

## METODA ATOMOWEJ SPEKTROSKOPII ABSORPCYJNEJ I JEJ ZASTOSOWANIE W FIZJOLOGII ROŚLIN

### Atomic Absorption Spectroscopy and its application in plant physiology

Witold RECZYŃSKI, Tadeusz BOCHNIA

**Summary.** Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) is one of analytical methods most often used in the elemental analysis of biological material. The basic phenomenon is the absorption of a photon of light (of definite energy, which corresponds to definite frequency and then to definite wavelength) by an atomic vapour containing free atoms of an element in the ground state. Transitions between two energy states are schematically presented in Fig. 1. Quantitatively this process is described by the Lambert-Beer law - absorption of light is proportional to the concentration of a given element in the analyzed sample.

Basing upon the scheme in Fig. 2 instrumental systems are described:

- emission system is a source of specific radiation. The hollow-cathode lamps (made of the elements which are to be determined) are most commonly used;
- absorption system generates the atomic vapour (Fig. 3) of the introduced liquid sample. Two methods can be distinguished: 1) flame AAS, where the sample is sprayed to the burner, and 2) flameless, where the electrothermal graphite atomizers or atomizers of cold vapours are applied;
- spectral and photometric systems enable to select optical conditions (wavelength, slit, etc.) and to detect and measure the intensity of the light beam.

However AAS is a very specific technique, several interferences as matrix, chemical, ionisation and background absorption can occur.

The methods of sample preparation and few examples of the use of Atomic Absorption Spectroscopy in plant physiology research are presented and discussed.

As the method is suitable for determining about 69 elements, both micro- and macronutrients, it is assumed that it is one of the most useful methods of quantitative analysis of elements, applied in the field of plant physiology.

**Key words:** Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), plant physiology

*Mgr W. Reczyński, mgr T. Bochnia, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków*

Spółród metod analitycznych mających zastosowanie w analizie elementarnej materiału biologicznego najczęściej stosowane są metody elektrochemiczne (np. polarografia, elektrody jonoselektywne), metody aktywacyjne (np. neutronowa analiza aktywacyjna, metoda PIXE), metody spektralne (spektrografia emisyjna, absorpcyjna).

Metody elektrochemiczne, ze względu na często bardzo złożony skład analitu (duża ilość związków organicznych i nieorganicz-

nych mogących podlegać utlenieniu czy redukcji), stosowane są do analizy prostszych układów np. analiza wód czy też stopów metalicznych. Stosując te metody nie można oznaczyć K, Na, Mg i Ca, a więc pierwiastków o istotnej roli fizjologicznej. Analiza polarograficzna wymaga zastosowania skomplikowanych procedur, mających na celu wyekstrahowanie oznaczanych składników. Elektrody jonoselektywne, wystarczające do oznacze-

nia makroskładników (granica wykrywalności dla większości elektrod jest rzędu  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>), nie pozwalają oznaczać ilościowo mikrośladów, a ponadto do oznaczeń tą metodą potrzebna jest stosunkowo duża objętość próbki (więcej niż 1 cm<sup>3</sup>).

Neutronowa analiza aktywacyjna zmusza do pracy z próbkami radioaktywnymi, oraz wymaga dysponowania źródłem neutronów o wysokich energiach [13]. Metoda PIXE (ang. Particle Induced X-Ray Emission) jest metodą oferującą bardzo wysoką wykrywalność (sięgającą  $10^{-12}$ g). Zasadniczą trudnością jest przygotowanie do analizy wzorców i próbek proszkowych (tkanek roślinnych) [17].

Spśród wyżej wymienionych metod spektralnych, spektralna analiza emisyjna (z wyjątkiem ICP, ang. Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy) ze względu na trudności we wzorcowaniu jest stosowana głównie do analizy jakościowej. Użyteczność metody ICP w badaniach próbek roślinnych wykazał Schramel [34]. Aten i inni [2] porównali wyniki oznaczeń Mg, Fe i Zn uzyskanych z użyciem ICP i ASA.

Metoda atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ASA) znalazła bardzo szerokie zastosowanie w analizie elementarnej materiału roślinnego. Artykuł niniejszy zawiera opis metody ASA, wraz z przykładami jej zastosowań w fizjologii roślin.

## CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA METODY

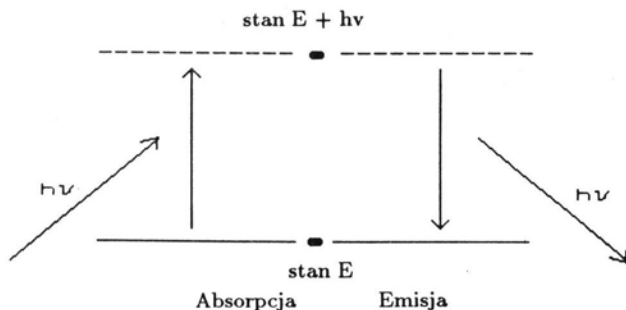
Atomowa spektroskopia absorpcyjna (ang. Atomic Absorption Spectroscopy – AAS) to metoda analityczna oparta na pomiarze absorpcji, następującej w strumieniu promieniowania o stałej intensywności i pożądanej długości fali, przez medium składające się z atomów analizowanego pierwiastka [27]. W tych warunkach, wielkość absorpcji wzrasta ze wzrostem stężenia atomów w absorbującym medium, a co za tym idzie, ze wzrostem stężenia próbki użytej do wytworzenia tego medium.

Określenie „atomowa” wynika z faktu, że medium absorpcyjne składa się z atomów analizowanego pierwiastka. Pary atomowe w niezbyt wysokich temperaturach i pod normalnym ciśnieniem, mają widma absorpcyjne składające się z ostrych linii spektralnych, leżących w bardzo wygodnym do selekcji z użyciem monochromatorów i spektrofotometrów przedziale długości fal (od 1800 do 9000 Å). Linie te są na tyle wąskie, że umożliwiają doskonałą selektywność.

Pierwsze publikacje teoretyczne, przedstawiające potencjalne możliwości absorpcji atomowej jako techniki analitycznej, pojawiły się w 1955 roku. Po kilku latach ciszy, pod koniec lat 50-tych, zaczęły się ukazywać prace zawierające opisy budowanych w laboratoriach absorpcjometrów, wraz z pierwszymi, wielce obiecującymi wynikami. Lata 60-te to bujny rozwój metody (pojawiają się urządzenia produkowane seryjnie), z czym wiąże się wzrost liczby publikacji. Wprowadzenie do użytku, na początku lat 70-tych, atomizerów bezpromieniowych pozwoliło na analizę próbek o bardzo małej objętości (100 μl).

## PODSTAWY TEORETYCZNE

Jeśli para atomowa zawierająca wolne atomy pierwiastka w stanie podstawowym jest oświetlona źródłem promieniowania o częstości charakterystycznej dla pierwiastka obecnego w parze, to obojętne wolne atomy zaabsorbują promieniowanie o częstości rezonansowej. Dokładniej mówiąc, w parze atomowej oświetlonej strumieniem światła, atom w stanie podstawowym (o energii  $E$ ) absorbuje foton światła (energia  $h\nu$ ), co powoduje zmianę rozkładu elektronów w atomie przeprowadzając go w stan wzbudzony (o energii  $E + h\nu$ ). Różnica poziomów wzbudzonego i podstawowego jest równa energii fotonu. Ponieważ atomy mogą istnieć tylko w określonych stanach energetycznych, tylko fotony o określonej energii mogą być absorbowane (energii fotonu odpowiada częstość, a stąd długość fali). Innymi słowy,



Ryc. 1. Przejścia elektronu pomiędzy dwoma poziomami energetycznymi.

Fig. 1. Transitions of electron between two energy states.

absorbowane są tylko fotony o długościach fal odpowiadających liniom widma absorpcyjnego atomów pierwiastka.

Zjawiskiem odwrotnym jest emisja promieniowania przez wzbudzony atom (przejście elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego połączone z emisją fotonu światła).

Obydwa zjawiska są przedstawione schematycznie na rycinie 1.

Prawo Lamberta-Beera ujmuje ilościowo proces absorpcji atomowej. W komórce absorpcyjnej (atomizer) o długości  $b$  znajdują się atomy o stężeniu  $c$ . Przez atomizer przechodzi wiązka promieniowania o natężeniu

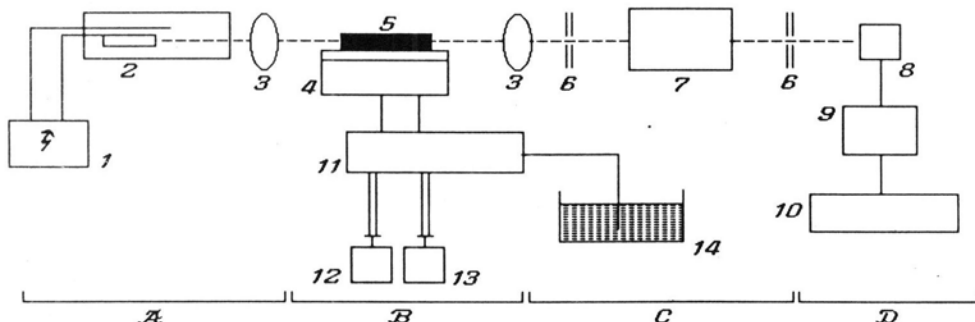
$I_0$ , a  $I$  jest natężeniem promieniowania niezaabsorbowanego przez atomy; wówczas pomiędzy stężeniem atomów a mierzoną własnością fizyczną jaką jest „ilość” promieniowania zachodzi zależność:

$$\lg \frac{I_0}{I} = abc$$

gdzie  $a$  jest współczynnikiem absorpcji.

