ROZDZIAŁ 5
METODY KALIBRACYJNE
– NOMENKLATURA I KLASYFIKACJA

Paweł Kościelniak
Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. R. Ingardena 3, 30-060 Kraków

1. WPROWADZENIE

Lektura literatury fachowej prowadzi do wniosku, że w chemii analitycznej brak jest jasno określonej, obowiązującej nomenklatury dotyczącej zagadnień kalibracji analitycznej. Charakterystyczne jest między innymi to, że pomimo nieuchronnej konieczności wykonywania kalibracji w analizie instrumentalnej, a także powszechnego stosowania samego pojęcia „kalibracja analityczna" nie jest ono zdefiniowane nawet w takich pozycjach, które są poświęcone zagadnieniom nomenklaturowym w chemii [1,2] lub też podane określenia są oderwane od praktyki analitycznej [3]. Dziwi również fakt, że wobec ogromnego znaczenia problematyki kalibracyjnej jest ona traktowana zbyt fragmentarycznie i dość niespójnie nawet w podręcznikach z zakresu analityki chemicznej [4-6]. Brak jest przede wszystkim uniwersalnej klasyfikacji metod kalibracyjnych, sformułowanej w formie na tyle klarownej i logicznej, by np. pojęcia „metoda kalibracyjna" i „metoda analityczna" były wyraźnie rozłączne i odnosiły się do różnych obszarów zagadnień chemii analitycznej.

Powyższy problem ma z pewnością niebagatelne znaczenie. Brak uporządkowania nomenklaturowego w zakresie problematyki kalibracyjnej może stać się źródłem wielu nieporozumień i niejasności, co może w konsekwencji wywołać niewłaściwe lub nawet całkowicie błędne postępowanie analityczne. Obecna sytuacja nie sprzyja również celom dydaktycznym, trudno bowiem w sposób wiarygodny przekazywać określony zasób wiedzy analitycznej na podstawie określonego podręcznika lub skryptu akademickiego posługując się językiem, który nie tylko we własnym odczuciu jest niepoprawny, lecz w dodatku jest odmienny od tego, jaki można napotkać w innym ogólnie dostępnym źródle. Należy wreszcie pamiętać o pewnym aspekcie psychologicznym: nie kto inny jak właśnie chemik-analityk jest (a przynajmniej powinien być) w szczególny sposób uwrażliwiony na „porządek" i „czystość", niezależnie od tego, jakich obszarów chemii analitycznej pojęcia te dotyczą.

Wymienione problemy są głównym motywem powstania obecnej pracy. Zawarte w niej propozycje definicji, nazewnictwa i klasyfikacji pojęć kalibracyjnych są sugestiami autorskimi, które jednakże znalazły zrozumienie w najbliższym środowisku naukowym autora i są stopniowo wprowadzane do programu nauczania chemii analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prezentacja ich szerokiemu gronu chemików-analityków ma na celu zainicjowanie dyskusji, która może rzucić jeszcze inne, nowe światło na poruszane zagadnienia i przyczynić się do ustalenia ogólnie akceptowanego stanowiska na tym polu.

2. KALIBRACJA ANALITYCZNA

Podstawowe zadanie analityczne polega na wyznaczeniu stężenia określonej substancji (*analitu*) w próbce badanego materiału. Można to zrobić jedynie za pomocą wybranego instrumentu analitycznego [1] na podstawie informacji pomiarowych dostarczanych przez ten instrument (tzw. *sygnałów analitycznych*) dla analizowanej próbki.

Niezależnie od zastosowanego w danym przypadku instrumentu mierzony sygnał analityczny (R) zależy nie tylko od stężenia analitu (c_a), ale również od szeregu innych czynników. Należą do nich parametry instrumentalne (p_{a1}, p_{a2}, …, p_{am}) i czynniki określające warunki fizykochemiczne badanej próbki (p_{c1}, p_{c2}, …, p_{ck}), a także stężenia innych substancji obecnych w próbce (c_{d1}, c_{d2}, …, c_{dn}), które są jej naturalnymi składnikami, bądź są dodawane do niej w trakcie procedury analitycznej. Ogólną zależność sygnału analitycznego od wymienionych czynników można więc opisać wzorem [2]:

$$R = f\,(c_a;\ c_{d1}, c_{d2}, \ldots, c_{dn};\ p_{a1}, p_{a2}, \ldots, p_{am};\ p_{c1}, p_{c2}, \ldots, p_{ck}) \qquad (1)$$

Przed wykonaniem pomiaru sygnału analitycznego instrument pomiarowy i badaną próbkę wzajemnie dostosowuje się do siebie, ustalając parametry określające warunki instrumentalne i fizykochemiczne na stałych, optymalnych poziomach [3]. Na etapie wykonywania pomiarów zależność (1) przyjmuje więc uproszczoną postać:

$$R = f\,(K;\ c_a;\ c_{d1}, c_{d2}, \ldots, c_{dn}) \qquad (2)$$

gdzie K jest współczynnikiem określającym ogólne warunki wykonywanej analizy.

Podstawowym problemem analitycznym jest określenie rodzaju i stężenia składników (c_{d1}, c_{d2}, …, c_{dn}), które wpływają na sygnał analityczny świadczący o obecności i stężeniu analitu w próbce. Wpływ ten nosi nazwę *efektu interferencyjnego*, a same substancje wywołujące ten efekt określa się mianem *interferentów*. Choć efekt interferencyjny teoretycznie może nie występować lub być zaniedbywany w określonym przypadku, to jednak zawsze należy się z nim liczyć, choćby ze względu na możliwość wprowadzenia interferentów do próbki w trakcie przygotowywania jej do pomiaru. Dokładne określenie wartości parametrów określających warunki analityczne (K) oraz ustalenie rodzaju i stężenia interferentów w próbce (c_{d1}, c_{d2}, …, c_{dn}) na podstawie rozważań teoretycznych lub choćby półempirycznych jest zawsze niezwykle trudne, a najczęściej wręcz niemożliwe. W

[1] Analiza ilościowa próbki zawsze jest wykonywana za pomocą określonego instrumentu pomiarowego, choć czasem wykorzystywane do tego celu przyrządy – w porównaniu z obecnie powszechnie stosowanymi, w pełni zautomatyzowanymi i sterowanymi komputerowo aparatami o złożonej budowie – są tak proste, że ich „instrumentalny” charakter nie jest zauważany i doceniany. Należą do nich przede wszystkim waga analityczna i biureta, służące do wykonywania analiz odpowiednio grawimetrycznych i wolumetrycznych. Z tego punktu widzenia powszechnie stosowany podział analizy chemicznej na analizę klasyczną (czyli właśnie grawimetryczną i wolumetryczną) i analizę instrumentalną nie ma racji bytu.

[2] W niektórych przypadkach sygnał analityczny nie jest mierzony bezpośrednio dla analitu, lecz dla innego składnika, który jest dodawany do próbki w znanej ilości i wiąże analit w reakcji o znanej stechiometrii. Sygnał zależy wtedy dodatkowo od stężenia tego składnika. Ze względu jednak na to, że obecność tego składnika w próbce ma charakter pomocniczy i służy jedynie ustaleniu stężenia analitu, nie został on uwzględniony we wzorze.

[3] Zabiegi te wykonywane w odniesieniu do instrumentu nazywa się również często „kalibracją”, które to określenie nie należy jednak mylić, ani w żadnym stopniu utożsamiać z pojęciem „kalibracji analitycznej”.

konsekwencji bezpośrednie wyznaczenie stężenia analitu w próbce na podstawie zmierzonego sygnału analitycznego za pomocą ściśle określonego wzoru (2) jest również niemożliwe. Dlatego też powszechnie stosuje się w tym celu podejście czysto empiryczne, będące domeną tzw. *kalibracji analitycznej*.

