

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN C
BẰNG PHƯƠNG PHÁP VON - AMPE HÒA TAN ANOT**

Đến toà soạn 10 - 7 - 2015

Dương Thị Tú Anh

Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Cao Văn Hoàng

Khoa Hóa học - Trường Đại học Quy Nhơn

**RESEARCH AND DETERMINATION OPTIMAL CONDITIONS TRACE LEVELS
VIT.C BY ANODE STRIPPING VOLTAMMETRY METHOD**

SUMMARY

Vitamin C (ascorbic acid, or Vit.C) has long since is known as an essential nutrient for higher primates, and for a small number of other species. Vit.C presence is needed in a variety of metabolic reactions in all animals and plants, they are created in the body by almost all organisms, eliminate child humans, monkeys, dolphins lack a specific enzyme catalysis to convert glucose into Vit.C. It is also one of the people widely known as a vitamin, without which it will cause scurvy for humans [1-7].

May determine the amount of objects Vit.C analyzed by several different methods, including Von - Ampere soluble anode (ASV) methods with technical momentum differential (DP) is one method sensitivity, precision, high selectivity and low detection limits. This paper published research results select the appropriate experimental conditions allows the determination of the method Vit.C by DPASV. The study results showed that the limit of detection and quantification limit Vit.C of the method respectively are 1,6ppb and 4,9ppb.

Keywords: *Von-Ampere dissolved, trace levels, methods, and Vit.C.*

1. MỞ ĐẦU:

Chức năng chủ yếu của Vit.C là sản xuất collagen, một protein chính của cơ thể. Đặc biệt, Vit.C giúp nối kết một phần của phân tử amino acid proline để hình thành hydroxyproline làm cho cấu trúc collagen ổn định. Collagen không những là một protein

rất quan trọng trong việc liên kết các cấu trúc cơ thể với nhau (mô liên kết, sụn khớp, dây chằng, vv..), Vit.C còn cần thiết cho sự lành vết thương, khỏe nướu răng, và ngăn ngừa các mảng bám ở da [1-7].

Vit.C còn có chức năng miễn dịch, tham gia quá trình tạo ra một số chất dẫn truyền thần

kinh và hormon, tổng hợp carnitine, hấp thụ và sử dụng các yếu tố dinh dưỡng khác. Vit.C cũng là một chất dinh dưỡng chống oxy hóa rất quan trọng [9-11].

Vì vậy, việc nghiên cứu xác định hàm lượng vết Vit.C trong các đối tượng phân tích, nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng Vit.C nâng cao sức khỏe cho mỗi người là một việc rất cần thiết.

Phương pháp Von-Ampe hoà tan anốt xung vi phân (DPASV) là một trong những phương pháp cho phép xác định hàm lượng vết Vit.C [8] trong nhiều đối tượng khác nhau với độ nhạy, độ chính xác, độ chọn lọc cao và giới hạn phát hiện thấp. Trong bài báo này, chúng tôi sẽ trình bày các kết quả nghiên cứu các điều kiện thí nghiệm thích hợp để xác định hàm lượng Vit.C bằng phương pháp DPASV.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hoá chất

Các phép đo được thực hiện trên hệ thiết bị phân tích cực phổ VA 797 do hãng Metrohm (Switzerland) sản xuất, có hệ thống sục khí tự động với hệ 3 điện cực: Điện cực làm việc là điện cực giọt thủy ngân treo; điện cực so sánh: Ag/AgCl, KCl(3M); điện cực phụ trợ: điện cực Platin. Tất cả các hoá chất được sử dụng trong quá trình nghiên cứu đều là hoá chất tinh khiết phân tích (PA); các dung dịch chuẩn Vit.C được pha chế hàng ngày từ Vit.C (PA) của Merck bằng nước cất hai lần.

Trước khi tiến hành phân tích, điện cực và bình chứa mẫu được làm sạch bằng dung dịch HNO₃ 10% và tráng rửa nhiều lần bằng nước cất hai lần.

Các dụng cụ thủy tinh như: bình định mức, pipét... các chai thủy tinh, chai nhựa PE, chai lọ đựng hoá chất đều được ngâm trong

dung dịch HNO₃ 10% , tráng, rửa sạch bằng nước cất 2 lần trước khi dùng.

