

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

Optimalizacja warunków pomiarowych dla oznaczeń woltamperometrycznych na przykładzie analizy ilościowej kwasu askorbinowego (witamina C)

Optimization of the experimental conditions for voltammetric determinations exemplified by quantitative analysis of ascorbic acid (vitamin C)

Radosław Porada, Bogusław Baś

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

ABSTRAKT: W artykule opisano sposób optymalizacji warunków pomiarowych wg metody Gaussa, na przykładzie oznaczeń woltamperometrycznych kwasu askorbinowego, techniką impulsową różnicową. Omówione zostały sposób i kryteria definiowania funkcji celu, kolejność zmian poszczególnych parametrów techniki oraz uzyskane informacje dotyczące procesu elektrodowego. W warunkach uznanych za optymalne przeprowadzono kalibrację metodą wielokrotnego dodatku wzorca. Parametry funkcji kalibracyjnej, wyznaczone techniką walidacji krzyżowej skonfrontowano z wynikami, które uzyskano w warunkach przed optymalizacją. W efekcie dowiedziono, iż właściwy dobór parametrów eksperymentalnych pozwala na istotną poprawę parametrów walidacji projektowanych metod analitycznych.

ABSTRACT: In this paper methodology of the experimental parameters' optimisation for voltammetric determination is presented. The way and criteria for the definition of optimisation problem, the order of parameters' change as well as information about the electrode process, which can be concluded at this stage, are discussed. The standard addition method was used when carrying out calibration in the optimized conditions. Calibration curve and validation parameters . estimated by means of cross-validation technique for the developed method of vitamin C determination were compared with those obtained in non-optimized conditions. It was proven, that an appropriate and balanced selection of the experimental variables' values allows significance improvement of validation parameters of the new analytical methods.

Słowa kluczowe: woltamperometria impulsowa różnicowa, walidacja, optymalizacja, metoda Gaussa, witamina C

1. Wstęp

Woltamperometria jest elektrochemiczną metodą instrumentalną, w której rejestrowany jest prąd związany z procesem zachodzącym w badanym układzie, pod wpływem przyłożonego z zewnątrz napięcia. Przebieg zmian napięcia polaryzującego w funkcji czasu jest podstawą klasyfikacji technik woltamperometrycznych z liniową (LSV), sinusoidalną (ACV), schodkową (SCV) oraz impulsową (NPV, DPV, SQV) zmianą potencjału. Zainteresowanie woltamperometrią wynika m.in. z wysokiej czułości i selektywności tej techniki oraz relatywnie niskich kosztów zakupu i eksploatacji aparatury, a także wykonania pomiaru w porównaniu z analizą chromatograficzną czy spektroskopową [1].

Dla każdego procesu elektrodowego można wyróżnić trzy zasadnicze etapy: transport depolaryzatora do powierzchni elektrody, reakcja elektrodowa z przeniesieniem ładunku przez granicę faz elektrody – roztwór oraz gromadzenie się powstałych produktów reakcji na powierzchni elektrody lub w jej wnętrzu albo transport tych produktów w głąb roztworu. Z racji wieloetapowości procesu o jego efektywnej szybkości decyduje najwolniejszy z wymienionych etapów. Zazwyczaj jest nim transport analitu, który po wyeliminowaniu migracji w polu elektrycznym oraz wzajemnego ruchu warstw roztworu względem siebie (konwekcja) odbywa się wyłącznie na drodze dyfuzji.

Oznacza to, iż rozwiązanie II równania Ficka umożliwia wyznaczenie zależności między prądem piku (granicznym) a stężeniem redukującej lub utleniającej się substancji, zwanej depolaryzatorem. W przypadku technik impulsowych zależność ta jest opisywana równaniem:

$$i_p = K \frac{n^2 F^2 A D_S^{1/2}}{4 R T} \cdot \frac{dE}{X^{1/2}} \cdot C_S^0 \quad (1)$$

gdzie: K – stała, zależna od wybranej techniki woltamperometrycznej, n – liczba wymienianych elektronów, F – stała Faradaya, A – powierzchnia elektrody, D_S – współczynnik dyfuzji depolaryzatora S do powierzchni elektrody, R – uniwersalna stała gazowa, T – temperatura bezwzględna, dE – amplituda impulsu, X – parametr kinetyczny, C_S^0 – stężenie depolaryzatora w głębi roztworu [1-3].

Wielkość uznana za parametr kinetyczny zależy od rodzaju wybranej techniki woltamperometrycznej i w przypadku najczęściej stosowanej techniki impulsowej różnicowej DP (ang. *Differential Pulse*) jest nim połowa czasu impulsu t_{imp} . Przy wyprowadzeniu tego równania przyjęto pewne założenia upraszczające, przez co zakres jego stosowalności jest ograniczony. Ponadto mnogość występujących w nim parametrów sprawia, iż bezpośrednie wyznaczenie stężenia analitu z pomiaru prądu jest problematyczne, gdyż wymaga znajomości wartości parametrów środowiskowych (temperatura), współczynnika dyfuzji analitu w danym elektrolicie podstawowym, jak również powierzchni elektrody. Równanie (1) można zatem traktować jako model półempiryczny, który wskazuje na istnienie jakościowej, liniowej zależności między prądem piku a stężeniem depolaryzatora. W praktyce dokładna relacja między tymi wielkościami jest wyznaczana w procesie kalibracji, w którym w ustalonych warunkach dokonywany jest pomiar prądu piku dla roztworów o znanym stężeniu. Występujące w równaniu (1) stałe zostają wówczas zastąpione jednym parametrem, określanym jako nachylenie prostej kalibracyjnej, które odpowiada również czułości metody [1-4].

W pracach badawczych bardzo często konieczne jest ustalenie warunków prowadzenia procesu, tak aby możliwe było osiągnięcie optymalnej (tzn. minimalnej bądź maksymalnej) wartości pewnej zmiennej, określanej mianem *funkcji celu*. Wyróżnia się optymalizację prostą, w której funkcja celu stanowi pojedynczą odpowiedź obiektu, oraz optymalizację kompleksową z więcej niż jedną cząstkową funkcją celu. Dobór matematycznej zależności, która wiąże cząstkowe funkcje celu w tzw. *funkcję kompleksową*, jest trudnym i złożonym zadaniem, a równocześnie ma bezpośredni wpływ na przebieg i wynik procedury optymalizacji. Do najczęściej stosowanych metod optymalizacyjnych należą: przeszukiwanie systematyczne, metoda Gaussa, algorytm Boxa-Wilsons, analiza powierzchni odpowiedzi oraz metoda simpleksowa. W pierwszej z nich na m -wymiarową przestrzeń zmiennych nałożona zostaje siatka z n punktami w każdym kierunku. Pomiar wykonywany jest w każdym z n^m węzłów sieci, co pozwala na dokładne odwzorowanie przebiegu funkcji celu oraz znalezienie ekstremum. Wadą takiego podejścia jest wykładniczy wzrost liczby koniecznych do wykonania pomiarów ze wzrostem liczby optymalizowanych zmiennych, co przekłada się na wysoki koszt oraz długi czas realizacji takiego planu eksperymentalnego. W metodzie Gaussa poszukuje się wartości optymalnej w kierunku każdej zmiennej kontrolnej, podczas gdy pozostałe parametry pozostają niezmiennicze. Po znalezieniu ekstremum funkcji dla danej zmiennej przypisuje się jej wyznaczoną wartość optymalną i kontynuuje pomiary dla kolejnych zmiennych. Złożoność tego algorytmu jest równa $n \cdot m$. Podobny do metody Gaussa jest algorytm Boxa-Wilsons, z tą różnicą, że optymalizację przeprowadza się w wyznaczonym doświadczalnie kierunku najszybszego spadku (bądź wzrostu), stąd też metoda ta wymaga wykonania większej liczby pomiarów oraz obliczeń. W algorytmie analizy powierzchni odpowiedzi funkcja celu jest przybliżana za pomocą kwadratowego modelu regresyjnego. Przyjmuje się, iż ekstrema modelu odpowiadają ekstremom odpowiedzi modelowanego układu. Simpleks z kolei to obiekt o $m+1$ wierzchołkach w m -wymiarowej przestrzeni. W optymalizacji metodą simpleksową porównuje się wartości funkcji w jego wierzchołkach i odpowiednio przesuwa go na drodze odbicia, ekspansji, kontrakcji bądź zmniejszenia w kierunku ekstremum [4].

