

Analisi strumentale di elementi in traccia

Giorgio MATTIELLO e Angelo BORTOLI

Presidio Multizonale di Prevenzione, USSL 36, Mestre, Venezia

Riassunto. - Lo studio degli elementi in traccia di interesse clinico e tossicologico richiede la determinazione affidabile di concentrazioni sempre più basse di questi elementi in matrici biologiche complesse. Tra le metodologie strumentali attualmente di maggior rilevanza vanno annoverate la spettrometria di massa con diluizione isotopica, l'analisi per attivazione neutronica, la voltammetria di ridissoluzione anodica, la spettrometria di emissione atomica a plasma induttivo e la spettrometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite. Quest'ultima tecnica, in particolare, offre elevata sensibilità ed affidabilità per l'analisi di un vasto numero di elementi. Queste caratteristiche sono ottenute tramite l'impiego di numerosi accorgimenti, tra cui l'adozione del protocollo basato sul fornetto di grafite con piattaforma a temperatura stabilizzata, l'uso di modificatori di matrice universali, l'incenerimento in corrente di ossigeno e l'adozione di sistemi di correzione del fondo che utilizzano l'effetto Zeeman.

Parole chiave: tecniche analitiche strumentali, spettrometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite, modificatori di matrice, effetto Zeeman, elementi in traccia, fluidi biologici.

Summary (Instrumental analysis of trace elements). - The study of trace elements in human medicine and toxicology requires very low concentration of these elements to be determined in biological matrices. Among the analytical methodologies of major impact there are isotopic dilution mass spectrometry, neutron activation analysis, anodic stripping voltammetry, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and electrothermal atomization atomic emission spectrometry. This last, in particular, provides high sensitivity and reliability for the determination of numerous elements. Instrumental and methodological improvements leading to these achievements include the adoption of the so-called stabilized temperature platform furnace, the introduction of universal matrix modifiers, oxygen charring steps and background correction systems based on the Zeeman effect.

Key words: instrumental analytical techniques, graphite furnace atomic absorption spectrometry, matrix modifiers, Zeeman effect, trace elements, biological fluids.

Introduzione

Da quando, agli inizi degli anni '60, l'attenzione di medici, biologi, chimici, ecc., si è concentrata sui vari elementi presenti nell'organismo umano, un'esigenza sempre più sentita è stata quella di affinare le tecniche analitiche per renderle maggiormente affidabili, precise, veloci e sensibili [1]. Numerosi elementi, infatti, pur presenti in piccolissime quantità nell'organismo, svolgono un ruolo essenziale per il corretto funzionamento delle attività metaboliche o danno luogo a effetti tossici a lungo termine. Nella Tab. 1 sono riportate, a titolo di esempio, le concentrazioni, nel siero o nel sangue, di alcuni metalli di interesse clinico o tossicologico.

La determinazione accurata di questi livelli di concentrazione, sia per scopi clinici che per scopi di ricerca, rappresenta un compito non facile per l'analista. Non a caso, i livelli di riferimento riportati in letteratura per le concentrazioni di numerosi elementi nei fluidi biologici sono andati diminuendo nel tempo di pari passo con il miglioramento delle prestazioni analitiche, dovuto sia allo sviluppo di strumentazione sempre più sofisticata, sia alla crescente attenzione ai problemi di contaminazione e all'adozione di più strette procedure di controllo della

qualità dei dati. Attualmente sono disponibili diverse tecniche strumentali per la determinazione degli elementi in traccia, delle quali verranno descritti brevemente vantaggi e svantaggi. Tra queste, l'analista dovrà scegliere il metodo analitico più idoneo in relazione al particolare problema in esame, tenendo conto di vari fattori quali la sensibilità per lo specifico elemento, il livello di accuratezza raggiungibile e la praticabilità.

Inoltre, l'adozione di determinate procedure di controllo di qualità dovrebbe essere considerata parte integrante di un procedimento analitico, allo scopo di verificare costantemente la qualità dei dati prodotti e di mantenere sotto controllo le prestazioni del metodo prescelto.

