

DEVELOPING METHOD OF DIFFERENTIAL PULSE POLAROGRAPHIC FOR ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL RESIDUE IN MILK

Pengembangan Metode Polarografi Pulsa Diferensial Untuk Penentuan Kadar Residu Kloramfenikol dalam Air Susu Sapi

Daryono Hadi Tjahjono, Amir Musadad, Septy Mariana K.

Unit Bidang Ilmu Farmasi Analisis, Departemen Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung 40132, Indonesia

E-mail : daryonohadi@gerbang.fa.itb.ac.id

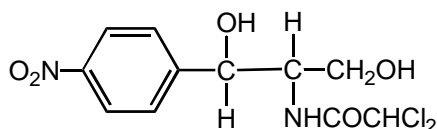
ABSTRACT

A differential pulse polarographic method for a quantitative analysis of chloramphenicol residue in milk had been developed. Result showed that the method using dropping mercury electrode as working electrode, Ag/AgCl electrode as reference electrode, and platinum electrode as auxiliary electrode with an acetic buffer solution of pH 4.7 as supporting electrolyte had a recovery for chloramphenicol of $(96.88 \pm 3.17)\%$ with a detection limit of $0,027 \mu\text{g/mL}$, a quantitation limit of $0,089 \mu\text{g/mL}$, and a determination limit of $0,010 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: differential pulse polarography, residue, chloramphenicol, milk.

PENDAHULUAN

Secara Kasus munculnya penyakit dan penyebarannya yang tidak dapat terelakkan sering terjadi pada peternakan modern. Peristiwa terakhir yang masih terus dipantau adalah berkembangnya penyebaran penyakit flu burung dan sapi gila. Oleh karena itu penggunaan obat menjadi sangat penting baik untuk pengobatan penyakit maupun mengontrol berjangkitnya penyakit pada ternak. Obat-obatan golongan sulfonamida, nitrofuran dan antibiotik merupakan antimikroba yang potensial dan secara luas sudah digunakan sebagai obat veteriner[1].



Gambar 1 Struktur kimia kloramfenikol

Kloramfenikol (Gambar 1) merupakan antimikroba berspektrum luas dan banyak digunakan pada binatang ternak penghasil minuman dan daging untuk pencegahan dan/atau pengobatan penyakit [2,3] serta sering ditambahkan pada pakan ternak. Namun demikian residu antibiotik ini dapat bertahan dalam binatang ternak tersebut dan dapat masuk ke rantai makanan manusia. Di samping itu telah dilaporkan bahwa

penggunaan kloramfenikol pada manusia dapat menyebabkan depresi sumsum tulang yang mengakibatkan terjadinya anemia neoplastik[4]. Berkenaan dengan efek toksik tersebut dan juga efek hipersensitivitas yang disebabkan oleh kloramfenikol, sejumlah negara Uni Eropa, Kanada, Amerika Serikat dan Australia telah melarang penggunaan kloramfenikol pada hewan ternak dan produk perikanan[2,3,5]. Oleh karena itu, akhir-akhir ini negara-negara tersebut dan juga Jepang serta Singapura secara intensif mengawasi dengan ketat produk peternakan dan perikanan yang mereka impor.

Air susu sapi merupakan salah satu produk peternakan yang dikonsumsi oleh manusia dalam bentuk minuman segar atau dalam bentuk produk olahan menjadi susu bubuk. Residu kloramfenikol yang terdapat dalam air susu sapi maupun produk olahannya dapat memasuki rantai makanan manusia dan dikhawatirkan dapat menyebabkan resistensi mikroorganisme yang sensitif terhadap antibiotik tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan penentuan residu kloramfenikol dalam air susu sapi sebagai langkah awal untuk mengantisipasi dan mencegah terjadinya masukan residu kloramfenikol yang tidak diinginkan ke dalam tubuh manusia. Untuk mendeteksi keberadaan residu kloramfenikol diperlukan suatu metode analisis yang peka dan akurat. Berbagai metode penentuan kadar kloramfenikol telah dikembangkan, di antaranya uji

aktivitas hayati, kolorimetri, spektrofotometri [6] kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) [7] *radio and enzyme immunoassay* [8] gas kromatografi-spektroskopi masa (GK-SM) [9,10] dan kromatografi cair kinerja tinggi-spektroskopi masa (KCKT-SM)[11].