W przypadku pomiarów woltamperometrycznych kompleksowa funkcja celu jest trudna do jednoznacznego zdefiniowania. Zwykle najważniejszym parametrem jest wysokość pików (bądź fali), jednak nie można zapomnieć o jego szerokości połówkowej oraz kształcie i symetrii, które trudno wyrazić i opisać za pomocą pojedynczego parametru. Stąd wybór optymalnych warunków pomiarowych wymaga zawsze jakościowej i ilościowej oceny rejestrowanych krzywych. W niniejszym artykule przedstawiono sposób optymalizacji parametrów techniki impulsowej różnicowej na przykładzie oznaczania kwasu askorbinowego (witamina C). Szczególną uwagę zwrócono na kolejność badań wpływu poszczególnych zmiennych kontrolnych oraz informacje o badanym procesie elektrodowym, jakie można uzyskać na podstawie kreślonych charakterystyk. Jako punkt wyjścia przyjęto najczęściej stosowane wartości testowanych parametrów instrumentalnych. Optymalizację przeprowadzono z zastosowaniem metody Gaussa, która odzwierciedla indywidualny (swoisty) wpływ zmiennych pomiarowych na rejestrowane krzywe DPV.

2. Część eksperymentalna

2.1. Odczynniki

Pomiary woltamperometryczne przeprowadzono w roztworze składającym się z 4.50 mL wody bidestylowanej oraz 0.50 mL roztworu soli węglanowych lub buforu fosforanowego, Brittona-Robinsona (B-R), cytrynianowego oraz octanowego. Odpowiednie roztwory sporządzono przez rozpuszczenie wymaganych naważek wzorców (Sigma-Aldrich lub Merck, czda) w wodzie bidestylowanej. Roztwór wzorcowy witaminy C o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ otrzymano przez rozpuszczenie wymaganej ilości wzorca (POCH, czda, asc) i przechowywano w kolbie ze szkła bursztynowego w temperaturze 5°C .

2.2. Aparatura pomiarowa

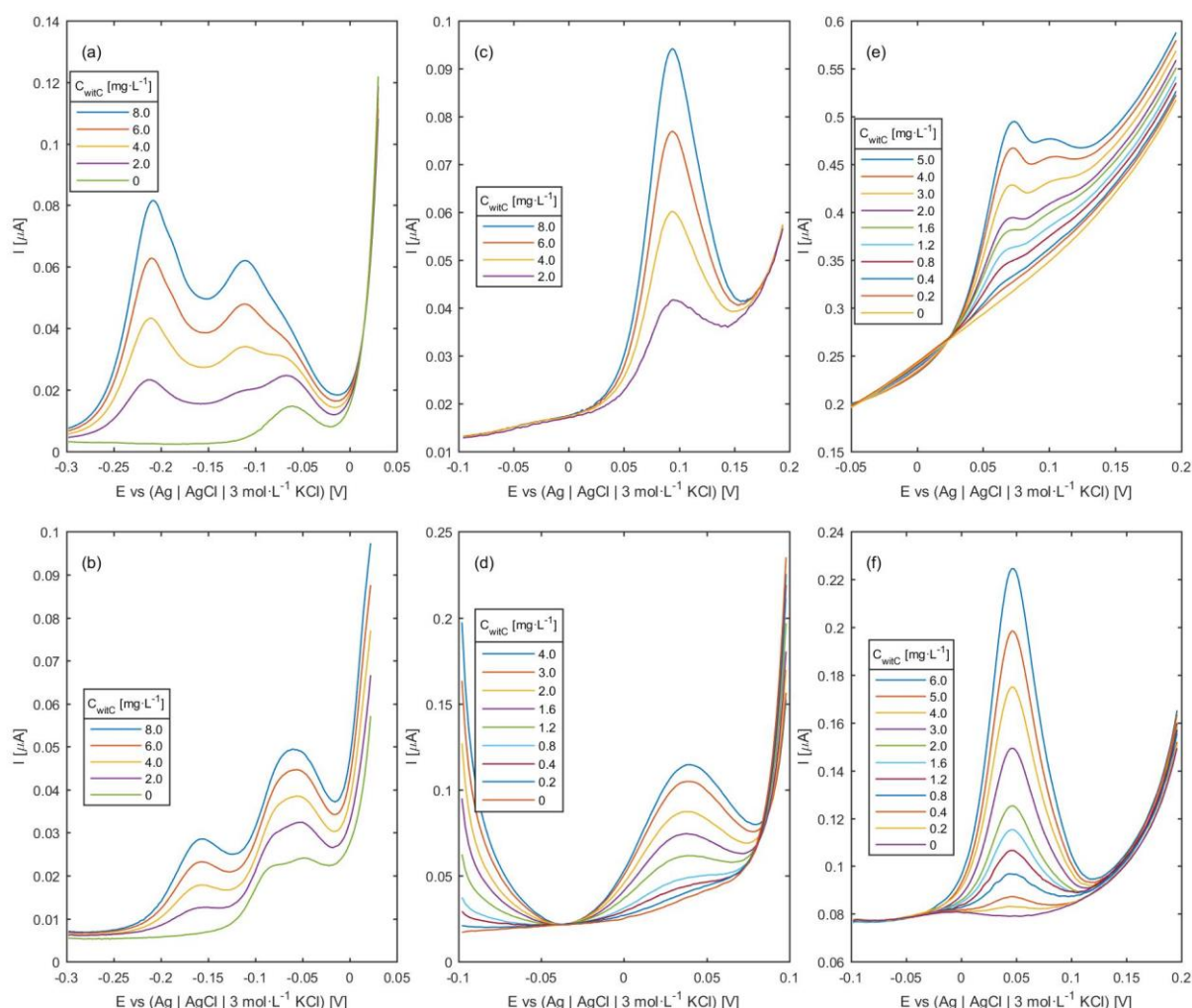
Pomiary przeprowadzone zostały w klasycznym, trójelektrodowym naczyniu kwarcowym o objętości nominalnej 10 mL. Rolę elektrody pracującej pełniła mikroelektroda rtęciowa o kontrolowanym wzroście powierzchni kropli (μCGMDE), a jej potencjał był mierzony względem chlorosrebrowej elektrody odniesienia z podwójnym płaszczem ($\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}|2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$). Jako elektrodę pomocniczą zastosowano drut platynowy. Do homogenizacji roztworu w naczynku użyto elementu mieszającego pokrytego teflonem, zaś w celu eliminacji tlenu zastosowano przepływ gazu obojętnego (Ar 5N, BOC Gases, Polska). Pełne wykorzystanie unikalnych cech elektrody CGMDE było możliwe dzięki użyciu statywu elektrodowego M164 sprzężonego z analizatorem elektrochemicznym M161E (*mtm-anko*, Kraków). Układ pomiarowy był sterowany za pomocą programu EAPro.