Tecniche analitiche di maggior rilievo per l'analisi di elementi

Spettrometria di massa con diluizione isotopica

La spettrometria di massa accoppiata con il metodo della diluizione isotopica può essere considerata una delle poche tecniche assolute nell'ambito della microanalisi elementare. La tecnica di ionizzazione più

Tabella 1. - Livelli di concentrazione nel siero o nel sangue (*) di alcuni elementi in traccia di interesse clinico o tossicologico

Al	2,5 - 7	µg/l
Cd *	0,2 - 1	µg/l
Co	0,06 - 0,4	µg/l
Cr	0,08 - 0,20	µg/l
Cu	0,5 - 1,5	mg/l
Mn	0,4 - 1,0	µg/l
Mo	0,2 - 1,2	µg/l
Ni	1 - 5	µg/l
Pb *	90 - 100	µg/l
Se	80 - 120	µg/l
V	0,03 - 0,90	µg/l
Zn	0,5 - 1,3	mg/l

utilizzata è la termoionizzazione di superficie, nella quale una soluzione del materiale da analizzare viene depositata su un filamento metallico che, riscaldato, produce ioni per effetto termoionico. Le determinazioni quantitative mediante diluizione isotopica si basano sulla variazione della composizione isotopica dell'elemento da determinare in seguito all'aggiunta di una quantità nota di un tracciante costituito dallo stesso elemento, ma con una composizione isotopica diversa da quella del campione. Misurando, per mezzo della spettrometria di massa, il rapporto tra la quantità di isotopo aggiunto e quella di un altro isotopo dell'elemento, è possibile calcolare la quantità di analita, originariamente presente nel campione, in base all'alterazione del rapporto relativo normale tra i due isotopi (abbondanza naturale).

Il principale vantaggio di questa tecnica è la sua elevata accuratezza: all'errore globale infatti contribuiscono soltanto l'errore sulla quantità di tracciante aggiunta e l'errore sulla misura del rapporto isotopico. Poiché si tratta di un metodo assoluto non è richiesta la calibrazione con campioni a titolo noto e l'accuratezza delle misure non è vincolata all'accuratezza della taratura. I risultati sono indipendenti dal recupero quantitativo e insensibili a contaminazioni che avvengano nella fase successiva all'aggiunta. Il metodo dimostra elevata specificità, ottima precisione ed elevata sensibilità. Il campo di applicazione si estende ad oltre settanta elementi. Restano esclusi gli elementi monoisotopici (circa 17, tra cui Al, As, Co, Mn, P) che non possono essere determinati con questa tecnica. Tra i principali svantaggi si devono considerare i generalmente lunghi tempi di analisi e procedure di purificazione spinta del campione. Data la sensibilità del metodo, per evitare inquinamenti anche

piccoli nella fase precedente l'aggiunta è necessario operare in ambienti controllati (laboratori di classe 100); inoltre, le apparecchiature sono costose e devono essere utilizzate da operatori esperti. Per le analisi di routine altri metodi sono senz'altro più veloci e più convenienti, mentre questa tecnica risulta insostituibile per la messa a punto di metodi definitivi e di riferimento.

La recente affermazione della spettrometria a plasma induttivo (ICP-AES) ha dato ulteriore impulso alla spettrometria di massa in campo inorganico (ICP-MS), sia senza che con diluizione isotopica. Gli sviluppi in questo settore sono sempre più rilevanti e rapidi.

Analisi per attivazione neutronica

La maggior parte degli elementi può formare, mediante interazione con neutroni, determinati isotopi radioattivi. Questi sono identificati e quantizzati in base alle caratteristiche di grandezze nucleari specifiche. La reazione nucleare più impiegata è quella in cui un isotopo stabile A è trasformato per cattura di un neutrone in un isotopo radioattivo B che a sua volta decade ad un nucleo stabile C con una sua costante di disintegrazione e emissione di radiazioni. L'identificazione di A avviene tramite la costante di disintegrazione, mentre l'intensità delle radiazioni emesse è proporzionale alla quantità di analita presente.

Questa tecnica permette di effettuare analisi multielementari con elevata sensibilità per la maggior parte degli elementi; in particolare, presenta interferenze da parte delle matrici biologiche, costituite per la maggior parte da elementi (C, H, N, O) che danno luogo a radioisotopi con emivite brevissime o ad elementi stabili. Caratteristica unica di questa tecnica è il fatto che la misura non è influenzata da eventuali impurezze presenti nei reagenti, eventualmente aggiunti per effettuare separazioni radiochimiche dopo l'attivazione. Di conseguenza, è possibile raggiungere limiti di rivelabilità molto bassi poiché il valore del "bianco" può essere reso trascurabile.