#### BUDOWA I DZIAŁANIE SPEKTROFOTOMETRU ABSORPCJI ATOMOWEJ

Schemat budowy spektrofotometru absorpcji atomowej jest przedstawiony na ryc. 2 [14, 21, 27].



Ryc. 2. Schemat budowy spektrometru absorpcji atomowej. 1 - zasilacz, 2 - lampa, 3 - soczewki, 4 - palnik, 5 - płomień, 6 - szczeliny, 7 - monochromator, 8 - fotodetektor, 9 - wzmacniacz, 10 - rejestrator. 11 - rozpylacz, 12 - gaz palny, 13 - gaz nośny, 14 - próbka; A - układ emisyjny, B - układ absorbcyjny, C - układ optyczny, D - układ pomiarowy.

Fig. 2. Scheme of an atomic absorption spectrophotometer. 1 - source power supply, 2 - lamp, 3 - lens, 4 - burner, 5 - flame, 6 - slit, 7 - monochromator, 8 - photodetector, 9 - amplifier, 10 - recorder, 11 - sprayer, 12 - fuel gas, 13 - support gas, 14 - sample solution; A - emission system, B - absorption system, C - selection system, D - photometric system.

Składa się on z czterech podstawowych układów:

1. układu emisyjnego,
2. układu absorpcyjnego,
3. układu optycznego,
4. układu pomiarowego.

1. Układ emisyjny to zasilacz i lampa będąca źródłem promieniowania. Najczęściej jest to lampa z katodą wnąkową. Katoda jest wykonana z pierwiastka, którego stężenie mamy oznaczać; np. jeśli oznaczamy miedź, to katoda lampy jest wykonana z miedzi. Używane są także lampy wielopierwiastkowe, w których katoda jest wykonana ze stopu np. Na, K, czy też Ca, Mg i Al, co pozwala, bez konieczności wymiany lampy, oznaczać kolejno kilka pierwiastków. Coraz częściej stosuje się lampy bezelektrodowe, w których pobudzenie atomów metalu do emisji promieniowania następuje pod wpływem działania pola elektromagnetycznego o wysokiej częstotliwości.

