

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

# Woltamperometryczny "odcisk palca" jako źródło informacji o badanych obiektach

## *Voltammetric "fingerprint" as a source of information about the studied objects*

Gabriela Skowrya<sup>[a]</sup>, Małgorzata Jakubowska<sup>[a]</sup>

[a] AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

---

**ABSTRAKT:** W niniejszej pracy zastosowano technikę woltamperometryczną DPV do badania próbek żywnościowych - cydrów. Wielowymiarowość otrzymanych danych wymagała zastosowania odpowiednich technik chemometrycznych, tak by móc wyodrębnić użyteczną informację w analizie jakościowej. Początkowo powstałe woltamogramy należało przetworzyć stosując algorytm niezbędny do aproksymacji tła pomiarowego. Można dokonać podziału metod chemometrycznych na dwa rodzaje: z nadzorem (LDA i metoda drzew decyzyjnych CART) i bez nadzoru (PCA i analiza skupień). Dla każdej techniki utworzono odpowiednie procedury umożliwiające rozróżnienie badanych obiektów między sobą. Optymalizowano poszczególne parametry, aż do momentu uzyskania satysfakcjonujących wyników końcowych. Celem pracy było wykazanie czy metoda woltamperometryczna do pomiarów próbek żywnościowych może służyć jako tytułowy „odcisk palca” z wykorzystaniem szeroko rozumianej chemometrii.

---

**Słowa kluczowe:** woltamperometria, techniki chemometryczne, cydry, analiza jakościowa

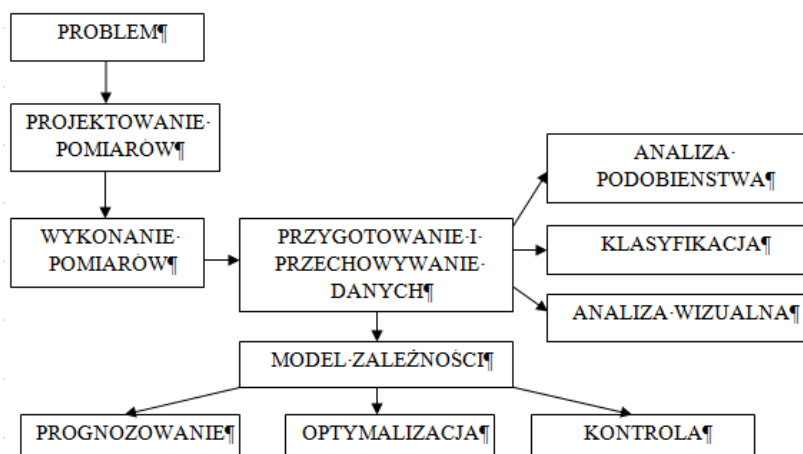
### 1. Wstęp

Chemia analityczna przez ostatnie dziesiątki lat stała się niezwykle szybko rozwijającą dziedziną nauki na świecie i w Polsce. Jej aspekty wykorzystywane są w procesach gospodarczych, technicznych i naukowych w wielu krajach. Jedną z technik elektrochemicznych wykorzystywanych do analizy jakościowej i ilościowej jest woltamperometria. Jest zaawansowaną techniką opierającą się na pomiarze prądu zgromadzonego na elektrodzie pracującej poprzez przyłożenie odpowiedniego napięcia z źródła zewnętrznego. Wynikiem pomiarów są wykresy woltamperometryczne zależności deterministycznej krzywej natężenia prądu od potencjału elektrody. Z pików odczytać można ich wysokość, która daje informację ilościową, oraz położenie pików, które dostarcza informacji jakościowej. Metoda wykazuje wysoką czułość pomiarową i względnie niską granicę oznaczalności. Woltamperometria cechuje się krótkim czasem pomiaru dzięki całkowitej automatyzacji metody oraz niskim kosztem utrzymania aparatury [1].