Pod pojęciem „kalibracja analityczna" należy rozumieć proces polegający na odwzorowaniu rzeczywistej (prawdziwej, teoretycznej) zależności sygnału analitycznego od stężenia analitu (zwanej w tym kontekście *zależnością kalibracyjną*) do postaci empirycznej (czyli tzw. *wykresu kalibracyjnego* [4]), a następnie na wykorzystaniu tego wykresu do wyznaczenia stężenia analitu w badanej próbce (czyli uzyskania tzw. *wyniku analitycznego*). Wykres kalibracyjny konstruuje się w określonych, stałych warunkach analitycznych (instrumentalnych i fizykochemicznych) przy użyciu jednego lub kilku *roztworów wzorcowych* [5], czyli roztworów o znanych, ściśle ustalonych stężeniach przynajmniej jednego składnika (najczęściej analitu).

Kalibracja analityczna składa się więc z trzech etapów: laboratoryjnego (tj. sporządzenia roztworów wzorcowych), pomiarowego (tj. konstruowania wykresu kalibracyjnego) i matematycznego (tj. obliczania wartości wyniku analitycznego). Szczegółowy tryb wykonania poszczególnych etapów składa się na tzw. *procedurę kalibracyjną*.

Każda procedura kalibracyjna powinna być realizowana zgodnie ze ściśle ustalonymi regułami, które określają bardziej ogólny sposób postępowania, prowadzący do osiągnięcia – poza głównym zadaniem kalibracyjnym – pewnych dodatkowych celów analitycznych. Taki specyficzny tryb postępowania kalibracyjnego można nazwać *metodą kalibracyjną.*

3. NOMENKLATURA METOD ANALITYCZNYCH

W analizie chemicznej stosuje się kilka różnych metod kalibracyjnych. Pojawiają się one w literaturze pod rozmaitymi, dość dowolnie nadawanymi nazwami, co stwarza sytuację chaosu i wprowadza wiele nieporozumień.

W odniesieniu do konwencjonalnej, powszechnie stosowanej metody używa się przemiennie nazw „metoda serii wzorców" i „metoda krzywej kalibracyjnej". Żadna z nich *notabene* nie pozwala na odróżnienie tej metody od innych, bo przecież w innych przypadkach też często sporządza się kilka roztworów wzorcowych i zawsze posługuje się wykresem kalibracyjnym. Metodzie dodatków wzorca często nadaje się nieprawidłowe określenie „technika dodatków", jak również zupełnie niepotrzebnie i niekonsekwentnie często wyróżnia się jej wersję pod nazwą „metoda pojedynczego dodatku". Niektóre inne określenia, takie jak „metoda wzorca wewnętrznego" są niespójne pojęciowo i mylące, bowiem występująca tu nazwa „wzorzec" odnosi się do substancji dodawanej w określonej ilości do roztworu o znanym stężeniu analitu (czyli „wzorzec" jest dodawany do „wzorca"). Takie nazwy metod kalibracyjnych jak „metoda rozcieńczeń" [7,8] czy stosunkowo niedawno wprowadzona „metoda dodatków i kolejnych rozcieńczeń" [9], również budzą wątpliwości, bowiem nie oddają

[4] Bardziej poprawnym określeniem jest „funkcja kalibracyjna", lecz ze względu na powszechnie przyjęty zwyczaj ujmowania informacji kalibracyjnych w postaci graficznej zdecydowano się na użycie pojęcia „wykres kalibracyjny".

[5] Bardziej ogólnym określeniem jest „próbka wzorcowa", lecz w celu uniknięcia kolizji tego pojęcia z próbką rzeczywistą, a także ze względu na powszechność stosowania roztworów w analizie chemicznej zdecydowano się na użycie nazwy „roztwór wzorcowy".

w prawidłowy sposób istotnych różnic między metodami. Inne, rzadziej stosowanej metody kalibracyjne nie mają w zasadzie ustalonych nazw, co przyczynia się do powstania jeszcze większego zamętu.

Wydaje się, że powyższe problemy wynikają głównie stąd, że stosowane nazwy metod kalibracyjnych odnoszą się w większości przypadków jedynie do laboratoryjnego etapu procedury kalibracyjnej, tzn. podkreślają określony sposób przygotowania wzorców (np. w formie serii wzorców czy wzorca wewnętrznego), lub też realizacji postępowania doświadczalnego (np. dodawania wzorców, rozcieńczania). W różnych metodach stosuje się jednak przecież te same zabiegi laboratoryjne, a wynikające stąd efekty kalibracyjne i analityczne są często zupełnie różne.

Sytuację komplikują dodatkowo doniesienia na temat kalibracji analitycznej w analizie przepływowej [10-13]. Techniki przepływowe oferują tak rozmaite i odmienne od tradycyjnie przyjętych sposoby sporządzania roztworów i wykonywania pomiarów, że opracowanym rozwiązaniom kalibracyjnym nadaje się z reguły nazwy opisujące stosowane procedury. W rezultacie trudno jest nawet czasem na tej podstawie zorientować się, z jaką właściwie metodą kalibracyjną ma się w danym przypadku do czynienia [14].

Bardzo ważnym aspektem analitycznym związanym z zagadnieniami kalibracyjnymi, a więc również z problemami nomenklaturowymi w tym zakresie, jest zjawisko efektu interferencyjnego. Jest ono zasadniczo niepożądane w analizie chemicznej. Efekt interferencyjny można zminimalizować na etapie przygotowania próbki do pomiaru poprzez oddzielenie interferentów od analitu przy użyciu rozmaitych technik rozdzielania substancji lub dodanie do próbki określonej substancji eliminującej wpływ interferenta na analit na drodze chemicznej lub fizykochemicznej. Z różnych jednak przyczyn wymienione zabiegi mogą okazać się ryzykowne, zawodne lub wręcz niemożliwe do wykonania. W takich przypadkach ostatnią szansą opanowania problemu interferencji jest zastosowanie odpowiedniej metody kalibracyjnej.

Wobec braku należytego uporządkowania nomenklaturowego i klasyfikacyjnego w odniesieniu do zagadnień kalibracyjnych istnieją, jak można zauważyć, istotne nieporozumienia co do praktycznych możliwości minimalizacji efektów interferencyjnych na drodze kalibracyjnej. Jest to jeszcze jeden ważny powód konieczności zaproponowania nowej, klarownej klasyfikacji metod kalibracyjnych, która byłaby pomocna w pełnym wyjaśnieniu tych problemów.

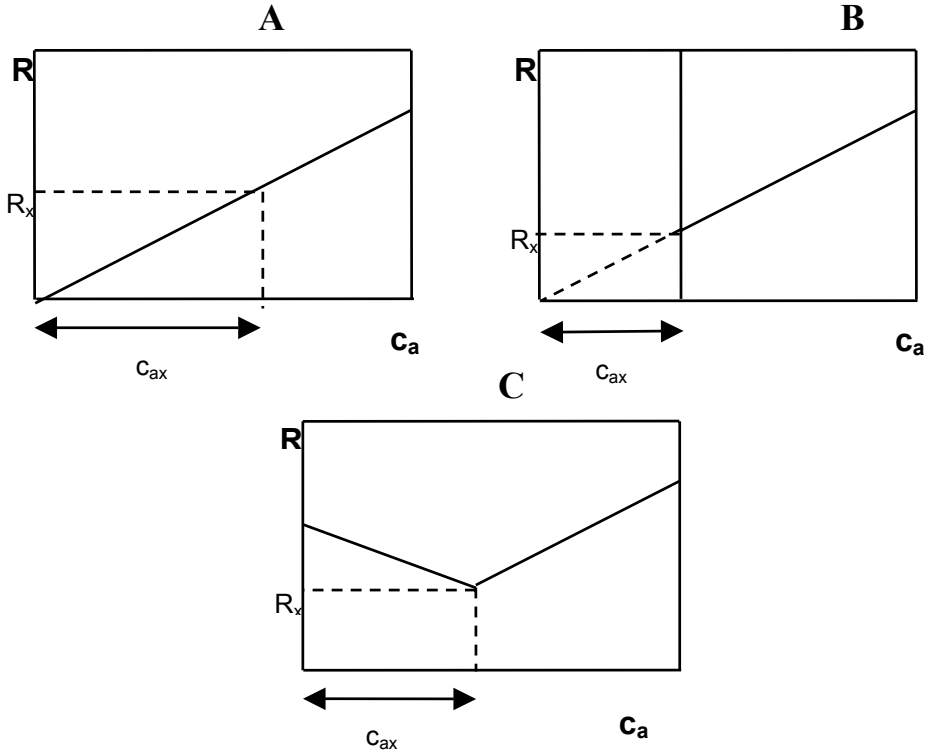
4. NOWA KLASYFIKACJA METOD KALIBRACYJNYCH