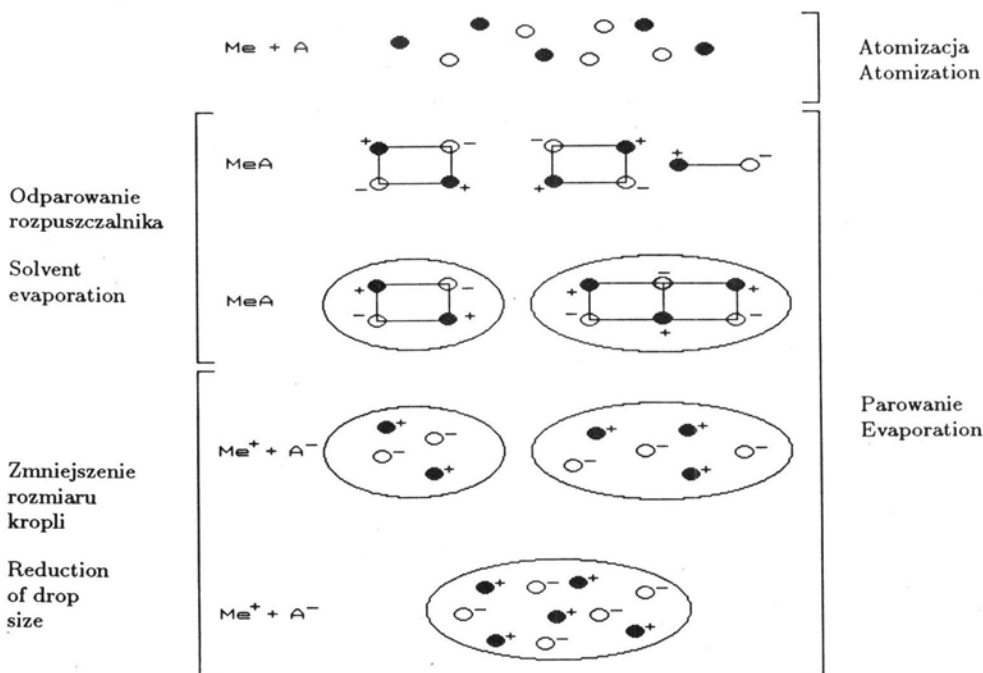
2. Układ absorpcyjny stanowi atomi-

zer. Istnieją dwa rodzaje atomizerów: płomieniowe i bezpłomieniowe. Atomizery płomieniowe są to rozpylacze pneumatyczne połączone z głowicą palnika. Sprężony gaz, przepływając przez dyszę rozpylacza powoduje zassanie analizowanej próbki i rozpylenie jej. Aerosol próbki miesza się w komorze palnika z gazem palnym, który spala się u wylotu palnika. Procesy tam zachodzące ilustruje ryc. 3.

Najczęściej stosowane mieszaniny gazów, oraz temperatury płomienia przedstawia poniższe zestawienie [3]:

Gas palny	Gas nośny	Temp. (°C)
metan	powietrze	1875
gaz ziemny	powietrze	1700-1900
wodór	powietrze	2000-2050
acetylen	powietrze	2125-2400
acetylen	N <sub>2</sub> O	2600-2800

Jednym z atomizerów bezpłomieniowych jest wysokotemperaturowy atomizer grafi-



Ryc. 3. Odparowanie i dysocjacja termiczna próbki w płomieniu.

Fig. 3. Evaporation and thermal dissociation of sample in flame.

towy (HGA) firmy Perkin-Elmer. Zasadniczą częścią HGA jest rurka grafitowa umieszczona równolegle do wiązki promieni. Próbkę dozowaną jest specjalną pipetą do środka rurki. Sposób założenia rurki pozwala na jej oporowe grzanie do określonej temperatury przez określony czas, oraz na prowadzenie atomizacji w strumieniu gazu obojętnego (np. argonu), co zapobiegając tworzeniu się tlenków, poprawia precyzję oznaczeń i przedłuża trwałość rurki grafitowej. Program pracy atomizera składa się z czterech etapów: (a) odparowania rozpuszczalnika, (b) rozkładu termicznego próbki, (c) atomizacji i (d) wygrzania rurki w celu odparowania wszystkich składników próbki oraz przygotowania rurki do następnej analizy. Maksymalna temperatura w atomizerze grafitowym wynosi ok. 2800°C.

Do atomizerów bezpłomieniowych należą także atomizery par zimnych (do oznaczania Hg, Se, As, Sb, Bi, Sn, Tl).

3. Układ optyczny. Służy do ustalenia parametrów spektralnych (ustawienie szczeliny, długości fali, zwierciadeł i monochromatora).

4. Układ pomiarowy. W jego skład wchodzi detektor promieniowania (fotopowielacz), układ przetwarzający (wzmocniacz) oraz urządzenia wyjściowe – rejestrator graficzny lub miernik cyfrowy.

## INTERFERENCJE

Obecnie nie istnieje i prawdopodobnie nigdy nie będzie istnieć metoda analityczna całkowicie wolna od zakłóceń, mogących powodować zafalszowanie wyników analizy. Zakłócenia wynikające z zastosowanej metody analitycznej oraz ze składu próbki nazywamy interferencjami. W atomowej spektroskopii absorpcyjnej wyróżnia się następujące rodzaje interferencji:

1. Interferencje fizyczne. Są one związane z własnościami fizycznymi próbki, jej lepkością, gęstością, napięciem powierzchniowym. Jeśli próbka i wzorec wyraźnie

różnią się którąś z tych własności, będą niejednakowo zasysane i w różnym stopniu w płomieniu rozpylane, co w efekcie prowadzi do błędnych wyników. Eliminować tego typu błędy można poprzez możliwie dokładne dobranie głównych składników próbki i wzorca.

2. Interferencje chemiczne. Interferencje chemiczne powstają w wyniku tworzenia się w atomizerze trudno dysocjujących związków analizowanego pierwiastka [9]. Powoduje to obniżenie ilości wolnych atomów zdolnych do absorpcji promieniowania. Przykładami mogą być fosforany, siarczany czy krzemiany (np. Ba, Ca), tlenki i wodorotlenki (Al, V, Mo, Cr), spinele (związki międzymetaliczne, np. Al-Ca, Al-Mg). Istnieją dwa sposoby eliminacji tego typu interferencji. Pierwszy polega na stosowaniu „dodatku spektralnych”. Na przykład fosforan wapnia nie dysocjuje całkowicie w płomieniu acetylenowo-tlenowym; dodanie do próbki związków lantanu powoduje wiązanie przez te ostatnie fosforanu i uwolnienie wapnia do atomizacji. Drugi sposób to podniesienie temperatury płomienia poprzez zastosowanie odpowiedniej mieszaniny gazowej, wystarczającej do dysocjacji termicznej określonych związków.