Krzywe woltamperometryczne rejestrowano techniką impulsową różnicową, w cyklu anodowym. Dla każdej testowanej wartości parametru instrumentalnego oraz dodatku wzorca witaminy C rejestrowano po trzy krzywe, które następnie uśredniano. Interpretacja krzywych obejmowała również redukcję linii bazowej (wg wielomianu III stopnia), statystyczne opracowanie danych (SD, RSD) oraz kalibrację metody. Wymienione operacje przetwarzania sygnałów wykonano w programie EAQt. Na etapie wyjaśniania mechanizmu reakcji elektrodowej stosowano technikę cykliczną CV (ang. *Cyclic Voltammetry*).

3. Wyniki pomiarów i dyskusja

3.1. Wpływ elektrolitu podstawowego

Rys. 1 przedstawia wpływ różnych elektrolitów podstawowych na rejestrowane woltamogramy DPV, w szczególności na pik (piki) utleniania witaminy C. Szczegółowy opis warunków pomiarowych umieszczono w komentarzu pod rysunkiem. W roztworze węglaanu sodu (**Rys. 1(a)**) i 0.01 mol·L⁻¹ roztworze węglaanu potasu z dodatkiem 0.005 mol·L⁻¹ chlorku potasu (**Rys. 1(b)**) stwierdzono występowanie dwóch, częściowo nakładających się na siebie, niesymetrycznych pików o różnej wysokości. Obserwowany przyrost prądu piku z każdym kolejnym dodatkiem roztworu wzorcowego jest nieliniowy. Zauważalny jest również gwałtowny wzrost prądu tła po przekroczeniu potencjału 0 V, co jest spowodowane utlenianiem materiału elektrodowego (rtęci). Sygnał ten nakłada się na rejestrowany pik utleniania witaminy C, a ponadto w zakresie potencjałów utleniania witaminy C zaobserwowano pik pochodzący od stosowanych soli węglanowych. Ewentualne zastosowanie ww. roztworów jako elektrolitu podstawowego wiązałoby się z szeregiem trudności na etapie interpretacji rejestrowanych krzywych DPV.



Rysunek 1. Wpływ elektrolitu podstawowego na kształt rejestrowanych woltamogramów DPV oraz położenie i wysokość piku utleniania witaminy C. Skład roztworu w naczynku: 4.50 mL wody bidestylowanej i 0.50 mL elektrolitu podstawowego: (a) roztwór Na₂CO₃; (b) 0.01 mol·L⁻¹ K₂CO₃ + 0.005 mol·L⁻¹ KCl; (c) 0.1 mol·L⁻¹ bufor cytrynianowy; (d) 0.1 mol·L⁻¹ bufor fosforanowy pH 8.0; (e) 0.1 mol·L⁻¹ bufor Brittona-Robinsona pH 4.0; (f) 0.1 mol·L⁻¹ bufor octanowy pH 5.0 (podane stężenia odnoszą się do roztworów w naczynku pomiarowym). Technika DPV, $E_s = 2$ mV, $dE = 40$ mV, $t_{imp} = 40$ ms, E_0 i E_k zależne od elektrolitu podstawowego.

Analogiczna sytuacja występuje w przypadku buforu cytrynianowego oraz fosforanowego (pH 8.0), co obrazują odpowiednio **Rys. 1(c)** i **(d)**. Uzyskane przebiegi krzywych prądowo-napięciowych utrudniają ich jednoznaczną interpretację, na którą składa się wyznaczenie potencjału początku i końca formowania się pików, korekta linii bazowej, wyznaczenie szerokości połówkowej pików i wartości prądu w jego maksimum.

W przypadku pomiarów wykonywanych w buforze Brittona-Robinsona (B-R) stwierdzono *quasi*-liniowy przyrost prądu tła ze wzrostem potencjału, jak to zostało zilustrowane na **Rys. 1(e)**. Na krzywej prądowo-napięciowej po dodatku roztworu wzorcowego zaobserwowano sygnał w postaci dwóch pików, z których pierwszy posiada wyraźnie zarysowane maksimum, drugi zaś jest mocno spłaszczony. Taki przebieg może wskazywać na dwuetapowy przebieg procesu utleniania witaminy C w tym środowisku.

Wymienionych wcześniej wad wydają się być pozbawione sygnały zarejestrowane w 0.1 mol·L⁻¹ buforze octanowym (pH 5.0), w którym pik utleniania witaminy C jest (idealnie) symetryczny, a prąd tła ma stałą wartość, niezależną od stężenia depolaryzatora w naczynku (**Rys. 1(f)**). Po przekroczeniu zakresu potencjałów formowania się pików obserwuje się początkowo łagodny przyrost prądu tła aż do potencjału +0.2 V, przy którym rozpoczyna się utlenianie materiału elektrodowego. Widoczny na **Rys. 1(f)** kształt pików DPV umożliwia bezproblemowe określenie zarówno prądu pików jak i jego szerokości połówkowej. Na podstawie analizy woltamogramów z **Rys. 1** można przypuszczać, iż spośród testowanych elektrolitów podstawowych największą czułość oznaczeń uzyskuje się w przypadku **buforu octanowego**. Dlatego tylko ten bufor stosowano w dalszych etapach badań.

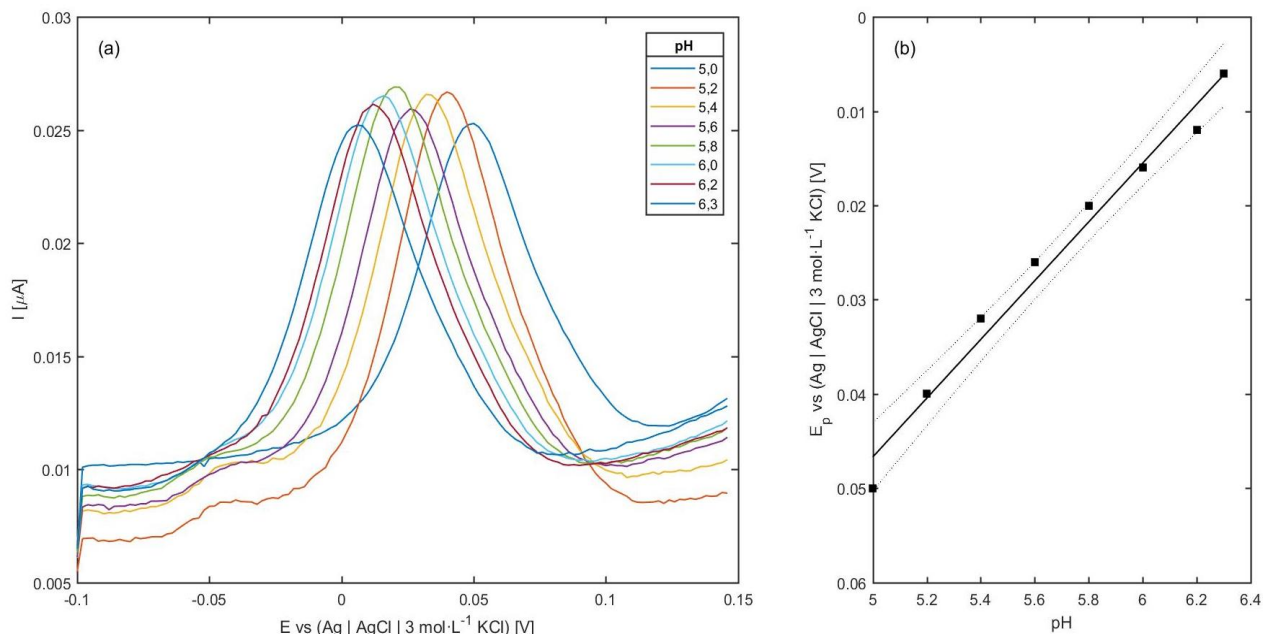
Rys. 1 ukazuje, jak ważny jest dobór odpowiedniego elektrolitu podstawowego, którego rola nie sprowadza się tylko i wyłącznie do zapewnienia odpowiedniego przewodnictwa roztworu. Elektrolit ten zapewnia również warunki do zachodzenia określonych procesów i poprzez interakcję z analitem wpływa na kształt rejestrowanych sygnałów oraz ich położenie względem osi potencjałów. Jak to zostanie przedstawione w Podrozdziale 3.3, parametry instrumentalne w niewielkim stopniu wpływają na kształt rejestrowanych pików DPV, zazwyczaj mają tylko wpływ na ich wysokość i szerokość połówkową. W większości przypadków kształt pików jest determinowany przez zastosowany elektrolit podstawowy, zatem dobór jego składu powinien zawsze stanowić pierwszy krok procedury optymalizacyjnej. Głównym celem na tym etapie jest uzyskanie symetrycznego pików, a w przypadku analizy mieszanin wieloskładnikowych również separacja nakładających się sygnałów pochodzących od różnych analitów zawartych w badanej próbce.