Podstawą nowej klasyfikacji metod analitycznych jest przytoczona wyżej definicja kalibracji analitycznej zakładająca, że zasadniczymi etapami kalibracji są odwzorowanie zależności kalibracyjnej i sposób wyznaczenia wyniku analitycznego. Przyjęto więc, że podstawowymi kryteriami różnicującymi metody kalibracyjne od siebie powinny być nie (jak w dotychczasowym ujęciu) aspekty laboratoryjne, lecz pomiarowe i obliczeniowe.

Wychodząc z powyższego założenia postawiono tezę, że wszystkie metody kalibracyjne znane w chemii analitycznej można zaliczyć do trzech kategorii: interpolacyjnej, ekstrapolacyjnej i wskaźnikowej [14]. Graficzna interpretacja metod należących do wszystkich trzech kategorii jest przedstawiona schematycznie na rys. 1.

We wszystkich przypadkach wynik analityczny (c_{ax}) wyznacza się za pomocą wykresu kalibracyjnego biorąc pod uwagę sygnał analityczny zmierzony przy użyciu próbki (R_x).

W metodach interpolacyjnych wynik analityczny oblicza się na podstawie tej części wykresu kalibracyjnego, która obejmuje zakres wyznaczony w sposób doświadczalny, a w metodach ekstrapolacyjnych – tej części, która znajduje się poza zakresem wyznaczonym doświadczalnie. W obu przypadkach wykres w części służącej do wyznaczenia wyniku analitycznego nie zawiera punktu doświadczalnego o cechach matematycznych odróżniających go od innych punktów.



Rys. 1. Sposób wyznaczenia wyniku analitycznego, c_{ax}, na podstawie sygnału R_x odniesionego do odpowiedniej części wykresu kalibracyjnego w metodzie interpolacyjnej (A), ekstrapolacyjnej (B) i wskaźnikowej (C); R – sygnał analityczny, c_a – stężenie analitu

W metodach wskaźnikowych wynik analityczny oblicza się na podstawie położenia na wykresie kalibracyjnym punktu charakterystycznego, odmiennego (od strony matematycznej) od innych punktów tworzących ten wykres.

5. METODY INTERPOLACYJNE

W praktyce analitycznej stosowane są cztery różne kalibracyjne metody interpolacyjne, które można nazwać:

- „konwencjonalna metoda interpolacyjna" („*Conventional Interpolative Method"– CIM*),
- „pośrednia metoda interpolacyjna" („*Indirect Interpolative Method"-IIM*),
- „interpolacyjna metoda wzorca wewnętrznego"[6] („*Interpolative Internal Standard Method -IISM"),*
- „interpolacyjna metoda rozcieńczeń" („*Interpolative Dilution Method"- IDM*).

[6] Wydaje się, że określenie „wzorzec wewnętrzny" w odniesieniu do metody analitycznej jest tak mocno zakorzenione w świadomości chemików-analityków, że sugerowanie jego zmiany byłoby krokiem bezcelowym.

Zasada wszystkich wymienionych metod interpolacyjnych jest przedstawiona bliżej na rysunku 2.

Metoda CIM jest tożsama z najbardziej powszechnie stosowanym podejściem kalibracyjnym, zwanym popularnie „metodą serii wzorców" lub „metodą krzywej kalibracyjnej". W metodzie tej sporządza się zwykle kilka roztworów wzorcowych o różnym, znanym stężeniu analitu. Roztwory te oraz badaną próbkę poddaje się pomiarom sygnału analitycznego w warunkach charakterystycznych dla analitu. Wykonanie pomiarów z osobna dla każdego roztworu wzorcowego i dla próbki stwarza możliwość obliczenia wyniku analitycznego drogą interpolacyjną (patrz rysunek 2A).

W analizie przepływowej wiele jest przykładów takiej realizacji metody CIM, gdzie seria roztworów wzorcowych jest generowana z pojedynczego roztworu [15-17]. W niektórych przypadkach tak sporządzanym roztworom wzorcowym nie można przypisać ściśle określonego stężenia analitu; zależność kalibracyjną odwzorowuje się wówczas w postaci sieci liniowych wykresów kalibracyjnych [18,19]. Proponowane jest też taka wersja metody CIM, w której roztwory wzorcowe są dodawane do próbki (w układzie wstrzykowo-przepływowym), dając jednak możliwość wykonania pomiarów dla wszystkich tych roztworów z osobna [20]. Wszystkie te modyfikacje nie zmieniają jednak charakteru i istoty metody CIM.

Metodę IIM stosuje się wtedy, gdy używany instrument nie daje możliwości wykonania pomiaru sygnału analitycznego dla analitu, ale istnieje możliwość zmierzenia sygnału dla innej substancji, która może wejść w reakcję chemiczną z analitem. Reagent ten dodaje się wówczas w stałej, znanej ilości zarówno do próbki, jak i do roztworów wzorcowych o wzrastającym stężeniu analitu. Jeżeli reagent jest dodany w nadmiarze w stosunku do największego stężenia analitu, to pomiar sygnałów dla reagenta pozostałego po reakcji w każdym roztworze wzorcowym prowadzi do skonstruowania wykresu kalibracyjnego o kształcie przedstawionym na rysunku 2B [7].

Kalibracja z wykorzystaniem metody IIM może przyczynić się do zwiększenia liczby i rodzaju substancji możliwych do oznaczania za pomocą danej metody analitycznej. Typowym przykładem tego typu możliwości jest wykorzystanie kalibracji z wykorzystaniem techniki IIM do oznaczania anionów metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej [21].

Metoda IISM (zwana powszechnie „metodą wzorca wewnętrznego") różni się od metody CIM tym, że do roztworów wzorcowych i do próbki dodaje się inną substancję (tzw. wzorzec wewnętrzny) w jednakowym, znanym stężeniu, a pomiary wykonuje dla wszystkich roztworów w warunkach charakterystycznych zarówno dla analitu, jak i dla wzorca wewnętrznego. Za sygnał analityczny przyjmuje się stosunek sygnałów otrzymanych w obu warunkach (patrz rysunek 2C).

Podstawowym celem metody IISM jest wyznaczenie stężenia analitu w próbce ze zwiększoną precyzją. Przyjmuje się bowiem, że jeżeli wzorzec wewnętrzny i analit mają podobne właściwości chemiczne, to wielkość i kierunek przypadkowych zmian sygnałów analitycznych mierzonych dla obu składników jest również podobny. W takiej sytuacji istnieje duża szansa, że stosunek obu sygnałów będzie charakteryzował się znacznie mniejszymi fluktuacjami, niż sam sygnał mierzony dla analitu, co w konsekwencji pozwoli na zminimalizowanie błędu przypadkowego wyniku analitycznego.

[7] Na opisanej zasadzie można sporządzić roztwory wzorcowe również w taki sposób, by wykres kalibracyjny był „rosnący".