3. Interferencje jonizacyjne. Interferencje jonizacyjne pojawiają się wtedy, gdy w płomieniu zachodzi jonizacja atomów analizowanego pierwiastka. Zmniejsza się ilość wolnych atomów, a tym samym zaniżana jest absorpcja [3, 9]. Eliminuje się te błędy dodając do analizowanej próbki nadmiar pierwiastka o niskiej energii jonizacji (najczęściej Na lub K). Dodatek ten, dostarczając do płomienia dużą ilość wolnych elektronów, powstrzymuje dysocjację pierwiastka analizowanego.

4. Absorpcja tła. Jest to tzw. niespecyficzna absorpcja, powodowana przez atomy różne od oznaczanych, cząsteczki związków powstałych w płomieniu, nie wyparowane cząsteczki aerozolu. Ten rodzaj interferencji korygowany jest we współczesnych aparatach

automatycznie przez stosowanie „systemu korekcji tła”.

Pierwsze trzy interferencje mogą być korygowane także bez użycia sposobów opisanych powyżej, a jedynie poprzez zastosowanie odpowiedniej techniki analitycznej – metody dodatków wzorca. Zasada jest następująca: dzieli się próbkę na trzy części, do pierwszej nie dodaje się nic, do drugiej i trzeciej dodaje się różne ilości wzorca, wszystkie rozcieńcza się do tej samej objętości, aby stężenie oryginalnej próbki było wszędzie jednakowe i wykonuje się oznaczenie. Interferencje w takim samym stopniu zaburzają absorpcję wzorców i próbki. Pozwala to na uzyskanie wiarygodnych wyników.

#### PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY METODĄ ASA

Próbki ciekłe w zasadzie nie wymagają wstępnej obróbki i mogą być analizowane po odpowiednim rozcieńczeniu. Próbki stałe wymagają oddzielenia matrycy organicznej (mineralizacji) i przeprowadzenia do roztworu [1, 18]. Najczęściej stosowane sposoby mineralizacji to mineralizacja sucha – polegająca na spalaniu próbki w powietrzu lub tlenie przy temp. 400 do 550°C w tyglach krzemionkowych [1, 4, 7, 16, 41] oraz mineralizacja mokra – gdzie oddzielenie matrycy organicznej następuje pod wpływem utleniających nieorganicznych (mieszanki kwasów nieorganicznych, np. azotowego, nadchlorowego i siarkowego [10, 11, 20], kwasu azotowego i perhydrolu [31, 32, 33, 38], lub innych [6, 25, 36, 37]). Próbki po mineralizacji są rozpuszczane w wodnych roztworach kwasów nieorganicznych (np. HNO<sub>3</sub>).

Wprawdzie w niektórych przypadkach można oznaczać śladowe ilości pierwiastków w próbkach stałych nie przeprowadzając ich do roztworu, jednak analiza taka wymaga specjalnego wyposażenia (mikrowaga, łódeczki tantalowe, specjalne manipulatory).

#### ZALETY I WADY METODY ASA

Do zalet metody ASA należy zaliczyć:

- możliwość ilościowego oznaczenia 69 pierwiastków, wszystkich metali i niektórych niemetalii;
- wysoką czułość oznaczeń (czyli stosunek przyrostu sygnału analitycznego do odpowiadającego mu przyrostu stężenia oznaczanego składnika);
- selektywność (zdolność do oznaczania za pomocą danej metody tylko jednego pierwiastka w określonych warunkach);
- wysoką precyzję oznaczeń (precyzja jest to wielkość charakteryzująca rozrzut wyników uzyskiwanych przy wielokrotnym oznaczaniu danego składnika daną metodą);
- stosunkowo niewielką objętość analitu potrzebną do oznaczeń. Przy stosowaniu atomizera płomieniowego najmniejsza objętość próbki wynosi ok. 1 ml, natomiast dla atomizera grafitowego ok. 100 µl.

Wady metody:

- konieczność rozpuszczenia próbek stałych,
- występowanie wzajemnego oddziaływania pierwiastków obecnych w próbce.