W kolejnym etapie, dla wybranego elektrolitu podstawowego dokonano optymalizacji jego stężenia oraz pH. W przypadku pierwszego parametru, który zmieniano w zakresie od 0.02 do 0.2 mol·L⁻¹, nie stwierdzono istotnych różnic w wysokości i położeniu pików na osi potencjałów. W celu zapewnienia odpowiedniego przewodnictwa roztworu, niezbędnego do eliminacji składowej migracyjnej prądu, oraz pojemności buforowej w dalszych eksperymentach stosowano wyłącznie bufor octanowy o stężeniu **0.1 mol·L⁻¹**.

Wpływ pH buforu octanowego sprawdzano w zakresie 5.0 – 6.3. Analiza zarejestrowanych woltamogramów DPV, przedstawionych na **Rys. 2(a)**, wskazuje na porównywalną wysokość pików utleniania witaminy C dla testowanych wartości pH. Ponadto stwierdzono przesuwanie się potencjału pików E_p w kierunku potencjałów bardziej ujemnych ze wzrostem pH, co ilustruje **Rys. 2(b)**. Przedstawiona zależność $E_p = f(\text{pH})$ może być opisana funkcją liniową (współczynnik korelacji $r = 0.9899$):

$$E_p = -(0.031 \pm 0.002) \cdot \text{pH} + (0.203 \pm 0.010) \text{ [V]} \quad (2)$$

Nachylenie tej prostej odpowiada w przybliżeniu połowie wartości nachylenia nernstowskiego (0.0591 V·pH⁻¹), co wskazuje, iż w procesie utleniania witaminy C biorą udział dwa protony. Wniosek ten znajduje potwierdzenie również w danych literaturowych [5]. Biorąc pod uwagę kształt pików, jego symetryczność oraz szerokość połówkową (funkcje celu), za wartość optymalną uznano **pH = 6.0** i stosowano ją w dalszych pomiarach.

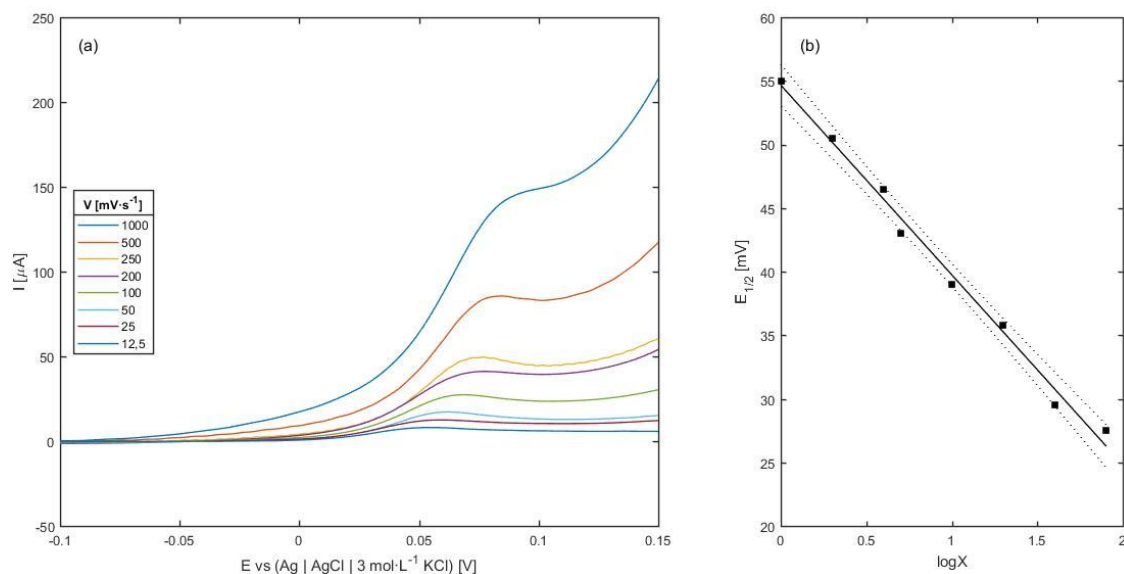


Rysunek 2. (a) Wpływ pH 0.1 mol·L⁻¹ buforu octanowego na kształt rejestrowanych voltamogramów DPV oraz położenie i wysokość piku utleniania witaminy C. (b) Zależność potencjału piku E_p witaminy C od pH buforu octanowego. Technika DPV, $E_0 = -0.2$ V, $E_s = 2$ mV, $dE = 40$ mV, $t_{imp} = 40$ ms, stężenie witaminy C 1 mg·L⁻¹.

3.2. Charakterystyka procesu elektrodowego

Do badania procesów zachodzących na powierzchni elektrody pracującej, określenia mechanizmów reakcji elektrodowych oraz wielkości powierzchni aktywnej stosowana jest technika voltamperometrii cyklicznej CV, w której potencjał zmienia się liniowo pomiędzy zadanymi z góry wartościami. W technice tej ma miejsce również zmiana kierunku polaryzacji, dzięki czemu możliwe jest określenie odwracalności badanej reakcji chemicznej oraz procesu (lub procesów) elektrodowego. Jeżeli reakcja chemiczna jest odwracalna, to uzyskuje się piki dla zmiany potencjału zarówno w kierunku katodowym, jak i anodowym.

W badaniu odwracalności procesów elektrodowych użytecznym pojęciem jest tzw. parametr kinetyczny X , który w przypadku techniki liniowej LSV odpowiada odwrotności szybkości zmiany potencjału V . Liniowa zależność prądu piku I_p od pierwiastka z V świadczy o dyfuzyjnym lub kinetycznym mechanizmie procesu. Rozróżnienie obu przypadków umożliwia analiza różnicy pomiędzy potencjałem piku a potencjałem połowy wysokości piku. W przypadku procesów odwracalnych (dyfuzyjnych) różnica ta jest równa $0.057/n$ [V], zaś dla procesów nieodwracalnych, kontrolowanych szybkością przeniesienia elektronu przez granicę faz, wynosi $0.048/(\alpha \cdot n)$ [V], gdzie: n – liczba wymienianych elektronów, α – współczynnik przejścia. Dla procesów nieodwracalnych charakterystyczna jest również zależność potencjału piku od szybkości polaryzacji. Do analogicznych wniosków prowadzi analiza zależności $I_p \cdot X^{1/2} = f(X^{1/2})$, która pozwala również na określenie typu dyfuzji analitu do powierzchni elektrody. Dla dyfuzji liniowej funkcja f jest funkcją stałą, zaś w przypadku dyfuzji sferycznej – rosnącą. W sytuacji, gdy prąd piku przyrasta liniowo ze wzrostem szybkości narastania potencjału, mamy do czynienia z procesem kontrolowanym przez adsorpcję depolaryzatora na powierzchni elektrody pracującej [2,3].