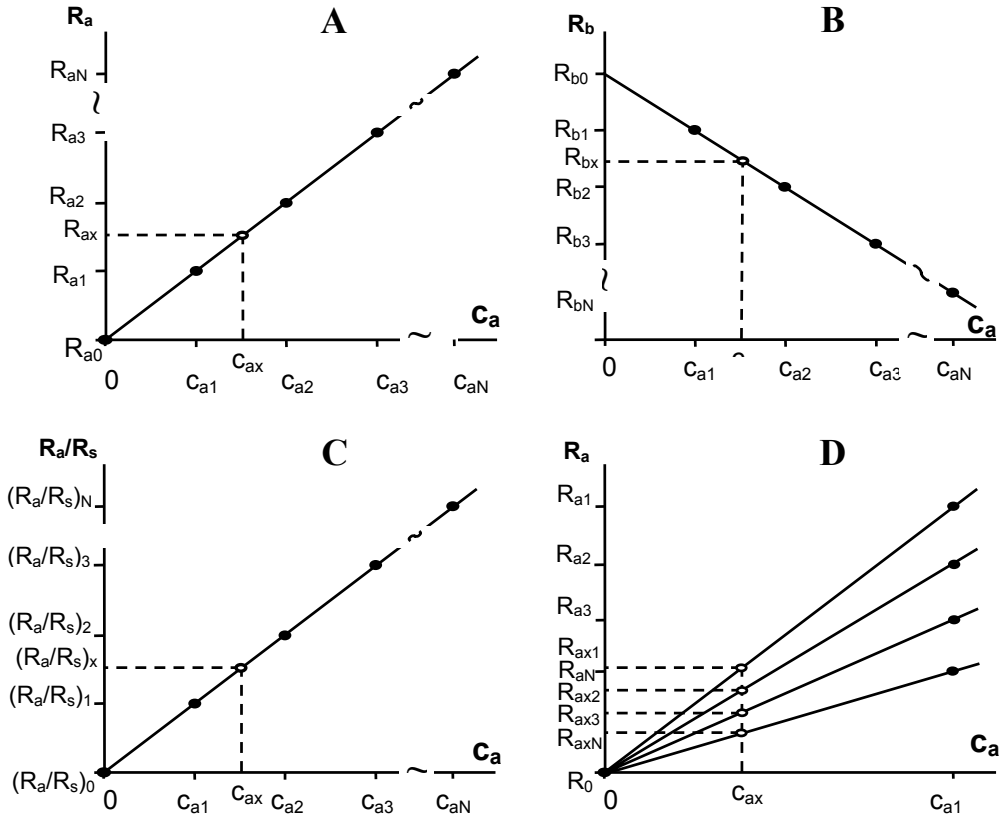
W przypadku metody IDM stosuje się pojedynczy roztwór wzorcowy zawierający analit. Wzorzec i próbkę stopniowemu rozcieńcza się i na każdym stopniu rozcieńczenia poddaje się oba roztwory pomiarom w warunkach charakterystycznych dla analitu. Każda para uzyskanych sygnałów analitycznych pozwala na interpolacyjne wyznaczenie stężenia analitu w próbce o danym rozcieńczeniu (tzw. stężenia pozornego) za pomocą „dwupunktowego" wykresu kalibracyjnego (patrz rysunek 2D).

Zbiór uzyskanych stężeń pozornych interpretuje się w następujący sposób [8]:

a) jeżeli wartości stężeń pozornych są statystycznie jednakowe, to wynik analityczny oblicza się z wartości średniej tych stężeń,
b) w przeciwnym wypadku wyznacza się graniczną wartość stężenia pozornego (w próbce o nieskończenie wielkim rozcieńczeniu), którą przyjmuje się za miarę wyniku analitycznego.

Metoda rozcieńczeń ma zastosowanie w szczególnie trudnych i nie do końca dobrze rozpoznanych warunkach analitycznych, tzn. gdy istnieje ryzyko, że pomiary są wykonywane w nieliniowym zakresie zależności kalibracyjnej i gdy istnieje efekt interferencyjny. Przyjmuje się bowiem, że w miarę rozcieńczania próbki oba efekty stopniowo zmniejszają się i zanikają całkowicie przy nieskończenie wielkim rozcieńczeniu próbki, pozwalając tym samym na dokładne wyznaczenie wyniku analitycznego.

Metodę IDM zastosowano również w analizie przepływowej, w dwóch wariantach: techniki ciągłego przepływu [22] i techniki wstrzykowo-przepływowej [23,24].



Rys. 2. Graficzne przedstawienie zasady metod interpolacyjnych: CIM (A), IIM (B), IISM (C) i IDM (D); R_a, R_b, R_s – sygnały mierzone odpowiednio dla analitu, substancji reagującej z analitem i wzorca wewnętrznego; ●, ○ – punkty doświadczalne otrzymane odpowiednio dla roztworów wzorcowych i próbek; (pozostałe oznaczenia jak na rys. 1)

6. METODY EKSTRAPOLACYJNE

Wszystkie metody interpolacyjne mogą być realizowane w wersji ekstrapolacyjnej. Można zatem powiedzieć, że do metod ekstrapolacyjnych zalicza się:

-„konwencjonalną metodą ekstrapolacyjną" („*Conventional Extrapolative Method"- CEM*),
-„pośrednią metodą ekstrapolacyjną" („*Indirect Extrapolative Method"- IEM*),
-„ekstrapolacyjną metodą wzorca wewnętrznego" („*Extrapolative Internal Standard Method"- EISM*),
-„ekstrapolacyjną metodą rozcieńczeń" („*Extrapolative Dilution Method"- EDM).*

Graficzna interpretacja metod ekstrapolacyjnych jest przedstawiona na rysunku 3.

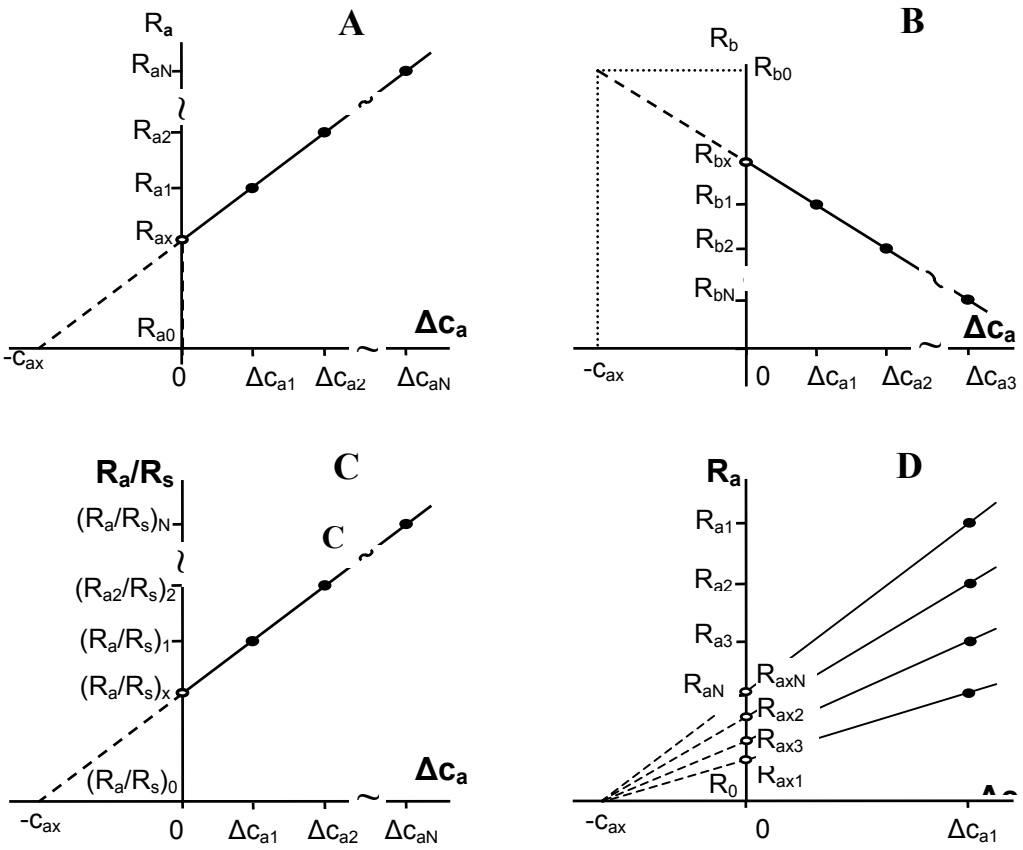
Podstawowym warunkiem koniecznym do tego, by dana metoda interpolacyjna nabrała charakteru ekstrapolacyjnego jest wykonanie pomiarów dla samej próbki i próbki z przynajmniej jednym dodatkiem roztworu wzorcowego zawierającym analit. Roztwory poddawane pomiarom należy przygotować w taki sposób, by stężenie tej części analitu, która jest zawarta w sposób naturalny w próbce było w tych roztworach jednakowe. Wykres kalibracyjny skonstruowany na podstawie danych pomiarowych objęty jest w tym przypadku ograniczonym zakresem stężeń analitu, tj. w granicach od stężenia analitu w próbce do łącznego stężenia analitu w próbce i w dodatku o największym jego stężeniu. Wyznaczenie wyniku analitycznego jest więc możliwe jedynie na drodze ekstrapolacji tego wykresu (patrz rysunek 3).