Otrzymane wykresy woltamperometryczne w rzeczywistości oprócz użytecznej składowej posiadają również składową nieużyteczną, pochodzącą od prądu pojemnościowego, oraz stochastyczną składową nieużyteczną- szum i deterministyczną, tło. Dąży się do otrzymania sygnałów niezakłóconych składową nieużyteczną, z kolei należy uwidocznić informację użyteczną w pomiarze. Jest to trudne do realizacji, można napotkać się na wiele trudności z wyborem odpowiedniej procedury przetwarzania sygnału. Operacje niezbędne do przetworzenia sygnału należy dobrać w taki sposób, aby nie utracić użytecznych informacji. W tym celu zastosowano automatyczną procedurę pozwalającą na uzyskanie użytecznych sygnałów woltamperometrycznych poprzez odjęcie tła zaburzającego pomiar.

Wykorzystując wyniki pomiarów woltamperometrycznych można dokonać analizy jakościowej przy użyciu wielowymiarowych danych za pomocą metod chemometrycznych. Pozwalają one na wydobycie użytecznej informacji o badanych obiektach przy wykorzystaniu metod matematycznych

i statystycznych. Chemometria jest metodą przetwarzania i interpretacji danych, której celem jest wydobywanie informacji użytecznej z wielu danych pomiarowych. Inaczej nazywana jest wielowymiarową analizą danych. Metoda ta dąży do uzyskania maksimum informacji poprzez analizę danych pomiarowych. Informacja często nie jest dostępna bezpośrednio, często jest zamaskowana przez inne składowe nieużyteczne. Podczas pomiarów mogą występować czynniki, które zaburzają składową użyteczną tj. szum, linia bazowa. Czynniki mogą pochodzić z niedokładnie przeprowadzonego pomiaru, lub z nieumiejętności osoby przeprowadzającej doświadczenie. Chemometria dąży do wyodrębnienia za pomocą licznych metod informacji użytecznej ze zbioru wielowymiarowego. W tym celu zastosowano liczne techniki pomiarowe służące do wyodrębnienia informacji użytecznej o badanych obiektach- cydrach [2].



Rys.1 Obszary wykorzystania technik chemometrycznych.

Wyniki jakie otrzymano z pomiarów voltamperometrycznych stanowiły szeroki zbiór danych, co wiązało się z trudnością w interpretacji powstałych wykresów. W tym celu zastosowano metody chemometryczne, aby wydobyć użyteczną informację z wielowymiarowych danych tzn. przekształcić pierwotne dane w nowe, wzajemnie ortogonalne zmienne. Chemometria opiera się na metodach grupowań modelu, i klasyfikacji, tak by zaobserwować relację ze struktury badanych obiektów.

Zastosowano metody klasyfikacji *bez nadzoru nauczyciela* (ang. *Unsupervised Pattern Recognition*). Należy do nich analiza skupień (ang. *Cluster Analysis*) oraz analiza głównych składowych PCA (ang. *Principal Component Analysis*). Zarówno analiza skupień jak i PCA pozwalają zaprezentować relację między badaną próbką, a obiektami w przestrzeni wielowymiarowej. Graficznie, klasyfikacje z nadzorem polegają na grupowaniu zbioru danych na skupienia o odpowiednich odległościach pomiędzy sobą [3]. Metoda PCA jest jedną z najczęściej stosowanych technik bez nadzoru. Pozwala na wyodrębnienie kilku głównych składowych (o jak największej wariancji) opisujących zbiór badanych zmiennych. Drugą grupę tworzą metody *uczenia z nadzorem* (ang. *Supervised Pattern Recognition*), do których należy metoda LDA (ang. *Linear Discriminant Analysis*), oraz metoda drzew decyzyjnych CART. Metody te znacznie różnią się od metod bez nadzoru. W metodzie LDA występują reguły klasyfikacji przynależności obiektów do znanych wcześniej klas. W metodach dyskryminacyjnych nowe próbki, nie zakwalifikowane wcześniej do żadnej grupy zostają odpowiednio przydzielone do danej grupy w zależności od znanych wcześniej reguł dopasowań do klas [4].