Rysunek 3. Badanie mechanizmu reakcji utleniania witaminy C na elektrodzie μ CGMDE. (a) Woltamogramy LSV zarejestrowane dla wzrastającej szybkości zmiany potencjału V . (b) Zależność potencjału połowy wysokości pików $E_{1/2}$ od logarytmu z parametru kinetycznego X ($X = V^{-1}$). Technika LSV, elektrolit podstawowy: $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bufor octanowy (pH 6.0), stężenie witaminy C $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

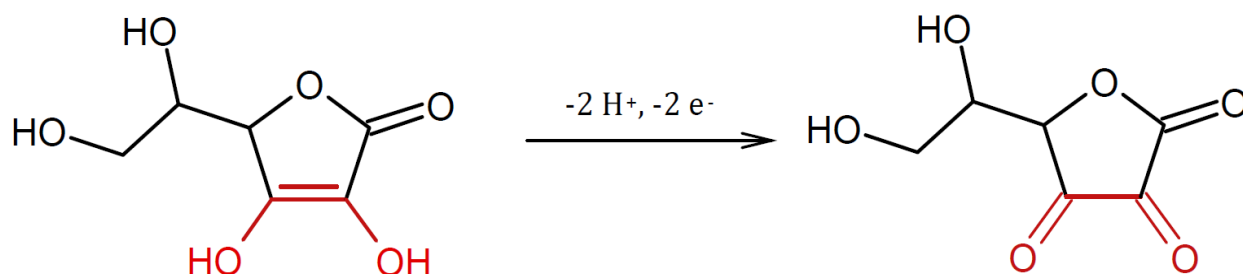
W przypadku krzywych LSV utleniania witaminy C, przedstawionych na **Rys. 3(a)**, żadna z wyżej wymienionych zależności nie była liniowa, co wskazuje, iż proces jej utleniania posiada bardziej złożony mechanizm. Dalsza analiza zarejestrowanych krzywych LSV prowadzi do wniosku, iż zależność potencjału $E_{1/2}$, przy której osiągana jest połowa wysokości pików, od logarytmu dziesiętnego z parametru kinetycznego X jest liniowa ($r = 0.9952$), co ilustruje **Rys. 3(b)**. Świadczy to o mechanizmie EC, czyli reakcji elektrodowej z następczą reakcją 1° , którą w przypadku witaminy C jest hydratacja kwasu dehydroaskorbinowego. W reakcji tej biorą udział dwa substraty, jednak ze względu na duży nadmiar wody o szybkości procesu hydratacji decyduje wyłącznie stężenie produktu utlenienia witaminy C (reakcja pseudo-pierwszego rzędu). Fakt, iż dla zmiany potencjału w kierunku katodowym nie zaobserwowano pików, świadczy o tym, że uwodniony produkt jest nieaktywny elektrodowo w badanym oknie potencjałów. Tym samym reakcja utleniania witaminy C jest reakcją nieodwracalną. Uzyskaną na drodze rozważań teoretycznych zależność $E_{1/2}(X)$ dla mechanizmu EC opisuje równanie:

$$E_{1/2} = \frac{RT}{2nF} \cdot 2.3 \cdot \log(X) + B \text{ [V]} \quad (3)$$

gdzie: B – stała zależna od metody pomiarowej oraz stałej szybkości reakcji zachodzącej po przeniesieniu elektronów, zaś mnożnik 2.3 odpowiada za zamianę logarytmu naturalnego na logarytm dziesiętny [2]. Stosując metodę regresji liniowej wyznaczono zależność $E_{1/2}(X)$ dla badanego procesu utlenienia kwasu askorbinowego, uzyskując równanie:

$$E_{1/2} = -(14.9 \pm 0.6) \cdot \log(X) + (54.7 \pm 0.7) \text{ [mV]} \quad (4)$$

Odnosząc je do równania (3) stwierdzono, iż przez granicę faz elektroda – badany roztwór przeniesieniu ulegają dwa elektrony. Równanie reakcji utleniania witaminy C przedstawia Rys. 4.



Rysunek 4. Reakcja utleniania kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego [5].

3.3. Wpływ parametrów instrumentalnych techniki DPV

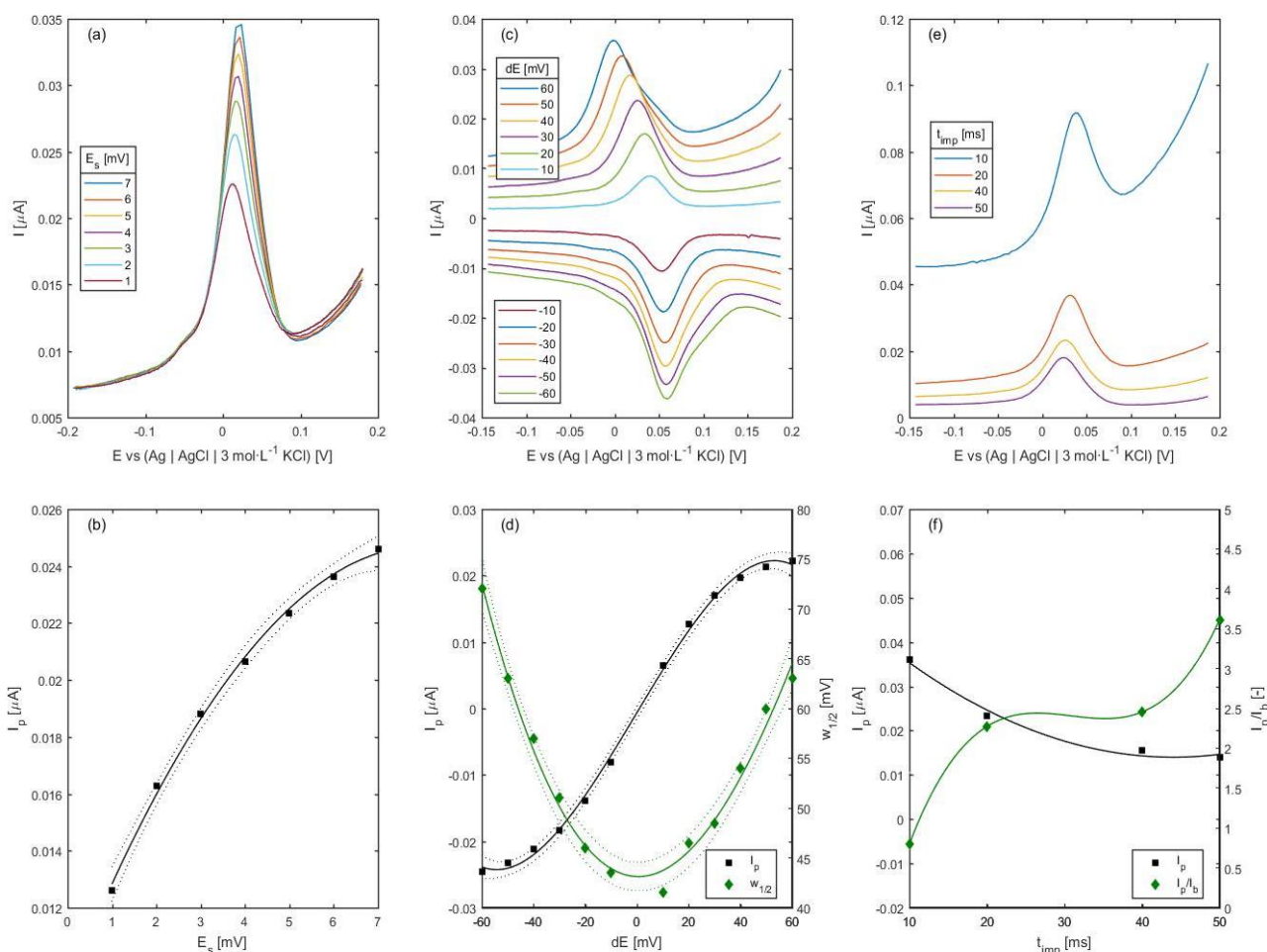
Tab. 1 zawiera wartości wyjściowe oraz testowane dla optymalizowanych zmiennych eksperymentalnych. Poszukiwanie optymalnych parametrów techniki DPV dla oznaczania witaminy C rozpoczęto od zbadania wpływu potencjału początkowego E_0 rejestracji krzywej prądowo-napięciowej. Stwierdzono, iż zmiana E_0 w zakresie od -0.5 do -0.1 V nie wpływa na wysokość oraz położenie pików względem osi potencjałów. W celu odtworzenia przebiegu tła, niezbędnego na etapie interpretacji krzywych DPV, do dalszych pomiarów stosowano wartość $E_0 = -0.2$ V. Wartość potencjału końcowego przyjęto równą $+0.2$ V (początek procesu utleniania rtęci). Kolejnym krokiem było sprawdzenie możliwości nagromadzenia witaminy C na powierzchni elektrody rtęciowej przy potencjale $E_{acc} = -0.2$ V dla podanych w **Tab. 1** czasów zateżania t_{acc} . Stwierdzono, iż wprowadzenie etapu zateżania nie przyczynia się do zwiększenia wysokości rejestrowanych sygnałów, a tym samym do poprawy czułości opracowywanej metody, dlatego kolejne rejestracje krzywych $i(E)$ nie były poprzedzane fazą nagromadzenia depolaryzatora ($t_{acc} = 0$ s).