Każda z metod interpolacyjnych po przyjęciu wersji ekstrapolacyjnej może być realizowana (na etapach laboratoryjnym, pomiarowym i obliczeniowym) w sposób charakterystyczny dla siebie i spełniać dzięki temu swoje specyficzne (poprzednio wymienione) cele i zadania.

Konwencjonalna metoda kalibracyjna w wersji ekstrapolacyjnej (CEM) jest określana terminem "metoda dodatku wzorca" i, jak wiadomo, ma powszechne zastosowanie w analizie chemicznej. Jest ona najczęściej realizowana zgodnie z tradycyjną procedurą, obejmującą m.in. sporządzenie serii roztworów próbki z kolejnymi dodatkami wzorca o różnym stężeniu i wykonanie pomiarów dla każdego z tych roztworów z osobna. W analizie przepływowej proponuje się różne modyfikacje tej procedury, prowadzące do jej usprawnienia zarówno na etapie laboratoryjnym, jak i pomiarowym [10,11].

Wykorzystanie w praktyce analitycznej znalazła też metoda EDM, którą w literaturze proponuje się pod nazwami „metoda dodatków i kolejnych rozcieńczeń" [9] lub po prostu „metoda dodatków i rozcieńczeń"[25]. Metodę EDM ostatnio wprowadzono również do analizy przepływowej [26].

Autorowi nie są znane przykłady zastosowania do kalibracji analitycznej metod IEM i EISM (choć oczywiście nie wyklucza on istnienia takich doniesień). Jest jednak rzeczą nie mogącą budzić wątpliwości, że realizacja tych metod jest całkowicie realna – stąd ich obecność na liście metod podlegających proponowanej klasyfikacji.



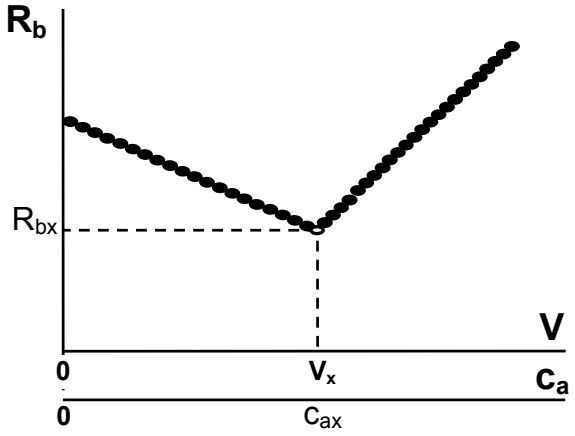
Rys. 3. Graficzne przedstawienie zasady metod ekstrapolacyjnych: CEM (A), IEM (B), EISM (C) i EDM (D); Δc_a –stężenie analitu dodanego do próbki (pozostałe oznaczenia jak na poprzednich rysunkach)

7. METODA WSKAŹNIKOWA

Metoda wskaźnikowa obejmuje wszystkie techniki miareczkowania [8] stosowane w analizie chemicznej.

Podstawą miareczkowania jest reakcja chemiczna zachodząca między analitem a jednym ze składników roztworu wzorcowego (titranta). Wykres kalibracyjny (czyli tzw. krzywą miareczkowania) konstruuje się zwykle na podstawie sygnałów analitycznych mierzonych po ciągłym dodawaniu określonych porcji roztworu wzorcowego do próbki (lub odwrotnie). Pomiary wykonuje się w warunkach charakterystycznych dla wybranej substancji biorącej udział w reakcji (produktu lub substratu). Stężenie analitu w próbce wyznacza się na podstawie wartości objętości roztworu wzorcowego (lub próbki) odpowiadającej punktowi końcowemu miareczkowania (patrz rysunek 4).

[8] W powszechnej opinii miareczkowanie jest uważane za jeden z nielicznych sposobów bezpośredniego (bezkalibracyjnego) wyznaczania stężenia analitu w próbce. Należy jednak zauważyć, że stężenie to nie może być ujawnione bez znajomości stężenia tego składnika titranta, który wchodzi w reakcję z analitem. Tak więc traktowanie roztworu titranta jako roztworu wzorcowego, a procesu miareczkowania jako procesu kalibracji empirycznej jest – w opinii autora – całkowicie uzasadnione.



Rys. 4. Miareczkowanie jako kalibracyjna metoda wskaźnikową: V – objętość roztworu wzorcowego (titranta), V_x – objętość titranta w punkcie końcowym (O) miareczkowania; ● – punkty doświadczalne otrzymywane w trakcie procesu miareczkowania

Z punktu widzenia kryteriów proponowanej nowej klasyfikacji metod kalibracyjnych miareczkowanie stanowi całkowicie odrębną metodę kalibracji analitycznej. Podstawą i charakterystyczną cechą tej metody jest reakcja chemiczna. Reakcja jest wprawdzie również zasadniczym elementem pośredniej metody interpolacyjnej (IIM), jednak w miareczkowaniu – w odróżnieniu metody IIM – przebieg reakcji jest rejestrowany w sposób ciągły aż do osiągnięcia określonego stanu odpowiadającego punktowi końcowemu. Inna różnica polega na tym, że wynik analityczny miareczkowania uwarunkowany jest znajomością stechiometrii zachodzącej reakcji, podczas gdy w przypadku metody IIM informacje te mogą być całkowicie nieznane.

Zupełnie specyficzną cechą miareczkowania jest możliwość wyznaczenia stężenia analitu w próbce bez udziału instrumentu mierzącego sygnał analityczny: dzięki temu, że dla osiągnięcia tego celu wystarczające jest określenie odpowiedniego stanu zachodzącej reakcji chemicznej, w odpowiednich warunkach chemicznych stan ten może być „uchwycony” wizualnie.

8. METODY KALIBRACYJNE A EFEKT INTERFERENCYJNY

Dokonana klasyfikacja metod kalibracyjnych ma swoje osobne uzasadnienie z punktu „odporności” poszczególnych kategorii metod kalibracyjnych na występujące efekty interferencyjne.