Jako próbek badanych w poniższej pracy użyto cydrów, pochodzących od pięciu polskich producentów. Cydr nie jest ani winem, ani piwem. Trunek ten produkuje się znacznie rzadziej w porównaniu do wina czy innych alkoholi niskoprocentowych np. piwa. Jednak w ostatnich latach zyskał on ogromną popularność wśród zwolenników lekkich fermentowanych napoi alkoholowych

zawierających w swej objętości minimum 60% owoców. Najbardziej rozpowszechniony jest w Anglii, Francji a od niedawna zyskuje uznanie także w Polsce. Charakteryzuje się słodko – kwaśnym, orzeźwiającym smakiem oraz świeżym aromatem. Doskonale gasi pragnienie. Cydr to napój zawierający w swoim składzie liczne przeciwutleniacze takie jak: antocyjany, flawonoidy, triterpenoidy i fenole, czyli związki chroniące organizm ludzki przed chorobami, szybkim starzeniem się, posiadające właściwości przeciwzapalne i antyhistaminowe. Trunek jest ponadto źródłem potasu, korzystnie wpływającego na pracę układu mięśniowego w tym mięśnia sercowego. W swoim składzie posiada też związki (kempferol, katechina), zmniejszające utlenianie cholesterolu LDL w organizmie i tym samym ogranicza powstawanie choroby miażdżycowej, co wiąże się z poprawą krążenia krwi. Jabłecznik dostarcza do organizmu dużą dawkę witaminy C, która chroni przed występowaniem infekcji [5].

Procedury optymalizacyjne wykonywano w programie Matlab 2011. Tworzono użyteczne algorytmy stosowane do każdej z wyżej wymienionych technik chemometrycznych. Na podstawie wyników określono najbardziej użyteczną technikę do wyodrębnienia informacji użytecznej z utworzonej macierzy wyników pomiarów woltamperometrycznych.

Celem pracy była: analiza wyników pomiarów woltamperometrycznych zarejestrowanych dla zestawu cydrów przy użyciu metod chemometrycznych, mająca na celu wykazanie, że sygnał woltamperometryczny może służyć do jakościowej analizy obiektów pochodzących od pięciu różnych producentów, wykazanie czy metody chemometryczne mogą służyć do oceny przynależności nowych, nieznanymi próbek cydrów do odpowiedniej klasy, wykazanie możliwości zastosowania metod woltamperometrycznych (DPV) do analizy jakościowej produktów żywnościowych, dążenie do wzbogacenia wiedzy o zastosowanych algorytmach chemometrycznych oraz ich ocena przydatności w zastosowanej metodzie.

## 2. Opis eksperymentu

### 2.1. Instrumenty pomiarowe

Eksperyment opisany w niniejszej pracy został przeprowadzony dzięki technice woltamperometrycznej. Układ pomiarowy składał się z trzech elektrod-pracującej, odniesienia i pomocniczej, zamkniętych w naczyniu kwarcowym o pojemności 5cm<sup>3</sup>. Zastosowano układ firmy mtm-anko produkcji polskiej. Elektrode pracującą w układzie stanowiła elektroda dyskowa wykonana z węgla szklatego o powierzchni geometrycznej wynoszącej 0,1cm<sup>3</sup>. Jako elektrodę odniesienia zastosowano elektrodę chlorosrebrową Ag|AgCl|KCl, zaś elektroda pomocnicza zbudowana była z platyny o powierzchni geometrycznej >2cm<sup>3</sup>. Pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej. Wszystkie szklane przyrządy przed pomiarem zostały przemyte rozcieńczonym kwasem HNO<sub>3</sub> zmieszonym w stosunku 1:1 z wodą, a następnie opłukane w wodzie destylowanej.