Wzrost wysokości schodka potencjału E_s powoduje istotny wzrost prądu pików, przy zachowaniu stałego, niewielkiego poziomu prądu tła, co ilustruje **Rys. 5(a)**. Zauważalny jest jednak wzrost szerokości połówkowej pików dla dużych wartości E_s . Zależność prądu pików I_p (po odjęciu tła) od wysokości schodka potencjału, przedstawiona na **Rys. 5(b)**, wykazuje początkowo liniowy charakter. W miarę wzrostu wartości E_s przyrosty prądu stają się coraz mniejsze, a funkcja $I_p(E_s)$ ulega spłaszczeniu. Otrzymane wartości wskazują, iż zmiana schodka potencjału od 1 do 7 mV powoduje zwiększenie wartości prądu od 0.015 do 0.027 μA , co świadczy, że sygnał analityczny wzrasta o 78%. Istotnie za to zmniejsza się liczba punktów pomiarowych (z 400 dla $E_s = 1$ mV do 56 dla $E_s = 7$ mV), co rzutuje na pogorszenie rozdzielczości oraz precyzji odczytu wielkości stanowiących przedmiot interpretacji, tj.: prąd i potencjał pików. Zależność $I_p(E_s)$ ma charakter rosnący dla wszystkich procesów, za wyjątkiem tych kontrolowanych przez adsorpcję, jak w przypadku oznaczania witaminy B₂. Prąd pików maleje wówczas wraz ze wzrostem wysokości schodka potencjału, co jest spowodowane dłuższym okresem czasu, w którym mogą zachodzić procesy adsorpcji. Dla tego parametru instrumentalnego funkcja celu powinna uwzględniać wysokość pików oraz rozdzielczość metody, rozumianą jako liczba punktów pomiarowych. Biorąc pod uwagę te czynniki za wartość optymalną dla witaminy C uznano $E_s = 3$ mV i stosowano ją w dalszych pomiarach.

Tabela 1. Optymalizacja warunków rejestracji voltamogramów DPV utleniania witaminy C.

Parametr	Jednostka	Wartość wyjściowa	Testowane wartości
pH buforu octanowego	-	5.0	5.0; 5.2; 5.4; 5.6; 5.8; 6.0; 6.2; 6.3
E_0	V	-0.2	-0.5; -0.4; -0.3; -0.2; -0.1
t_{acc}	s	0	0; 5; 10; 20
E_s	mV	2	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7
dE	mV	40	-60 ÷ -10; 10 ÷ 60 z krokiem 10
t_{imp}	ms	40	10; 20; 40; 50

W przypadku stosowania dodatnich wartości amplitudy impulsu dE obserwowano przesuwanie się piku utleniania witaminy C w kierunku potencjałów bardziej ujemnych, zaś dla amplitud ujemnych potencjał piku E_p pozostawał praktycznie stały, co ilustruje **Rys. 5(c)**. Ponadto ze wzrostem wartości bezwzględnej amplitudy kształt piku zmienia się z symetrycznego w nieregularny, a na jego zboczu, po przekroczeniu potencjału E_p można zaobserwować przegięcie, które powoduje zwiększenie szerokości połówkowej. Stąd wniosek, iż optymalną wartość tego parametru należy wybrać spośród niewielkich amplitud impulsu.



Rysunek 5. Wpływ parametrów instrumentalnych na kształt rejestrowanej krzywej DPV oraz położenie i wysokość piku utleniania witaminy C w $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ buforze octanowym (pH 6,0). Wartości wyjściowe jak w Tabeli 1. Stężenie witaminy C w naczynku $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. (a) Wpływ wysokości schodka potencjału E_s ($dE = 40 \text{ mV}$, $t_{imp} = 40 \text{ ms}$). (b) Zależność prądu piku I_p (po odjęciu tła) od wysokości schodka potencjału E_s . (c) Wpływ amplitudy impulsu dE ($E_s = 3 \text{ mV}$, $t_{imp} = 40 \text{ ms}$). (d) Zależność prądu piku I_p oraz szerokości połówkowej $w_{1/2}$ od amplitudy impulsu. (e) Wpływ czasu impulsu t_{imp} ($E_s = 3 \text{ mV}$, $dE = 30 \text{ mV}$). (f) Zależność prądu piku I_p oraz stosunku prądu piku do prądu tła I_p/I_b od t_{imp} .