Mając powyższe na uwadze należy stwierdzić, że atomowa spektrofotometria absorpcyjna jest, ze względu na szerokość zastosowań, jedną z najwartościowszych metod chemii analitycznej stosowanych w badaniach biologicznych.

#### PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ METODY ASA

Zastosowanie metody absorpcji atomowej w badaniach materiału biologicznego jest coraz częstsze. Dotyczy oznaczeń ilościowych pierwiastków w całej roślinie i w poszczególnych organach roślinnych. Metoda ASA znalazła również zastosowanie w badaniach nad pobieraniem i transportem składników mineralnych w roślinach.

Lastra i inni [22] badali pobieranie Cu, Fe,

Mn i Zn przez korzenie *Pinus radiata* i rozmieszczenie wymienionych pierwiastków w siewkach (w korzeniach, lodygach i szpilkach) tego gatunku, hodowanych na pożywkach o różnym stężeniu miedzi. Studiowano także zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych metali w siewkach (np. w szpilkach im więcej było miedzi tym mniej manganu, odwrotnie było ze stężeniem żelaza).

Badania nad mobilnością K, Ca, Mg i Mn w roślinach prowadzili Van Goor i Wiersma [42]. Oznaczali stosunek stężeń jonów w liściach i owocach jabłoni, oraz skład soku floemu u *Yucca flaccida* i *Ricinus communis*. Potas oznaczono fotometrycznie, pozostałe pierwiastki stosując absorpcję atomową.

Rozmieszczenie i translokację pierwiastków w roślinach określali McGrath i Robson (stężenie Zn w liściach, młodych pędach, liścieniach, lodygach i korzeniach siewek *Pinus radiata*) [23, 24], Bittner i Buschman (oznaczali K, Ca, Mg w liściach, hypokotylach i korzeniach *Raphanus sativus*) [5], Roblin i Fleurat-Lessard (określali stężenia K i Ca w międzywęźlach, poduszkach i ogonkach liściowych *Mimosa pudica*) [30], Campos i Curtius (stężenia K, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn i Cu w międzywęźlach trzciny cukrowej) [8].

Stosując metodę absorpcji atomowej badano sezonowe zmiany składu soku ksylemu (K, Ca, Mg) [40]; zmiany stężenia pierwiastków (K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) w załączkach (sok centralnej wakuoli, endosperm i zarodki) podczas embriogenezy (Ryczkowski i inni [31], Ryczkowski, Ryczyński [32, 33]). Wpływ deficytu Cu na fotosyntetyczny transport elektronów badała Droppa i inni [12].

Ekologiczno-fizjologiczny charakter miały badania Horsta i innych [18] nad wpływem Al na rozwój *Vigna unguiculata*. W pomiarach zastosowano aż trzy metody analityczne: Al i P oznaczano plazmową spektroskopią emisyjną, Ca i Mg atomową spektrofotometrią absorpcyjną, K fotometrią płomieniową.

Taylor i Crowder [39] analizowali pobieranie i akumulację pierwiastków ciężkich Cu, Ni, Zn, Mn, Fe, Mg i Ca w korzeniach, liściach, kwiatach męskich i żeńskich oraz pyłku *Typha latifolia* rosnących na mokradłach w kanadyjskiej prowincji Ontario (gleby bogate w serpentyn  $3\text{MgO}\cdot 3\text{Mg}(\text{OH})_2\cdot 4\text{SiO}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Wszystkie pierwiastki analizowano omawianą metodą stosując mineralizację mokrą ( $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  pod ciśnieniem).

Akumulację Ni i Zn w pewnych gatunkach roślin północnoamerykańskich mierzyli Reeves i inni [29]. Stężenie niklu i cynku w liściach różnych gatunków miało ogromną rozpiętość; odpowiednio od 1 do 8910  $\mu\text{g/g}$  i od 8 do 3000  $\mu\text{g/g}$  suchej masy.

Popp [26] oznaczala skład chemiczny liści 22 gatunków mangrowców australijskich. Absorpcja atomowa posłużyła do oznaczeń K, Ca, Na i Mg.

Jak różnorodne problemy z zakresu fizjologii roślin były rozwiązywane opisywaną metodą świadczą poniższe przykłady:

- Glen i O'Leary [15] badali zależność rozwoju, poziomu mineralów i zawartości wody w liściach dwuliściennych halofitów przy różnym zasoleniu.
- Rauser [28] określił tolerancję różnych gatunków *Agrostis gigantea* na Cu.
- Studiowano wpływ NaCl na fotosyntezę u *Phaseolus vulgaris* [35].
- Metodę ASA zastosowano do weryfikacji wyników oznaczeń Cu i Zn w liściach *Piper betle* i owocach *Areca catechu* [38].