### 2.2. Próbki badane

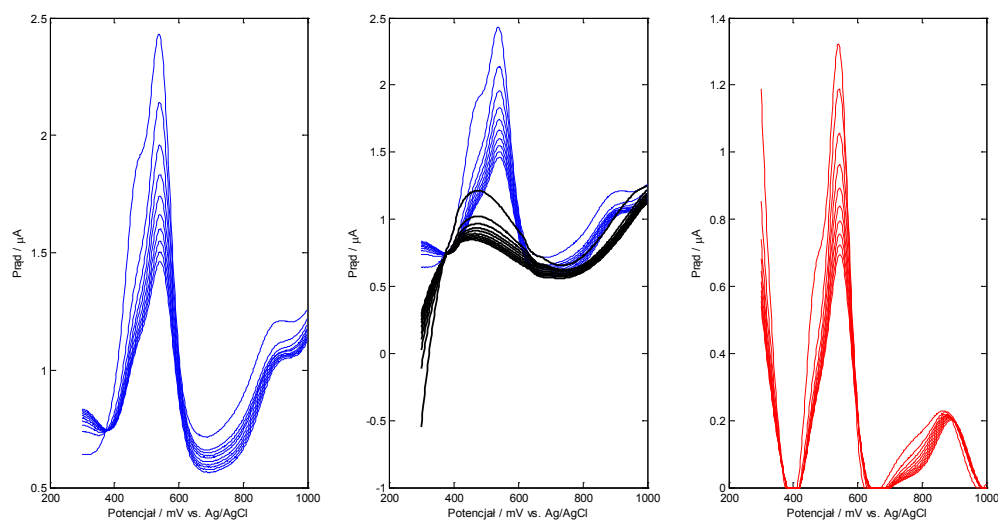
Do pomiarów użyto cydrów pięciu polskich producentów z 2014 roku, które znajdowały się w sprzedaży w sklepach na terenie całego kraju. Zastosowane cydry to: *Warka*, *Smile*, *Lubelski na miodzie*, *Dobroński*, *Meli Melum*. Pomiar wykonano w oparciu o próbki pobrane z trzech opakowań każdego rodzaju cydru. Próbki przed pomiarem odgazowywano (badane próbki umieszczono w naczyniach pomiarowych w celu usunięcia CO<sub>2</sub>) przez 10min i mieszano bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

### 2.3. Procedura analityczna

Przed pomiarem elektroda pracująca z węgla szklanego została delikatnie oszlifowana przy użyciu proszku tlenku glinu o uziarnieniu 0,3-0,05 $\mu\text{m}$ , a następnie dwukrotnie przepłukana wodą destylowaną. Metodą zastosowaną w części eksperymentalnej jest woltamperometria impulsowa różnicowa (ang. Differential Pulse Voltammetry, DPV). Przed pomiarem techniką DPV, elektroda pracująca została aktywowana z zastosowaniem techniki woltamperometrii cyklicznej. Potencjał skanowano od 5-10 cykli w potencjale mieszczącym się w przedziale od -0,2 do 1,0 V, przy szybkości skanowania 50mVs<sup>-1</sup>. Próbki badanych cydrów przed pomiarem nie były odtleniane. Parametry techniki DPV wynoszą odpowiednio: amplituda 30mV, czas próbkowania 10ms, amplituda schodka 2mV, potencjał początkowy 0,1 potencjał końcowy 1 V.

### 3. Wyniki przeprowadzonych badań

W poniżej pracy zastosowano algorytm iteracyjny do korekty linii bazowej w woltamperometrii w celu automatyzacji tego procesu. Dzięki użyciu wspomnianego algorytmu udało się dopasować krzywą do linii bazowej sygnału. Metoda ta ułatwia interpretację, gdyż nie wymaga wyodrębnienia położenia pojedynczego piku oraz przedziałów do aproksymacji. Do modyfikacji sygnału niezbędne są punkty na krzywej, które służą, jako wartości progowe. Fragmenty sygnału, które mają wartość powyżej krzywej progowej są zastępowane, te leżące poniżej, pozostają bez zmiany. Na podstawie otrzymanego sygnału generowane jest tło, które następnie odejmowane jest od sygnału wejściowego.