Pada penelitian ini dilakukan pengembangan metode penentuan kadar kloramfenikol dengan metode polarografi pulsa diferensial. Pemilihan metode ini berdasarkan pertimbangan bahwa kloramfenikol memiliki gugus fungsi nitro elektroaktif yang dapat mengalami reaksi reduksi sehingga dapat membangkitkan arus difusi yang dapat diukur. Di samping itu, teknik polarografi ini relatif lebih murah biayanya dibandingkan dengan teknik KCKT (-SM), GK-SM, uji hayati maupun *radio and enzyme immunoassay* untuk penetapan kadar kloramfenikol dalam rentang konsentrasi yang tidak dapat dilakukan dengan titrasi, sehingga dapat digunakan untuk pemantauan.

PERCOBAAN

Bahan

Kloramfenikol BPF1 (no. kontrol 196082) diperoleh dari Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan. Etanol absolut, kloroform, heksana, asam asetat, natrium asetat, aseton dan kertas Whatman dibeli dari Merck, air bebas mineral disuplai oleh PT Citra Airum (Malang, Indonesia), gas nitrogen diperoleh dari PT Industri Gas (Bandung), air susu sapi yang telah dipasteurisasi diperoleh dari pasar di Bandung.

Alat

Satu set polarograf yang terdiri dari 693 VA Processor, elektroda kerja tetes raksa, elektroda acuan Ag/AgCl, elektroda pembantu kawat platina (Metrohm), timbangan analitik digital (Mettler), pH meter (Beckman), alat sentrifuga, evaporator (Buchi) dan alat gelas lainnya yang umum digunakan dalam laboratorium analisis.

Prosedur

Pembuatan larutan induk

Larutan induk pembanding kloramfenikol dibuat dalam pelarut etanol absolut dengan konsentrasi 1 mg/ml dan diencerkan dengan etanol absolut hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan pada saat akan digunakan.

Penyiapan larutan bufer asetat pH 4,7

Ditimbang 8,2030 g natrium asetat, dimasukkan ke dalam gelas piala 1 L, ditambah lebih kurang 800 mL air bebas mineral dan diaduk sampai larut kemudian diukur pH-nya menggunakan pH meter. Larutan diaduk sambil ditambah asam asetat

sampai pH 4,7, selanjutnya dipindahkan ke dalam labu takar 1000 mL dan diencerkan dengan air bebas mineral sampai tanda batas.

Penyiapan alat polarografi dan pengaturan kondisi pengukuran

Elektroda yang disiapkan terdiri dari tiga macam, yaitu elektroda kerja tetes raksa, elektroda acuan Ag/AgCl, dan elektroda pembantu kawat platina. Sebelum pengukuran, dilakukan pengaliran gas nitrogen murni ke dalam larutan uji selama 120 detik, kemudian didiamkan selama 10 detik sebelum dilakukan pengukuran. Kondisi pengukuran yang diatur adalah rentang potensial pengukuran untuk mendapatkan potensial puncak kloramfenikol, potensial amplitudo, waktu selurus, dan laju selurus.

Penentuan rentang potensial pengukuran dan potensial puncak kloramfenikol

Sebanyak 10 mL larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dimasukkan ke dalam sel polarografi lalu diukur pada berbagai rentang potensial, antara lain -1100 sampai 100 mV. Pada rentang potensial -600 sampai -100 mV memberikan arus sisa yang relatif konstan, sedangkan diluar rentang tersebut memberikan puncak lain yang mungkin dapat mengganggu pengukuran kloramfenikol. Untuk menentukan potensial puncak kloramfenikol, dilakukan pengukuran larutan kloramfenikol dalam larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dengan konsentrasi kloramfenikol sebesar 1 µg/mL.

Pengaruh potensial amplitudo terhadap besar arus difusi

Sebanyak 10 mL larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dimasukkan ke dalam sel polarografi lalu ditambahkan larutan kloramfenikol baku hingga konsentrasi kloramfenikol dalam sel pengukuran 1 µg/mL, larutan diukur pada kondisi awal pengukuran dengan mengubah-ubah potensial amplitudo yaitu -100; -50 ; 50 ; dan 100 mV, sedangkan parameter-parameter lainnya dijaga tetap.