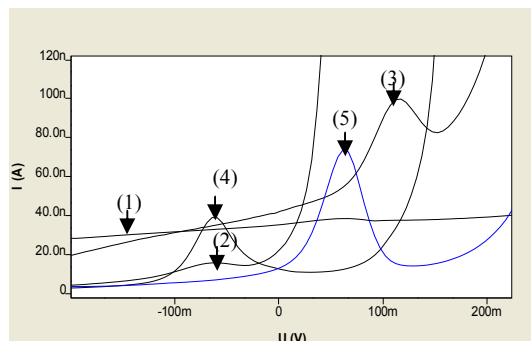
2.2. Quy trình phân tích Vit.C

Lấy một thể tích nhất định dung dịch nghiên cứu có chứa Vit.C và dung dịch chất điện li làm nền vào bình điện phân. Tiến hành sục khí N₂ (5.0) để đuổi oxy hòa tan. Sau đó, tiến hành điện phân làm giàu ở -0,2V, khuấy dung dịch với tốc độ 2000 vòng/phút. Khi kết thúc giai đoạn làm giàu, ngừng khuấy, để dung dịch yên tĩnh 15s, quét thế theo chiều dương từ -0,20V đến 0,3V bằng kỹ thuật xung vi phân với biên độ xung $\Delta E = 50mV$; thời gian xung 40ms; thời gian mỗi bước thế $t_{step} = 0,2s$; bước nhảy thế 5mV và tốc độ quét thế 25mV/s, đồng thời ghi đường DPASV. Để xác định nồng độ Vit.C chúng tôi lựa chọn phương pháp thêm chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn chất điện li nền

Tiến hành thí nghiệm nghiên cứu với dung dịch Vit.C 10ppb, thêm vào đó một thể tích nhất định một trong các dung dịch chất điện li làm nền cần khảo sát. Tiến hành ghi đo đường DPASV của Vit.C trong các nền điện li đã chọn, với các điều kiện ghi đo tương tự như phần 2.2. Kết quả ghi đo được thể hiện trên hình 1:



Hình 1. Đường DPASV của Vit.C trong các nền điện li khác nhau

(1) trong nước; (2) trong dung dịch KCl; (3) trong dung dịch axit axetic; (4) trong dung dịch đệm photphat; (5) trong dung dịch đệm axetat

Kết quả khảo sát cho thấy:

Khi không có mặt dung dịch chất điện li làm nền, trên đường DPASV (đường 1) hầu như không xuất hiện pic tại vị trí nào, hơn nữa đường nền nằm rất cao.

Trong dung dịch KCl 0,1M trên đường DPASV (đường 2) xuất hiện pic ở thế $E = -0,069V$. Tuy nhiên dòng đỉnh pic I_p thấp, chân pic không đều và tương đối cao.

Trong dung dịch axit axetic 0,1M, trên đường DPASV (đường 3) xuất hiện pic ở thế $E = 0,112V$, vị trí pic chuyển dịch về phía thế dương lớn nhất, song chân pic rất cao, không cân đối.

Trong nền đệm photphat 0,1M, trên đường DPASV (đường 4) xuất hiện pic ở thế $E = -0,064V$, vị trí thế đỉnh pic chuyển dịch về phía thế âm hơn, mặt khác chân rộng hơn, không cân đối, hơn nữa dòng đỉnh pic I_p đạt giá trị thấp hơn so với đường DPASV trong đệm axetat 0,1M.

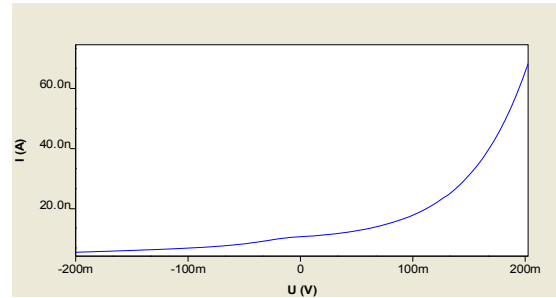
Trong nền đệm axetat 0,1M, trên đường DPASV (đường 5) xuất hiện pic ở thế $E = 0,062V$; pic của Vit.C đẹp, cân đối, chân pic gọn và thấp, hơn nữa dòng đỉnh pic I_p đạt giá trị lớn nhất.

Do vậy, chúng tôi chọn nền điện li là đệm axetat 0,1M trong tất cả các phép đo DPASV.