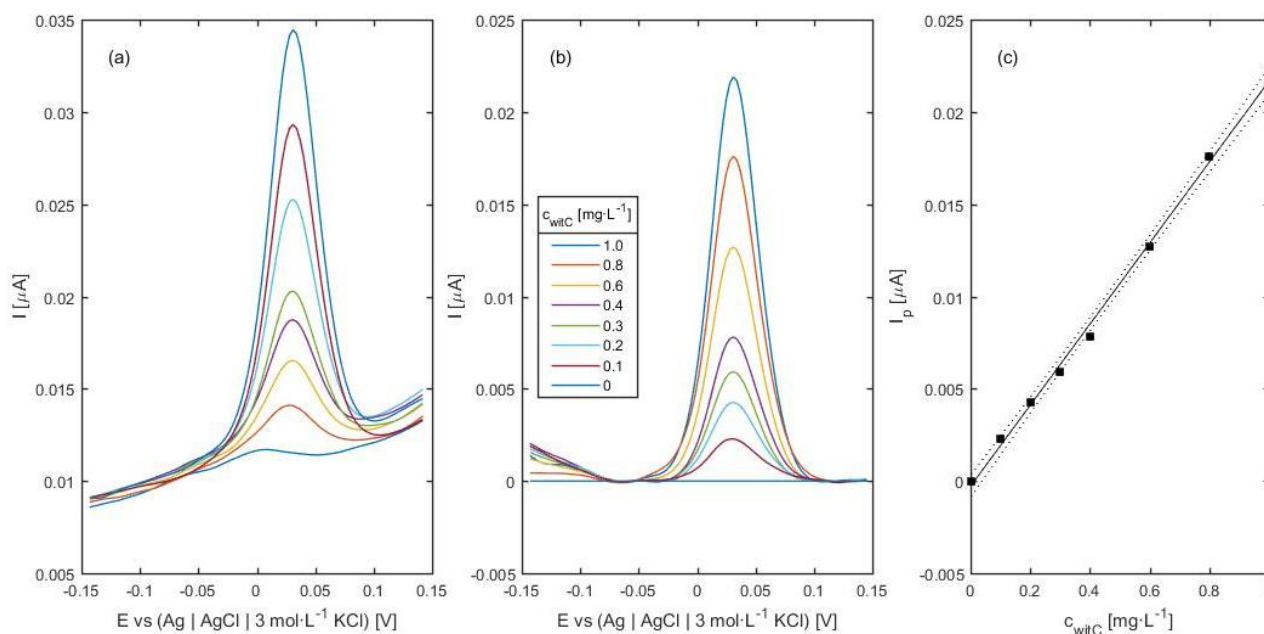
Zależność prądu piku od amplitudy impulsu, zilustrowana na **Rys. 5(d)**, ma charakter sigmoidalny (krzywa o kształcie litery S). Wykazuje ona symetrię punktową względem punktu (0,0), w otoczeniu którego może być aproksymowana funkcją liniową, zaś dla dużych wartości dE obserwowane przyrosty stają się coraz mniejsze, a prąd piku osiąga wartości graniczne, które stanowią dwie asymptoty poziome funkcji. Analiza wykresu zależności szerokości połówkowej piku $w_{1/2}$ od amplitudy impulsu prowadzi do wniosku, iż $w_{1/2}$ przyjmuje mniejsze wartości dla amplitud dodatnich. Ponadto dla wartości dE z zakresu $-30 \div 30 \text{ mV}$ szerokości połówkowe pików są do siebie zbliżone.

Wpływ amplitudy impulsu na rejestrowane krzywe DPV jest niezależny od mechanizmu procesu elektrodowego, a charakterystyki $I_p(dE)$ i $w_{1/2}(E_s)$ mają przebiegi zbliżone do tych uzyskanych dla witaminy C. Często obserwowane jest również zniekształcenie rejestrowanych sygnałów dla dużych wartości amplitud, zwłaszcza w przypadku, gdy pik nie jest symetryczny. Biorąc pod uwagę wymienione czynniki za wartość optymalną w przypadku oznaczeń witaminy C uznano $dE = 30$ mV.

Ostatnim optymalizowanym parametrem techniki DPV był czas impulsu t_{imp} , który jest sumą czasu wyczekiwania t_w i czasu próbkowania prądu t_p (w pomiarach zawsze $t_w = t_p$). **Rys. 5(e)** przedstawia zarejestrowane krzywe prądowo-napięciowe utleniania witaminy C dla t_{imp} z zakresu 10 – 50 ms. Zauważalny jest dla nich spadek prądu pikowego I_p ze wzrostem czasu impulsu, co szczegółowo ilustruje **Rys. 5(f)**. Głównym celem stosowania czasu wyczekiwania jest redukcja wartości prądu tła I_b , którego główną składową stanowi prąd pojemnościowy. Krzywa $I_p = f(t_{imp})$ ma charakter malejący, zaś funkcja $I_p/I_b = g(t_{imp})$ jest funkcją rosnącą, dlatego wybór optymalnej wartości czasu impulsu jest zawsze kompromisem między wysokością pików a stosunkiem sygnału użytecznego do szumu. W przypadku witaminy C za wartość optymalną uznano $t_{imp} = 20$ ms.

3.4. Kalibracja metody oznaczania witaminy C

Stosując metodę wielokrotnego dodatku wzorca dokonano, w warunkach uznanych za optymalne, kalibracji metody oznaczania witaminy C w buforze octanowym. Przedstawione na **Rys. 6(a)** woltamogramy dla wzrastającego stężenia analitu od ślepej próby do $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ poddano interpretacji, która obejmowała ich uśrednienie oraz korektę linii bazowej. W efekcie otrzymano krzywe zilustrowane na **Rys. 6(b)**, w oparciu o które wykreślono krzywą kalibracyjną, zamieszczoną na **Rys. 6(c)**. Jej parametry oraz współczynnik korelacji liniowej, wyznaczone metodą walidacji krzyżowej, zestawiono w **Tab. 2**. Na ich podstawie wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności oraz zakres liniowości opracowywanej metody analitycznej.



Rysunek 6. (a) Woltamogramy DPV utleniania witaminy C w $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ buforze octanowym (pH 6.0) zarejestrowane dla wzrastającego stężenia witaminy C w zakresie od ślepej próby do $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (jedno z trzech powtórzeń). (b) Krzywe z Rys. 6(a) poddane interpretacji. (c) Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie krzywych z Rys. 6(b). Technika DPV, $E_0 = -0.2$ V, $E_k = 0.2$ V, $E_s = 3$ mV, $dE = 30$ mV, $t_{imp} = 20$ ms.

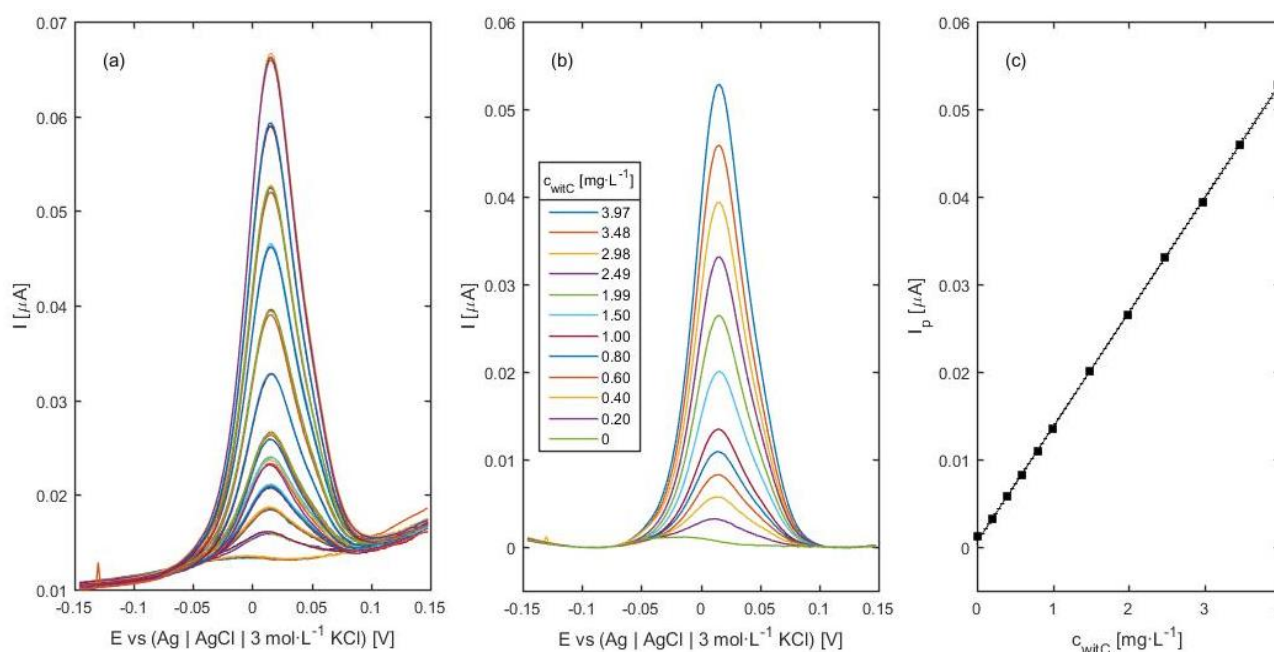
Tabela 2. Parametry krzywych kalibracji dla woltamperometrycznego oznaczania witaminy C na elektrodzie μ CGMDE wyznaczone techniką walidacji krzyżowej.