La necessità di disporre di un reattore nucleare come sorgente di neutroni è il principale ostacolo ad un più largo impiego di questo metodo. Un altro svantaggio possono essere i tempi di analisi piuttosto lunghi, in particolare per elementi che danno luogo ad isotopi con vita media molto lunga e richiedono irraggiamenti prolungati (anche dell'ordine di mesi) per ottenere una buona sensibilità. Inoltre, è spesso necessario separare i radionuclidi in gruppi bilanciati in intensità di emissione. Il metodo non è applicabile alla determinazione di elementi leggeri che formano radioisotopi con emivite brevissime o di elementi stabili. Attualmente molti elementi possono essere determinati con analoghe caratteristiche di sensibilità e precisione con altre tecniche. Tuttavia, per alcuni elementi presenti a livelli di ultratraccia l'analisi per attivazione neutronica resta il metodo da preferire.

Voltammetria di ridissoluzione anodica

La voltammetria di ridissoluzione anodica è l'unico metodo elettrochimico applicabile all'analisi di metalli in traccia. Esso comporta una fase di deposizione, in cui gli ioni metallici presenti nel campione sono ridotti e depositati su un catodo (un elettrodo di grafite ricoperto da un sottile film di mercurio), seguita da una elettrolisi inversa nel corso della quale i metalli depositati sono ridisciolti sequenzialmente nella soluzione. Il potenziale di ridissoluzione è una grandezza specifica per ciascun metallo, che ne consente l'identificazione, mentre l'intensità della corrente elettrica necessaria per l'ossidazione è proporzionale alla quantità di metallo ridotto durante la fase di deposizione.

Il metodo risulta tra i più sensibili attualmente a disposizione, con un potere di rivelabilità dell'ordine di grandezza dei ng/l. La strumentazione è relativamente poco costosa e semplice da usare; con un'opportuna scelta delle condizioni è possibile determinare selettivamente più elementi nello stesso campione. Il campo di applicazione è però limitato ad un piccolo numero di metalli (Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Ga, Hg, Pb, Sb, Tl, Zn). I tempi di analisi sono piuttosto lunghi se confrontati con quelli di altre tecniche di uso comune (da 5 a 30 minuti per campione, a seconda del livello di precisione richiesto). In tutti i campioni in cui i metalli sono fortemente complessati (ad esempio, sangue e tessuti, dove i metalli sono fortemente associati alle proteine) l'analisi deve essere preceduta da trattamenti con agenti decomplessanti o mineralizzazione acida. Infine, proprio a causa dell'elevata sensibilità del metodo, il valore del "bianco" risulta critico ed è necessario l'impiego di reagenti ultrapuri e, per il dosaggio di concentrazioni molto basse, la purificazione elettrochimica dei reagenti. In pratica, le applicazioni di questa tecnica in campo biomedico possono considerarsi di importanza piuttosto limitata.

Spettrometria atomica

La spettrometria atomica è il principale dei metodi ottici per la determinazione degli elementi [2]. Il principio su cui si basa è la capacità degli atomi di assorbire ed emettere radiazioni di lunghezza d'onda specifica. A seconda che si misuri l'emissione o l'assorbimento e in base al sistema di atomizzazione usato si devono distinguere: la spettrometria di emissione in fiamma, in pratica limitata, nell'uso clinico, alla determinazione di Na e K; la tecnica ICP-AES, di recente introduzione; la spettrometria di assorbimento atomico (AAS), in fiamma (FAAS) e con fornello di grafite (ETA-AAS).

Spettrometria di emissione a fiamma. - Nella spettrometria di emissione atomica si misura l'intensità delle radiazioni emesse da atomi eccitati termicamente

nel ritornare allo stato fondamentale. Con la sorgente di eccitazione più comune, una fiamma aria-propano o aria-acetilene, questa tecnica dimostra una sensibilità piuttosto bassa, specie se confrontata con la spettrometria di assorbimento atomico. Va fatta eccezione per i metalli alcalini che, a causa della loro semplice configurazione elettronica, sono più facilmente eccitabili. Di conseguenza, è di scarso o nessun interesse per la determinazione degli elementi in traccia.

Tecnica ICP-AES. - Recentemente sono stati introdotti e sono ormai abbastanza diffusi strumenti che impiegano come sorgente di eccitazione un plasma, cioè un gas altamente ionizzato ed elettricamente neutro, che può raggiungere temperature comprese tra i 7.000 e i 10.000 K, tali cioè da portare allo stato eccitato con sufficiente sensibilità praticamente tutti gli elementi, inclusi alcuni metalli. La tecnica ICP-AES si è rapidamente affermata come una metodologia sensibile e affidabile e ha trovato numerose applicazioni anche in campo clinico.