3.2. Thí nghiệm trắng

Thí nghiệm trắng là thí nghiệm được thực hiện trong các điều kiện hoàn toàn như thí nghiệm nghiên cứu chỉ khác là không cho chất phân tích. Chúng tôi tiến hành khảo sát trong các điều kiện tương tự như nghiên

cứu dung dịch nền. Kết quả khảo sát được thể hiện trên hình 2:



Hình 2. Đường ASV của mẫu trắng

ĐKTN: $E_{dp} = -0,2V$; $t_{dp} = 50s$; $t_{nghe} = 20s$;

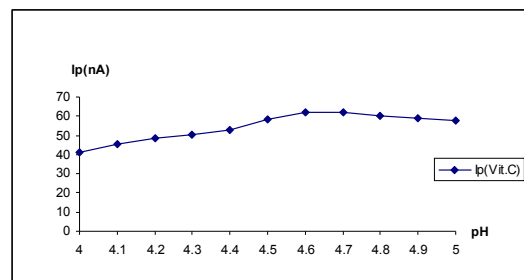
Kích cỡ giọt thủy ngân $\theta = 4$; $\omega = 2000$ vòng/phút;

Đuổi oxi hòa tan (DO) trong 60s bằng $N_25.0$.

Từ kết quả khảo sát trên hình 2 chúng tôi nhận thấy không xuất hiện pic của Vit.C, có nghĩa là sự nhiễm bẩn của toàn bộ hệ thống phân tích hầu như không có.

3.3. Nghiên cứu lựa chọn pH tối ưu

Để khảo sát ảnh hưởng của pH đến dòng đỉnh hòa tan của các chất nghiên cứu, chúng tôi tiến hành phép ghi đo trong các điều kiện tương tự như phần 2.2, nhưng thay đổi các giá trị pH khác nhau. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 3:

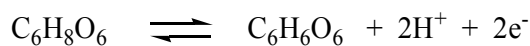


Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của I_p vào giá trị pH dung dịch đệm

Từ các kết quả nghiên cứu được, chúng tôi nhận thấy:

Khi tăng dần giá trị pH của dung dịch đệm, thế đỉnh pic dịch chuyển về phía dương

hơn. Mặt khác, trong vùng khảo sát giá trị pH dung dịch đệm từ 4,0 đến 5,0 dòng đỉnh hòa tan I_p của Vit.C tăng dần trong khoảng pH 4,0 đến 4,6; ở các giá trị pH từ 4,6 đến 4,7 các đường DPASV đạt giá trị ổn định, thế đỉnh pic cao, chân pic cân đối, pic gọn và đẹp; song có xu hướng giảm nhẹ ở các giá trị pH 4,7 đến 5,0. Điều này có thể là do trong dung dịch xảy ra bán phản ứng oxi hóa khử của Vit.C :



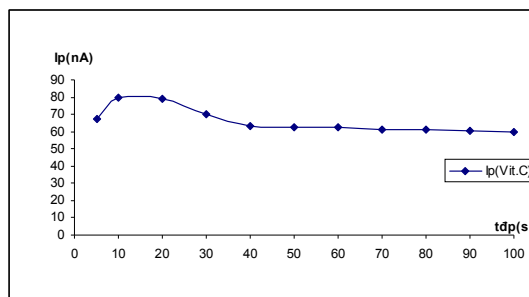
Hơn nữa trong dung dịch Vit.C phân li ở nấc thứ nhất với $pK_{a_1} = 4,17$ và phân ly rất yếu ở nấc 2, $pK_{a_2} = 11,56$. Tốc độ oxi hóa Vit.C thành axit L-đehidroascorbic càng lớn khi pH càng tăng.

Do vậy khi pH của dung dịch tăng, làm cho cân bằng trên dịch chuyển sang phải tạo ra dạng $C_6H_6O_6$ làm cho thế đỉnh pic E_p có sự dịch chuyển.

Vì vậy, để thuận lợi cho quá trình phân tích Vit.C chúng tôi chọn giá trị pH dung dịch đệm thích hợp nhất cho việc ghi đo đường DPASV của Vit.C là 4,6.