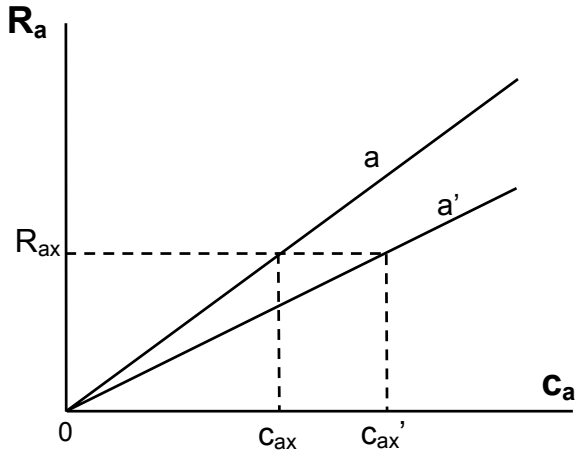
Stosując do kalibracji konwencjonalną metodę interpolacyjną (CIM) można się spodziewać stosunkowo największego zagrożenia ze strony efektu interferencyjnego. Wynika to stąd, że zależność kalibracyjna odpowiadająca próbce zawierającej interferenty nie może być dokładnie odwzorowana wykresem kalibracyjnym skonstruowanym przy użyciu roztworów wzorcowych zawierających sam analit. Jeżeli zatem sygnał mierzony dla próbki, będący sygnałem wywołanym przez analit i zmienionym przez interferenty, jest odniesiony do takiego właśnie wykresu kalibracyjnego, to należy liczyć się z tym, że uzyskany wynik analityczny będzie obarczony błędem. Sytuacja ta jest przedstawiona na rysunku 5.

Powyższa zasada dotyczy również pozostałych metod interpolacyjnych, choć ich specyficzne cechy sprawiają, że problem nabiera nieco mniejszej wagi.

W przypadku pośredniej metody interpolacyjnej (IIM) sygnał nie jest mierzony bezpośrednio dla analitu, lecz dla „obcego" składnika dodawanego do próbki i do roztworów wzorcowych. Istnieje zatem szansa, że składnik ten zwiąże analit w obu środowiskach w oczekiwanej ilości, uwalniając go w ten sposób od obecności interferentów. Z drugiej strony należy uważać, by obecne w próbce składniki nie przyjęły roli interferentów w stosunku do dodawanego składnika.

Wykonując kalibrację z wykorzystaniem interpolacyjnej metody wzorca wewnętrznego (IISM) można mieć nadzieję, że obecne w próbce intereferenty spowodują jednakową (co do kierunku i wielkości) zmianę sygnałów mierzonych dla analitu i dla wzorca wewnętrznego. W takim przypadku stosunek obu sygnałów nie wykaże istniejącego efektu interferencyjnego. Wobec znacznej specyficzności tych efektów można mieć jednak uzasadnione wątpliwości, czy dobór tak działającego wzorca wewnętrznego jest realny.

Kalibracja za pomocą interpolacyjnej metody rozcieńczeń (IDM) ma na celu eliminację efektów interferencyjnych. Zadanie to wynika z założenia, że efekty te redukują się stopniowo w miarę rozcieńczania roztworu próbki. Wykazano jednak doświadczalnie [27,28], że założenie to nie zawsze jest spełnione. Co więcej, udowodniono, że rozcieńczenie próbki może powodować wzrost efektu interferencyjnego, prowadząc do wyznaczenia stężenia analitu korzystając z metody IDM z błędem większym, niż w próbce nierozcieńczonej [27].

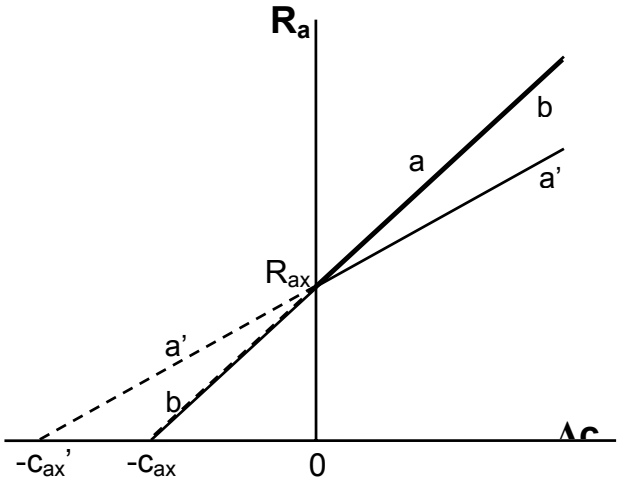


Rys. 5. Metoda CIM: błędne odwzorowanie zależności kalibracyjnej (a) za pomocą wykresu kalibracyjnego (a') w wyniku występowania efektu interferencyjnego oraz wynikający stąd błąd analityczny ($c_{ax}' \neq c_{ax}$)

Jedyna, w pełni skuteczna możliwość minimalizacji efektów interferencyjnych, która jest uniwersalna w stosunku do wszystkich metod interpolacyjnych, polega na dokładnym odwzorowaniu składu próbki w roztworach wzorcowych ze względu na rodzaj i stężenie interferentów. Tylko wtedy bowiem zależność kalibracyjna odpowiadająca składowi próbki może być dokładnie odwzorowana za pomocą wykresu kalibracyjnego. W praktyce wymaga to rozpoznania, które składniki próbki w danym przypadku pełnią rolę interferentów i dodania ich do wszystkich roztworów wzorcowych w takich stężeniach, w jakich są obecne w próbce. Oczywiście zadanie to jest niezwykle trudne i możliwe do zrealizowania w pełnym stopniu tylko w przypadku niewielkich efektów interferencyjnych wywoływanych przez pojedyncze składniki próbki.

Można więc ogólnie stwierdzić, że możliwość eliminacji efektów interferencyjnych z zastosowaniem interpolacyjnych metod kalibracyjnych jest bardzo ograniczona.

Konwencjonalna metoda ekstrapolacyjna (CEM) w samej swojej zasadzie stanowi pewną drogę kompensacji efektów interferencyjnych. Po dodaniu roztworów wzorcowych do próbki analit znajduje się w jej naturalnym środowisku, a więc również w obecności ewentualnych interferentów z idealnym uwzględnieniem ich rodzaju i stężenia. Można zatem powiedzieć, że skład próbki w roztworach wzorcowych jest wówczas odwzorowany w sposób idealny. W konsekwencji, wykres kalibracyjny powinien również idealnie odwzorowywać zależność kalibracyjną, a wyznaczony wynik analityczny powinien być dokładny (patrz rysunek 6).



Rys. 6. Metoda CEM: wierne odwzorowanie zależności kalibracyjnej (a) wykresem kalibracyjnym (b) w wyniku kompensacji efektu interferencyjnego, a także błędne odwzorowanie (a') w wyniku odmiennego zachowania się analitu w próbce i we wzorcach oraz wynikający stąd błąd analityczny ($c_{ax}' \neq c_{ax}$)

Podstawowa zasada innych metod ekstrapolacyjnych jest taka sama, jak metody CEM. Można więc sadzić, że mają one również podobną zdolność kompensacji efektów interferencyjnych. Ponadto, ich specyficzne właściwości mogą być w takim samym stopniu dodatkowo pomocne na tym polu, jak analogiczne metody interpolacyjne w stosunku do metody CIM (udowodniono to ostatnio doświadczalnie w przypadku kalibracji z wykorzystaniem ekstrapolacyjnej metody rozcieńczeń (EDM) zastosowaną w analizie przepływowej [26]).

Z drugiej strony metoda CIM ma różne ograniczenia w zakresie minimalizacji efektów interferencyjnych. Jednym z nich jest to, że analit dodawany do próbki może mieć inną formę chemiczną, niż analit zawarty w próbce w sposób naturalny [29]. Obie formy analitu mogą wówczas podlegać wpływowi interferentów w różnym stopniu, co w rezultacie uniemożliwi wierne odtworzenie zależności kalibracyjnej (jest to przedstawione na rysunku 6). Problem ten dotyczy z pewnością również innych metod ekstrapolacyjnych.

Wydaje się, że największą „odpornością" na efekty interferencyjne odznacza się metoda wskaźnikowa. Można wymienić szereg szczególnych okoliczności sprzyjających takiej właściwości tej metody:

a) roztwór wzorcowy dodaje się do próbki (umieszczając go w naturalnym środowisku obecnych w próbce interferentów),
b) dodawany roztwór wzorcowy nie zawiera analitu (nie zachodzi więc ryzyko dodawania analitu w niewłaściwej formie chemicznej),
c) określony składnik roztworu wzorcowego reaguje z obecnym w próbce analitem (uwalniając go od wpływu interferentów).