Tra i suoi principali vantaggi si devono citare la velocità di analisi (dell'ordine di alcuni secondi per campione) e la possibilità di effettuare analisi di più elementi sullo stesso campione. La preparazione richiesta per il campione è in genere limitata ad una semplice diluizione. Le elevate temperature raggiunte dal plasma, l'assenza di ossigeno e l'elevata densità elettronica dell'ambiente in cui si viene a trovare il campione riducono in maniera sostanziale la possibilità di interferenze di tipo chimico (formazione di ossidi, di composti termostabili, di ioni) e permettono la determinazione anche di elementi refrattari, come B, e di elementi a carattere non metallico, come PeS. Comunque, poiché tutti gli elementi presenti emettono contemporaneamente il loro spettro di radiazioni e poiché possono formarsi numerose specie a diverso grado di ionizzazione per ciascun elemento, si verificano molte interferenze spettrali dovute alla sovrapposizione di più linee, che possono solo in parte essere superate con l'uso di monocromatori a risoluzione molto spinta. D'altra parte, la stessa ricchezza dello spettro suggerisce la possibilità di aggirare l'ostacolo effettuando le misure ad una lunghezza d'onda secondaria, in una zona meno affollata di righe. Tra gli svantaggi si deve tener presente che gli operatori necessitano di un certo grado di esperienza e che il costo della strumentazione è piuttosto elevato, come pure le spese di gestione, considerato il consumo di argon necessario per alimentare il plasma.

Spettrometria di assorbimento atomico. - Questa tecnica si basa sulla capacità degli atomi di assorbire energia da radiazioni elettromagnetiche di specifica frequenza. La quantità di energia assorbita può essere messa in relazione con la concentrazione dell'elemento in esame, secondo la legge di Lambert e Beer. L'elemento da analizzare viene portato allo stato di vapore atomico

per dissociazione termica delle molecole presenti, ottenuta mediante una fiamma o per riscaldamento elettrico di un fornello di grafite (ETA-AAS) [3].

Il pregio principale delle tecniche di assorbimento atomico è quello della assoluta specificità e la quasi totale assenza di interferenze spettrali. Il metodo basato sull'atomizzazione in fiamma è senz'altro più veloce (pochi secondi per analisi), più semplice e soggetto a minori interferenze chimiche rispetto alla tecnica con fornello di grafite. Tuttavia esso presenta un potere di rivelabilità limitato per la maggior parte degli elementi e richiede quantità di campione relativamente elevate.

L'introduzione della tecnica ETA-AAS ha praticamente rivoluzionato il settore dell'analisi degli elementi in traccia mettendo a disposizione una tecnica semplice, di possibile uso routinario, in grado però di raggiungere limiti di rivelazione estremamente bassi. La sua applicazione in vari settori della biologia e della medicina ha promosso l'approfondimento delle conoscenze in merito agli oligoelementi e ha contribuito al notevole ampliamento del numero degli elementi oggi reputati essenziali.

Oltre ai già citati vantaggi di potere di rivelabilità, specificità e semplicità di analisi, si deve ricordare che sono richiesti piccoli volumi di campione (dell'ordine di 10 µl o poco più) e che i tempi di analisi sono relativamente brevi (intorno ai 2-3 minuti per campione). Il principale problema, specie analizzando matrici biologiche complesse come sangue e urine, è dovuto alla presenza di accentuate interferenze chimiche, che possono in parte essere eliminate mediante l'uso di correttori del fondo, e di modificanti di matrice. Esse però spesso impongono anche l'uso di standards di calibrazione preparati nella stessa matrice dell'analita.

Vale la pena in particolare di soffermarsi su questa tecnica che ormai da un ventennio ha raccolto il più vasto consenso ed ha così potuto dar luogo a quella molteplicità di applicazioni che ora le sono proprie.

Il più notevole passo in avanti nella tecnica del fornello di grafite, a partire dalla sua diffusione commerciale nel 1970, è stato fatto con l'introduzione della piattaforma a temperatura stabilizzata (STPF) che ha reso questa metodica quasi completamente svincolata dalle interferenze di carattere non spettrale. In sintesi, questo sistema non è che un insieme di condizioni che collocano il fornello di tipo Massman in una situazione in cui la teoria originale di L'vov diventa applicabile. Questa teoria asserisce che qualsiasi differenza nelle caratteristiche della atomizzazione di un elemento, causata da fattori intrinseci o estrinseci al campione, diventa irrilevante quando l'analita stesso è atomizzato in un ambiente che è all'equilibrio termico e quando il segnale di assorbimento viene integrato in tempo reale [4, 5].

