водных растворах с использованием метиленового синего как вещества-индикатора при pH 9–11. Впервые получены калибровочные графики и соответствующие инвариантные уравнения линий регрессии в координатах «Тангенсы угла наклона функции концентрации  $C(Mc)$  к абсциссе–концентрация глюкозы  $C(\text{Гл})$ » и «концентрация глюкозы  $C(\text{Гл})$ –Тангенсы угла наклона функции концентрации  $C(Mc)$  к абсциссе.
2. Показана возможность использовать метод тангенсов для определения некоторых параметров соответствующего кинетического уравнения. Рассчитаны значения: а)  $1,88 \cdot 10^{-7}$  для эффективной константы скорости; б) первый порядок реакции для глюкозы как реагента; –0,5 порядок реакции для реагента-индикатора (метиленового синего).
3. Определена чувствительность применённого метода тангенсов к определению глюкозы в 3,50 ммоль/л (или 0,63 мг/мл).

### Список литературы

1. Устименко В. Н. Рациональные методы определения сахаров в растительной продукции (тезисы доклада научной конференции) / В. Н. Устименко, Т. Г. Пономарёва // Сб. тезисов докладов участников Российской теоретической и научно-практической, юбилейной конференции «Агробиологические основы адаптивно-ландшафтного ведения сельскохозяйственного производства» (посвященной 100-летию создания Академии биоресурсов и природопользования) (12–16 октября 2018 г., г. Симферополь). – Симферополь: АБиП КФУ им. В.И. Вернадского, 2018. – С. 19–22
2. Эшворд М. Р. Ф. Титриметрические методы анализа органических соединений. Методы прямого титрования / М. Р. Ф.Эшворд. – М. Химия, 1968. – 555 с.
3. Применение метода Лэйнл–Эйнона в анализе редуцирующих сахаров экстракта физалиса / Т. Ю. Гумсров, К. Ю. Маркова, Д. И. Валоева, О. А. Решетник // Вестник технологического университета. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 144–146.
4. Влияние избытка глюкозы на физиологические и биохимические характеристики листьев сахарной свёклы в зависимости от возраста листа и всего растения / А. К. Романова, А. Р. Игнатъев, В. А. Мудрик, С. Е. Пермяков, Б. Н. Иванов // Физиология растений.– 2008.– Т. 55, № 2.– С 219–229.
5. Устименко В. Н. Термодинамика и кинетические модели природного биосинтеза монотерпеновых компонентов эфирных масел растений рода *Artemisia* / В. Н. Устименко, Г. В. Ходаков // Учёные записки КФУ им. В. И. Вернадского Биология. Химия.– 2018. – Т. 4 (70), № 3. – С. 219–241.

6. Яцимирский К. Б. Кинетические методы анализа / К. Б. Яцимирский. – М.: Химия, 1967. – 200 с.
7. Шмид Р. Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций: пер. с англ. / Р. Шмид, В. Н. Сапунов – М.: Мир, 1985. – 264 с.
8. Ларсен Р. У. Инженерные расчёты в Excel / Р. У. Ларсен. – М.: Вильямс, 2001. – 544 с.
9. Закгейм А. Ю. Введение в моделирование химико-технологических процессов. 2-е изд. перераб. и доп. / А. Ю. Закгейм. – М.: Химия, 1982. – 288 с.

## KINETIC METHOD TO DETERMINATE THE QUANTITY OF A GLUCOSE IN WATER SOLUTIONS

*Ustimenko V. N.<sup>1</sup>, Ponomareva T. G.<sup>2</sup>, Khodakov G. V.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Crimean engineering and pedagogical university by the name of Fevzi Yakubov, Simferopol, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of biochemical technologies, ecology and pharmacy CFU by the name of V.I. Vernadsky, Simferopol, Russia*

<sup>3</sup>*Agrotechnological academy CFU by the name of V.I. Vernadsky, Simferopol, Russia*

*E-mail: uvn\_@mail.ru*

In the present article, the application of kinetic method which permits to define the quantity of glucose in water solutions is coincided as most sensitive chemical methods of the analysis. One puts the problem to develop a procedure of the analysis, which is most comprehensible to make researches «in field conditions», especially about a dynamic of photosynthesis and researches about the productivity of terpene hydrocarbons in ethereous plants, where a glucose and isoprene take place.