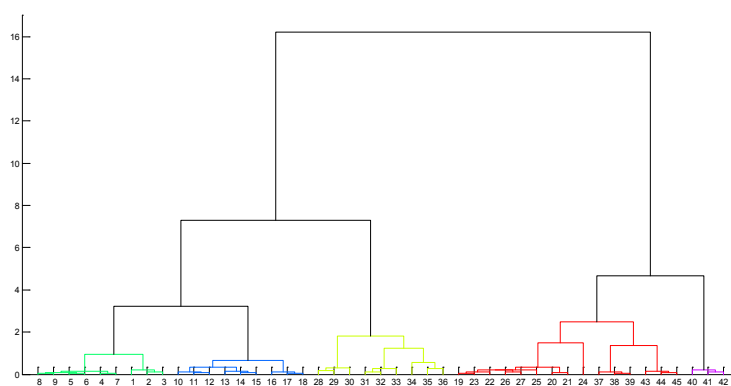
**Rys.2** Dopasowanie tła (A) krzywe wyjściowe wraz z tłem. Dla każdej krzywej algorytm odejmujący tło dopasuje się z osobna, (B) etap po aproksymacji krzywej, modyfikacja sygnału, wraz z linią oznaczającą linię bazową, piki wyeliminowane w wyniku aproksymacji (C) krzywe po odjęciu tła, po kilku interakcjach, wykres po odcięciu linii tła wzdłuż konturu, który przedstawiał rysunek B przy zastosowaniu funkcji wielomianowej.

Przed użyciem algorytmu iteracyjnego należy zoptymalizować jego parametry tj. wybrać optymalny stopień wielomianu [6] oraz liczbą iteracji- to znaczy taką liczbą powtórzeń algorytmu, która daje satysfakcjonujący wynik pomiaru. Stopień wielomianu w algorytmie zazwyczaj przyjmuje wartości od 2 do 8 [7,8]. Najwyższą potęgą w wielomianie ustala stopień wielomianu. Zastosowanie odpowiedniego stopnia wielomianu wiąże się z wizualną oceną kształtu wygenerowanego tła, skorygowanej krzywej oraz z parametrami decydującymi o prawidłowości wyniku pomiaru.

Na rysunku przedstawiono voltamperogram dla pierwszych 10 sygnałów wyodrębnionych z całej macierzy pomiarowej 150 x 350. W programie *Matlab* odpowiednio optymalizowano parametry, tak aby uzyskać optymalny wynik.

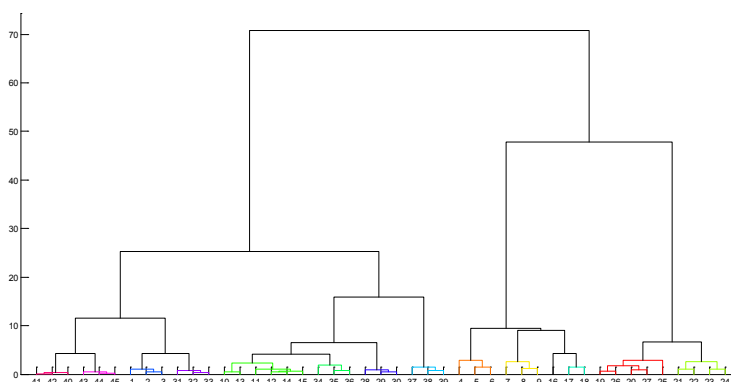
#### Analiza skupień (ang. cluster analysis)

Wykresem graficznym w analizie skupień jest dendrogram, który ilustruje w sposób hierarchiczny zbiór badanych obiektów i ich zmniejszające się podobieństwo pomiędzy sobą. Dla wykazania różnicy pomiędzy stopniem wielomianu, a ilością skupień wygenerowano dendrogramu przy stopniu wielomianu 2, liczbie iteracji 10, z tłem i bez tła pomiarowego.