Należy dodać, że atomowa spektroskopia absorpcyjna jest stosowana w medycynie, archeologii, badaniach materiałów pochodzenia kosmicznego, a także kryminalistyce.

Pełne dane bibliograficzne dotyczące zastosowań metody ASA są zawarte w wydawanym przez Korporację Perkin-Elmer czasopiśmie *Atomic Spectroscopy* (dawniej *Atomic Absorption Newsletter*).

#### LITERATURA

- [1] ADRIAN W. J., STEVENS M. L. 1977. Effect of Different Sample Preparation Methods on



- the Atomic-absorption Spectrophotometric Determination of Calcium in Plant Material. *Analyst* **102**: 446-452.
- [2] ATEN C. F., BOURKE J. B., WALTON J. C. 1983. Determination of Magnesium, Iron, and Zinc in Fertilizers by Flame Atomic Absorption and by Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy: Comparison of Methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**: 766-768.
- [3] BEATY R. D. 1978. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin-Elmer Corporation.
- [4] BERRY W. L., JOHNSON C. M. 1966. Determination of Calcium and Magnesium in Plant Material and Culture Solution, Using Atomic-Absorption Spectroscopy. *Appl. Spectroscopy*. **20**: 209-211.
- [5] BITTNER A., BUSCHMANN C. 1983. Uptake and Translocation of  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  by Seedlings of *Raphanus sativus* L. Treated with Kinetin. *Z. Pflanzenphysiol.* **109**: 181-189.
- [6] BRADFIELD E. G. 1974. Chemical Interferences in the Determination of Manganese in Plant Material by Atomic-absorption Spectroscopy. *Analyst* **99**: 403-407.
- [7] BUCHANAN J. R., MURAOKA T. T. 1964. Determination of zinc and manganese in tree leaves by atomic absorption spectroscopy. *At. Absorption Newsletter* **3**: 79-83.
- [8] CAMPOS C. C., CURTIUS A. J. 1982. Distribuição de Metais em Cana-de-Açúcar. *An. Acad. brasil. Cienc.* **54**: 663-668.
- [9] CAROLI S., SENOFONTE O., DELLE FEMMINE P. 1983. Determination of Trace Elements in Biological Materials Using a Hollow-cathode Discharge: Comparative Study of Matrix Effects. *Analyst* **108**: 196-203.
- [10] DAVID D. J. 1959. Determination of Calcium in Plant Material by Atomic-absorption Spectrophotometry. *Analyst* **84**: 536-545.
- [11] DAVID D. J. 1962. Atomic absorption spectrochemical analysis of plant materials with particular reference to manganese and iron. *At. Absorption Newsletter* **1**: 45-50.
- [12] DROPPA M., TERRY N., HORVATH G. 1984. Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2369-2373.
- [13] EHMANN W. D., YATES S. W. 1988. Nuclear and Radiochemical Analysis. *Anal. Chem.* **60**: 42-62.
- [14] EWING G. W. 1980. Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN, Warszawa, s. 149-162.
- [15] GLENN E. P., O'LEARY J. W. 1984. Relationship between salt accumulation and water content of dicotyledonous halophytes. *Plant Cell Physiol.* **7**: 253-261.
- [16] HENNING S., JACKSON T. L. 1973. Determination of molybdenum in plant tissue using flameless atomic absorption. *At. Absorption Newsletter* **12**: 100-101.
- [17] HOLYŃSKA B., MARKOWICZ A. 1987. Wybrane zagadnienia analitycznej spektrometrii atomowej. Ossolineum, Warszawa, s. 5-70.
- [18] HORST W. J., WAGNER A., MARSCHNER H. 1983. Effect of Aluminium on Root Growth, Cell-division Rate and Mineral Element Contents in Roots of *Vigna unguiculata* Genotypes. *Z. Pflanzenphysiol.* **109**: 95-103.
- [19] ISAAC R. A. 1980. Atomic Absorption Methods for Analysis of Soil Extracts and Plant Tissue Digests. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**: 788-796.
- [20] JAGO J., WILSON P. E., LEE B. M. 1971. Determination of Sub-microgram Amounts of Cobalt in Plants and Animal Tissues by Extraction and Atomic-absorption Spectroscopy. *Analyst* **96**: 349-353.
- [21] KOWALSKA A. 1984. Metoda Atomowej Spektroskopii Absorpcyjnej. *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biologii Molekularnej.* **12**: 33-45.
- [22] LASTRA O., CHUECA A., LACHICA M., GORGE J. L. 1988. Root Uptake and Partition of Copper, Iron, Manganese, and Zinc in *Pinus radiata* Seedlings Grown under Different Copper Supplies. *J. Plant Physiol.* **132**: 16-22.
- [23] MCGRATH J. F., ROBSON A. D. 1984. The Movement of Zinc through Excised Stems of Seedlings of *Pinus radiata* D. Don. *Ann. Bot.* **54**: 231-242.
- [24] MCGRATH J. F., ROBSON A. D. 1984. The Influence of Zinc Supply to Seedlings of *Pinus radiata* D. Don on the Internal Transport of Recently Absorbed Zinc. *Aust. J. Plant Physiol.* **11**: 165-178.
- [25] NEUMAND R., MUNSHOWER F. F. 1981. Rapid Determination of Molybdenum in Botanical Material by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **123**: 325-328.
- [26] POPP M. 1984. Chemical Composition of Australian Mangroves. I. Inorganic Ions and Organic Acids. *Z. Pflanzenphysiologie* **113**: 359-409.
- [27] RAMIREZ-MUÑOZ J. 1968. Atomic-Absorption Spectroscopy and Analysis by Atomic-Absorption Flame Photometry. Elsevier, Amsterdam - London - New York.
- [28] RAUSER W. E. 1984. Copper-binding protein and copper tolerance in *Agrostis gigantea*. *Plant Sci. Lett.* **33**: 239-247.
- [29] REEVES R. D., MACFARLANE R. M., BROOKS R. R. 1983. Accumulation of nickel and zinc by western North America genera containing serpentine-tolerant species. *Amer. J. Bot.* **70**: 1297-1303.