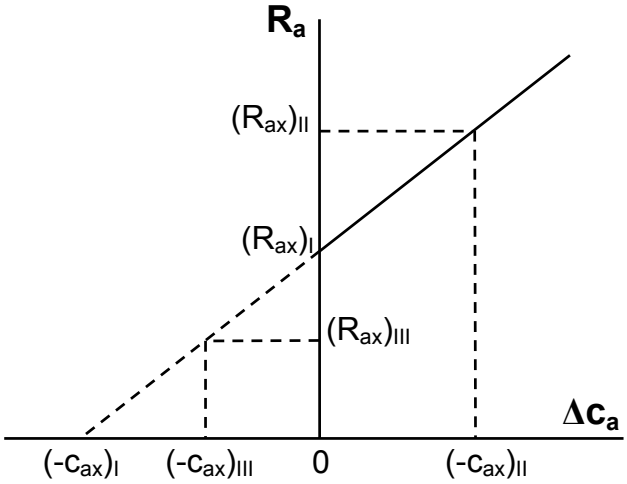
Szczególnie duże znaczenie z punktu widzenia eliminacji efektów interferencyjnych ma udział reakcji chemicznej w procedurze kalibracyjnej miareczkowania. Roztwór wzorcowy można bowiem w dużej mierze dobrać tak, by zachodząca reakcja była w jak największym stopniu specyficzna w stosunku do analitu.

Niestety, miareczkowanie nie może być stosowane w wielu metodach analitycznych (np. takich, które nie operują roztworami ciekłymi lub w których instrument pomiarowy nie jest w stanie reagować jedynie na wybraną formę analitu biorącą udział w reakcji chemicznej). Wobec wielu jej zalet, stawiających miareczkowanie pod wieloma względami (nie tylko dużej „odporności" na działanie interferentów) ponad innymi metodami kalibracyjnymi, należy tego żałować.

9. ŁĄCZONE METODY KALIBRACYJNE

Na koniec należy wspomnieć o dwóch innych podejściach kalibracyjnych, które są stosowane w praktyce analitycznej, a nie znajdują bezpośrednio miejsca w proponowanej klasyfikacji metod kalibracyjnych.

Jedna z tych procedur polega na tym, że spośród serii badanych próbek o podobnym składzie chemicznym wybiera się jedną, którą analizuje się z zastosowaniem konwencjonalnej metody ekstrapolacyjnej (CEM). Skonstruowany na tym etapie wykres kalibracyjny, rozszerzony o część ekstrapolowaną, używa się do interpolacyjnego oznaczania (z wykorzystaniem metody CIM) analitu w innych próbkach. Zasadę tej metody schematycznie ilustruje wykres przedstawiony na rysunku 7.

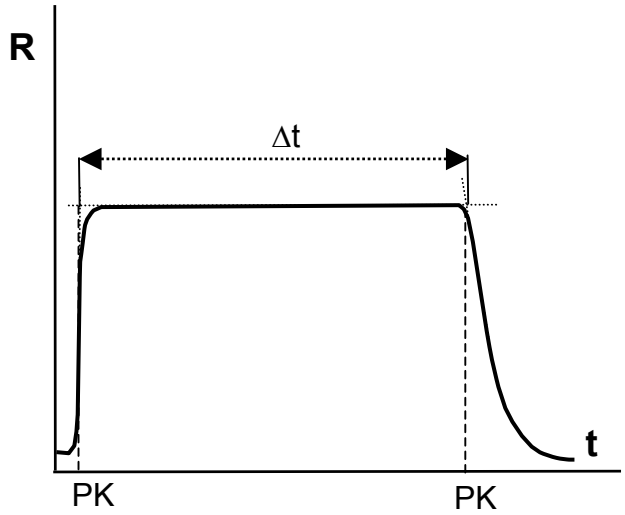


Rys. 7. Schemat metody ekstrapolacyjno-interpolacyjnej: wykres kalibracyjny otrzymany za pomocą metody CEM służy do wyznaczenia stężenia $(c_{ax})_I$ analitu w wybranej próbce drogą ekstrapolacyjną i do wyznaczenia stężeń $(c_{ax})_{II}$ i $(c_{ax})_{III}$ w dwóch innych próbkach drogą interpolacyjną

U podstaw opisanego postępowania kalibracyjnego leży założenie (nie zawsze oczywiście spełnione), że odwzorowana zależność kalibracyjna, uwzględniająca obecność interferentów w wybranej próbce, dokładnie pokrywa się z zależnościami odpowiadającymi pozostałym próbkom. Z drugiej strony, zastosowanie w przypadku analiz seryjnych takiej procedury – w miejsce konwencjonalnej metody ekstrapolacyjnej (CEM) stosowanej w odniesieniu do każdej próbki – pozwala na znaczne zaoszczędzenie czasu i pracy.

Powyższa metoda łączy procedury kalibracyjne charakterystyczne dla metod CEM i CIM, można ją zatem nazwać *metodą ekstrapolacyjno-interpolacyjną*.

Innym interesującym przypadkiem kalibracyjnym jest metoda wskaźnikowa w wersji zaadaptowanej do analizy przepływowej. Procedura kalibracyjna wygląda w tym przypadku zwykle tak, że roztwór wzorcowy dozuje się w określonej porcji do ciągłego strumienia roztworu próbki (lub odwrotnie) dopływającego do instrumentu pomiarowego [30]. W wyniku zachodzącej „po drodze" reakcji chemicznej rejestruje się wykres kalibracyjny o charakterystycznym kształcie „uciętego" piku, co przedstawiono na rysunku 8. Na takim wykresie można wprawdzie zidentyfikować sygnał (a nawet dwa) odpowiadający punktowi końcowemu, lecz sygnałowi temu w praktyce nie można przypisać dokładnej wartości objętości dodanego w tym momencie roztworu i obliczyć wyniku analitycznego w sposób charakterystyczny dla metody wskaźnikowej.



Rys. 8. Wykres kalibracyjny (zależność sygnału analitycznego R od czasu t) dla przypadku metody wskaźnikowej realizowanej w analizie wstrzykowo-przepływowej i sposób wyznaczenia punktu końcowego miareczkowania (PK); szerokość piku (Δt) odpowiada jest miarą stężenia analitu w próbce

W celu rozwiązania tego problemu wykorzystuje się fakt, że szerokość rejestrowanego piku odpowiada stężeniu analitu w badanym roztworze. W związku z tym przygotowuje się serię nowych roztworów wzorcowych, zawierających tym razem sam analit w różnych, ściśle określonych stężeniach, i wprowadza się te roztwory kolejno do układu przepływowego przed wprowadzeniem próbki. Pomiar szerokości zarejestrowanych pików pozwala na sporządzenie konwencjonalnego wykresu kalibracyjnego, który służy następnie do interpolacyjnego wyznaczenia stężenia analitu w próbce.

Opisana metoda kalibracyjna łączy w sobie procedury metod wskaźnikowej i metody CIM, można ją więc nazwać *metodą wskaźnikowo-interpolacyjną*.