3.4. Nghiên cứu lựa chọn thời gian điện phân làm giàu

Để lựa chọn được thời gian điện phân làm giàu thích hợp, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với dung dịch Vit.C 10ppb, thêm vào đó 0,5mL dung dịch đệm axetat có pH 4,6 và thay đổi thời gian điện phân từ 5s đến 100s. Sau đó, tiến hành ghi đo đường DPASV của Vit.C với các điều kiện ghi đo tương tự như phần 2.2. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 4:

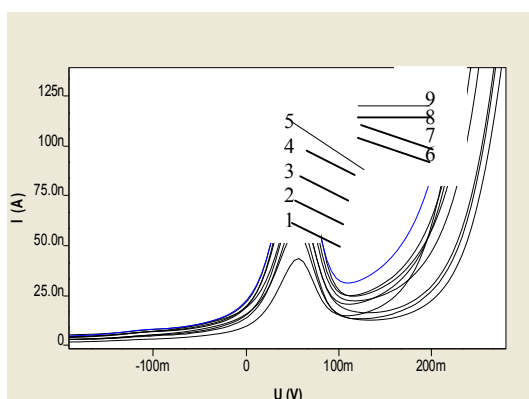


Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của I_p vào thời gian điện phân

Dựa vào kết quả thu được chúng tôi nhận thấy: Khi tăng thời gian điện phân thì các giá trị I_p của Vit.C thay đổi không nhiều. Tuy nhiên, ở những thời gian đầu chiều cao pic chưa ổn định, chân pic cao và rộng, pic không cân đối. Trong khoảng thời gian từ 50s trở đi chiều cao pic ổn định, chân pic hẹp và thấp, pic cân đối hơn rất nhiều. Điều này có thể là do lúc này tốc độ khử Vit.C ổn định, lượng Vit.C khuếch tán vào trong lòng giọt thủy ngân đạt giá trị ổn định và lớn nhất. Như vậy, để đảm bảo độ chính xác của phép phân tích Vit.C, chúng tôi chọn thời gian điện phân làm giàu là 50s.

3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích cỡ giọt thủy ngân

Tiến hành tương tự phần 3.4, nhưng thay đổi kích cỡ giọt thủy ngân từ 1 đến 9. Sau đó, tiến hành ghi đo đường DPASV của Vit.C với thời gian điện phân là 50s và các điều kiện ghi đo khác tương tự như phần 2.2. Kết quả ghi đo được thể hiện trên hình 5.

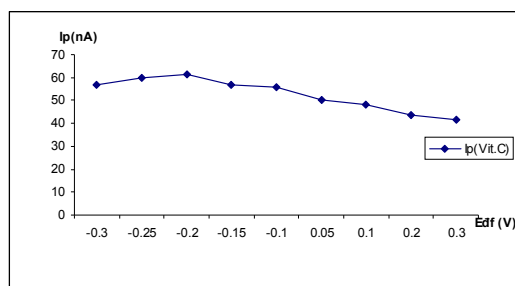


Hình 5. Các đường DPASV của Vit.C ứng với kích cỡ giọt thủy ngân khác nhau

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi kích cỡ giọt Hg tăng dần từ 1 đến 9 thì dòng đỉnh hòa tan I_p cũng tăng dần. Tuy nhiên với giọt treo khi kích cỡ quá lớn thì giọt dễ bị rơi trong quá trình phân tích làm sai lệch kết quả phân tích. Chính vì vậy chúng tôi chọn kích cỡ giọt thủy ngân ở mức trung bình là 4 trong các phép ghi đo.

3.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của thế điện phân làm giàu

Để lựa chọn được thế điện phân thích hợp cho phép phân tích chúng tôi tiến hành khảo sát trong các điều kiện tương tự như ở phần 3.5, nhưng thay đổi thế điện phân làm giàu trong khoảng $-0,30V \div 0,30V$, các điều kiện ghi đo khác tương tự như phần 2.2. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 6:

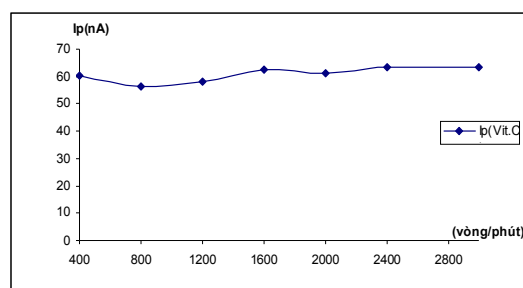


Hình 6. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của I_p vào thế điện phân làm giàu khác nhau

Từ các kết quả thu được ở trên chúng tôi thấy: Khi tăng dần giá trị thế điện phân đặt vào hai điện cực từ $-0,30V$ đến $-0,20V$ thì giá trị I_p của vitamin C cũng tăng dần và đạt giá trị lớn nhất ở thế bằng $-0,20V$. Tuy nhiên khi tăng dần giá trị thế điện phân từ $-0,15V$ đến $0,30V$, giá trị I_p của vitamin C có xu hướng giảm dần. Điều này có thể là do càng gần với thế đỉnh pic E_p của chất nghiên cứu thì sự khuếch tán các chất điện hoạt tới điện cực giảm, do đó lượng chất phân tích bề mặt điện cực giảm dần tới cường độ dòng I_p giảm. Vì vậy, chúng tôi chọn thế điện phân là $-0,20V$ trong các phép ghi đo.