Parametr	Jednostka	Warunki zoptymalizowane	warunki niezoptymalizowane
wyraz wolny a	μA	(0.0003 ± 0.0001)	0**
czułość b	$\mu\text{A}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$	(0.0219 ± 0.0002)	(0.0131 ± 0.0001)
wsp. korelacji r	-	0.9987	0.9999
granica wykrywalności LD	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.013	0.013
granica oznaczalności LQ	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.044	0.044
zakres liniowości	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.044 \div 1.00^*$	$0.044 \div 4.00$

*zakres ten można rozszerzyć do $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; ** obliczona wartość jest mniejsza niż dokładność przyrządu pomiarowego

Otrzymany model (krzywa kalibracyjna) cechuje się istotnością i zdolnością prognostyczną. Ponadto granica oznaczalności jest mniejsza niż wartość najmniejszego stężenia użytego do sporządzenia kalibracji ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a współczynnik korelacji jest większy niż 0.995. Na tej podstawie opisana metoda woltamperometrycznego oznaczania witaminy C może być uznana za analitycznie przydatną.

Celem weryfikacji przeprowadzonego procesu optymalizacji sporządzono kalibrację oznaczania witaminy C dla pomiarów wykonywanych w warunkach wyjściowych (przed optymalizacją). Zarejestrowane woltamogramy DPV przedstawia **Rys. 7(a)**, zaś krzywe uzyskane po ich uśrednieniu i korekcie linii bazowej zilustrowano na **Rys. 7(b)**. W oparciu o nie wykreślono krzywą kalibracyjną, którą przedstawiono na **Rys. 7(c)**, zaś jej parametry zestawiono w **Tab. 2**. Analogicznie jak dla warunków zoptymalizowanych, wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności oraz zakres liniowości. Na podstawie wyznaczonych parametrów stwierdzono, iż metoda oznaczania witaminy C w warunkach niezoptymalizowanych jest również analitycznie przydatna.



Rysunek 7. (a) Woltamogramy DPV utleniania witaminy C w $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ buforze octanowym (pH 6.0) zarejestrowane dla wzrastającego stężenia witaminy C w zakresie od ślepej próby do $3.97 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ w warunkach niezoptymalizowanych. (b) Krzywe z Rys.7(a) poddane interpretacji. (c) Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie krzywych z Rys. 7(b). Technika DPV, $E_0 = -0.2 \text{ V}$, $E_k = 0.2 \text{ V}$, $E_s = 2 \text{ mV}$, $E_s = 2 \text{ mV}$, $dE = 40 \text{ mV}$, $t_{imp} = 40 \text{ ms}$.

Analiza danych zawartych w **Tab. 2** prowadzi do wniosku, iż procedura oznaczania witaminy C w warunkach zoptymalizowanych cechuje się blisko 2-krotnie większą czułością, co stanowi jeden z atutów odpowiednio przeprowadzonej optymalizacji parametrów pomiarowych. Wyznaczone wartości LD , LQ oraz zakres liniowości są porównywalne dla obu metod. Niewielka różnica w wartości współczynnika korelacji, na korzyść warunków przed optymalizacją, może wynikać z różnej liczby woltamogramów DPV, które uwzględniano w obliczeniach.

4. Podsumowanie

Prawidłowo wykonana optymalizacja warunków eksperymentalnych dla oznaczeń woltamperometrycznych techniką impulsową różnicową pozwala na uzyskanie symetrycznych pików o małej szerokości połówkowej oraz eliminację zakłóceń ze strony matrycy organicznej i substancji powierzchniowo-czynnych. Analiza krzywych LSV pozwala na stwierdzenie odwracalności reakcji chemicznej i procesu elektrodowego, a także określenie jego mechanizmu i liczby wymienianych elektronów. Liczbę protonów biorących udział w reakcji można wyznaczyć z zależności potencjału pikowego od pH elektrolitu podstawowego.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż:

- wzrost amplitudy impulsu powoduje przyrost prądu pikowego, przy czym możliwy jest wzrost szerokości połówkowej pików i zmiana jego położenia względem osi potencjałów;
- wzrost czasu impulsu powoduje obniżenie wartości mierzonego sygnału analitycznego, lecz równocześnie następuje poprawa stosunku sygnału użytecznego do szumu;
- wraz ze zwiększeniem wysokości schodka potencjału następuje wzrost prądu pikowego; wyjątek od tej reguły stanowią procesy kontrolowane przez adsorpcję depolaryzatora, dla których obserwowana zależność $I_p(E_s)$ jest malejąca;
- potencjał początkowy rejestracji woltamogramu ma wpływ na wysokość pików tylko w przypadku procesów adsorpcyjnych – im większa różnica między potencjałem startowym, a potencjałem pikowym, tym większe są wartości mierzonego prądu pikowego.

W przypadku procesów kontrolowanych przez adsorpcję możliwe jest zateżnienie analitu na powierzchni elektrody przed rozpoczęciem rejestracji krzywej prądowo-napięciowej (woltamperometria stripingowa), co pozwala na zwiększenie czułości oznaczeń oraz obniżenie granicy oznaczalności.

Opisana w niniejszej pracy optymalizacja warunków eksperymentalnych została wykonana dla pomiarów, w których rolę elektrody pracującej pełniła mikroelektroda rtęciowa o kontrolowanym wzroście powierzchni kropli. W przypadku stosowania elektrod stałych koniecznym jest także dobranie odpowiedniej procedury przygotowania powierzchni elektrody, która obejmuje zazwyczaj polerowanie na zawieszinach Al_2O_3 o rozmiarach nanometrycznych oraz kondycjonowanie przy silnie ujemnym potencjale.

Literatura

- [1] *Instrumentalne metody analizy chemicznej*, pod redakcją W.W. Kubiaka i J. Gołasia, skrypt AGH, Wydawnictwo Naukowe Akapit, Kraków, 2005.
- [2] Z. Galus, *Teoretyczne podstawy metod elektrochemicznych*, Warszawa 1977.
- [3] A. Kiszka, *Elektrochemia II, Elektrodyka*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2001.
- [4] J. Mazerski, *Chemometria praktyczna*, Publikacja wydana pod auspicjami Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Warszawa 2009.
- [5] G.F. Jr. Combs, *The vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health* (3rd ed.), Ithaca, NY: Elsevier Academic Press, 2008.