For the first time kinetic methods of the analysis (in particular, a method of tangents) are applied to quantitative definition of glucose in water solutions, where one used the methylene dark blue as the material-indicator at pH 9–11. By means of applied packages of MS Excel some calibration graphs with the co-ordinates «tangents of line corner –the glucose concentration» and «the glucose concentration–tangents of line corner » in the field of the glucose concentrations such as  $3,50 \cdot 10^{-3}$ – $2,22$  mole/L are constructed. The regression equations for these calibration graphs are received, the coefficients of determination  $R^2$  had the value of 1,000.

Possibility to use the method of tangents due to define some parameters of the corresponded formal kinetic equation is shown. There was defined the parameters of the formal kinetic equation such as  $1,88 \cdot 10^{-7}$  for an effective kinetic constant, as well as the orders of the reaction between reagents, namely: the first for a glucose and –0,5 for the methylene dark blue. Sensitivity of the applied method of tangents to the glucose definition is defined as 3,5 mmol/L (or 0,63 mg/mL). The temperature coefficient of Vant-Goff by the value  $3,45 \pm 0,01$  and the confidential probability by 80 % are calculated.

**Keywords:** glucose, the methylene dark blue, formal kinetics, an effective kinetic constant, the calibration graph, statistical criteria, the regression equation.

References

1. Ustimenko V. N., Ponomareva T. G., *Rational methods for a definition of Saccharums in vegetative production (theses of the report in the scientific conference)*. **J.** Theses and reports of participants in the Russian theoretical and scientifically-practical, anniversary conference «Agrobiological bases of the adaptable-and-landscape technology of the agricultural production» (devoted to the 100 anniversary from the building of the bioresources and wildlife management Academy) (on October, 12-16th, 2018, Simferopol), 19 (Simferopol: ABWM CFU named by V.I. Vernadsky, 2018).
2. Ashford M .R. F., *Titrimetric methods of the organic compounds analysis. Methods of a direct titration*. 555 p. (Izd-vo Chemistry, Moscow, 1968). (in Russ.).
3. Gumerov T. J., Markova K. J., Valoeva D. I., Reshetnik O. A., Application of the Lejnl-Ejnon method in the analysis of reducing sugars in an extract of a cape gooseberry. *J. Bulletin technological university*. **20(2)**, 144 (2017).
4. Romanova A. K., Ignatyev A. R., Mudrik V. A., Permjakov S. E., Ivanov B. N., Influence of the glucose excess on physiological and biochemical characteristics of the sugar beet leaves depending on the age of leave and of all plant. *J. Physiology of plants*, **55(2)**, 219 (2008).
5. Ustimenko V. N., Khodakov G. V., Thermodynamics and kinetic models of a connatural biosynthesis of monoterpenic components of essential oils in plants by the sorts Artemisia. *J. Scientific notes CFU by the name of V.I. Vernadsky: Biology. Chemistry*, **4(70), (3)**, 219 (2018).
6. Jatsimirsky K.B. *Kinetic analysis methods*, 200 p. (Chemistry, Moscow, 1967). (in Russ.)
7. Schmidt R., Sapunov V. N., *Unformed kinetics. In search of chemical reactions paths*: translated from English. 264 p. (World, Moscow, 1985) (in Russ.)
8. Larsen R. U., *Engineering calculations in Excel*. 544 p. (Williams, Moscow, 2001). (in Russ.)
9. Zakgajm A. J., *Introduction in modeling of chemical and technology processes*. 2 ed. 288 p. (Chemistry, Moscow, 1982). (in Russ.).