**Rys. 3** Dendrogram hierarchiczny (wariant bez tła: wielomian stopnia 2, iteracja 10).

W wariacie bez tła (rys 3) wyraźnie zaobserwować można podział na pięć oddzielnych ugrupowań wyznaczonych przez badanych producentów. Próbkki nie są całkowicie równomiernie rozdzielone (punkty odbiegające), ale mimo to widać podobieństwo obiektów w skupieniach.

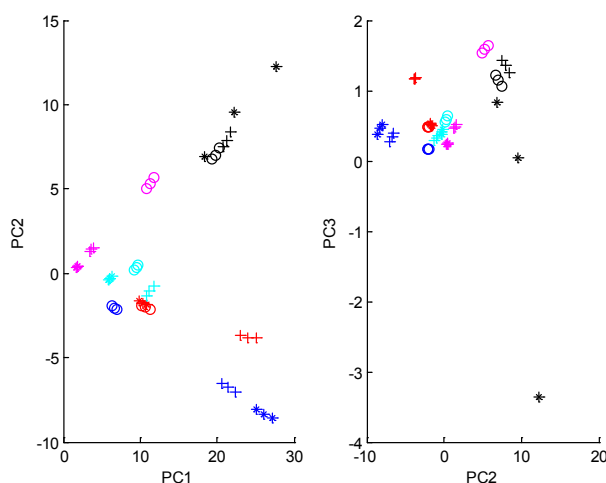


**Rys.4** Dendrogram hierarchiczny (wariant z tłem: wielomian stopnia 2, iteracja 10)

Rys. 4 obrazuje wyodrębnienie się kilkunastu skupień z badanej macierzy. Wariant ten nie spełnia założonych wcześniej wymagań dotyczących otrzymania pięciu niezależnych ugrupowań obiektów. Poszczególne obiekty nie są rozdzielone hierarchicznie, grupują się na nieodpowiednią liczbę grup zawierającą obiekty niepodobne do siebie.

### Metoda głównych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA)

Należy do metod eksploracyjnych inaczej nazywanych metodami modelowania bez nadzoru. Technika nie wymaga wiedzy a priori o przynależności obiektów do danej kategorii. Polega na identyfikacji kilku grup obiektów o podobnych właściwościach, oraz wskazuje obiekty znacznie różniące się od innych grup. Celem PCA jest wyznaczenie głównych składowych, czyli zmiennych które posiadają najwyższą wariancję i są ortogonalne. Liczne zabiegi pomiarowe wykazały że zmienność zbioru danych można opisać przy pomocy trzech zmiennych PC1, PC2, PC3, które opisują zmienność danych w 98%. Badane cydry zaznaczono kolorami: Warka, Smile, Lubelski na miodzie, Dobroński, Meli Melum.