Per raggiungere l'equilibrio termico in un fornello riscaldato ad impulsi elettrici, il campione deve essere atomizzato posto su di una piattaforma (piattaforma di

L'Vov) inserito nel tubo di grafite, con una velocità di riscaldamento molto alta e a flusso di gas interrotto o ridotto. L'uso di modificatori di matrice (cioè di reagenti aggiunti in largo eccesso per formare composti stabili con l'analita in modo da ritardarne la volatilizzazione) esalta questo effetto ed è parte integrante del sistema STPF. Un gran numero di autori ha mostrato come la maggior parte degli elementi possa essere determinata, per una ampia tipologia di campioni, essenzialmente senza interferenze di carattere non spettrale qualora il principio della STPF sia applicato correttamente [6-9].

Inoltre, è stata accertata anche una riduzione dell'assorbimento da parte del fondo con l'uso della STPF. Per trarre il massimo vantaggio da queste condizioni operative l'elettronica strumentale deve essere abbastanza rapida da registrare senza distorsioni i segnali di assorbimento che vengono emessi in modo discontinuo. I vecchi registratori a carta sono senza dubbio troppo lenti per questo scopo e non sono in grado di fornire un segnale di assorbimento integrato con sufficiente accuratezza.

Nonostante l'indubbia riduzione delle interferenze con l'uso di questa metodologia analitica, rimangono alcuni problemi irrisolti inerenti alla bontà dei contatti della piattaforma con il tubicino di grafite ed alle conseguenti variazioni nella temperatura.

Per quanto riguarda i modificatori di matrice o di analita, questi stabilizzano l'elemento da determinare in modo da poter applicare una elevata temperatura di pirolisi per rimuovere la maggior parte della matrice prima dell'atomizzazione del metallo. Durante gli ultimi dieci anni è stato proposto un numero notevole di modificatori: solo recentemente la ricerca si è indirizzata a modificatori utilizzabili in una molteplicità di situazioni. Un buon modificatore deve stabilizzare il metallo per permettere una alta temperatura di pirolisi; non deve contribuire significativamente all'assorbimento da parte del fondo (meglio se lo riduce); deve essere disponibile ad elevato grado di purezza (non contenere cioè esso stesso l'analita) e non deve essere costituito da elementi che debbano essere in seguito determinati a basse concentrazioni (a causa di possibili effetti memoria). Studi recenti hanno dimostrato che il nitrato di palladio, spesso in combinazione con quello di magnesio, può costituire un modificatore da utilizzare per 25 o 30 elementi. In parecchi casi il potere di stabilizzazione del palladio è superiore a quello di altri modificatori sinora raccomandati singolarmente per alcuni elementi. Poiché esso soddisfa tutte le caratteristiche innanzi menzionate per un buon modificatore, le sue applicazioni appaiono molto promettenti.

Va poi considerato che, quando volumi relativamente elevati di sangue vengono pirolizzati in atmosfera di gas inerte nel fornello di grafite, la formazione e l'accrescimento di una massa di residuo carbonioso può inficiare sia la precisione che l'accuratezza delle misure

analitiche anche solo dopo una decina di determinazioni. L'introduzione di un flusso di ossigeno (per 10-20 secondi a circa 500 °C) serve ad eliminare effettivamente questo inconveniente.

Infine l'applicazione al sistema SPT del dispositivo basato sull'effetto Zeeman per la correzione del fondo, ha raggiunto la possibilità di eliminare, nella maggior parte dei casi, gli errori sulla misura del segnale derivanti da assorbimenti strutturati spuri (anche molto elevati).

La correzione del fondo con l'effetto Zeeman elimina molte delle interferenze osservate con i sistemi di correzione tradizionali (lampade al deuterio e al tungsteno).

Nella determinazione degli elementi in traccia nei fluidi e nei tessuti biologici l'operatore ha l'esigenza di misurare concentrazioni sempre più basse. L'utilizzo dell'effetto Zeeman ha reso possibile la determinazione di elementi come As, Cd, Co, Cr, Mn, Ni e Se con una sensibilità mai ottenuta in precedenza. La preparazione del campione per l'analisi si riduce ad una semplice diluizione nel caso di un fluido biologico. Questa semplice manipolazione riduce il rischio di contaminazioni del campione. I problemi di contaminazione in un laboratorio normale sono di difficile controllo e per questo particolari analisi come quelle citate dovrebbero essere eseguite solo in laboratori di classe 100.