Pengaruh waktu selurus terhadap besar arus difusi

Sebanyak 10 mL larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dimasukkan ke dalam sel polarografi lalu ditambahkan larutan kloramfenikol baku hingga konsentrasi kloramfenikol dalam sel pengukuran 1 µg/mL, lalu diukur pada kondisi awal pengukuran dengan mengubah-ubah waktu selurus yaitu 0,3; 0,6; dan 0,9 detik, sedangkan parameter-parameter lainnya dijaga tetap.

Pengaruh laju selusur dalam berbagai potensial amplitudo terhadap besar arus difusi

Sebanyak 10 mL larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dimasukkan ke dalam sel polarografi lalu ditambahkan larutan kloramfenikol baku hingga konsentrasi kloramfenikol dalam sel pengukuran 1 $\mu\text{g/mL}$, lalu diukur pada kondisi awal pengukuran dengan mengubah-ubah laju selusur yaitu 6,67; 10; dan 20 mV/detik dan pada potensial amplitudo -50; -100; 50 dan 100 mV, sedangkan parameter-parameter lainnya dijaga tetap.

Pembuatan kurva kalibrasi dan penentuan kepekaan metode

Pengukuran arus difusi dilakukan berulang 10 kali pada kondisi pengukuran optimum yang diperoleh dari (c) sampai (g) terhadap larutan blanko dan larutan kloramfenikol dalam larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dengan konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 g/mL . Batas deteksi dan batas kuantisasi dihitung dari kurva kalibrasi yang diperoleh secara statistika [12]. Batas determinasi ditentukan dengan memperhitungkan batas deteksi dalam proses ekstraksi kloramfenikol yang dilakukan.

Penentuan kecermatan metode

Kecermatan ditentukan dengan metode baku tinambah (*standard addition method*). Sebagai larutan baku digunakan larutan kloramfenikol dengan kadar 100 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 100 μL , 200 μL , dan 300 μL larutan baku kloramfenikol ini ditambahkan ke dalam 10 mL air susu yang selanjutnya diekstraksi dan diukur berulang sebanyak 3 kali. Selain itu juga dilakukan ekstraksi terhadap air susu yang tidak ditambahkan larutan baku ke dalamnya. Ekstraksi air susu untuk penentuan perolehan kembali adalah sebagai berikut. Sebanyak 10 mL air susu yang telah ditambah larutan kloramfenikol baku dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut campur kloroform-aseton (1:1) sebanyak 30 mL dan disaring dengan kertas Whatman serta dibilas 2 kali dengan 2,5 mL pelarut kloroform-aseton (1:1). Residu diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform-aseton (1:1) sebanyak 15 mL, disaring dengan kertas Whatman dan dibilas 2 kali dengan 2,5 mL pelarut kloroform-aseton (1:1).

Kedua ekstrak kemudian digabungkan menjadi satu dalam erlenmeyer. Sebanyak 10 mL dari ekstrak tersebut diuapkan perlahan dengan evaporator. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 20 mL bufer asetat pH 4,7, dikocok selama 1 menit. Selanjutnya campuran dipindahkan ke dalam corong pisah dan ditambah 10 mL heksana dan dikocok selama 1 menit, didiamkan selama 2 menit dan dikocok kembali selama 1 menit, dibiarkan fase memisah selama 15 menit kemudian diambil fase airnya sebanyak 10 mL untuk dianalisis dengan polarografi. Kecermatan ditentukan dengan menghitung perolehan kembali (P_K) dengan rumus:

$$P_K = (C_s - C_o) / C \times 100\%$$

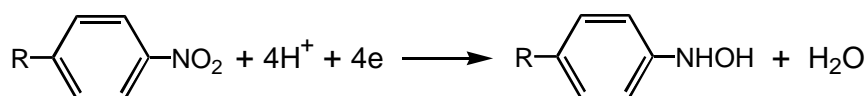
dimana C_s adalah konsentrasi dari pengukuran sampel dengan penambahan baku, C_o adalah konsentrasi dari pengukuran sampel tanpa penambahan baku, dan C adalah konsentrasi teoritis.