- [30] ROBLIN G., FLEURAT-LESSARD P. 1983. Distribution of Potassium, Chloride and Calcium and Capacity of Hydrogen Ion Excretion in Various Parts of the *Mimosa pudica*. *Plant. Ann. Bot.* **52**: 763-768.
- [31] RYCZKOWSKI M., KOWALSKA A., RECZYŃSKI W. 1986. Element Concentrations in the Sap Surrounding the Developing Embryo of *Aesculus hybrida*. *J. Plant Physiol.* **122**: 467-472.
- [32] RYCZKOWSKI M., RECZYŃSKI W. 1986. Concentration of elements in the central vacuole sap and in the developing embryo of *Aesculus glabra* Willd. *Acta Bot. Neerl.* **35**: 217-222.
- [33] RYCZKOWSKI M., RECZYŃSKI W. 1988. Concentration of elements in the central vacuole sap during proembryogenesis *Clivia* sp. *Annales Scientifiques de L'Université de Reims.* **23**: 176-177.
- [34] SCHRAMMEL P., LI-QIANG XU. 1983. Determination of 14 Elements in Botanical Samples by Simultaneous Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry Using Standard Reference Material as Multielement Standard. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **314**: 671-677.
- [35] SEEMANN J. R., CRITCHLEY Ch. 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **164**: 151-162.
- [36] SIMMONS W. J. 1973 Determination of Low Concentrations of Cobalt in Plant Material by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Anal. Chem.* **45**: 1947-1949.
- [37] SIMMONS W. J., LONERAGAN J. F. 1975. Determination of Copper in Small Amounts of Plant Material by Atomic Absorption Spectroscopy Using a Heated Graphite Atomizer. *Anal. Chem.* **47**: 566-568.
- [38] TARAFDAR S. A., AKHTER S., KAR S., BISWAS S. K., KHAN A. H. 1987. Multielement Proton-Induced X-Ray Emission Analysis of Betel Leaves, Betel Nuts, and Lime. *Biol. Trace El. Res.* **12**: 121-131.
- [39] TAYLOR G. J., CROWDER A. A. 1983. Uptake and accumulation of heavy metals by *Typha latifolia* in wetlands of the Sudbury, Ontario region. *Can. J. Bot.* **61**: 63-73.
- [40] TROMP J. 1979. Seasonal Variations in the Composition of Xylem Sap of Apple with Respect to K, Ca, Mg, and N. *Z. Pflanzenphysiol.* **94**: 189-194.
- [41] URE A. M., EWEN G. J., MITCHELL M. C. 1980. A Three-channel Flame Atomic Absorption/Emission Spectrometer for the Rapid, Routine Determination of Major Cations in Soil Extracts and Plant Ash Solutions. *Anal. Chim. Acta.* **118**: 1-9.
- [42] VAN GOOR B. J., WIERSMA D. 1974. Redistribution of Potassium, Calcium, Magnesium, and Manganese in the Plant. *Physiol. Plant.* **31**: 163-168.