3.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy dung dịch

Để nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy dung dịch tới dòng đỉnh hòa tan I_p của Vit.C trong các điều kiện như phần 2.2, nhưng thay đổi tốc độ khuấy trộn dung dịch trong khoảng $400 \div 2800$ vòng/phút. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trên hình 7:



Hình 7. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của I_p vào tốc độ khuấy dung dịch

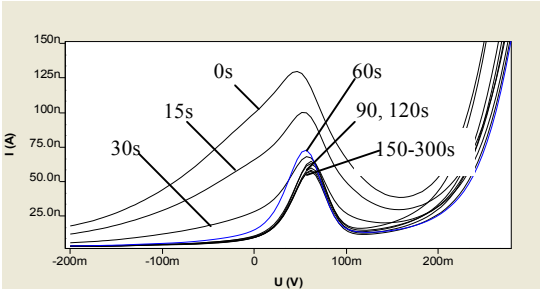
Các kết quả nghiên cứu cho thấy khi tốc độ khuấy dung dịch càng lớn thì các giá trị I_p của Vit.C càng cao. Tuy nhiên khi tốc độ khuấy lớn thì sự khuếch tán chất phân tích tới bề mặt điện cực không đồng đều, dễ tạo thành sự đa lớp của chất phân tích, đồng

thời tốc độ khuấy quá cao cũng dễ dẫn tới hiện tượng rơi giọt.

Vì vậy, chúng tôi chọn tốc độ khuấy 2000 vòng/phút là giá trị tối ưu sử dụng cho các phép ghi đo.

3.8. Nghiên cứu lựa chọn thời gian sục khí

Để lựa chọn được thời gian sục khí thích hợp, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu với dung dịch vitamin C 10ppb, thêm vào đó 0,5mL dung dịch đệm axetat có pH 4,6 và thay đổi thời gian sục khí từ 15 s đến 300s. Sau đó, tiến hành ghi đo đường DPASV của Vit.C với các điều kiện ghi đo tương tự như phần 2.2. Kết quả ghi đo được thể hiện trên hình 8:



Hình 8. Các đường DPASV của Vit.C ở các thời gian sục khí khác nhau

Các kết quả nghiên cứu cho thấy: trong vùng khảo sát thời gian sục khí, ở thời gian sục khí từ 0 ÷ 30s giá trị I_p cao, tuy nhiên chân pic cao, không cân đối, ảnh hưởng đến độ chính xác của phép đo. Trong khoảng thời gian 60s đến 120s dòng đỉnh hòa tan I_p của Vit.C khá ổn định, trong khoảng thời gian từ 150s đến 300s có xu hướng giảm nhẹ. Vì vậy, chúng tôi chọn giá trị thời gian sục khí thích hợp nhất cho phép ghi đo là 60s.

Tổng hợp các kết quả khảo sát chúng tôi đã xác định các điều kiện thí nghiệm thích hợp

cho phép xác định Vit.C bằng phương pháp DPASV được trình bày ở bảng 1:

Bảng 1. Các điều kiện thí nghiệm thích hợp cho phép xác định Vit.C bằng phương pháp

DPASV

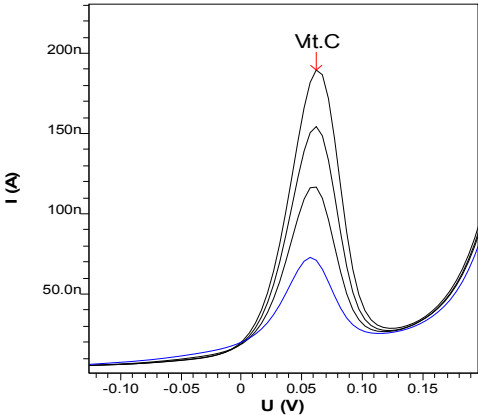
Dung dịch nền	đệm axetat	Thời gian điện phân	50s
pH dung dịch nền	4,6	Kích cỡ giọt thủy ngân	4
Thể tích dung dịch đệm	0,5mL	Thế điện phân (E_{dp})	- 0,2V
Thời gian sục khí	60s	Tốc độ khuấy dung dịch	2000 rpm