Pemeriksaan sampel air susu

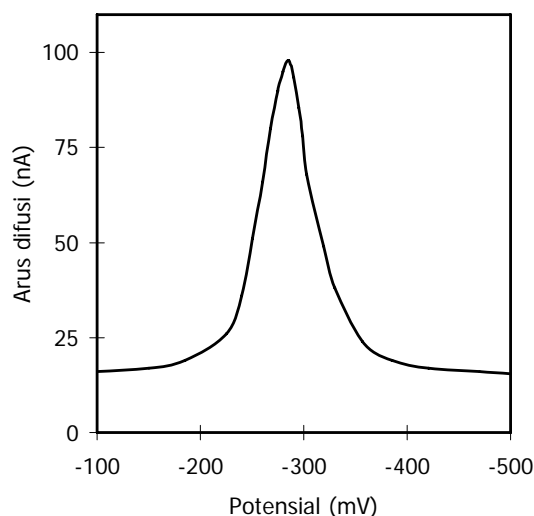
Sebanyak 25 mL air susu dimasukkan dalam corong pisah, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut kloroform-aseton (1:1) sebanyak 50 mL dan disaring dengan kertas Whatman serta dibilas 2 kali dengan 5 mL pelarut kloroform-aseton (1:1). Residu diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform-aseton (1:1) sebanyak 25 mL, disaring dengan kertas Whatman dan dibilas 2 kali masing-masing dengan 5 mL pelarut kloroform-aseton (1:1). Kedua ekstrak digabungkan dalam erlenmeyer menjadi satu. Sebanyak 10 mL dari ekstrak tersebut diuapkan perlahan dengan evaporator. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 20 mL bufer asetat pH 4,7, dikocok selama 1 menit. Selanjutnya dipindahkan ke dalam corong pisah dan ditambah 10 mL heksana kemudian dikocok 1 selama menit, diamkan selama 2 menit dan dikocok kembali selama 1 menit. Fase dibiarkan memisah selama 15 menit kemudian diambil fase airnya sebanyak 10 mL untuk analisis dengan polarografi.

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN

Kloramfenikol memiliki gugus nitro yang dapat direduksi menjadi gugus hidroksilamin dengan membutuhkan 4 elektron [13] sehingga dapat dianalisis secara elektrokimia (Gambar 2).



Gambar 2 Reaksi reduksi gugus nitro dari kloramfenikol



Gambar 3 Polarogram (puls diferensial) kloramfenikol 0,5 mg/mL dalam larutan elektrolit pendukung dapar asetat pH 4,7.

Tabel 1 Kondisi pengukuran kloramfenikol dengan polarografi pulsa differensial dalam larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7

Parameter	Besaran
Waktu pengaliran gas N ₂	120 detik
Waktu kesetimbangan	10 detik
Potensial amplitudo	-100 mV
Waktu selusur	0,9 detik
Laju selusur	5 mV/detik
Potensial awal	-600 mV
Potensial akhir	-100 mV

Pada penelitian ini pengukuran arus difusi dilakukan pada rentang potensial -100 sampai -600 mV karena merupakan rentang potensial yang memberikan arus sisa yang relatif konstan dengan menggunakan larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7 dan setelah diuji dengan penambahan kloramfenikol baku ke dalam larutan elektrolit pendukung yang digunakan dan diukur, diperoleh arus puncak tunggal dari kloramfenikol (Gambar 3). Ini menunjukkan bahwa rentang potensial -100 sampai -600 mV merupakan rentang potensial yang khas untuk pengukuran kloramfenikol dengan menghasilkan puncak polarogram kloramfenikol yang baik. Potensial puncak kloramfenikol terukur pada (-285 ± 20) mV terhadap elektroda pembanding Ag/AgCl. Selama pengukuran, larutan harus dibebaskan dari oksigen terlarut dengan cara mengalirkan gas nitrogen murni ke dalam larutan karena pada potensial yang lebih negatif dari 1000 mV, oksigen akan mengalami reduksi dan dapat memberikan puncak pada polarogram.¹⁴

Sebelum dilakukan pengukuran arus difusi untuk pembuatan kurva kalibrasi, penetapan

keseksamaan, persen perolehan kembali, dan residu kloramfenikol dalam sampel air susu, dilakukan penentuan kondisi pengukuran yang meliputi parameter : potensial amplitudo, waktu selusur, dan laju selusur agar menghasilkan arus difusi yang optimum. Untuk senyawa kloramfenikol, kondisi pengukuran yang optimum adalah seperti terangkum dalam Tabel 1.