L'analisi diretta di campioni solidi è stata descritta sin dai primi anni di impiego del fornetto di grafite, ma ha ricevuto una vera attenzione solo negli ultimi tempi, in seguito alle innovazioni tecnologiche strumentali cui è stato sopra accennato. Le nuove tecniche sono ancora allo stadio sperimentale per i problemi sia di introduzione del campione che di calibrazione; nonostante ciò, il loro sviluppo deve essere attentamente valutato perché promettente, specie per l'analisi di campioni di tessuto.

Sviluppi futuri

In molte discipline sperimentali la determinazione del contenuto totale di un elemento è spesso meno importante dell'identificazione delle diverse specie sotto cui esso è presente [10]. Per questo aumenta progressivamente l'interesse nella determinazione separata delle varie forme chimiche in cui sono presenti gli elementi nei campioni biologici (speciazione chimica). La gas-cromatografia e la cromatografia liquida ad alta efficienza sono state usate a tale scopo associando ad esse l'assorbimento atomico come rivelatore specifico. Questo tipo di accoppiamento non ha ancora dato risultati soddisfacenti e tali da consentire il pieno utilizzo delle capacità analitiche del fornetto di grafite.

Infine, nel settore analitico degli elementi in traccia, oligoelementi e microcontaminanti, sia nel contesto biologico che ambientale, è fondamentale l'adozione di adeguate misure di controllo di qualità, in considerazione delle concentrazioni spesso molto basse che si debbono determinare e dell'elevato rischio di possibili contaminazioni.

Le procedure di sicurezza dovrebbero comprendere: la valutazione delle caratteristiche del metodo adottato, in termini di precisione (riproducibilità delle misure), e di accuratezza (concordanza col valore "vero"), valutata quest'ultima mediante prove di recupero, analisi di materiali di riferimento o confronto incrociato con altri metodi o laboratori; l'analisi di campioni di controllo interno, preparati in laboratorio o disponibili sul mercato, in ogni serie analitica allo scopo di verificare la qualità dei dati e di sorvegliare, anche attraverso la costruzione di carte di controllo, le prestazioni del metodo; la partecipazione ad idonei programmi di controllo di qualità esterno, gestiti da un'organizzazione centrale, che consistano nell'invio di campioni commutabili con i campioni reali, a concentrazione ignota da analizzare periodicamente.

Le informazioni ottenute dovrebbero consentire al laboratorista attento di individuare e rimuovere le cause di errore analitico, qualora si presentino, e di migliorare costantemente la qualità delle prestazioni.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 10 gennaio 1995.

BIBLIOGRAFIA

1. *Methods involving metal ions and complexes in clinical chemistry. Serial metal ions in biological systems*. 1983. Sigel, H. (Ed.). Vol. 16. Marcel Dekker, New York.
2. *Sviluppi della spettrometria per le determinazioni quantitative*. 1988. Caroli, S. & Morisi, G. (Eds). Roma, Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN, 88/18).
3. WELZ, B. 1985. *Atomic absorption spectrometry*. 2. ed. VCH, Deerfield Beach (Fl).
4. MASSMANN, H. 1968. The comparison of atomic absorption and atomic fluorescence in the graphite cuvette. *Spectrochim. Acta* **23B**: 215-226.
5. L'VOV, B.V. 1978. Electrothermal atomization. The way toward absolute methods in atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta* **33B**: 153-193.
6. SLAVIN, W. & CARNRICK, G.R. 1985. Survey of applications of stabilized temperature platform furnace and Zeeman correction. *At. Spectrosc.* **6**: 157-160.
7. BORTOLI, A., GEROTTO, M., MARCHIORI, M. & MATTIELLO, G. 1989. Determinazione del mercurio, del selenio e dell'arsenico nell'acqua di mare e in organismi marini mediante ETA-AAS Zeeman. In: *Applicazioni dell'ETA-AAS Zeeman nel laboratorio chimico e tossicologico*. C. Minoia & S. Caroli (Eds). Edizioni Libreria Cortina, Padova. p. 239-255.
8. TÖLG, G. 1993. Problems and trends in extreme trace analysis for the elements. *Anal. Chem. Acta* **3**: 1-18.
9. SLAVIN, W. & CARNRICK, C.R. 1986. Interferences in graphite furnace AAS continuum background correction a survey. *At. Spectrosc.* **7**: 7-14.
10. CAROLI, S. 1995. Element speciation: challenges and prospects. *Microchem. J.* **51**: 64-72.