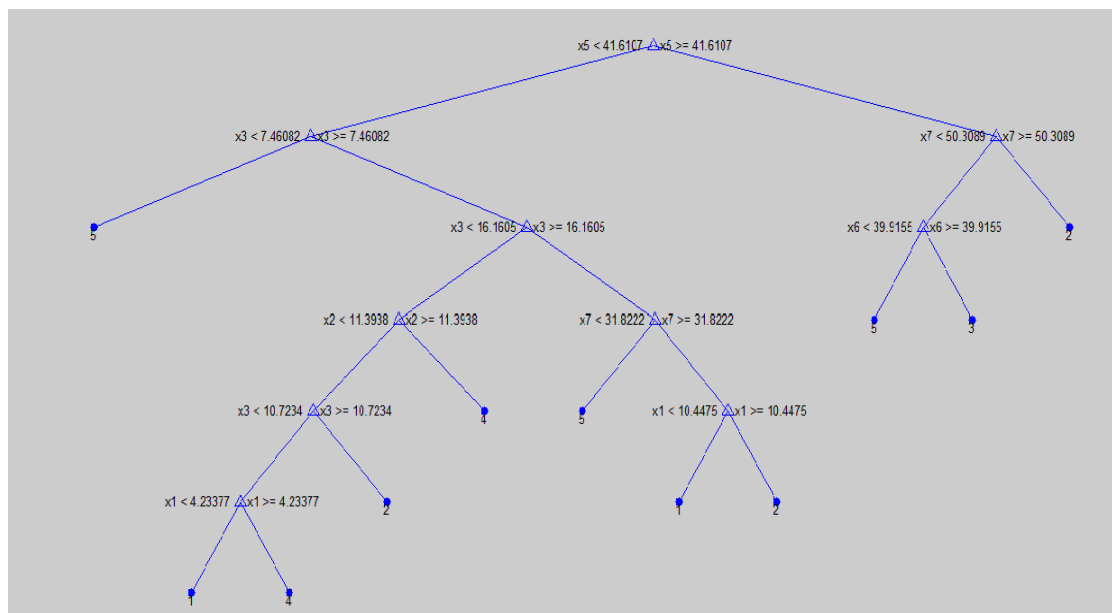


**Rys.5** Rzut obiektów na płaszczyznę zdefiniowaną przez trzy główne składowe PC1 i PC2 oraz PC2 i PC3 (wariant z tłem, wielomian 2 stopnia, liczba iteracji 10, przebieg 5 i 7).

Interpretując rys.5. zauważyć można pewne grupowanie analizowanych danych na płaszczyźnie PC1 i PC2. Z kolei rozważając płaszczyznę PC2 i PC3 można stwierdzić, że grupowanie nie jest widoczne. Pozytywny wynik pierwszego grupowania związany jest z wyborem innych krzywych do interpretacji. Sposób korekty linii bazowej nie uległ zmianie.

### CART(ang. Classification and Regression Trees)

Do przyporządkowania badanych obiektów do odpowiedniej klasy posłużono się metodą drzew klasyfikacyjno-regresyjnych CART. Na rys.4, stosując algorytm CART (wcześniej wykonana kompresja danych oraz procedura walidacji krzyżowej) [9], otrzymano wykres w postaci drzewa, na którego szczycie znajduje się węzeł macierzysty (korzeń) zawierający wszystkie badane obiekty pięciu producentów jabłecznika. Podział na odpowiednie klasy (węzły potomne) jest możliwy, dzięki odpowiednim warunkom umożliwiającym klasyfikację badanych obiektów do klasy potomnej. Wynikiem jest otrzymanie drzewa składającego się z 11 węzłów końcowych (liści) i z 6 poziomów wysokości. Interpretacja końcowych węzłów wskazuje na poprawne zaklasyfikowanie próbek do badanych producentów. Wyrażone cyfrowo przynależności próbek do odpowiedniego producenta (1 do 5) dają wynik klasyfikacji obiektów.



**Rys.6** Metoda CART w analizie cydrów, 10 podziałów, liczba końcowych węzłów 11, wysokość drzewa 6.

Stosowany algorytm CART wykazał obecność 9 błędów przynależności badanych obiektów do odpowiedniej klasy.

$$\text{Błąd klasyfikacji w metodzie CART} = \frac{9}{150} \cdot 100\% = 6 \quad (1)$$

#### LDA(ang. Linear Discriminant Analysis)

Wszystkie obiekty ze zbioru walidacyjnego przy użyciu odpowiedniej procedury w programie Matlab zostały poprawnie sklasyfikowane. Błąd klasyfikacji w tej metodzie wyniósł 0%, co wskazuje na maksymalną zdolność predykcyjną zastosowanego modelu [10]. Opracowany model może być stosowany w identyfikacji i klasyfikacji dla pięciu różnych producentów cydrów.