Kurva kalibrasi yang diplot dari konsentrasi kloramfenikol ($\mu\text{g/mL}$) terhadap arus difusi (nA) (Tabel 2) pada rentang $0,1$ sampai dengan $0,5$ $\mu\text{g/mL}$ memiliki persamaan regresi $y = 143,99x + 14,37$ dan koefisien korelasi $0,999$. Data ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki linieritas yang baik dan mampu memberikan respon arus difusi yang sebanding dengan konsentrasi analit pada rentang konsentrasi tersebut. Rentang linearitas ini lebih lebar dibandingkan dengan metode KCKT, yaitu $0,025$ sampai $0,1$ $\mu\text{g/mL}$.⁷

Batas deteksi dan batas kuantisasi yang merupakan parameter kepekaan metode analisis diperoleh dari perhitungan melalui kurva kalibrasi,¹² masing-masing adalah $0,027$ $\mu\text{g/mL}$ dan $0,089$ $\mu\text{g/mL}$. Ini menunjukkan bahwa $0,089$ $\mu\text{g/mL}$ (89

ng/mL) adalah konsentrasi terendah yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan tingkat kecermatan dan keseksamaan yang dapat diterima. Hasil ini masih dalam batas yang dapat dibanding dengan metode lain, yaitu kurang lebih 2 kali dari batas kuantisasi metode KCKT [7] atau 10 kali dari batas kuantisasi metode KCKT-SM [11]. Batas determinasi yang didapatkan adalah 0,01 μg tiap mL air susu. Ini menggambarkan bahwa metode ekstraksi yang dilakukan dapat digunakan untuk analisis kloramfenikol minimal sebanyak 0,01 μg tiap mL air susu sapi.

Kecermatan metode ditentukan dengan metode penambahan baku yaitu melalui penentuan persen perolehan kembali kloramfenikol dari matriks. Hasil percobaan menunjukkan bahwa perolehan kembali metode ini berkisar antara 92,2 sampai 100,1% (Tabel 2) dan masih komparatif dengan metode lain seperti KCKT, yaitu 96.6-104.2%.⁷ Ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki kecermatan yang dapat digunakan untuk analisis karena kriteria suatu metode yang cermat yaitu perolehan kembalinya berada dalam rentang 80-120%.

Keseksamaan dari metode yang dikembangkan ditentukan oleh keseksamaan metode dan keseksamaan sistem. Keseksamaan metode ditetapkan dari koefisien variasi pada penentuan perolehan kembali. Hasil percobaan menunjukkan bahwa nilai koefisien variasi perolehan kembali yang didapat adalah 3,27%. Nilai ini memenuhi syarat kriteria keseksamaan metode yang baik

yaitu kurang dari 5%. Keseksamaan sistem adalah untuk menunjukkan kinerja alat pada kondisi pengukuran. Kriteria keseksamaan sistem yang baik menurut Horwitz yaitu koefisien variasinya kurang dari $2^{(1-0,5 \log C)}$ dengan C adalah konsentrasi analit dalam fraksi desimal. Dalam penelitian ini, keseksamaan sistem ditetapkan dari koefisien variasi pengukuran larutan kloramfenikol dengan konsentrasi 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,0000005 g/mL) sebanyak sepuluh kali dan berdasarkan kriteria dari Horwitz, koefisien variasinya harus kurang dari 22,52%. Koefisien variasi yang didapat dari hasil percobaan adalah 0,23% dan 2,0% untuk potensial puncak dan arus difusi kloramfenikol (Tabel 3). Ini berarti bahwa sistem yang digunakan memiliki keseksamaan yang baik.

Hasil pengukuran residu kloramfenikol dalam air susu tidak menunjukkan adanya arus puncak pada potensial (-285 ± 20) mV, yang merupakan potensial yang khas dari kloramfenikol untuk memberikan arus puncak. Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya residu kloramfenikol dalam air susu yang dianalisis atau ketidakmampuan alat untuk mendeteksi residu kloramfenikol tersebut karena kadarnya yang kurang dari batas deteksi yaitu dibawah konsentrasi 0,027 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bila hal terakhir yang terjadi maka metode elektrokimia lain seperti voltametri *stripping* dapat dikembangkan karena memiliki kemampuan batas deteksi yang lebih rendah.