3.9. Độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp

3.9.1. Độ chính xác

3.9.1.1. Độ đúng

Dựa trên các điều kiện tối ưu đã khảo sát được theo bảng 1, chúng tôi tiến hành đánh giá độ đúng của phép đo thông qua dung dịch chuẩn và các điều kiện phân tích đã chuẩn bị ở phần 2.2. Mẫu được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Kết quả phân tích được thể hiện trên hình 9 và bảng 2:



Hình 9. Các đường DPASV phân tích mẫu chuẩn Vit.C

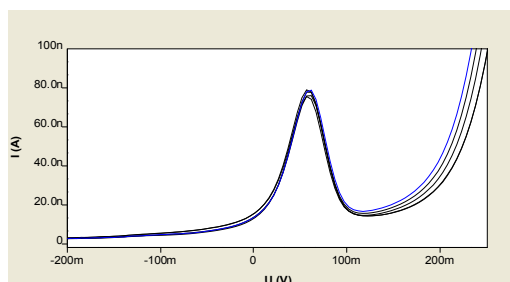
Bảng 2. Kết quả xác định hàm lượng Vit.C trong mẫu chuẩn

Mẫu phân tích	Nồng độ vit.C (ppb)
Lần 1	$10,31 \pm 0,36$
Lần 2	$9,97 \pm 0,75$
Lần 3	$10,36 \pm 1,41$
Trung bình	$10,49 \pm 1,02$

Các kết quả nhận được cho thấy sai số tương đối $\varepsilon = 0,98$. Chứng tỏ phép đo có độ đúng tốt.

3.9.1.2. Độ chụm

Để xác định độ chụm của phép đo chúng tôi tiến hành ghi đo đường Von-Ampe hòa tan anot của dung dịch Vit.C nồng độ 10ppb trong các điều kiện tối ưu đã khảo sát theo bảng 1, lặp lại phép đo 10 lần. Kết quả ghi đo được thể hiện trên hình 10 và bảng 3:



Hình 10. Các đường DPASV của Vitamin C trong 10 lần đo lặp lại

Bảng 3. Các giá trị I_p của Vit.C trong 10 lần đo lặp lại

Lần đo	$I_{Vit.C}$ (nA)	Lần đo	$I_{Vit.C}$ (nA)
1	62,4	6	62,3
2	63,8	7	62,3
3	63,2	8	63,5
4	62,2	9	63,7
5	62,5	10	61,9

Sử dụng các kết quả ghi đo trong phần khảo sát độ chụm của phép đo để tính toán, chúng tôi thu được kết quả sau:

Giá trị I_p trung bình $I_{p(tb)} = 62,78$ nA

Độ lệch chuẩn: $S = 0,69$

Phương sai $S^2 = 0,48$

Độ lệch chuẩn của đại lượng trung bình:

$$S_{\bar{x}} = 0,221$$

Độ chính xác của phép đo:

$$\Delta X(\alpha, k) = t \cdot s_{\bar{x}} = 2,36 \cdot 0,221 = 0,52$$

Từ kết quả trên chúng tôi thấy giá trị I_p của Vit.C trong các lần đo sai khác nhau không đáng kể, điều đó chứng tỏ phép đo có độ chụm tốt.

3.9.2. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ):

Sử dụng các kết quả ghi đo trong phần khảo sát độ chụm của phép đo để tính LOD, LOQ chúng tôi thu được kết quả như sau :

$$LOD = 1,66 \text{ ppb}$$

$$LOQ \approx 3 LOD = 4,99 \text{ ppb}$$

4. KẾT LUẬN

Qua các kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã xác định được các điều kiện thí nghiệm thích hợp cho phép ghi đo xác định Vit.C trong mẫu phân tích đó là: chất điện li làm nền là dung dịch đệm axetat với pH bằng 4,6; thế điện phân làm giàu là -0,20V; thời gian điện phân làm giàu là 60s; khoảng quét thế là -0,2V ÷ 0,2V; tốc độ quét thế là 25mV/s; tốc độ khuấy dung dịch là 2000v/phút và kích cỡ giọt thủy ngân là 4.
2. Đã áp dụng các điều kiện thí nghiệm thích hợp xác định được để kiểm tra độ chính xác của phép đo thông qua mẫu chuẩn, kết quả kiểm tra cho thấy phép đo có độ chính xác tốt. Kết quả sai lệch với mẫu chuẩn nằm trong giới hạn cho phép.

(xem tiếp tr. 82)