10. WNIOSKI

Proponowana, nowa klasyfikacja metod kalibracyjnych w połączeniu z sugerowanym nazewnictwem pojęć kalibracyjnych niewątpliwie przyczynia się do uporządkowania różnych rozwiązań kalibracyjnych proponowanych w literaturze analitycznej. Sklasyfikowane metody charakteryzują się określonymi, specyficznymi cechami, wyraźnie odróżniającymi je od siebie. Charakterystykę tych metod przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 .Cechy charakterystyczne metod kalibracyjnych

Metoda	Konstrukcja wykresu kalibracyjnego	Obliczenie wyniku analitycznego
interpolacyjna	na podstawie wyników pomiarowych otrzymanych z osobna dla roztworów wzorcowych (rzadziej dla pojedynczego roztworu wzorcowego) zawierających analit i dla roztworu próbki	za pomocą wykresu kalibracyjnego na drodze interpolacyjnej
ekstrapolacyjna	na podstawie wyników pomiarowych otrzymanych dla roztworów wzorcowych (rzadziej dla pojedynczego roztworu wzorcowego) zawierających analit dodanych do roztworu próbki	za pomocą wykresu kalibracyjnego na drodze ekstrapolacyjnej
wskaźnikowa	na podstawie wyników pomiarowych otrzymanych w wyniku reakcji chemicznej zachodzącej między analitem zawartym w roztworze próbki a składnikiem (nie analitem) pojedynczego roztworu wzorcowego stopniowo łączonego z próbką	za pomocą wykresu kalibracyjnego na podstawie położenia charakterystycznego punktu doświadczalnego

Proponowana klasyfikacja jest otwarta. Oznacza to, że nie wyklucza ona istnienia lub możliwości opracowania innych metod kalibracyjnych, a także tego, że nowe metody mogą mieć nieco inne cechy od powyżej wymienionych. Nie wydaje się jednak, by wprowadzenie innych metod mogło zaprzeczyć słuszności lub zmienić generalny podział wszystkich metod na trzy kategorie: interpolacyjne, ekstrapolacyjne i wskaźnikowa

Szczególnie interesujące jest to, że dokonane uporządkowanie pozwala w pewnym stopniu przewidzieć możliwość wykonywania kalibracji w sposób dotąd nie stosowany (dotyczy to np. pewnych metod ekstrapolacyjnych analogicznych do metod interpolacyjnych), a także – jak się wydaje – może zainspirować do podejmowania nowych prób łączenia ze sobą różnych metod kalibracyjnych. Przedstawione

rozważania mogą mieć więc bezpośredni wpływ na kierunek i rozwój doświadczalnych prac badawczych w dziedzinie kalibracji analitycznej.

Inna konsekwencją akceptacji przedstawionego sposobu podejścia do zagadnień kalibracyjnych jest możliwość dokonania pewnych istotnych, logicznych zmian w klasyfikacji metod analitycznych. Jeżeli zgodzić się z tym, że miareczkowanie jest metodą kalibracyjną, to prezentowanie technik miareczkowania instrumentalnego w formie oddzielnych metod analitycznych (np. miareczkowanie amperometryczne) [5], czy przeciwstawianie ich w obrębie danej metody tzw. technikom bezpośrednim (np. potencjometria bezpośrednia i miareczkowanie potencjometryczne) [5] traci rację bytu. Wydaje się, że w podręcznikowym opisie metod analitycznych każdej z nich powinien być poświęcony oddzielny fragment dotyczący możliwych do zastosowania w danym przypadku różnych metod kalibracyjnych z uwzględnieniem określonej techniki miareczkowania.

Dokonana klasyfikacja może zatem mieć dość daleko idące konsekwencje analityczne w zakresie aplikacyjnym i dydaktycznym. Wydaje się, że jest to „zasługa" nie tyle właśnie takiej klasyfikacji jaka została zaproponowana, ale tego, że w ogóle jakakolwiek klasyfikacja została wprowadzona. Potwierdza to konieczność podejmowania tego typu działań w tej i innych dziedzinach chemii analitycznej.

Powyższa uwaga ma szerszy i bardziej ogólny aspekt. Zbyt często, mianowicie, zadania chemików-analityków sprowadza się do aktywności czysto doświadczalnej, a chemię analityczną traktuje się jedynie jako analitykę chemiczną, czyli dyscyplinę pełniącą usługową i uzupełniającą rolę w innych dziedzinach chemii, a nawet poza nią (np. w biologii, geografii czy ochronie środowiska) [9]. Zapomina się, że chemia analityczna jest osobną nauką i jako taka wymaga wypracowywania i modyfikacji reguł, zasad i metod, na których się opiera. Przedstawione w pracy rozważania są przykładem potrzeby dostrzegania tej skądinąd oczywistej prawdy.

LITERATURA

[1.] *Słownik chemii analitycznej*, WNT, Warszawa 1984

[2.] *Słownik Chemiczny*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1995

[3.] Danzer K. ,Currie L.A. , *Pure & Appl. Chem.,* **4**, 993 (1998)

[4.] Minczewski J. , Marczenko Z. , *Chemia analityczna*, t. I–III, PWN, Warszawa 1985

[5.] Szczepaniak W. , *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002

[6.] Cygański A. , *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, WNT, Warszawa (1993)

[7.] Gilbert Jr. P.T. , *Anal. Chem.*, **31**, 110 (1959)

[8.] Kościelniak P. , *Zesz. Nauk. UJ*, **36**, 27 (1993)

[9.] Pszonicki L. , Skwara W. , *Talanta*, **36**, 1265 (1989)

[10.] Fang Z. , *Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley, Chichester 1995, 203

[11.] de la Guardia M. , *FIA Strategies for Calibration and Standarization in Atomic Spectrometry*, w: *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*, A. Sanz-Mendel (ed), Elsevier, Amsterdam, 1999, 98

[12.] Tyson J. F. , *Spectrochim. Acta*, **14**, 169 (1991)

[13.] Trojanowicz M. , Olbrych-Śleszyńska E. , *Chem. Anal.(Warszawa)*, **37**, 111 (1992)

[9] Dowodem takiej sytuacji jest między innymi stanowisko redaktorów wielu czasopism chemicznych o charakterze analitycznym, którzy z reguły nie przyjmują do opublikowania prac czysto teoretycznych i koncepcyjnych nawet wtedy, gdy proponowane rozważania i wysuwane hipotezy nie wymagają dowodów doświadczalnych lub gdy takie dowody nie są możliwe do natychmiastowego przedstawienia.

[14.] Kościelniak P. , *Anal. Chim. Acta*, **438**, 323 (2001)
[15.] Agudo M. , Rios A. , Valcarcel M. , *Anal. Chim. Acta*, **264**, 265 (1992)
[16.] Krieger B.L. , Kimber G.M. , Selby M. , Smith F.O. , Turak E.E. , Petty J.D. , Peachey R.M. , *J, Anal. At. Spectrom.*, **9**, 267 (1994)
[17.] Kościelniak P. , Herman M. , Janiszewska J. , *Lab. Robot. Autom.*, **11**, 111 (1999)
[18.] Tyson J.F. , Bysouth S.R. , *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 211 (1988)
[19.] Kościelniak P. , Janiszewska J. , Fang Z. , *Chem. Anal. (Warszawa)*, **41**, 85 (1996)
[20.] Tyson F.J. , *Anal. Proc.*, **18**, 542 (1981)
[21.] *Absorpcyjna spektrometria atomowa*, M. Pinta (ed), PWN, Warszawa 1977, 368
[22.] Kościelniak P. , Kozak M. , Karocki A. , *Chem. Anal. (Warszawa)*, **41**, 363 (1996)
[23.] Fan S. , Fang Z. , *Anal. Chim. Acta*, **241**, 15 (1990)
[24.] Sperling M. , Fang Z. , Welz B. , *Anal. Chem.*, **63**, 151 (1991)
[25.] Kościelniak P., Walas S. , *Zesz. Nauk. UJ*, **36,** 53 (1993)
[26.] Kościelniak P. , Kozak J. , *Anal. Chim. Acta.*, **460**, 235 (2002)
[27.] Kościelniak P. , Sperling M. , Welz B. , *Chem. Anal.*, **41**, 587 (1996)
[28.] Kościelniak P. , *Anal. Chim. Acta*, **367**, 101 (1998)
[29.] Welz B. , *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **325**, 95 (1986)
[30.] Růžička J. , Hansen E.H. , *Flow Injection Analysis*, John Wiley, New York 1988, 47