Tabel 2 Hubungan konsentrasi kloramfenikol dan besar arus difusi dalam larutan elektrolit pendukung bufer asetat pH 4,7

Konsentrasi kloramfenikol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Arus difusi (nm)
0	$13,82 \pm 0,43$
0,1	$29,01 \pm 0,39$
0,2	$44,40 \pm 0,57$
0,3	$57,62 \pm 0,47$
0,4	$70,03 \pm 1,02$
0,5	$87,36 \pm 0,81$

Tabel 3 Hasil penentuan persen perolehan kembali kloramfenikol

Konsentrasi teoritis ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Konsentrasi amatan ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Perolehan kembali (%)
1,0	0,94	94,63
	0,96	95,84
	0,97	96,98
2,0	1,85	92,51
	1,98	99,20
	2,00	100,1
3,0	2,99	99,94
	2,98	99,49
	2,89	96,24

KESIMPULAN

Penentuan kadar residu kloramfenikol dalam air susu dapat dilakukan dengan metode polarografi pulsa diferensial menggunakan elektrolit pendukung larutan bufer asetat pH 4,7 dengan potensial awal -600 mV dan potensial akhir -100 mV. Kondisi pengukuran dilakukan pada laju selusur 5 mV/detik dengan potensial amplitudo sebesar -100 mV. Potensial puncak polarogram kloramfenikol terukur pada (-285 ± 20) mV terhadap elektroda pembanding Ag/AgCl. Pada rentang 0-0,5 g/mL metode ini memiliki linieritas yang baik dengan koefisien korelasi 0,999, dengan memberikan batas deteksi 0,027 µg/mL, batas kuantisasi 0,089 µg/mL dan batas determinasi 0,010 µg/mL, serta perolehan kembali kloramfenikol sebesar $(96,88 \pm 3,17)\%$. Metode polarografi pulsa diferensial ini juga memiliki keseksamaan yang baik seperti ditunjukkan oleh keberulangan pengukuran dengan koefisien variasi sebesar 0,23% untuk potensial puncak dan 2% untuk arus difusi. Dalam sample air susu sapi terpasteurisasi yang dianalisis ternyata tidak terdeteksi adanya residu kloramfenikol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada Bapak Drs. Darsono Sigit, M.Si. dan PT Citra Airum (Malang, Jawa Timur) yang telah mensuplai air bebas mineral untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Dairy Federation, 1997, *Monograph on Residues and Contaminant in Milk and Milk Product*, FIL/IDF, Brussels, Belgium.
2. Crosby, N.T., 1991, *Determination of Veterinary Residues in Food*, Chichester, Elish Horwood.
3. Botsoglou, N.A., and Fletouris, D.J., 2001, *Antibacterial Drugs: Drug Residues in Foods*, Mercel Decker. New York.
4. Takeda, N., and Akiyama, Y., 1992, *J. Chromatography*, **607**, 31-38.
5. Commission Decision of 30 January 2002, 2002, *Off. J. Eur. Commun.*, **L30**, 50.
6. Florey, K., 1975, *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. IV, Academic Press, Inc., New York.
7. Perez, N., Guitierrez, R. Nom, M., Diaz, G., Luna, H., Escobar, I., and Munez, Z. 2002, *J. AOAC Inter.*, **85**, 20-24.
8. Gaudin, V. and Marris, P., 2001, *Food and Agricultural Immunology*, **13**, 77-86.
9. Kijak, P.J., 1994, *J. AOAC Inter.*, **77**, 34-40.
10. Mottier, P. Veronique, P., Gremaud, E., Guy, P.A., and Stadler, R.H., 2003, *J. Chromatography A*, **994**, 75-84.
11. Verzeznassi, L., Royer, D., Mottier, P., and Stadler, R.H., 2003, *Food Additives and Contaminants*, **20**, 335-342.
12. Miller J.N., and Miller, J.C., 2000, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, Essex.
13. Bard, A.J., 1979, *Electroanalytical Chemistry A Series of Advances*, vol. XI, Marcel Dekker, Inc., New York, 175-176, 292-295.
14. Willard, H.H., Merritt, Jr., L.L., Dean, J.A., and Settle, Jr., F.A., 1998, *Instrumental Methods of Analysis*, 7th ed., Wadsworth Publ. Co, Belmont, 656-669, 697-728.