## 4. Podsumowanie i wnioski

Metoda woltamperometrii impulsowej różnicowej (DPV) okazała się odpowiednia do jakościowej analizy próbek żywnościowych. W początkowym etapie pomiarów woltamperometrycznych mogły wystąpić jednak pojedyncze błędy pomiarowe, które miały ogromny wpływ na otrzymane wykresy woltamperometryczne i na ich dalszą analizę metodami chemometrycznymi. Błędy mogły powstać już w momencie doboru próbek cydrów oraz podczas samego pomiaru woltamperometrycznego. Powstałym problemem jest niewątpliwie występowanie charakterystycznych pików o niskim potencjale, w porównaniu z szukanym sygnałem na otrzymanych woltamperogramach. Błąd ten może wynikać z efektu blokowania powierzchni elektrody wykonanej z węgla szklanego. Zaistniały problem można rozwiązać poprzez aktywację powierzchni elektrody. Dzięki temu procesowi, powierzchnia elektrody pracującej zostaje oczyszczona z zaadsorbowanych zanieczyszczeń i tlenków, które mogą pochodzić od próbek badanych cydrów. Pomocne staje się także pokrycie powierzchni elektrody substancjami zwiększającymi selektywność reakcji na pewne składniki w badanym roztworze. Użytecznym rozwiązaniem mogłoby okazać się zastosowanie innej elektrody, która umożliwi pomiar próbek żywnościowych.

Można stwierdzić, że wszystkie wyniki otrzymane metodami klasyfikacyjnymi i dyskryminacyjnymi są do siebie podobne. Wykazano, że zastosowano techniki chemometryczne

mogą służyć do oceny przynależności nowych próbek badanych cydrów. Spośród przeprowadzonych prób najlepszą metodą okazała się metoda LDA, która umożliwiła klasyfikację badanych obiektów z zerowym błędem, pozostałe metody charakteryzują się nieco mniejszą użytecznością zastosowanych modeli.

Po przeprowadzanych obliczeniach można stwierdzić, że metody chemometryczne są skutecznym narzędziem do poprawnego zinterpretowania otrzymanych woltamperogramów w analizie jakościowej obiektów. Pozwalają na rozwiązywanie problemów dotyczących analizy jakościowej próbek żywnościowych. Połączenie metod woltamperometrycznych z technikami chemometrycznymi pozwala uzyskać ciekawe informacje na temat zależności pomiędzy badanymi zmiennymi. Obiekty zaklasyfikowano poprawnie, dlatego użyte modele okazały się prawidłowe.

## Literatura

- [1] Mazerski J., Podstawy chemometrii, Gdańsk 2004
- [2] Górski Ł., Zastosowanie wybranych algorytmów przetwarzania sygnałów w analizie woltamperometrycznej, Rozprawa doktorska, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica. Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki.
- [3] Wójcicki K., Zastosowanie wybranych technik spektroskopowych do oceny jakości olejów roślinnych, rozprawa doktorska, Poznań 2013
- [4] Wrosz P., Zastosowanie spektroskopii bliskiej podczerwieni i klasycznej podczerwieni w analizie jakościowej i ilościowej surowców w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2012.
- [5] Miller J.N, Miller J.C., Statistics and chemometrics for analytical chemistry, Prentice Hall, London, 1999.
- [6] Aminov K.L., Pedersen J.B., Surf. Interf. Anal. 1995, 23, 717.
- [7] Bond A.M., Heritage I.D., Anal. Chem. 1985, 57, 174.
- [8] Kamenev A. I., Yu A., Rummyantsev, Bogdanova I.R., Zh. Anal. Khim. 1995, 50, 55.
- [9] Stanimirova, Daszykowski M., Walczak B., Metody uczenia z nadzorem – kalibracja, dyskryminacja i klasyfikacja.
- [10] Wiśniewska D., Analiza dyskryminacyjna w prognozowaniu cen akcji i indeksów giełdowych, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu.