

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra pedologie a ochrany půd



Speciace hliníku v environmentálních vzorcích

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Vodičková

Obor studia: Rozvoj venkovského prostoru (AMVKS)

Vedoucí práce: doc. Ing. Ondřej Drábek, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Speciace hliníku v environmentálních vzorcích" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Ondřeji Drábkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce.

Mé poděkování patří též katedře pedologie a ochrany půd, která mi umožnila provést praktickou část diplomové práce.

Děkuji Ing. Jiřímu Raisovi, CSc. za pomoc s překlady cizojazyčné odborné literatury do českého jazyka.

Speciace hliníku v environmentálních vzorcích

Souhrn

V této diplomové práci byly na základě literárních dat studovány metody speciace hliníku, konstanty stability jednotlivých forem včetně komplikovaných toxických forem typu Kegginova izomeru $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$. Na základě literatury byla sestavena nová aktualizovaná tabulka kritických hodnot stability s nejběžnějšími ligandy (OH^- , F^- , $\text{H}_3\text{SiO}_4^{2+}$, SO_4^{2-} a některé další).

V oblasti metod speciace byly diskutovány metody skupinové speciace hliníku, jako je vyluhování vzorku specifickými roztoky např. 1M KCl, 0,5 M CuCl_2 , 0,1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NH_4 oxalát, citrát dithionitu.

Podstatná část diplomové práce byla věnována postupům validace analytické metody IC pro stanovení Al^{3+} . Na základě literárních údajů byla identifikována kritéria, která by měla být splněna. Jedná se zejména o přesnost, linearitu, mez detekce a mez stanovitelnosti, selektivitu, asymetrii píku a robustnost metody.

V experimentální části byly výše uvedené parametry měřeny a vyhodnoceny. Ve všech případech, s výjimkou robustnosti, byla požadována kritéria splněna a metodika stanovení Al^{3+} tedy vyhovuje požadavkům správné laboratorní praxe. Pro určení robustnosti je potřeba dlouhodobé pozorování změny podmínek, např. detektoru teploty, složení mobilní fáze, koncentrace derivatizačního činidla, případně posouzení mezilaboratorní shody výsledků. Z časových důvodů (dlouhodobá nefunkčnost chromatografické sestavy) nebylo možno tento parametr spolehlivě testovat a následně vyhodnotit.

V části práce týkající se reálných půdních vzorků jsme očekávali potvrzení shodného nálezu koncentrace Al dvěma analytickými postupy pro vzorky identického původu. Celkový Al (ICP-OES) se očekával vyšší než Al^{3+} (IC), protože k němu se ještě přičítají další reaktivní i nereaktivní komplexy. Nicméně, experimentálně byl nalezen nižší celkový obsah Al stanovený metodou ICP OES než byl obsah výměnný Al^{3+} podle metody IC. Tento paradoxní závěr ukazoval, že buď měřené hodnoty Al^{3+} podle metody IC jsou nesprávně vyšší než Al_{tot} , nebo naopak, že metoda ICP-OES dává nesprávně nižší hodnoty Al_{tot} než jsou ve skutečnosti.

Vysvětlení je možné na základě dvou variant. První varianta naznačuje, že by se s Al^{3+} koeluoval další trojvalentní kation jako např. Mn^{3+} a Fe^{3+} . Druhá varianta je podle literárních údajů možná pravděpodobnější. Podle některých autorů je pro kvantitativní převod vzorku do měřitelné formy pomocí ICP-OES nutné zpracovat vzorek mikrovlnným rozkladem a následně použít pneumatickou nebulizaci.

Na základě těchto zjištění je zřejmě nutné v budoucích pracích správnost jedné z těchto variant potvrdit experimentálně.

Klíčová slova: hliník, konstanty stability, speciace, HPLC, validace

Speciation of aluminium in environmental samples

Summary

On the basis of literature data the methods of speciation of aluminum, stability of complexes, including complicated forms of highly toxic $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$, were studied in a submitted thesis. A new actualized table of critical values of stability constants with common ions (OH^- , F^- , $\text{H}_3\text{SiO}_4^{2+}$, SO_4^{2-} and others) is provided.

In the area of speciation, the methods of group speciation were discussed as are specific solutions as 1M KCl, 0,5 M CuCl_2 , 0,1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NH_4 oxalate, dithionite citrate.

Important part of the thesis was devoted to the procedures of validation of the determination of Al^{3+} by IC method. On the basis of literature data we identified criteria which ought to be adhered to. They are mainly: repeatability, linearity, limit of detection, limit of determination, selectivity, robustness, and asymmetry of the peaks. These all, with the exception of robustness were proved to be valid.

For properly evaluate robustness a long term observation of the changes of the conditions is necessary, e.g. temperature of the detector, composition of the mobile phase and concentration of derivative reagent, or results of intra – laboratory tests. From time reasons (long time non-functionality of chromatographic assembly) it was not possible to reliably test and evaluate this parameter.

At the part of thesis dealing with real soil samples we expected to find a same amounts of Al based on identical samples but by different experimental method. Total Al (ICP-OES) was expected to be higher than Al^{3+} (IC), because to it also reactive and nonreactive complexes are added. However a lower total Al content determined by ICP-OES method was measured than that of Al^{3+} by the IC method.

This paradoxical result had shown that either the measured Al according to IC are either incorrectly higher than Al_{tot} or, on the contrary, that ICP-OES method yields incorrectly lower values than they are in reality.

Possible explanation is based on two variants. According to first one there may proceed co-elution of another trivalent cation as Mn^{3+} and Fe^{3+} . Second variant according to the literature data is more probable. Namely, some authors in order to obtain full content of Al in ICP-OES claimed that it was necessary to treat a sample beforehand by microwave digestion and/or pneumatical nebulization.

On the basis of these facts, it will be necessary in further works to experimentally decide which variant is more correct.

Keywords: aluminum, stability constants, speciation, HPLC, validation

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
4	Metody speciace	6
4.1	Definice speciace, typy speciace s ohledem na speciaci hliníku	6
4.2	Individuální speciace Al	6
4.3	Aktualizovaná databáze konstant stability, metody výpočtu	10
4.4	Polymerní částice a Al₁₃ kation	11
4.5	Skupinová speciace	14
4.5.1	Loužící (extrakční) roztoky	14
4.5.2	Chromogenní a fluorimetrická činidla	21
4.5.3	Iontově selektivní elektrody	22
4.5.4	Elektrochemické metody	22
4.5.5	NMR techniky	22
4.5.6	HPLC	23
4.5.7	Příklady kombinace metod	24
4.6	Validace metody	27
4.6.1	Opakovatelnost (přesnost)	28
4.6.2	Střední (mezilehlá) přesnost	29
4.6.3	Mez detekce / Mez stanovitelnosti	29
4.6.4	Správnost (versus odchylka, chyba)	30
4.6.5	Linearita	31
4.6.6	Reprodukovatelnost	33
4.6.7	Selektivita/Separace/Rozlišení	34
4.6.8	Robustnost	36
5	Výsledky	37
5.1	Experimentální část	37
5.1.1	Chemikálie a roztoky	37
5.1.2	Použitá zařízení a postupy	37
5.2	Opakovatelnost (přesnost)	38
5.3	Linearita	40
5.4	Mez detekce DL / Mez stanovitelnosti QL	42
5.5	Selektivita/Separace/Rozlišení	43
5.6	Asymetrie píku	44
5.7	Reálné vzorky	45
6	Diskuze	50

7 Závěr	54
8 Literatura.....	55
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	62
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Kontaminace půd kovovými elementy je kritická pro posouzení kvality půd a jejich toxicity. Vyhodnocení toxicity hliníku je poměrně specifické. Zatímco většina těžkých kovů v půdách je bezprostředně toxická, pro hliník je toxicita v první řadě určena kyselostí půdy. Při neutrálních a alkalických se hliník nachází ve formě neškodných neutrálních komplexů typu $\text{Al}(\text{OH})_3$ a odvozených polymerních variant.

Toxicita Al pro rostliny kvalitativně klesá v pořadí $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ (Al_{13} , Kegginův kation) $> \text{Al}^{3+} > \text{Al}(\text{OH})^{2+} > \text{Al}(\text{OH})_2^+ > \text{Al}(\text{OH})_4^- > \text{AlSO}_4^+$ (podmíněně). Al vázané ve fluorech, organických komplexech, fosfátech, křemičitovaných polymerech a $\text{Al}(\text{OH})_3$ je považováno za netoxické.

Nebezpečnost hliníku v půdě je tedy v první řadě spojena se zvýšenou kyselostí půdy. Ty existují v současné době v rozsáhlých oblastech střední Afriky a jižní Ameriky, ale i ve východních oblastech USA a v severní a střední Evropě, De la Fuente-Martínez a Herrera-Estrella (1999). Acidifikace půdy v evropských zemích je převážně způsobena kyselými dešti z průmyslové výroby, jedná se tedy téměř vždy o antropogenní původ.

Vzhledem k různosti výskytu jednotlivých forem Al v přírodním prostředí je důležité kvantitativně znát pro dané podmínky jejich koncentrace (speciace). Jako základ pro vyhodnocení speciace jsou příslušné konstanty stability jednotlivých komplexů, problematika studovaná v této práci.

Pro vyslovení podložených závěrů je potřeba mít spolehlivé analytické metody. Proto v další části práce bude proveden ideový nástin validace metody pro stanovení Al^{3+} . Pro nejjednodušší případ stanovení Al^{3+} metodou HPLC byla splněna kritéria správnosti zvoleného postupu.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo vypracovat rešerši zaměřenou na speciaci hliníku v environmentálních vzorcích a studium toxických vlastností hliníku. Rovněž sledování závislosti pH a rozpustnosti Al v kyselých půdách a jeho uvolňování do životního prostředí bylo prioritním zájmem této práce.

Literární rešerše se opírá o novější, ale i neméně důležité historické poznatky výskytu jednotlivých forem Al v půdním prostředí v návaznosti na jeho toxické specie.

Dále bylo cílem sestavení tabulky konstant stability Al s různými ligandy.

V experimentální části bylo cílem vypracování kritérií validace analytického postupu týkající se konkrétní metodiky. Experimentální validace metody pro jednoduchý případ existence Al^{3+} .

3 Literární rešerše

Hliník je velmi rozšířený kovový prvek v zemské kůře a životním prostředí. Podle Bi et al. (2001) je jeho zastoupení v zemské kůře zhruba 8 váhových procent, což je třetí nejrozšířenější prvek po kyslíku a křemíku a je vůbec nejrozšířenější kov (Martin 1988). Nejrozšířenější rudou obsahující Al je bauxit, což je směs aluminosilikátů. Ve směsných oxidech se vyskytuje Al ve slídách a živci. Mezi minerály patří také polodrahokamy jako korund, granát (se stopami Cr) a safír (stopy Co) a další (Martin (1988)). Kryolit (Na_3AlF_6) byl dříve nalezen ve významných množstvích pouze v Grónsku, tento zdroj je vyčerpán a je připravován synteticky (Martin 1988). Podle Šrámka et al. (2011) se hliník v anorganické formě vyskytuje ve 250 minerálech, např. v oxidech (korund Al_2O_3) nebo hydroxidech (gibbsit – $\text{Al}(\text{OH})_3$). Jinými zdroji Al jsou například diaspor – AlOOH . Asi 40 % celkového množství minerálů obsahujících Al tvoří aluminosilikáty – např. živce, slídy či jílové minerály (Šrámek et al. 2011).

Kovový hliník se do poloviny 19. století řadil mezi velmi vzácné a drahé kovy. Například Napoleon III jedl při recepci hliníkovou vidličkou, zatímco ostatní se museli spokojit se zlatým a stříbrným servisem (Martin 1988).

Teprve elektrochemická metoda přípravy nalezená nezávisle v roce 1886 Hallem (USA) a Heroultem (Francie) a založená na použití roztaveného kryolitu jako rozpouštědla pro bauxit znamenala rozhodující krok pro masovou výrobu Al (Martin 1988).

Ačkoliv je hliník tak rozšířený, vyskytuje se převážnou měrou ve formě nerozpustných oxidů a aluminosilikátů a ve vodách je ho jen velmi málo, např. $< 1 \mu\text{g/l}$ v mořské vodě. Činností člověka dochází ke vzniku kyselých dešťů a tím k hromadění Al v povrchových vodách (Martin 1988; Bi et. al. 2001; Ščančar a Milačič 2006).

Zvýšené koncentrace Al vedou k ústupu lesů, snížení zemědělské produkce, úhynu vodních živočichů a ryb. Zvýšené hladiny v přírodních vodních zdrojích také ovlivňují kvalitu vody pufrováním pH a tím se ovlivňují cykly jiných kritických prvků jako fosforu, rozpuštěného organického uhlíku atp.

Vlivu Al na vodní faunu a flóru je věnován např. obsažný článek (Gensemer a Playle 1999). Autoři studovali účinky hliníku na sladkovodní řasy, vyšší vodní rostliny, vodní bezobratlé a ryby. Hliník je nejvíce toxický pro řasy v mírně kyselých prostředích okolo pH 6. Vodní bezobratlí nejsou ve srovnání s rybami příliš citliví. Hliník je jedem pro žábry dospělých ryb, a to negativním ionoregulačním efektem a také působením na procesy dýchání. Různé formy Al jsou navíc různě toxické, například $\text{Al}(\text{OH})_3$ je silně toxický pro ryby, ale netoxický pro rostliny (Gensemer a Playle 1999).

K záchytu Al lidskými organizmy vedou různé cesty (jídlo, kohoutková voda, voda v Al nádobí, dialyzáty), které mohou vést k vážným neurologickým nemocem jako Alzheimerova nemoc, Parkinsonismus, dialyzační encefalopatie, osteomalacie a anemie (Bi et. al. 2001). Ačkoliv zdravotní následky přítomnosti Al u lidí nejsou předmětem této práce, je nutno některé novější práce zmínit.

Gupta et al. (2005) v přehledném článku shrnuli dosavadní znalosti o vlivu Al na Alzheimerovu nemoc (AD), závěrem shrnují, že na základě rozsáhlé literatury nemůže být vliv hliníku na AD vyloučen, ale zda je hliník jediným faktorem při vzniku AD a zda je faktorem ve všech případech AD nemůže být zatím rozhodnuto.

O šest let později Tomljenovic (2011) píše: „The hypothesis that Al significantly contributes to AD is built upon very solid experimental evidence and should not be dismissed. Immediate steps should be taken to lessen human exposure to Al, which may be the single most aggravating and avoidable factor related to AD“ (Hypotéza, že Al podstatně přispívá k AD, je vybudována na velmi solidních experimentech a neměla by být opominuta. Měly by být podniknuty okamžité kroky ke zmenšení lidské expozice Al, který může být zhoršující, ale ne nevyhnutelný faktor ve vztahu k AD). Sordet-Guépet a Manckoundia (2014) prostudovali více než 600 abstraktů a přečetli 352 článků týkajících se problematiky AD. Autoři jednoznačně přiřazují hliník do skupiny neurotoxických látek, tento názor je však diskutabilní, viz Bondy (2010). Sordet-Guépet a Manckoundia (2014) vystihli současnou situaci následovně: „Protože reálné účinky těchto látek (tj. včetně Al) jsou zatím nejasné, vzhledem k nedostatku opačného důkazu jsou tyto látky považovány za neškodné. To vyvolává pochyby vzhledem k explozi AD a NDD (neurodegenerative diseases). Všichni ale souhlasí, že tyto nemoci jsou heterogenní a multifaktoriální.“

Toxicita Al pro rostliny kvalitativně klesá v pořadí $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ (Al₁₃, Kegginův kation) > Al³⁺ > Al(OH)₂+ > Al(OH)₂+ > Al(OH)₄⁻ > AlSO₄+ (podmíněně).

Al vázané ve fluoridech, organických komplexech, fosfátech, křemičitovaných polymerech a Al(OH)₃ je považováno za netoxické (Boudot et al. 1993; Drábek et al. 2003; Street et al. 2007).

$\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ je považován za ještě zhruba 10x toxicitější formu než Al³⁺ (Parker a Bertsch 1992; Street et al. 2007).

Velmi podrobné články (269 stran textu a 145 stran textu) o toxicitě vyšly v nedávné době (Krewski et al. 2007; Willhite et al. 2014). Obsah těchto článků je mimo dosah naší práce, proto budou citovány jen dva důležité poznatky z abstraktu novější práce.

Willhite et al. (2014) popisují mechanismus toxicity Al následujícím způsobem: „Rozpustný trojmocný Al reaguje s vodou se vznikem bidentátních superoxidových koordinačních sfér $[\text{Al}(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O}_4)^{2+}$ a $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$], které po komplexování s O₂, vytváří Al superoxydy. Semiredukované radikály konsumují mitochondriální Fe a podporují vznik H₂O₂, O₂ and OH radikálů. Tudíž Al³⁺ - indukovaný vznik kyslíkových radikálů vysvětluje oxidační poškození, které vede k apoptóze. Naopak toxicita nerozpustných oxidů Al závisí primárně na chování zúčastněných částic.“

Autoři se staví kriticky k výrokům o toxicitě Al pro lidské zdraví. V překladu píší: „Hliník býval spojován s lidskou morbiditou a mortalitou, ale neexistuje žádný konsistentní a přesvědčivý důkaz pro spojení Al nalezeného v potravě a pitné vodě v dávkách používaných v Severní Americe a západní Evropě se zvětšeným rizikem vzniku Alzheimerovy nemoci (AD). Rovněž neexistuje důkaz škodlivosti antiperspirantů a kosmetiky s obsahem Al pro vznik AD nebo rakoviny prsu. Expozice Al při neonatální a pediatrické parenterální výživě může zhoršovat mineralizaci kostí a zpozdit neurologický vývoj. Byly pozorovány nežádoucí efekty některých vakcín s Al adjuvanty, ale ty nebyly častější (a v některých případech méně časté) než při identické vakcinaci bez Al adjuvantů.“

S posledním tvrzením nesouhlasí řada autorů, např. (Tomljenovic 2011; Shaw a Tomljenovic 2013; Exley 2016; Exley 2017; Klotz et al. 2017).

Pro souvislost mezi vstřebaným Al a neurodegenerativními poruchami svědčí nedávný článek Yokela (2012), v závěru kterého uvádí: „Jsou důkazy pro transportem mediovaný influx a efflux Al přes BBB (Blood-brain barrier) což je primární sídlo influxu Al do mozku... Zdá se, že Al přetrvává v mozku po dlouhou dobu (odhadem od 20 % až k celkové délce života) a během života se akumuluje, čímž tvoří potenciál pro vznik neurodegenerativních poruch.“

Ačkoliv autoři (Willhite et al. 2014) údajně nenašli přesvědčivý důkaz o spojitosti Al a AD, taková vazba podle jiných autorů včetně Yokela (2012) existuje. Je nepochopitelné, že Yokel je spoluautorem společné publikace s Willhitem et al. (2014), kde naopak obhajuje názor o nízké škodlivosti Al. Dokud tyto rozpory nebudou jednoznačně vyřešeny, jediný přístup zřejmě spočívá v omezení přísunu Al živým organismům všude tam, kde je to možné.

4 Metody speciace

4.1 Definice speciace, typy speciace s ohledem na speciaci hliníku

Speciace je definována podle IUPAC Gold book jako „Speciace v chemii = Distribuce elementu mezi definovanými chemickými speciemi v systému“ a „Speciační analýza v chemii = Analytické aktivity identifikace a/nebo měření množství jedné nebo více specií ve vzorku“ (IUPAC 2003).

Striktně vzato termín speciace by měl být aplikován na přesně stanovenou formu částice. Podle Quevauvillera (1998) by neměl být termín speciace užíván pro ne zcela jednoznačně definovanou skupinu, jak to ilustruje na následujícím příkladu. Množina „extrahovatelné stopové prvky“ podle něj nemá být označena termínem speciace, protože se jedná o operačně určené skupiny stopových prvků bez jasné identifikace. Takto definovaná skupina podle něj sice představuje užitečný přístup, ale porovnatelnost výsledků je možná jen pokud jsou známy a dodržovány standardizované protokoly.

V případě hliníku jsou ale takovéto víceméně volně definované skupiny jako např. „volně vázané formy“ a „vyměnitelné formy“ velmi často používány.

V této diplomové práci bude pro tyto případy vyhrazen termín „skupinová speciace“ zatímco pro jednotlivé jednoznačně definované částice se jedná o „individuální speciaci“.

Jednoznačnou charakteristikou komplexu je jeho kumulativní konstanta stability β_n vyjádřená pro nejjednodušší případ jednomocného ligandu a pro celkově nízké koncentrace elektrolytu, takže aktivity mohou být nahrazeny koncentracemi, jako:

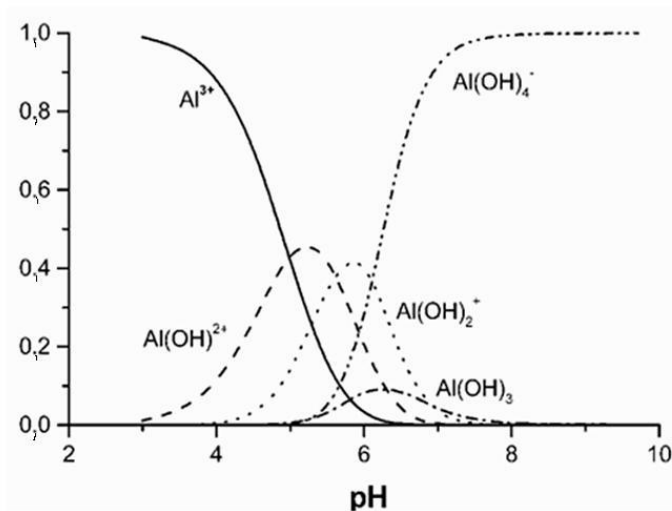


kde $[\text{AlL}_n]$, $[\text{Al}^{3+}]$ a $[\text{L}]$ označují rovnovážné koncentrace odpovídajících částic v systému.

4.2 Individuální speciace Al

Pro modelování chování forem hliníku ve vzorcích se většinou používají zjednodušené postupy s omezeným počtem částic, pro které jsou známy termodynamické parametry tvorby komplexů.

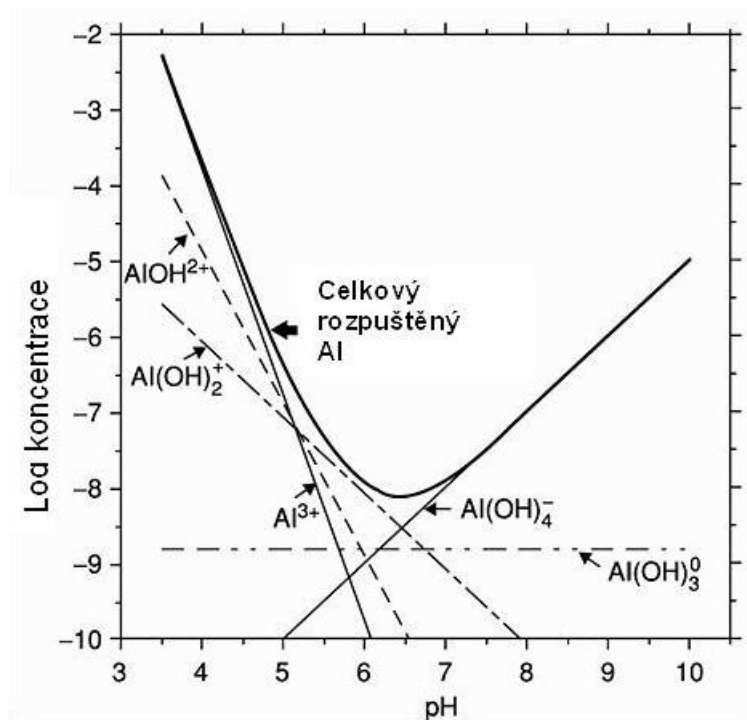
Nejjednodušší případ přítomnosti pouze Al ve vodných roztocích je např. popsán v práci (Gregory a Duana 2001), viz Obr. 1.



Obr. 1 Distribuce monomerního Al jako funkce pH (Z. Gregory & Duana 2001).

V jiných souřadnicích může být vynesena celková rozpustnost Al v závislosti na pH a definovaných konstantách stability tak, jak je znázorněno na Obr. 2 podle Parkera (2005).

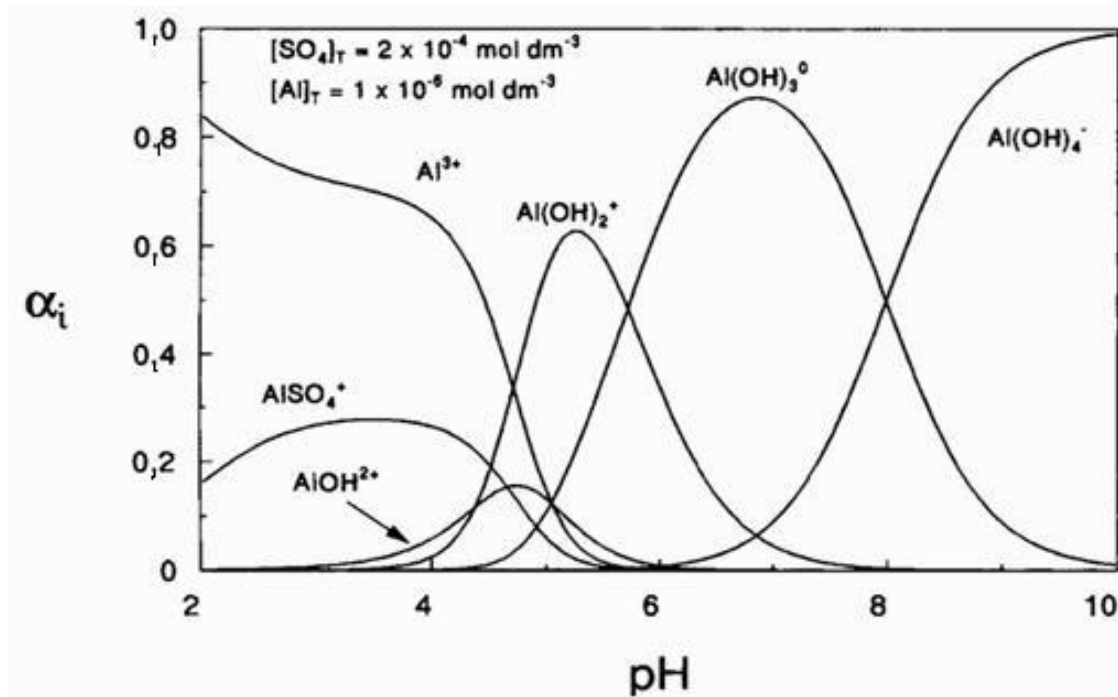
Minimum na křivce celkové rozpustnosti Al na pH odpovídá podle autorů rovnováze gibbsitu podle reakce $\text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} = \text{Al(OH)}_{3(s)} + 3\text{H}^+$, $\log\beta = -8.0$.



Obr. 2 Závislost celkové rozpustnosti hliníku na pH podle Parkera (2005).

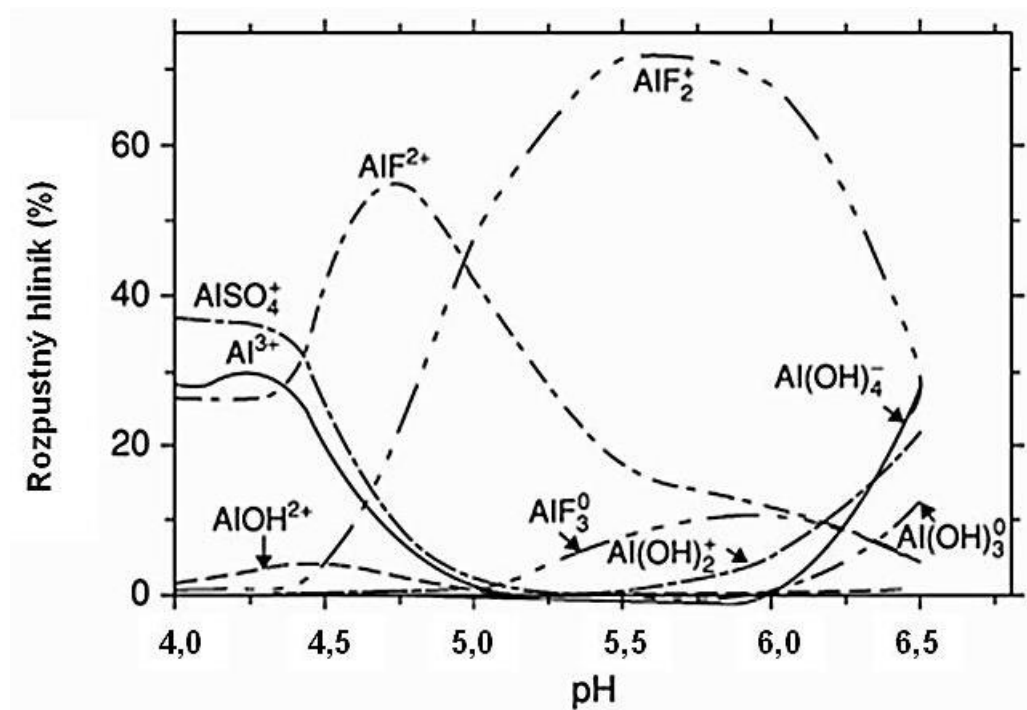
Alternativní hodnota rozpustnosti byla použita např. Blancem et al. (2006). Rozpustnost $\text{Al(OH)}_{3(s)}$ je podle nich určena minerálem boehmitem (při $101,5^\circ\text{C}$) a je zhruba o řád vyšší než u gibbsitu. Také pH minimální rozpustnosti je podle Parkera (2005) při $\text{pH} \sim 6,5$ a podle Blanca et al. (2006) při $\text{pH} \sim 4,8$, viz Obr. 1 a Obr. 2.

V literatuře jsou pak uváděny grafy podílu forem Al na pH i za přítomnosti dalších komplexujících ligandů. Pro systém za přítomnosti SO_4^{2-} uvádí Ure a Davidson (2002) následující rozložení, Obr. 3.



Obr. 3 Rozdělení forem Al za přítomnosti SO_4^{2-} podle Ure a Davidsona (2002), konstanty v tabulce viz Příloha č. 1.

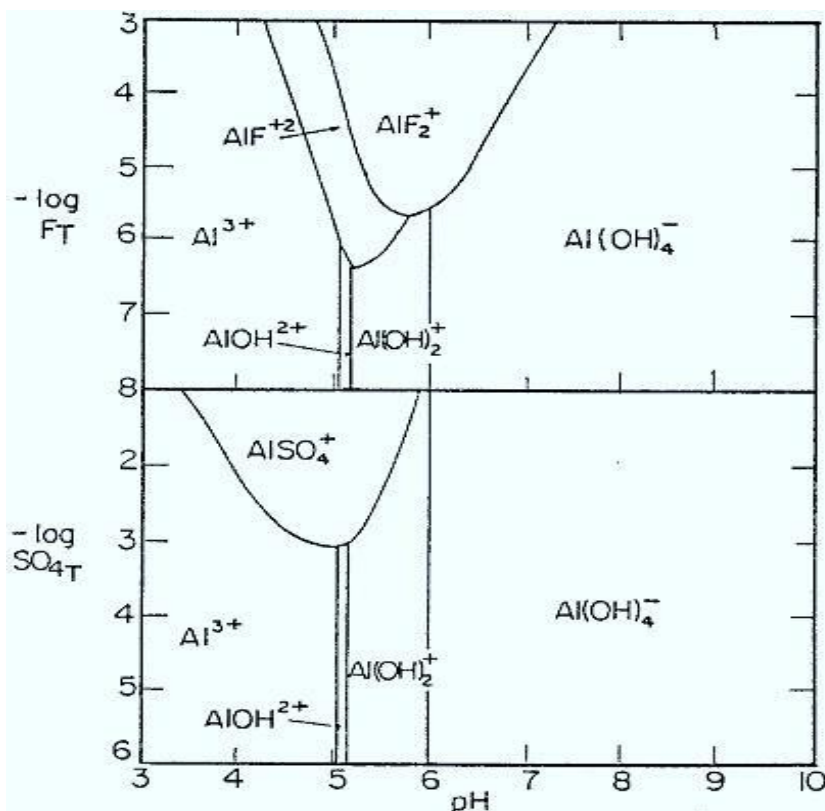
Pro systém s přítomností Al za přítomnosti SO_4^{2-} a F^- podle Parkera (2005) je potom průběh uveden na Obr. 4.



Obr. 4 Rozdělení četnosti výskytu jednotlivých forem Al za přítomnosti SO_4^{2-} a F^- podle Parkera (2005).

Iontové medium $1 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CaSO}_4$, s přidavkem $15 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ celkového F v roztoku. Speciace byla vypočtena podle konstant (Parker 2005) v tabulce Příloha č. 1 a jím předpokládáné rozpustnosti gibbsitu, Obr. 2.

Z Obr. 4 je zřejmé, že anionty F^- podstatněji ovlivňují rovnováhy Al než síranové anionty. To je názorně ukázáno na Obr. 5 podle Driscolla a Schechera (1990).



Obr. 5 Převzatý obrázek 7 z Driscolla a Schechera (1990).

Z Obr. 5 je zřejmé, že podobně jako F^- také SO_4^{2-} tvoří v kyselém prostředí komplexy s Al a je vytěšňován OH^- komplexy v zásaditém prostředí. Při nízkých koncentracích SO_4^{2-} je dominantním z Al- SO_4 komplexů $AlSO_4^+$ a přechází na $Al(SO_4)^{2-}$ při vyšších koncentracích SO_4^{2-} . Sulfátové komplexy Al nejsou tak silné jako s F^- komplexy. Ačkoliv ve sladkovodních vodách jsou koncentrace SO_4^{2-} jsou typicky vyšší než F^- , Al- SO_4 komplexy jsou podstatné pouze při vysokých SO_4^{2-} koncentracích a nízkých hodnotách pH, (Driscoll a Schecher 1990).

4.3 Aktualizovaná databáze konstant stability, metody výpočtu

Poslední podrobný kritický přehled speciálních konstant byl publikován Nordstromem a Mayem v roce 1999. V této práci jsme proto považovali za nutné údaje aktualizovat.

V tabulce Příloha č. 1 jsou uvedeny vybrané sady dat od roku 1986 do dnešní doby.

Pro finální doporučené hodnoty konstant v posledním sloupci tabulky Příloha č. 1 byly hodnoty Nordstroma a Maye (1999) vzaty s dvojitou vahou (započteny do průměru a standardní odchylky dvakrát), protože jsou založeny na zprůměrování již známých a dříve publikovaných údajů. Tito autoři jako jediní uvádí i statistickou chybu doporučených hodnot (nebyla námi použita v hodnotách posledního sloupce tabulky Příloha č. 1).

Další podstatnou databází je set publikovaný Blancem et al. (2006) viz čtvrtý předposlední sloupec v tabulce Příloha č. 1. Jejich hodnoty byly vybrány jako nejspolehlivější z různých údajů nalezených v literatuře, zejména z prací Pokrovského a Helgesona (1995, 1997), Tagirova a Schotta (2001) a vlastní francouzské databáze (Blanc et al. 2006).

Blanc et al. (2006) uvádí v jejich tabulce hodnoty doporučené a navržené. Jejich doporučené hodnoty jsou v tabulce Příloha č. 1 této práce vyznačeny tučně a vzaty s dvojitou vahou stejně jako u údajů Nordstroma a Maye (1999).

Akualizovaná data v tabulce Příloha č. 1 se diametrálně neliší od setu Nordstroma a Maye (1999) a rovněž standardní odchylky od průměru jsou analogické. Pro zachování konsistence doporučujeme používat novější set z naší práce. Naproti tomu hodnoty $\log \beta$ pro OH^- a F^- komplexy udávané Milačičem (2005), založené převážně na starší kompilaci Martella a Smithse (1977), jsou zcela nekompatibilní s hodnotami uvedenými v tabulce Příloha č. 1, a proto nebyly uvažovány. Větší rozdíly vidíme pouze pro oxaláty a citráty, které mohou být přítomny jako důsledek vlivu Al na kořeny rostlin a které mohou být přítomné jako kořenové exsudáty (Hubová et al. 2017).

Samostatnou kapitolu představují komplexy Al s všudypřítomnými huminovými látkami. Někteří autoři označují tyto organické kyseliny termínem „fulvic acids, FA“ (Parker 2004), ale vhodnější je název „humic substances, HS“ skládající se z „fulvic acid, FA“ a „humic acid, HA“ (Lambert et al. 1995). Jejich konstanty stability s Al leží podle Parkera (2004) v širokém rozmezí hodnot $\log \beta = 3-6$, takže mohou být silnými chelátory jako fluorid nebo slabými jako síran. Vzhledem k tomu, že tyto látky mohou být x-vazné s blíže neurčeným x, je možno vyčíslit pouze podmíněné (conditional) konstanty stability. Ty se pohybují podle Lamberta et al. (1995) v rozmezí $\log \beta = 2-4,3$.

Konstanty stability hliníku s ligandy jsou hojně využívány ve speciálních programech určených pro výpočet rovnovážných koncentrací částic v multikomponentních směsích.

Některé programy, jako např. MINEQL, GEOCHEM, WHAM, and ALCHEMI byly uvedeny v přehledném článku (Bi et al. 2001). Bi a Yin (1995) sami navrhli jejich jednoduchý počítačový program ALSCM, Ščančar a Milačič (2006) uvádí ve formě zkratk další programy SOLMINEQ88, SIMPLISIMA, KIRMAT, MINTEQA2, FORTRAN77, HARPHRQ, Model V a Model VI, NICA-Donnan, EQ3NR a HKF a v dalších letech Matuš a Kubová (2008) uvádí programy pod zkratkami HALTAFALL, SOLGASWATER, MINTEQ, MINEQL+, SOILE.

Populární jsou dva volně dostupné programy a to PHREEQC (Thyne 2007) a Visual MINTEQ, verze 3.1 (Gustafsson 2018).

Z nedostatků běžných programů pro speciaci hliníku je možno uvést nepřesnosti ve složení a konstant stability komplexů s organickými látkami (Bi et al. 2001), s možnou výjimkou programu WHAM (Windermere Humic Aqueous Model). Dále pak zanedbání polymerních částic uvedených např. v práci (Wang et al. 2002). Al_{13} kation, viz následující podkapitola 4.4, je zohledněn v programu SolEq podle Powella a Pettita (1997), Obr. 6.

4.4 Polymerní částice a Al_{13} kation

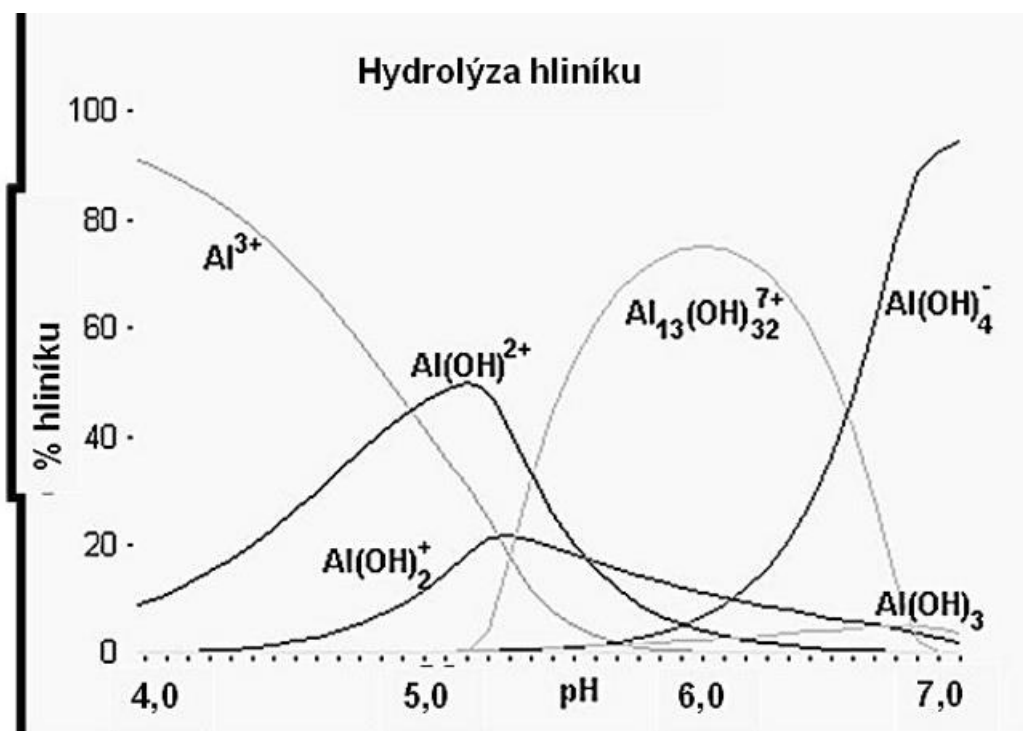
Ve skutečnosti je chování Al při hydrolyze komplikovanější než za předpokladu tvorby pouze monomerních produktů. Dochází k tvorbě polymerních částic, jejichž složení se navíc

časově mění. Ze starších prací je možno uvést detekci následujících částic: $[\text{Al}_2(\text{OH})_2]^{4+}$, $[\text{Al}_3(\text{OH})_4]^{5+}$, $[\text{Al}_4(\text{OH})_{10}]^{2+}$, $[\text{Al}_6(\text{OH})_{15}]^{3+}$, $[\text{Al}_8(\text{OH})_{20}]^{4+}$, $[\text{Al}_9(\text{OH})_n]^{(27-n)+}$, $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}]^{7+}$, $[\text{Al}_{13}(\text{OH})_{32}]^{7+}$, $[\text{Al}_{14}(\text{OH})_{34}]^{8+}$, $[\text{Al}_{15}(\text{OH})_{36}]^{9+}$ a $[\text{Al}_{15}(\text{OH})_{37}]^{8+}$ (Bertsch 1990).

Hydrolyzačně - polymerační proces pak probíhá podle dvou schémat: (i) podle „gibbsitového fragmentačního schématu“ je základní jednotkou $[\text{Al}_6(\text{OH})_{12}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{6+}$ s kontinuálním dvourozměrným růstem hexametrického řetězce zatímco alternativně je (ii) základem $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24+n}(\text{H}_2\text{O})_{12-n}]^{(7-n)+}$, Kegginův kation, ve směsi s dimerem $[\text{Al}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_8]^{4+}$ a trimerem $[\text{Al}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_{10}]^{5+}$. Jednoznačná formulace hydrolytických produktů byla možná pomocí ^{27}Al NMR (Bertsch 1990). Nedávno byly detailně studovány hydrolytické komplexy v pracích Sarpoly (2004), Zhaa (2009) a Saukkoriipiho (2010). Složení hydrooxidů Al včetně struktury 7 Al a 30 Al je uvedeno v přehledné práci (Caseye et al. 2001).

Nalezené částice metodou electrospray ionization mass spectrometry ESI MS jsou odlišné podle Sarpoly (2004) a Zhao (2009). Zatímco Zhao (2009) deklaruje nevyšší částici s obsahem 20 Al, Sarpola (2004) uvádí data až po částici s 30 Al a Wang et al. (2002) zmiňuje i částici Al_{54} . Wang et al. (2002) udávají pro některé komplexy i příslušné konstanty stability, jejich počet a plný důkaz jejich existence jsou však silně limitovány. Podle autorů nejpřesvědčivější experimentální podpora, ačkoliv obyčejně nepřímá, existuje pro částice $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Al}_6(\text{OH})_{12}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{6+}$, $\text{Al}_8(\text{OH})_{20}(\text{H}_2\text{O})_x^{4+}$, $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$, $\text{Al}_{54}(\text{OH})_{144}(\text{H}_2\text{O})_{36}^{18+}$, ale všechny nemohou existovat současně, dominantní částice se mění podle podmínek.

Wang et al. (2002) publikovali přehlednou tabulku obsahující dostupná data pro polymerní částice. Pro její důležitost je tabulka uvedena (viz Příloha č. 2). Pro doplnění jsou navíc uvedeny hodnoty konstant podle Sarpola (2007) v tabulce Příloha č. 3.



Obr. 6 Rozdělení podle Powella a Pettita (1997).

V literatuře bylo nalezeno pouze jediné schéma závislosti četnosti forem Al na pH se vzetím v úvahu Kegginův kation Al_{13} a to dle Powella a Pettita (1997), viz Obr. 6. Data jsou z databáze použité v programu SolEq, konstanty hydrolyzy stejné jako u Gregory a Duana (2001), navíc je uvažována Kegginova částice $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ se stejnou konstantou stability $\log \beta = 98.7$ jako je hodnota podle Marina et al. (2010) uvedená v hlavním textu v tabulce Příloha č. 1.

Existence $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ v roztoku je diskutabilní. Jejich existence v roztoku ve formě 7+ kationtu metodou ESI-MS podle Sarpoly (2007) nebyla prokázána. Autor detekoval Al_{13} částici s 6+ nábojem, ale tento náboj byl vždy kompenzován protiiontem. Naproti tomu byly detekovány 3+ a 2+ nabité Al_{13} ionty. Al_{13}^{3+} série ve vodném roztoku po 14 dnech zmizela, ale znovu se objevila při dalších měřeních.

Metodou ^{27}Ar NMR byla existence $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ v roztoku prokázána píkem +62,5 ppm (Parker a Bertsch 1992; Casey et al. 2001).

Vzhledem k velmi vysokému náboji částice $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ je nutno očekávat, že systém využije všechny možnosti k jeho snížení. To je prokázáno i pro kontakt s klasickým katexem. Bertsch a Anderson (1989) uvádí, že sice pozorovali v ^{27}Al NMR spektru částice $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ a $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$, ale tyto nebyly detekovány při iontové chromatografii což podle autorů indikovalo, že polynukleární částice silně reagovaly s ionexem a nebyly po standardní dobu eluce zachyceny. Prodloužení doby eluce na 20 minut také nezachytilo žádný pik. Pozorovaný vzrůst absorbance pozadí při následujících analýzách by však mohl nasvědčovat přítomnosti a určité degradaci polynukleárních částic. Promytí silnou kyselinou pravděpodobně vedlo k jejich rozkladu.

Mění se názory na existenci $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ v roztoku jsou zřejmé ze dvou formulací jednoho konkrétního autora. Parker a Bertsch (1992) ukazují na možnost identifikace a stanovení Al_{13} pomocí ferronu („Identification and Quantification of the “ Al_{13} ” Tridecameric Polycation Using Ferron“). Ale Parker o 13 let později v Parker (2005) uvádí: „V současné době je jen nízká pravděpodobnost, že Al_{13} existuje mimo laboratoře a jeho existence v půdních roztocích je zvláště nejistá („At present, however, there is little evidence that this polynuclear Al complex exists outside the laboratory, and its existence in soil solution is especially uncertain“).

Al_{13} se neuplatňuje v chromatografickém separačním procesu. Podle Drábka et. al (2003) se Al_{13} za těchto podmínek přeměňuje na hexaquo částici Al^{3+} a není tudíž detekovatelný.

Dříve byla srovnatelná váha jako $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ částici připisována částici $\text{Al}_8(\text{OH})_{20}^{4+}$, např. (Hayden a Rubin 1974), tento polymerní kation není v současnosti uváděn.

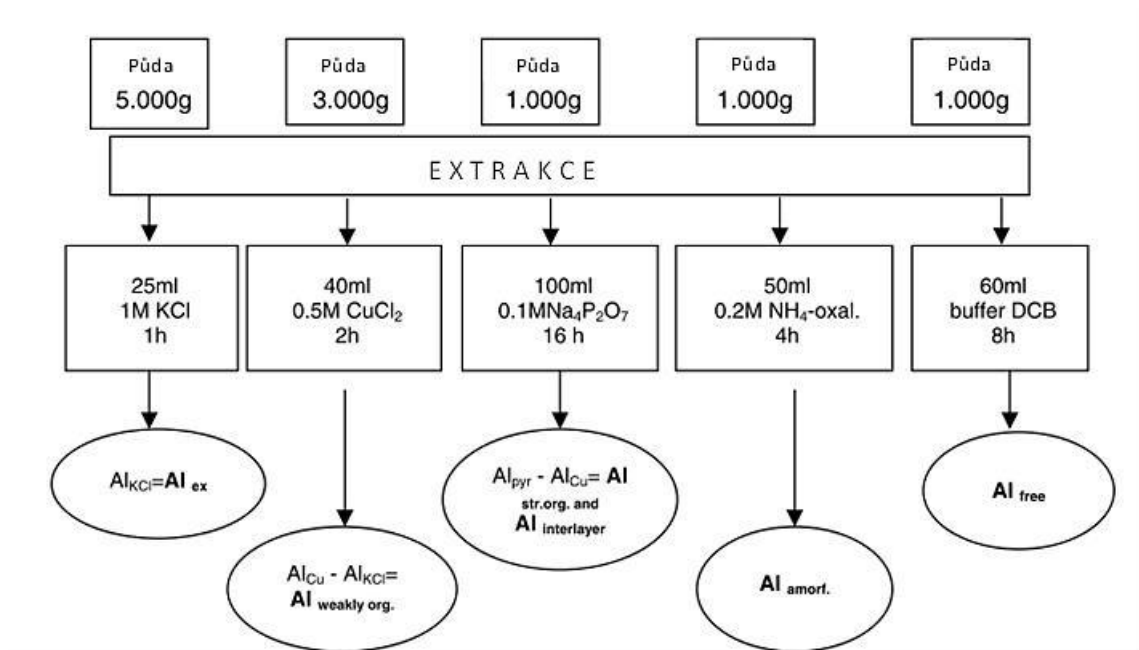
4.5 Skupinová speciace

4.5.1 Loužící (extrakční) roztoky

Jak již bylo uvedeno v podkapitole 4.1, nejčastější způsob klasifikace forem Al není založen na exaktní analýze všech zahrnutých částic, ale na víceméně volné (operační) definici jednotlivých frakcí. Někteří autoři používají pro „skupinovou speciaci“ také termín „frakcionace“ nebo víceméně zaměnitelné termíny „speciace a frakcionace“ (Matuš a Kubová 2008).

Skupinová speciace pro různé Al frakce byla popsána v desítkách článků, viz podrobný přehled v Clarke et al. (1996). Autor v přehledné tabulce uvádí operační název frakce, postup stanovení, co se měří a validaci metody pro 26 navržených postupů. Z těchto 26 položek 14 nebylo validováno. Rozbor jednotlivých metodik zde není možno provést.

Příkladem diferenciaci při loužení jednoduchými roztoky elektrolytů je schéma podle Walny et al. (2005), Obr. 7.



Obr. 7 Definice paralelních frakcí podle Walny et al. (2005), jejich obrázek 1, Buffer DCB je dithionit-citrátový pufr.

Zde Al_{ex} (Al_{ex} = Al_{KCl}) označuje vyměnitelnou frakci Al (exchangeable), Al_{weakly org} je snadno vyměnitelná organicky vázaná frakce (Al_{weakly organic} = Al_{Cu} - Al_{KCl}), Al_{str.org} and Al_{interlayer} je frakce pevně organicky vázaného a mezivrstvého Al (Al_{str.org} and Al_{interlayer} = Al_{pyr} - Al_{Cu}), dále existují Al amorfní (Al_{amorf}) a Al volný (Al_{free}). Loužící media a poměry fází jsou zřejmé z obrázku.

Takto definované skupiny celkem dobře souhlasí s předchozí prací Larssena et al. (1999), které jsou pro přehlednost uvedeny současně s originálními citacemi v Tabulka 2. Stojí za povšimnutí, že zatímco Walna et al. (2005) použili pro stanovení Al_{ex} loužení 1M KCl, Larssen et al. (1999) použili roztok 0,1M BaCl₂. Podobně Drábek et al. (2003) použili pro určení Al_{ex} frakce 1M KCl.

Tabulka 1 Operačně přiřazené skupiny forem Al při loužení roztoky. Drábek et al. (2003) navrhuje více konzervativní označení této skupiny jako „pyrofosfátem extrahovatelný Al“

Zkratka	Operačně definovaná skupina	Extrakční roztok	Citace
Al _{ex}	vyměnitelný	0,1M BaCl ₂ , 2hod.	(Hendershot a Duquette 1986)
Al _{Cu}	slabě organicky vázaný	0,5M CuCl ₂ , 2 hod.	(Jou a Kamprath 1979)
Al _p	organicky vázaný ^a	0,1M Na ₄ P ₂ O ₇ při pH 10, 16 hod.	(McKeague 1967)
Al _{oxal}	amorfni a organický	NH ₄ oxalát při pH 3, 4 hod. ve tmě	(McKeague a Day 1966)
Al _{thio}	reaktivní, amorfni, okludovaný v kysličnicích železa a v organice	citrát dithionitu, 16 hod.	(Holmgren 1967)
Al _{NaOH}	vyměnitelný, amorfni, organický a oxidy	var s 0,1M NaOH, 2,5 min.	(Hashimoto a, Jackson 1960)

Obdobně jako ve dvou předchozích pracích byla speciace provedena v práci Porebské a Muldera (1996).

Výběr vhodného extrakčního činidla při určení frakcí byl diskutován Drábkem et al. (2003). Pro skupinu Al_{ex} ze zkoumaných loužicích roztoků (0,1, 0,5, 1, a 2M KCl) navrhli jako ideální koncentraci 0,5 nebo 1M. Pro frakci Al_{Cu} doporučili z množiny 0,1, 0,3, 0,5 a 1M CuCl₂ použít 0,3 nebo 0,5M roztok. Pro skupinu Al_p pak navrhli použít 0,05 M Na₄P₂O₇ z volby 0,05 a 0,1 M Na₄P₂O₇.

Odlišné schéma frakcionace bylo navrženo Matúšem et al. (2005).

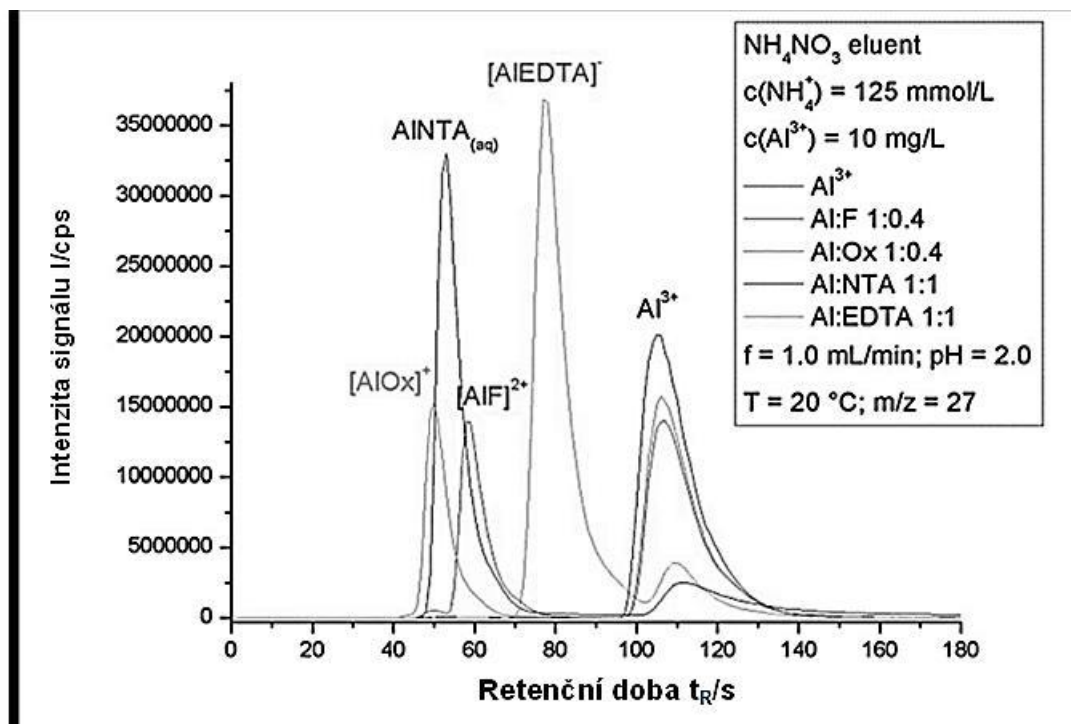
Tabulka 2 Schéma frakcionace podle Matúše et al. (2005).

Operačně definovaná skupina	Extrakční roztok	Poznámka
1. Al extrahovatelný kyselinou	0,11 M CH ₃ COOH po dobu 16 hodin, 1g/40 ml	Referováno v Rauret et al. (1999) jako vylepšená BCR sekvenční extrakce ve třech krocích
2. Redukovatelná frakce	0,5 M hydroxylamin hydrochlorid v 0,05 M HNO ₃ (pH~1,5) po dobu 16 hodin, 1g/40 ml	
3. Oxidovatelná frakce	8,8 M H ₂ O ₂ následováno 1M CH ₃ COONH ₄ při pH 2, 1g/10 ml (H ₂ O ₂) opakovaně, potom 1g/50 ml a 16 hodin extrakce	Podrobnosti procedury uvedeny v Rauret et al. (1999)
4. Residuální Al	Směs HF, HNO ₃ , HClO ₄ a H ₂ O ₂	Podrobnosti procedury uvedeny v Matúš et al. (2005)

Protože Al³⁺ je prakticky neoxidovatelný a neredukovatelný, není význam frakce 2 a 3 příliš jasný a může se vztahovat k jiným elementům ve vzorku, jejichž Red/Ox stav může bránit nebo podporovat vyluhování samotného Al.

Matúš et al. (2005) dále provedli loužení deseti extraktanty: **1.** Redestilovaná voda za poměru objemu/váhy vzorku v/w = 5/1, **2.** 0,01M CaCl₂ (v/w = 10/1), **3.** 0,2M (NH₄)₂C₂O₄ (v/w = 20/1), **4.** 0,2M Na₂S₂O₄ (v/w = 10/1), **5.** 0,5M NH₄F (v/w = 10/1), **6.** 0,005M NTA (v/w = 10/1), **7.** 0,005M EDTA (v/w = 10/1), **8.** 0,05M EDTA (v/w = 10/1), **9.** 0,005M DTPA (v/w = 10/1) a **10.** 0,5M HCl (v/w = 20/1). Ve všech případech (s výjimkou 24 hodinového loužení redestilovanou vodou a 2 hodinového loužení CaCl₂) byly vzorky protřepávány po dobu 1 hodiny a centrifugovány 20 minut při 2500 x g. Význam jednotlivých frakcí není zcela jasný, i když frakce **2** je podobná frakci Al_{ex} z tabulky 2 a frakce **3** frakci Al_{Oxal} tamtéž.

Matúš et al. (2005) použili pro extrakci Al roztok 0,005M a 0,05M EDTA, Uvádějí, že koncentrovanější roztok EDTA vyluhuje 0,4 až 1,6 % Al. Polohy píků při HPLC stanovení komplexů Al s NTA a EDTA byly uvedeny Winterem a Seubertem (2016), Obr. 8.

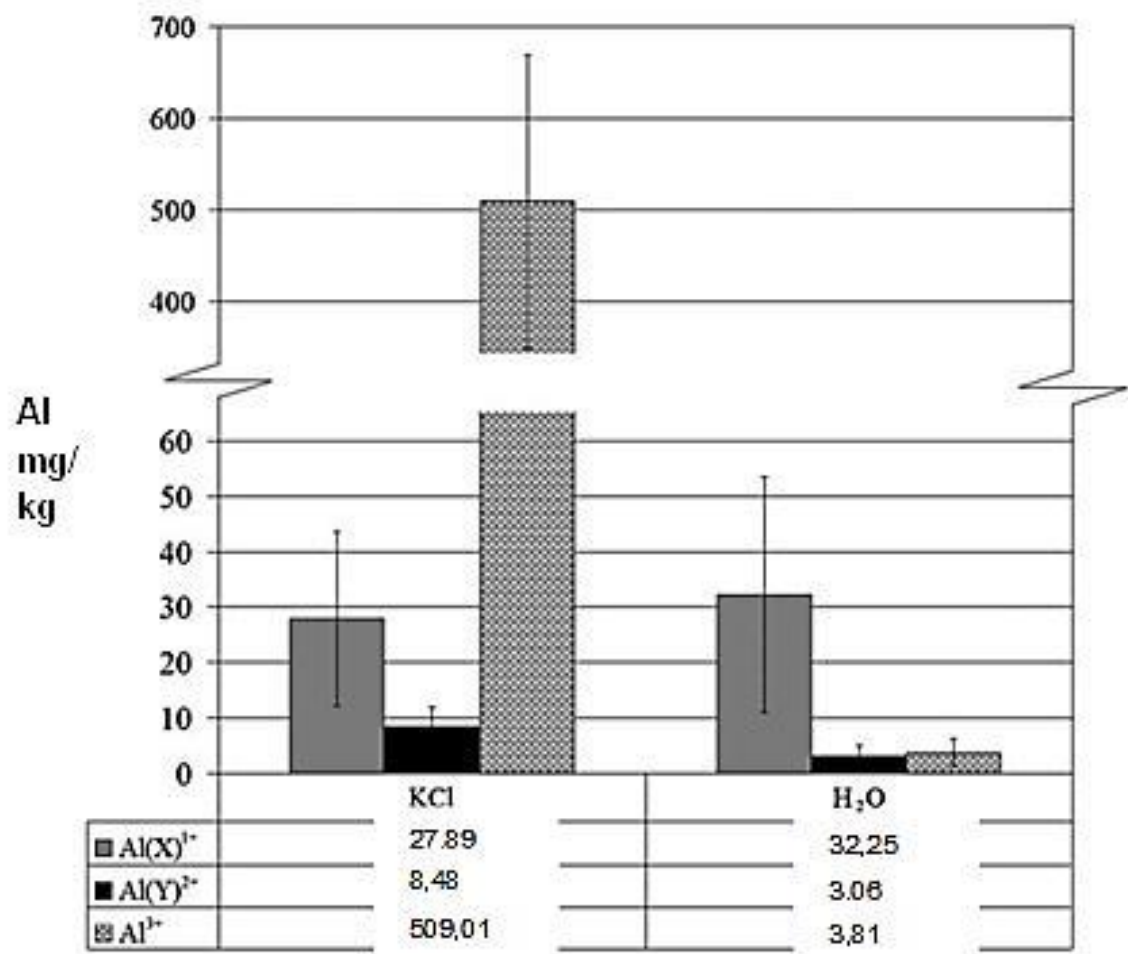


Obr. 8 Překryvné chromatogramy komplexů Al. Obrázek 1 z článku Wintera a Seuberta (2016).

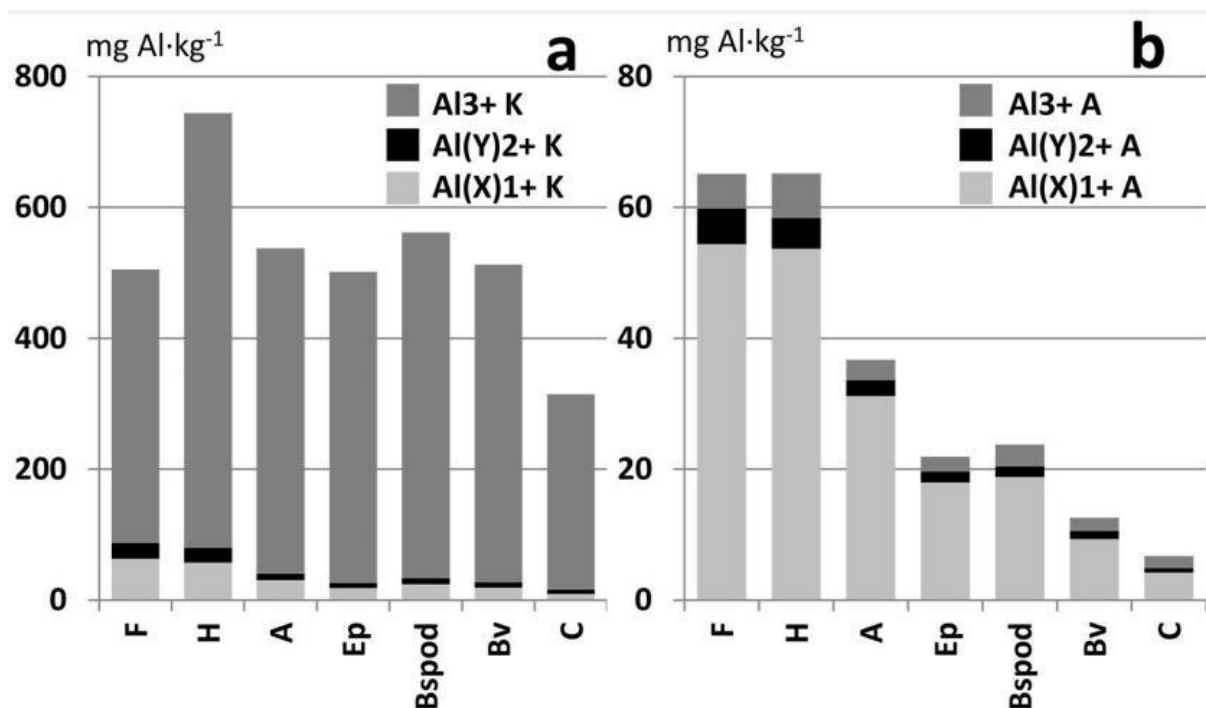
Pro úplnost je nutno uvést, že někdy je stanovována další frakce a to Al rozpustný v deionizované vodě, Al_{water} . Je pravidlem, že při loužení deionizovanou vodou je množství získaného Al podstatně nižší než při loužení 0,5 M KCl a složení komplexů je rovněž diametrálně odlišné, viz Obr. 9 podle Drábka et al. (2005). Při loužení KCl se uvolní 14× více celkového Al než při loužení vodou. To jde na vrub hlavně částici Al^{3+} (133× zvýšení). Ve vodném roztoku existuje 82,6 % ve formě $Al(X)^{1+}$, 8,4 % ve formě $Al(Y)^{2+}$ a 9,0 % ve formě Al^{3+} .

Autoři uvádějí, že tyto údaje jsou v souladu s prací Mitroviće a Milačičové (2000), kteří udávají že 45-50 % A_{water} je ve formě nízkomolekulárních organických komplexů (Al citrát, Al oxalát a AlF^{2+}) a 30-40 % této frakce existuje ve formě Al vázaného do huminových kyselin.

Drábek et al. (2005) v závěru uvádí, že za normálních podmínek je únik Al do prostředí minimální (Al_{water}), může se ale podstatně zvýšit po porušení stávající rovnováhy.



Obr. 9 Výluh vodou a 0,5M KCl podle Drábka et al. (2005).



Obr. 10 Rozdělení Al v půdních horských horizontech při loužení a) 0,5M KCl, b) deionizovanou vodou. Obrázek 2 z Pavlů et al. (2018). Horizonty: F: fermentační, H: humifikované, A: organominerální, Ep: eluviální albické, Bspod: spodické, Bv: kambické, C: substr

Markantní rozdíly KCl a vodných výluhů byly nedávno potvrzeny pro různé půdní horizonty v práci Pavlů et al. (2018), viz Obr. 10.

Kromě prosté výměnné reakce $K^+_{aq} \leftrightarrow Al^{3+}_{aq}$ může být pro pochopení markantního rozdílu hodnoty Al_{ex} při loužení 1M KCl a deionizovanou vodou důležitý pozorovaný pokles pH roztoku před a po loužení. Rozdíl v hodnotách pH pro počáteční a výsledné pH roztoku při loužení 1M KCl, 1M NH_4Cl a 0,5M $CuCl_2$ činil přibližně 1,5 jednotky pH pro tři studované půdní profily, Ponette et al. (1996). Autoři připisují uvolnění protonů z pevné fáze adsorpci nebo komplexování K^+ , NH_4^+ a Cu^{2+} iontů na koloidních površích, zvýšení iontové síly a hydrolýze Al iontů (při $pH > 4$).

Otázka koroze Al ve vodných roztocích solí s chloridovým aniontem v roztocích byla studována Natishanem a O'Grady (2014). Jak je známo, na volném povrchu kovového Al se automaticky tvoří vrstva Al_2O_3 . Tato vrstva je bodově korodována ionty Cl^- a to i v neutrálních nebo mírně alkalických roztocích. Podle autorů je složení pevné zoxidované vrstvy v podstatě vyjádřeno vzorcem $AlOOH$ (pseudoboehmit). Izoelektrický bod nebo pH nulového náboje pH_{pzc} hliníku je $pH_{pzc} \sim 9$ a pH_{pzc} oxidu hliníku $pH_{pzc} = 9,5$. Tudíž při pH menším než 9 je náboj Al kladný a umožňuje korozi zápornými chloridovými anionty.

4.5.2 Chromogenní a fluorimetrická činidla

Specifickou reakcí forem Al s vhodnými činidly dochází ke vzniku zbarveného komplexu, který může být detekován spektrofotometrickými metodami. Podrobný popis metod je uveden např. Clarkem et al. (1996) nebo Bloomem a Erichovou (1996), nověji pak Matúšem a Kubovou (2002).

Pro stanovení speciace používají tyto metody kinetický model s předpokladem, že v daném reakčním čase a za určitých reakčních podmínek je detekována jedna skupina specií, při změně parametrů pak detekujeme jinou frakci. Příkladem může být metoda podle Lalandové a Hendershota (1986). Podle autorů jsou definovány tři operativní skupiny: (i) Al₁ frakce získaná rychlou reakcí s oxinem (fast – oxine) jmenovitě 15 sec. reakce při pH 5, (ii) Al₂ stejné podmínky jako v (i) ale reakce v prostředí o pH 8,3, (iii) Al₃, pomalá reakce (slow – oxine) reakce v prostředí o pH 8,3 po dobu 60 min. Na základě těchto tří měření plus stanovení celkového obsahu Al byly autory postulovány skupiny monomerního Al, komplexního monomerního Al, skupina polymerních forem a skupinu residuálního Al.

Dnes je již historická metoda navržená Barnesovou (1975) spočívající v 20-30 vteřinové reakci a extrakci monomerních frakcí Al **8-hydroxychinolínem** (oxinem) do methyl isobutyl ketonu při pH 8,3 s následující atomovou absorpční spektrometrií. Metoda byla rozpracována dále Driscollem (1984), který použil jednak Barnesovu extrakci z původního vzorku („monomerní frakce“) a dále nechal vzorek projít katexem a znovu použil oxinovou extrakci („nelabilní monomerní frakce“). „Labilní monomerní frakce“ je pak rovna rozdílu výše uvedených hodnot. Metoda byla validována na základě měření koncentrací F⁻ po přidavku F⁻ jako indikátoru, použití známých konstant stability Al:F⁻ komplexů měřením F⁻ citlivou ion selektivní elektrodou.

La Zerte (1984) použil 15 vteřinovou reakci a extrakci oxinátu, čímž se údajně zabrání extrakci polymerních forem. Stejnou metodu použil na identický předem dialyzovaný vzorek pro zjištění anorganických monomerních forem. Také tento postup byl validován s použitím fluoridové selektivní elektrody.

Clarke et al. (1996) použili ještě kratší reakční čas ve flow injection variantě (FIA), jmenovitě 2,3 vteřiny při pH 5. Tímto způsobem jsou měřeny monomerní hydroxo komplexy Al + sulfátové, silikátové a karbonátové komplexy. Komplexy Al s F⁻ iontem nejsou měřeny, stejně tak jako objemné polymerní hydroxo komplexy. Rovněž tato metoda byla validována.

Z dalších chromogenních indikátorů je možno jmenovat 4,4'-(3H-2,1-benzoxathiol-3-ylidene)bisbebenzen-1,2-diol S,S-dioxid, **pyrokatecholová violet'** (PCV), triamoniová sůl 5-[(3-carboxy-4-hydroxyphenyl)(3-carboxy-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)methyl]-2-hydroxybenzoové kyseliny, **aluminon**, 8-hydroxy-7-iodochinolin-5-sulfonová kyselina, **ferron**, trisodná sůl 3,3'-(3H-2,1-benzoxathio1-3-ylidene)bis[6-hydroxy-5-methylbenzoové kyseliny S,S-dioxide, **eriochrome cyanine R** (ECR), 3''-sulfo-2'',6''-dichloro-3,3'-dimethyl-4-hydroxyfuchson-5,5'-dicarboxylová kyselina, **chromazurol S** (CAS).

Z repertoáru fluorimetrických stanovení zde můžeme zmínit 5-chloro-3-[(2,4-dihydroxyfenyl) azo] -2-hydroxybenzensulfonic acid, **lumogallion** (Sutheimerová a Cabaniss 1995). Autoři udávají detekční limit méně než 5 nm, podstatně nižší než u jiných metod.

Nehledě na velké množství navržených činidel pro spektrofotometrické a fluorimetrické stanovení Al, výzkum v této oblasti stále pokračuje.

Z novějších metod můžeme zmínit spektrofotometrické stanovení Al pomocí **xylénolové oranže** (Tehrani et al. 2013), pomocí **2-hydroxynafaldehydebzoyl hydrazonu, HNPBH** (Ahmed et al. 2010), nebo s použitím **5-Bromo-2-hydroxy-3-metoxybenzaldehyde-P hydroxybenzoic hydrazonu** (Saritha a Reddy 2014). Pro HPLC s obrácenými fázemi byl použit také 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone, **quercetin** (Lian et al. 2004).

Z fluorimetrických metod je možno například jmenovat stanovení 4-chloro-2-phenyliminomethylphenolem, **Cl-PMP** (Kim et al. 2008) a dále použití 8-hydroxyquinoline-5-sulfonové kyseliny, **8-HQSA** (Kumar et al. 2014).

4.5.3 Iontově selektivní elektrody

Pro účely speciace je velmi často používána F⁻ sensitivní elektroda (FISE). Elektroda je založená na použití diskovitého výřezu krystalu fluoridu vzácné zeminy (LaF₃, NdF₃ nebo PrF₃), (Frant a Ross 1966). Elektroda je vysoce selektivní na F⁻ koncentraci, údajně s 10⁵ vyšší selektivitou než pro jiné anionty.

Pro určení forem Al v roztoku se měří FISE jednak koncentrace volného F⁻, jednak koncentrace celkového F a na základě hodnoty pH a známých konstant stability komplexů Al:F je možno vypočítat speciaci Al. Modelový příklad je například stanovení forem Al s pomocí FISE a fluorimetrického činidla lumogallionu (Hara et al. 2001).

Metoda je podrobně popsána v Clarke et al. (1996) a v Bloom a Erich (1996). Nověji byly navrženy ISE pro přímou detekce iontů Al.

Aglan et al. (2012) použili pro tento účel karbonovou pastu s obsahem ionoforu 8 - dihydroxyanthrachinonu (**DHAQ**). Detekční limit elektrody je 5,0.10⁻⁷ mol. L⁻¹ Al(III) iontu a elektroda je selektivní pro Al³⁺.

Jen o něco méně citlivá je elektroda podle Liu et al. (2011), jmenovitě 7,0.10⁻⁶ mol. L⁻¹ Al(III) iontu, Tato elektroda je založená na použití salicylaldehyd salicyloyl hydrazonu (**SSH**).

Obě elektrody byly úspěšně testovány pro použití na reálných vzorcích včetně vzorků vod.

4.5.4 Elektrochemické metody

V přehledu (Bi et al. 2001) je uvedeno 16 elektrochemických metod pro stanovení Al. Většina metod používá jako elektrodu visící rtuťovou kapku a chelatační činidlo ze skupiny **alizarin S, morin, 4-nitrokatechol, PCV, kupferron, solochrom, violet' RS, kyselinu rubeanikovou**. Většina publikovaných článků pochází z dílny Bi et al. Diskuze těchto metod přesahuje rozsah této diplomové práce.

4.5.5 NMR techniky

Bi et al. (2001) a Ščančar a Milačič (2006) ve svých přehledných člancích věnují značnou pozornost ²⁷Al NMR metodám. Jejich nevýhodou je malá citlivost, takže se spíš hodí pro identifikaci a charakteristiku polymerních částic, viz podkapitola 4.4.

4.5.6 HPLC

Zavedení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s použitím vhodného kationtového iontoměniče jako pevné fáze znamenalo významný pokrok ve studiu speciace Al. Metoda je rychlá, spolehlivá a umožňuje korektní frakcionaci. Tyto metody se také někdy označují podle použitého iontoměniče jako stacionární fáze jako iontově výměnná chromatografie IC.

Drábek et al. (2003) pro zjištění potenciálně rizikových forem Al provedli speciaci Al pomocí HPLC v extraktu 0,5M KCl a ve vodném extraktu. Použitá metoda umožňuje separaci Al forem do tří skupin podle náboje částic:

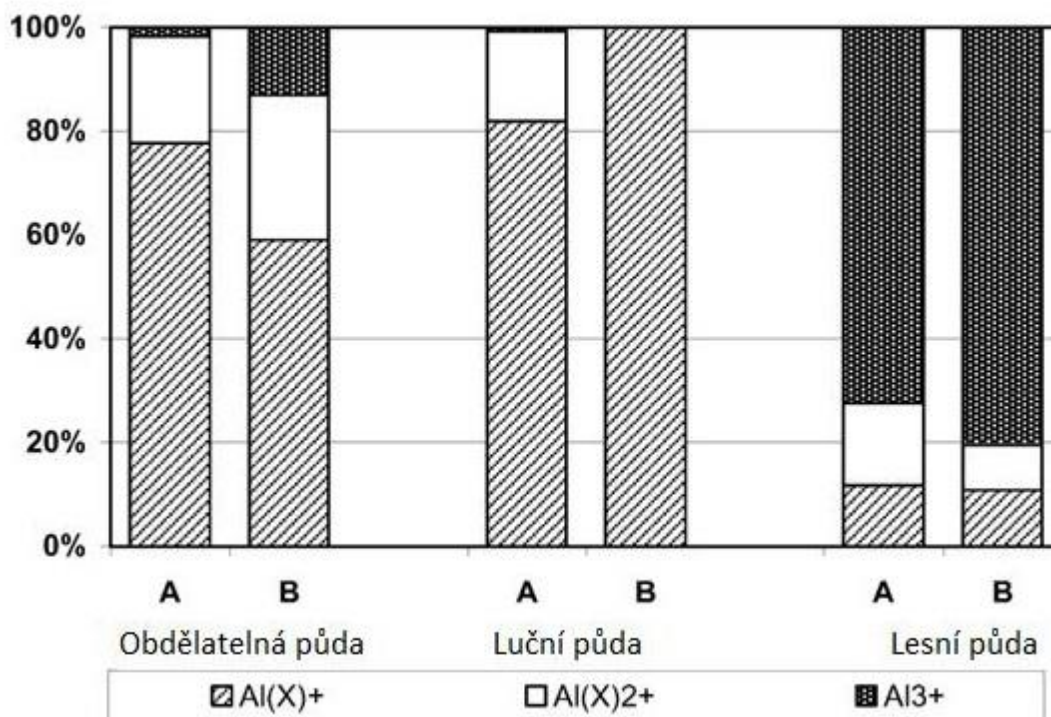
- $\text{Al(X)}^{\leq 1+}$ { Al(OH)_2^+ , $\text{Al(SO}_4)^+$, AlF^{2+} , $\text{Al(org.)}^{\leq 1+}$, etc.};
- Al(Y)^{2+} { Al(OH)^{2+} , $(\text{AlF})^{2+}$, etc.};
- Al^{3+} { Al^{3+} a transformované Al hydroxy-polymery }.

Hliníkové formy $\text{Al(X)}^{\leq 1+}$ a Al(Y)^{2+} jsou relativně netoxické, nicméně velice mobilní. Forma Al^{3+} představuje pro rostliny toxickou formu hliníku, která je navíc v kyselých roztocích stabilní a vysoce mobilní.

Gradientová eluce s rostoucí koncentrací NH_4NO_3 (0 - 8M NH_4NO_3 v průběhu 10 minut) s použitím HPLC ETAAS techniky byla studována Mitrovićem et al. (1998). Byly úspěšně detekovány částice Al^{3+} , Al(OH)_2^+ , Al(OH)^{2+} , Al(OH)_3 a Al(OH)_4^- při elucích z prostředí pH = 3-8.

4.5.7 Příklady kombinace metod

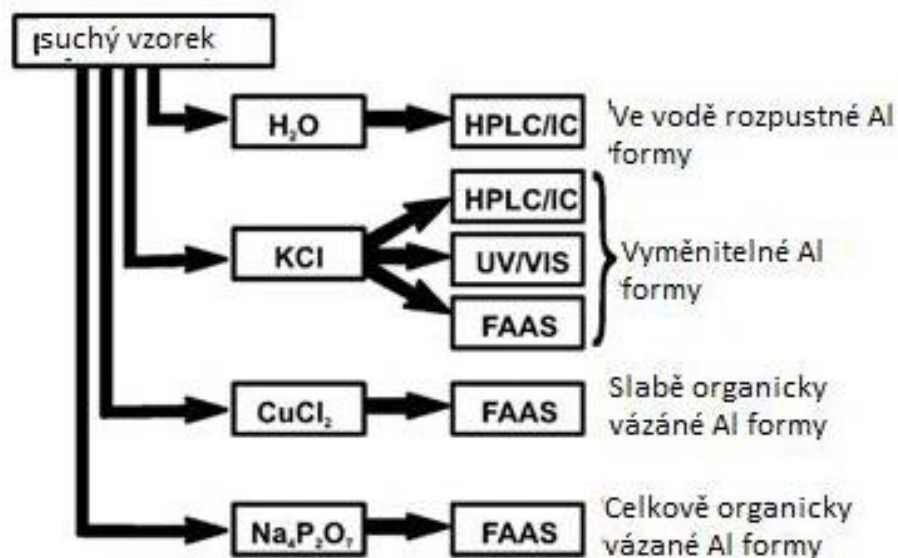
Často se používají kombinace výše uvedených metod, jak je zřejmé ze dvou níže uvedených příkladů.



Obr. 11 Procentuální obsahy forem Al v různých typech půd, A. vrchní horizont, B. spodní horizont.

Na Obr. 11 je uveden procentuální obsah různých forem Al v různých typech půd a v různých horizontech (Drábek et al. 2003). Celkový obsah vyměnitelného Al se podstatně mění pro uvedené tři typy půd a to 715,7 mg/kg pro lesní půdu, 10,4 mg/kg pro obdělátnou půdu a 9,2 mg/kg pro luční půdu. Pro lesní půdu je pozorován navíc markantní rozdíl mezi horním H (991,6 mg/kg) a spodním S (439,4 mg/kg) horizontem. pH výluhu stoupalo od lesní půdy (3,1 pro H a 4,0 pro S) k obdělátné půdě (4,8 a 5,3) a k luční půdě (5,3 a 6,8).

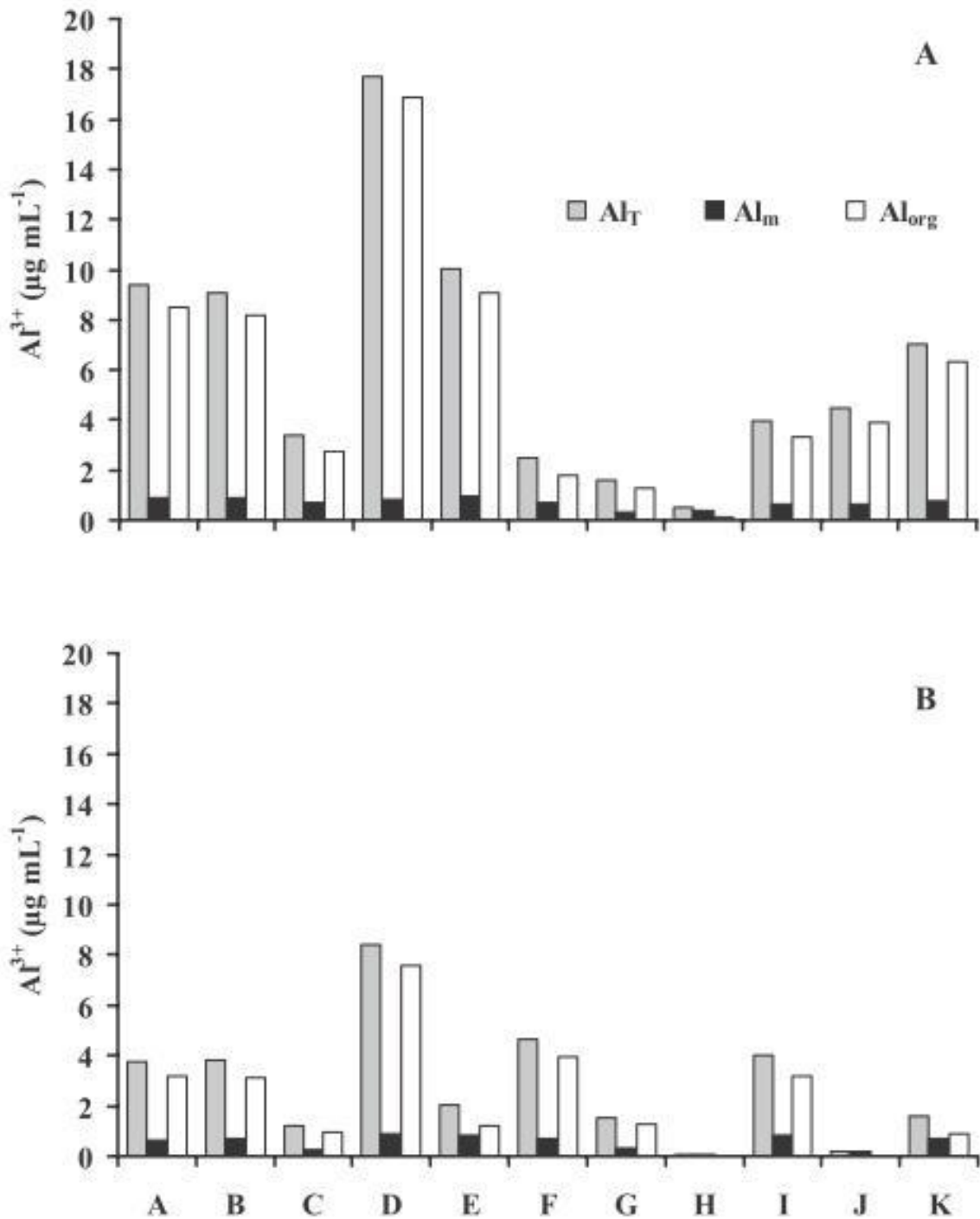
Jednotlivé formy byly určeny podle následujícího schématu, Obr. 12



Obr. 12 Speciace podle Drábka et al. (2003).

Příkladem rozdělení jednotlivých forem Al pro půdy odvozené od granitu je práce Auxtera a Madeiry (2011), viz Obr. 13.

V práci byl celkový obsah Al_T stanoven pomocí indukčně vázané plasma – atomové emisní spektrometrie, (ICP-EAS), anorganické monomerní formy Al_m aluminovou metodou podle Hsua (1963) a Blameye (1983). Organická frakce Al_{org} je potom podle autorů rovna rozdílu $Al_{org} = Al_T - Al_m$.



Obr. 13 Průměrná koncentrace celkového Al (Al_T), monomerního Al (Al_m) a organického Al (Al_{org}) v 11 různých lokalitách A – K, A..povrchová a B..podpovrchová vrstva, podle Auxtera a Madeiry (2011).

4.6 Validace metody

Validace metody je důležitý proces při vývoji spolehlivé a přesné analytické metody. Právně je v ČR proces validace zakotven v normě ČSN EN ISO/IEC 17025:2005, kap. 5.4.5, kde se praví (použit text z Effichem (2018)):

„5.4.5.1 Validace je potvrzení přezkoušením a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny.

5.4.5.2 Aby se potvrdilo, že metody jsou vhodné pro zamýšlené použití, musí laboratoř validovat metody neuvedené v normách nebo normativních dokumentech, metody navržené/vyvinuté laboratoří, normalizované metody používané mimo zamýšlený rozsah použití a normalizované rozšířené anebo modifikované metody. Validace se musí provést v takové šíři, jak je to třeba ke splnění potřeb týkajících se daného použití nebo oblasti použití. Laboratoř musí zaznamenat získané výsledky, postup použitý pro validaci a vyjádření, zda je metoda vhodná k zamýšlenému použití.

5.4.5.3 Rozsah a správnost hodnot, které lze získat z validovaných metod (např. nejistota výsledků, mez detekce, selektivita metody, linearita, meze opakovatelnosti a/nebo reprodukovatelnosti, robustnost z hlediska vnějších účinků a/nebo koeficienty citlivosti vůči ovlivnění způsobenému maticí vzorku/zkoušeného předmětu) tak, jak byly posouzeny pro zamýšlené použití, musí odpovídat potřebám zákazníka.“

Podle Novákové et al. (2013) je validace definována jako „získání důkazu ve formě dokumentace, který poskytuje vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci.“

Metody validace jsou popsány v monografiích, např. (Huber 2007; Thompson a Lowthian 2011; Magnusson a Örnemark 2014), v kapitolách monografií (Snyder et al. 1997; Swartz 2010). Poslední text je orientován na validaci HPLC technik. Na validaci HPLC je zaměřen také text Lindy L. Ng. (1994). Zmiňme také nedávné přehledné články, např. (Kazusaki et al. 2012) nebo (Paithankar 2013).

Podrobnější rozbor tvořící základ dalšího popisu byl čerpán ze tří zdrojů: (i) Metody validace pro HPLC metody popsané v Novákové et al. (2013) a na stránkách <http://www.hplc.cz>, Anonymní (neznámo), (ii) podrobná užitečná publikace (Ellisona et al. 2009) a (iii) stránky firmy EffiChem[®] (2018). Poslední zdroj odkazuje na samostatný program zaměřený na validaci, jehož 30 denní trial verzi je možno získat na odkazu <http://www.effichem.cz/ke-stazeni/>.

Lineární regresi včetně výpočtu mnoha parametrů je pochopitelně možno provést v Excelu[®] (Excel 2010, záložka data, analýza dat, regrese) nebo s použitím rozšíření Excelu podle Zaointza (2013-2018).

Validační kritéria jsou vyjádřena následujícími položkami, podle EffiChem© (2018):

- Opakovatelnost (přesnost)
- Střední (mezilehlá) přesnost
- Mez detekce / Mez stanovitelnosti
- Správnost (versus odchylka, chyba)
- Linearita
- Reprodukovatelnost
- Selektivita/Separace/Rozlišení
- Robustnost

Názorně jsou uvedeny případy, které mohou nastat na následujícím obrázku, Obr. 14.



Odchylka (bias)	neznámá	veliká	veliká	malá	veliká
Přesnost	neznámá	špatná	dobrá	dobrá	špatná
Chyba	veliká	veliká	veliká	malá	veliká

Obr. 14 Varianty odchylek, přesností a chyb. Podle Marešové (2007).

V dalším rozboru pokračujeme v zásadě podle přehledných směrnic ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Expert Working Group (2005) a Novákové et al. (2013).

4.6.1 Opakovatelnost (přesnost)

Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k referenční hodnotě. Je vyjadřována (počítána) jako relativní směrodatná odchylka výsledků zkoušek. Podle Novákové et al. (2013) je pro stanovení přesnosti nutno analyzovat nejméně 3 vzorky, a to minimálně na 3 koncentračních úrovních (3×3 matrice). Tzn. vzorek třech koncentračních bodů bude proměřen třikrát v každém bodě připravené koncentrace. Tyto úrovně by měly pokrývat celý rozsah koncentrací potenciálně měřených vzorků, např. 5%, 45%, 95%. Podle normy ICH Expert Working Group (2005) je možno alternativně provést minimálně 9 měření při 100% testované koncentraci. Podle Rosinga et al. (2000) by měly být měřeny vzorky odpovídající LLQ, 2-5× LLQ, 0,5 ULQ a ULQ.

Směrodatná odchylka je definována jako:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 4.6.1.1$$

kde x_i je naměřená hodnota, \bar{x} je průměr měření a n je počet měření.

Často se vyjadřuje relativní směrodatná odchylka (RSD), také nazývaná koeficient variace (CV):

$$RSD = CV = \frac{S}{\bar{x}} \quad 4.6.1.2$$

nebo procentuálně:

$$\% RSD = \% CV = \frac{100s}{\bar{x}} \quad 4.6.1.3$$

Přesnost by podle Novákové et al. (2013) měla být verifikována i jako dlouhodobá přesnost (inter-day precision) v delším časovém intervalu i několika měsících. Povolená velikost RSD je určena zadavatelem. Nováková et al. (2013) udává jako příklad kritérií zvolených farmaceutickými firmami $\%RSD = \pm 15 \%$, jinde (Ellison et al. 2009), se posuzují modelové příklady s $\%RSD$ řádově jednotek procent.

Při analýze přesnosti na základě směrodatných odchylek je nutno vyloučit náhodné jednoznačně nesprávné hodnoty (outlayers, „odlehlé“ body). Ty jsou většinou okamžitě viditelné, pro delší soubory dat je vhodné použít některý statistický algoritmus, jako je Cochranův, Grubbsův nebo Dixonův test, viz (Ellison et al. 2009).

4.6.2 Střední (mezilehlá) přesnost

Test se obvykle provádí měřením stejného vzorku v různých dnech, různými analytiky, různým vybavením atd. I když individuální $\%RSD$ mohou být nízké, je nutno počítat všechna měření v jednom souboru a $\%RSD$ může být podstatně vyšší.

4.6.3 Mez detekce / Mez stanovitelnosti

Mez detekce neboli detekční limit (DL nebo LOD = limit of detection) udává nejnížší koncentraci, která může být danou metodou detekována. Platí (Ellison et al. 2009):

$$DL = 3,3 \sigma / S \quad 4.6.2.1$$

kde σ je směrodatná odchylka odezvy a S je sklon kalibrační křivky.

Mez stanovitelnosti (quantitation limit QL, nebo LOQ = limit of quantitation) udává nejnížší koncentraci látky, která může být danou metodou změřena.

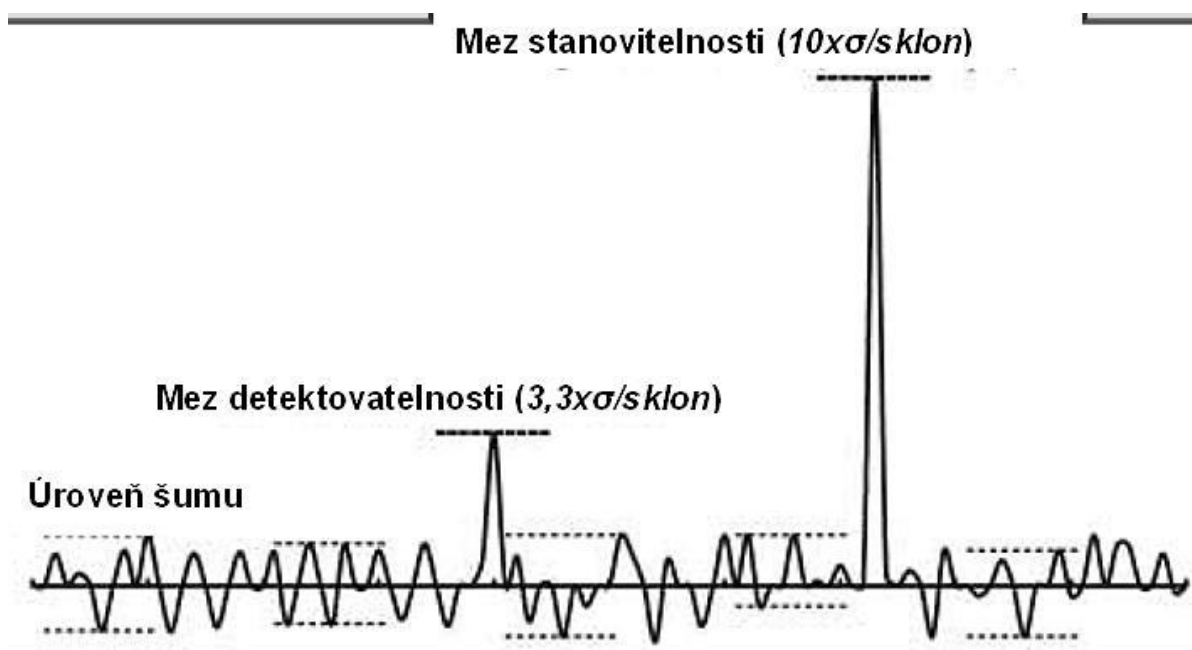
Platí:

$$QL = 10 \sigma / S.$$

4.6.2.2

Někdy je též používán horní limit stanovitelnosti (upper limit of quantitation, ULQ).

Nováková et al. (2013) udávají pro metody HPLC obdobný vzorec, ve kterém je σ nahrazeno hodnotou šumu ($\sigma = \text{šum}$) a S je vyjádřena v jednotkách použitých pro měření šumu (plocha píku), viz Obr. 15.

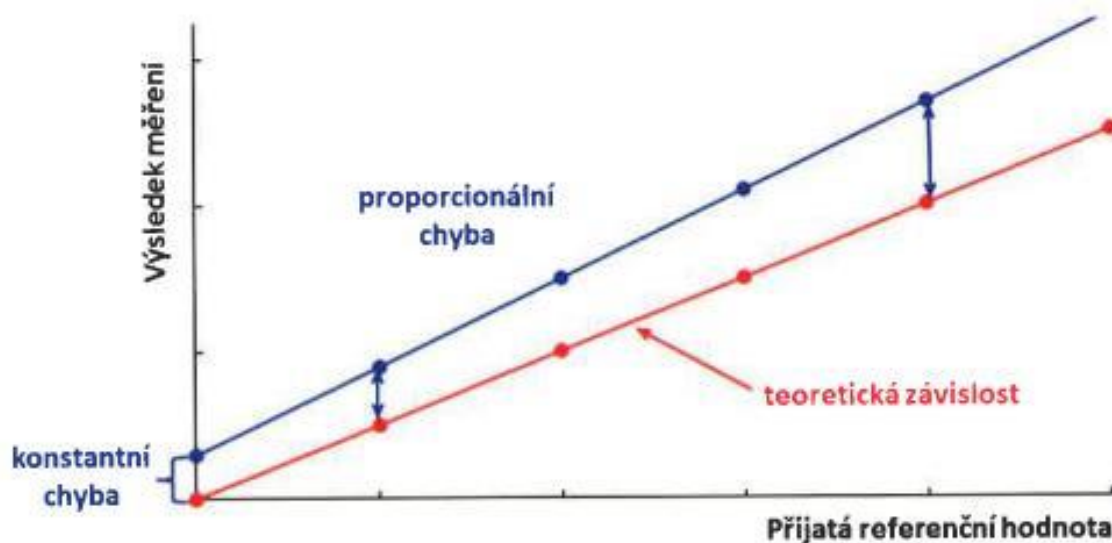


Obr. 15 Typický chromatogram ukazující DL a QL. Úrovně šumu jsou variabilní a jsou pozorovatelné v normálním distribučním spektru. Obrázek 3 z Kazusaki et al. (2012).

4.6.4 Správnost (versus odchylna, chyba)

Správnost (accuracy) je podstatnou částí validace a je základním údajem. Výsledek může být přesný a přesto nesprávný, viz Obr. 14.

Systematická (soustavná) chyba výsledku v průběhu řady výsledků zkoušek zůstává konstantní nebo se mění předvídatelným způsobem (proporcionální chyba). Složka chyby, která se v průběhu řady výsledků zkoušek mění nepředvídatelným způsobem, je nazývána náhodná chyba výsledku. Náhodnou chybu nelze žádným způsobem odstranit. Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek (obvykle vyjádřený jako průměr) a přijatou referenční hodnotou je nazýván odchylka (bias), viz (Nováková et al. 2013). Efekt konstantní a proporcionální chyby je zřejmý z Obr. 16.



Obr. 16 Konstantní a proporcionální chyba podle Novákové et al. (2013).

Konstantní chybu, způsobenou například kontaminací analytu, lze odstranit, proporcionální chybu odstranit nelze, lze ji však částečně redukovat (Nováková et al. 2013).

4.6.5 Linearita

Běžná analytická stanovení se provádí na základě předem stanovené kalibrační přímky, která udává závislost odezvy (absorbance, šířky nebo plochy chromatografického píku) na koncentraci analytu:

$$y = a \cdot x + b \quad 4.6.5.1$$

Optimální parametry a a b se získají lineární regrese podle vztahů (pro zjednodušení zápisu použijeme místo $\sum_{i=1}^n z$ pouze $\sum z$), vztahy vzaty z Ellison et al. (2009):

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad 4.6.5.2$$

$$b = \frac{\sum x_i^2 \sum y_i - \sum x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad 4.6.5.3$$

nebo s použitím průměrů \bar{x} a \bar{y} :

$$b = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad 4.6.5.4$$

a

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad 4.6.5.5$$

Shoda naměřených dat s ideálně proloženou přímkou je pak dána korelačním koeficientem r podle rovnice 4.6.5.6:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2][\sum(y_i - \bar{y})^2]}} \quad 4.6.5.6$$

Směrodatná odchylka kvadrátu residuí $(y_i - \hat{y}_i)^2$ je potom dána vztahem:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}, \quad 4.6.5.7$$

standardní odchylka odhadu sklonu:

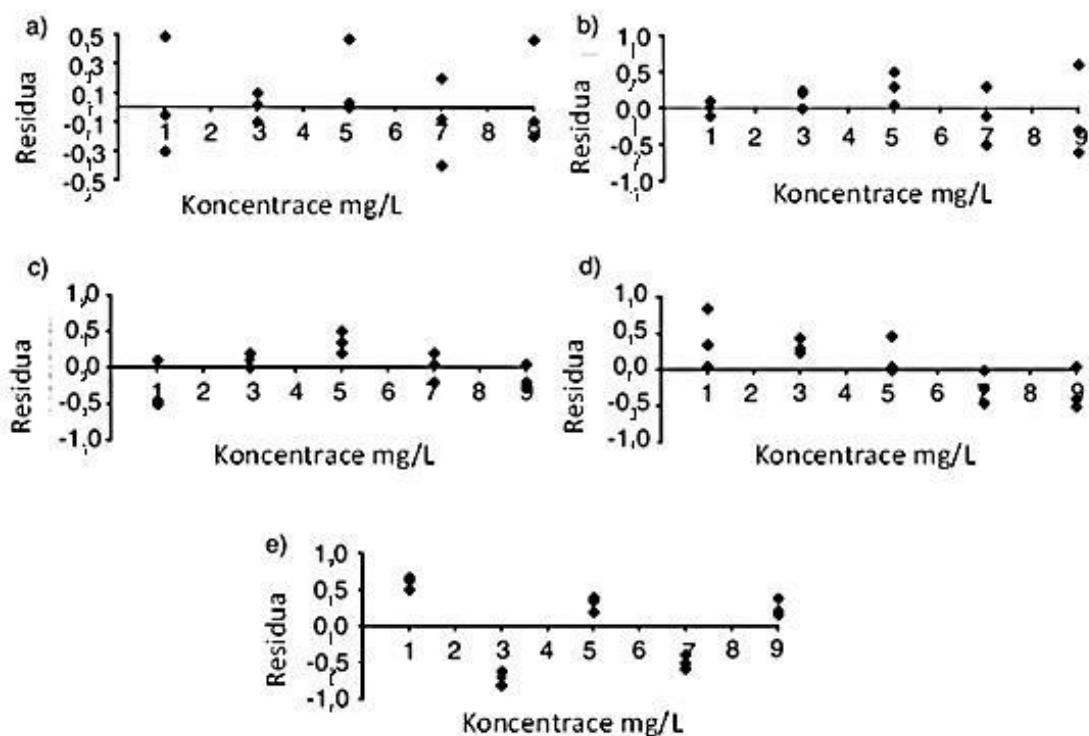
$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x}_i)^2}} \quad 4.6.5.8$$

a standardní odchylka odhadu úseku:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum(x_i - \bar{x}_i)^2}} \quad 4.6.5.9$$

Zdlouhavé ruční výpočty byly dnes nahrazeny automatickými subrutinami např. v Excelu[®] (záložka data, analýza dat, regrese).

Linearita poskytuje víc informací než pouhé měření přesnosti. Ellison et al. (2009) to ilustrují grafem závislostí residuí $(y_i - \hat{y}_i)$ na koncentraci, viz Obr. 17.



Obr. 17 Tvar závislostí residuí lineární regrese podle Ellisona et al. (2009), jejich a) Ideální náhodný rozptyl, b) standardní chyba se zvětšuje s koncentrací, c) zakřivená odezva, d) úsek nesprávně určen jako nula, e) vzájemná korelace residuí

Zatímco případ a) není problematický, varianty b) – e) zasluhují zvýšenou pozornost.

Závislosti uvedené na Obr. 17 je možno snadno vytvořit v Excelu[®] (data, analýza dat, regrese, označit „Graf s residuí“).

Praktický postup určení linearitě metody zahrnuje přípravu nejméně 5 kalibračních roztoků na různých koncentračních úrovních pokrývajících celý rozsah metody (pro stanovení čistoty ve farmacii např. QL až 120 % nebo 150 % specifikačního limitu), (Nováková et al. 2013). Podobně Dong (2006) uvádí kritérium měření pěti vzorků na úrovni 50 % až 150 %, konkrétně 50, 75, 100, 125 a 150 % standardního obsahu, a $r > 0,999$.

4.6.6 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost metody (reproducibility) vyjadřuje podle Novákové (2013) těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek reprodukovatelnosti, tj. výsledky měření stejného analytu ve vzorcích téhož materiálu. jednotlivá měření jsou však prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo, podmínky, čas, avšak stejná metoda). Reprodukovatelnost je realizována pomocí mezilaboratorních porovnávacích zkoušek, tím se liší od mezilehlé přesnosti.

4.6.7 Selektivita/Separace/Rozlišení

Selektivita analytické metody (method selectivity) je definována jako schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek (matrice), (Nováková 2013). Autorka nedoporučuje používat termín „specificita“, protože v praxi neexistují systémy úplně specifické, tj. reagující plně jen na jednu komponentu a nulově na jiné komponenty.

Podle EffiChem© (2018) je možno selektivitu zjistit třemi způsoby: (i) porovnáním kalibračních přímků, (ii) porovnáním výsledků se standardem nebo (iii) porovnáním výsledků s měřením bez interferentu.

Pro HPLC stanovení se používá „rozlišovací rovnice“ (resolution equation):

$$R_s = \left(\frac{k}{k+1} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \quad 4.6.7.1$$

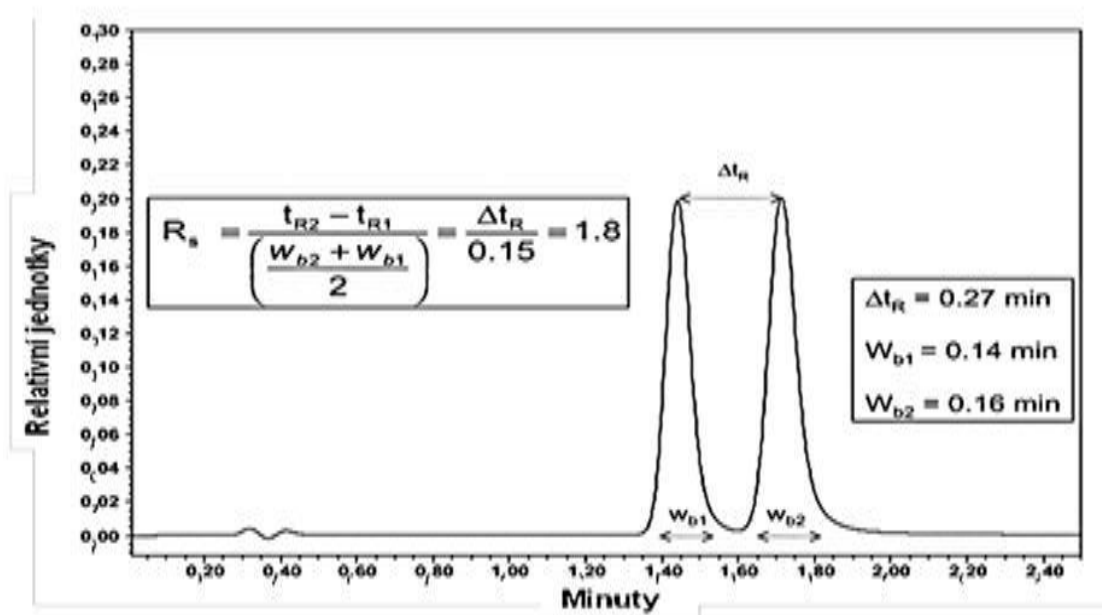
kde k je retence, α je selektivita a N je účinnost (počet teoretických pater) kolony, (Dong 2006).

Pro maximalizaci rozlišení musí být k dostatečně velké, ale pro vysoká k se první člen rovnice 4.6.7.1 blíží k jedné. Pro $k = 0$ je R_s rovno nule, totéž platí pro $\alpha = 1$. Pro podobné látky je α většinou rovno 1,01 až 1,50.

Z chromatogramu je rozlišení určeno vztahem (Dong 2006):

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2} \right)} \cong \frac{\Delta t_R}{w_b} \quad 4.6.7.2$$

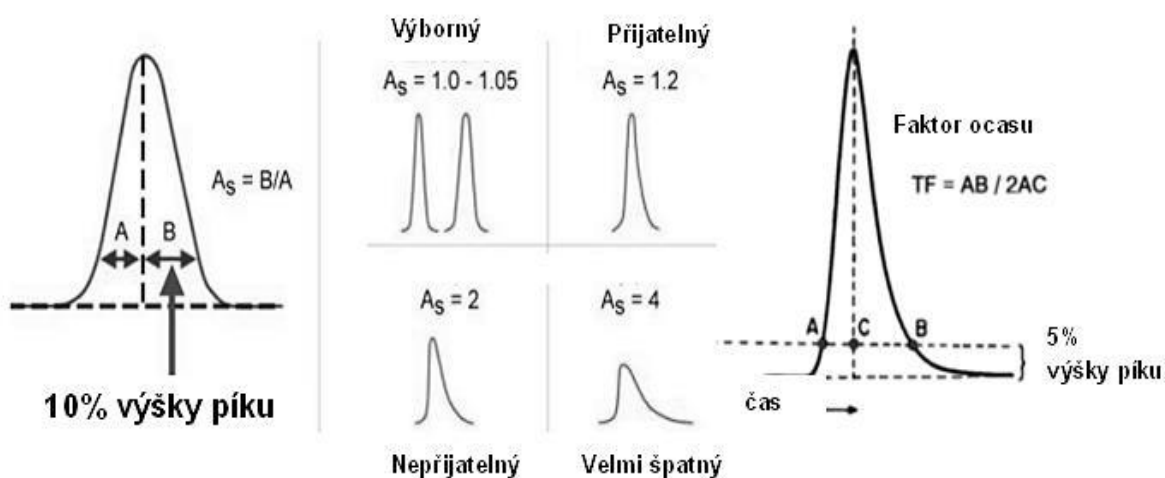
kde t_{R2} a t_{R1} jsou časy odpovídající maximu píku látky 2 a 1 a w_{b2} a w_{b1} jsou šířky píků, viz Obr. 18. Protože šířky dvou přilehlých píků jsou přibližně shodné, je možno vztah zjednodušit tak, jak je dáno posledním členem vztahu 4.6.7.2.



Obr. 18 Rozlišení chromatografických píkú podle Donga (2006), obrázek 2.6 z jeho knihy.

$R_s = 0$ znamená úplnou koeluci a žádné rozlišení, při $R_s = 0,6$ je viditelné rameno (shoulder), tj. slabá parciální separace. $R_s = 1$ je parciální separace, $R_s = 1,5$ indikuje základní (baseline) separaci. Ideální je $R_s = 1,5-2,0$ pro všechny analyty (Dong 2006).

Podstatná pro stanovení je rovněž asymetrie píku (Ravisankar et al. 2015). Faktor asymetrie (rovný přibližně tailing faktoru – efektu chvostu) je určen jako $A_s = B/A$, kde B je vzdálenost bodu středního bodu píku měřeného v 10 % výšky píky od bodu chvostu – trailing edge a A je totéž pro čelo píku. Tailing faktor TF se určuje ve výšce 5 %. Definice jsou zřejmé z obrázku, Obr. 19.



Obr. 19 Určení tailing TF a asymetrického A_s faktoru, podle Ravisankara et al. (2015), jejich obrázek 5.

Podle autorů pak platí následující kritéria pro vhodný proces:

- Počet teoretických pater $N > 2000$
- Separace nebo relativní retence $\alpha > 1$
- Rozlišení $R_s > 1,5$
- Tailing faktor TF nebo asymetrie $A_s < 2$
- Relativní standardní odchylka $RSD < 2$

Podobná kritéria uvádí také Nováková et al. (2013).

4.6.8 Robustnost

Robustnost metody je definována jako míra vlivu mírného kolísání hodnot jednotlivých parametrů metody na výsledek analytického stanovení (Nováková et al. 2013). Někdy jsou v literatuře používány dva parametry a to „robustness“ a „ruggedness“, vztahující se na změny parametrů v jedné nebo dvou laboratořích, podle Novákové et al. (2013) jsou to ale synonyma pod společným pojmem robustnost (robustness).

Variace podmínek může být například rozdílná teplota prostředí nebo postupná degradace kolony. Doporučuje se kvantifikovat robustnost ještě před konečným vypracováním metodiky, aby nemusela být později metodika nahrazena jinou spolehlivější metodou.

Podle Paithankara (2013) by měla být kontrolována stálost použitých roztoků v intervalech 4, 12, 24, 48 hodin atd. Pro léčiva a jiné produkty by měla být relativní chyba $\leq 2,0\%$ a pro stanovení nečistot $\leq 10\%$.

Nejdůležitější parametry, které by měly být testovány, jsou podle ICH Expert Working Group (2005):

- vliv změny pH mobilní fáze
- vliv změny složení mobilní fáze
- různé kolony (různé výrobní šarže a/nebo výrobci)
- teplota
- průtok

Pro detailní rozbor multifaktoriální analýzy všech možných vlivů na robustnost se používá schéma podle Placketta a Burmana (1946).

5 Výsledky

5.1 Experimentální část

5.1.1 Chemikálie a roztoky

Použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší od firem Sigma Aldrich a Lach-Ner. Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate, Sigma Aldrich 172553) byl deklarován jako 97% čistý. Vodné roztoky byly připraveny s použitím deionizované vody. Roztok tohoto derivatizačního činidla o složení $6 \cdot 10^{-4}$ mol/l Tiron v 1M octanu amonném byl připraven vždy čerstvý před započítáním pokusu. Byla použita 0,75 M HCl jako mobilní fáze. Roztoky byly před použitím tlakovou filtrací zbavené nečistot (filtrační membrána typu CRONUS FILTER NYLON 47 mm/0,2 μ m) a dále byl roztok zbaven rozpuštěného vzduchu – odplyněn probubláváním stlačeným heliem.

5.1.2 Použitá zařízení a postupy

Byla použita kationtová kolona Dionex™ IonPac™ CS5 IC v dřívější práci Vodičková (2017). Její charakteristiky podle výrobce viz http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4396-32558-05_CS5_V17.pdf odpovídají rozměrům 4×250 mm, průměru částic 13 μ m, zesílení divinylbenzen/styren polymerem 2 %, průměr latexu 110 nm, zesílení latexu 2 %, kapacita kolony 150 mikroekvivalentů, údajná hydrofobnost je nízká. Definované operační parametry pro analytickou kolonu jsou: zpětný tlak < 850 psi, standardní průtok 1 ml/min a maximální průtok 3 ml/min.

Byla použita tato instrumentální sestava: pumpa GP 50 (Dionex, USA), automatický dávkovač Triathlon (Sparks, Nizozemi), termostat kolon TCC 100 (Dionex, USA), detektor DeltaChrom PDA (Watrex, Česká republika). Směšovací T-spojka s reakční smyčkou. Bylo měřeno v UV oblasti při 310 nm se srovnávací vlnovou délkou 500 nm. Signál detektoru byl zpracován a uložen chromatografickým softwarem Chromeleon 6.2 (Dionex USA).

Pro detailnější popis instrumentální sestavy viz též kapitola 6. Diskuze.

Byla použita mobilní fáze 0,75M HCl, dále byly připraveny kalibrační roztoky. Pro kalibraci byl použit roztok 1000 mg Al^{3+} /l, který byl postupně ředěn na odpovídající koncentrace 1, 2, 10, 20, 40 a 100 mg/l.

Pro měření ICP-OES byl použit přístroj s axiální plasma konfigurací ICP-AES – Varian VistaPro, Australia, vybavený auto dávkovačem, a bylo měřeno při spektrální linii 396,152 nm. Zpracování vzorků bylo následující:

Pro obě metody ICP-OES a IC:

- Odběr vzorku
- Vysušení
- Homogenizace, drcení
- Prosátí přes síto s velikostí ok 2 mm
- Navážení
- Extrakce 0,5M KCl podle Drábka (2003)
- Odstředění

Další úprava pro IC:

- Filtrace přes diskový nylonový filtr 0,45 μm

Další úprava pro ICP-OES:

- Ředění 10 \times
- Filtrace přes diskový nylonový filtr 0,45 μm

5.2 Opakovatelnost (přesnost)

Opakovatelnost (přesnost) procesu byla měřena pro 13 vzorků na 5 koncentračních úrovních a to od 2 do 100 mg Al³⁺/l. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3. V tabulce jsou uvedeny naměřené hodnoty, průměry \bar{x} , a procentuální relativní směrodatné odchylky (%RSD), nazývané alternativně koeficienty variace (%CV), viz podkapitola 4.6.1.

Tabulka 3 Parametry pro stanovení přesnosti

Série	1	2	4	3	počet bodů	průměr \bar{x}	%RSD
mg Al/l in	mg Al/l měřeno						
1				0,91 0,88 0,89 1,06 0,98 1,16	6	0,98	11,4
2	1,57 1,77 1,74 1,82 1,90 1,80	1,94 1,87 1,22 1,47 1,53 1,89	1,78 1,83 1,68 1,84 1,88 1,93		18	1,75	10,82
10	9,81 9,31 10,04	9,97 10,49 9,54	10,54 8,98 10,51	10,63 10,42 9,47	12	9,97	5,56
20	19,83 19,86 19,85	21,47 20,21 20,78	21,55 20,05 18,90	20,12 19,55 20,78	12	20,25	3,82
40	38,97 41,08 40,71	41,58 38,60 38,29	41,84 40,06 37,84	40,53 40,08 38,73	12	39,86	3,37
100	100,00 96,50 103,42	99,28 102,51 98,40	101,87 99,67 98,49	99,37 99,76 100,96	12	100,02	1,91

Z tabulky je zřejmé, že pro koncentrace ≥ 2 mg Al/l jsou splněna i poměrně náročná kritéria používaná farmaceutickými firmami (%RSD < 15 %), viz podkapitola 4.6.1. Relativní přesnost stoupá s rostoucí koncentrací Al.

Závěr: Metoda vyhovuje (pro ≥ 2 mg Al/l). Vzhledem v podkapitole 5.4 stanovené mezi stanovitelnosti $QL > 3$ mg Al/l je asi správnější použít tuto vyšší hodnotu.

5.3 Linearita

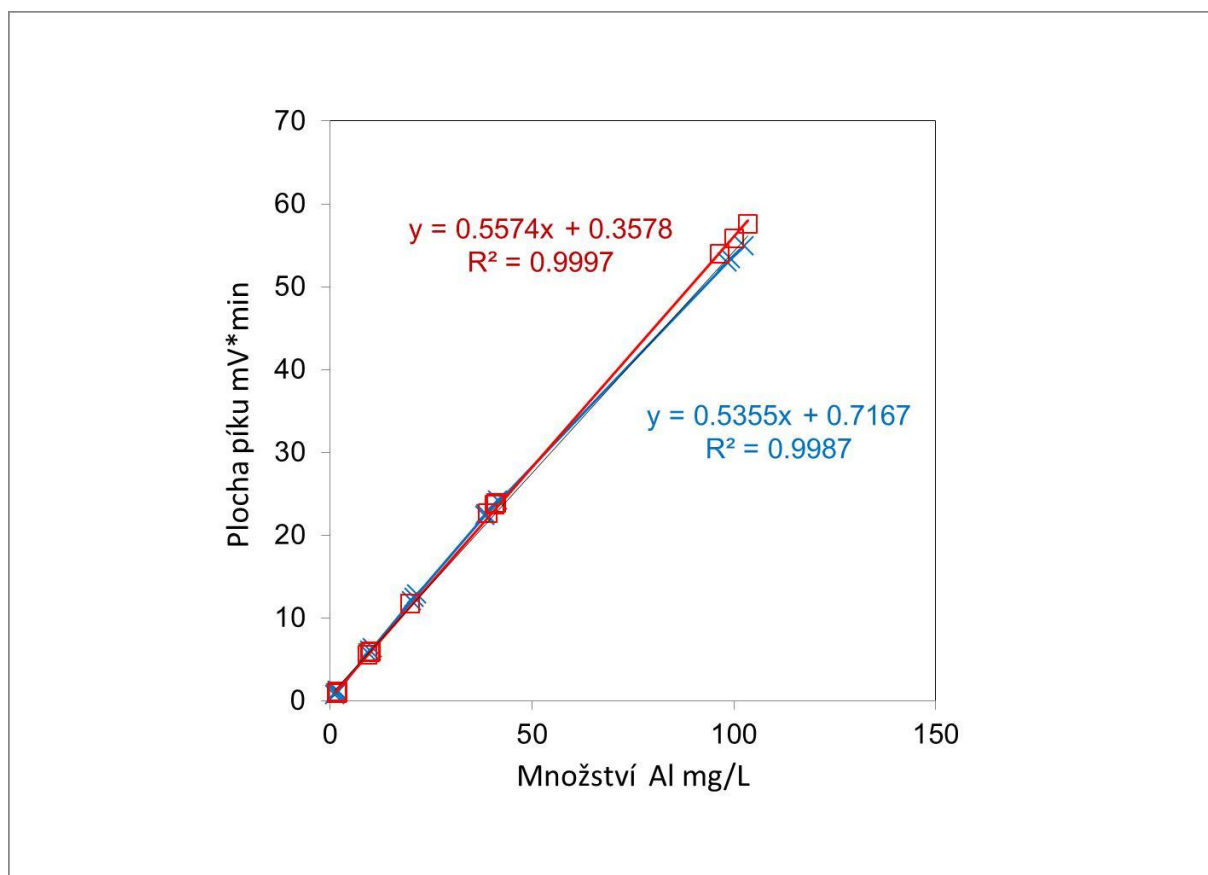
Linearita dat byla testována na 18 údajích v rozmezí 2-102 mg Al/l ve dvou nezávislých sériích. Otázka, zda je pro vyjádření koncentrace látky vhodnější plocha nebo výška píku, je diskutována v monografiích, O'Haver (2019) i na webových stránkách. Al-Rimawi (2017) a další preferují plochu píku a my jsme použili tuto metodu i zde. Naměřená data jsou uvedena v Tabulce 4.

Tabulka 4 Souhrn naměřených dat

Série 1			Série 2		
Množství mg/L Al ³⁺	Plocha mV*min Al ³⁺	Šum mV	Množství mg/L Al ³⁺	Plocha mV*min Al ³⁺	Šum mV
1,938	1,186	0,352	1,571	0,937	0,183
1,869	1,144	0,289	1,772	1,056	0,146
1,224	0,750	0,262	1,743	1,039	0,144
1,470	0,900	0,524	1,821	1,086	0,108
1,527	0,935	0,311	1,901	1,133	0,071
1,891	1,158	0,517	1,805	1,076	0,169
9,966	6,039	0,138	9,810	5,817	0,123
10,490	6,353	0,512	9,308	5,522	0,121
9,544	5,787	0,293	10,037	5,951	0,139
21,473	12,824	0,171	19,829	11,682	0,058
20,208	12,088	0,068	19,864	11,703	0,097
20,783	12,423	0,243	19,852	11,695	0,228
41,584	24,194	0,106	38,974	22,674	0,087
38,598	22,545	0,224	41,081	23,866	0,064
38,285	22,371	0,236	40,707	23,655	0,101
99,277	53,377	0,161	96,499	53,998	0,193
98,404	52,974	0,146	99,999	55,822	0,104
102,507	54,860	0,188	103,418	57,594	0,090

Lineární korelace je znázorněna a kalibrační grafy jsou uvedeny na Obrázku 20. Parametry přímky jsou pro první sérii $y = 0,5574x + 0,3578$ s kvadrátem korelačního koeficientu $R^2 = 0,9997$ ($R = 0,99984$). U druhé série platí $y = 0,5355x + 0,7167$ s kvadrátem korelačního koeficientu $R^2 = 0,9987$ ($R = 0,99935$). Hodnoty R odpovídají dobře požadované korelaci podle Donga (2006), jmenovitě $R = 0,999$. Přitom jsme splnili rovněž jeho požadavek měření v trojnásobném rozsahu nejnižší hodnoty.

Rovněž je splněna podmínka správné volby nulového bodu, tj. závislosti $y = a \cdot x$, protože hodnoty 0,3578 a 0,7167 leží pod limitem stanovitelnosti.

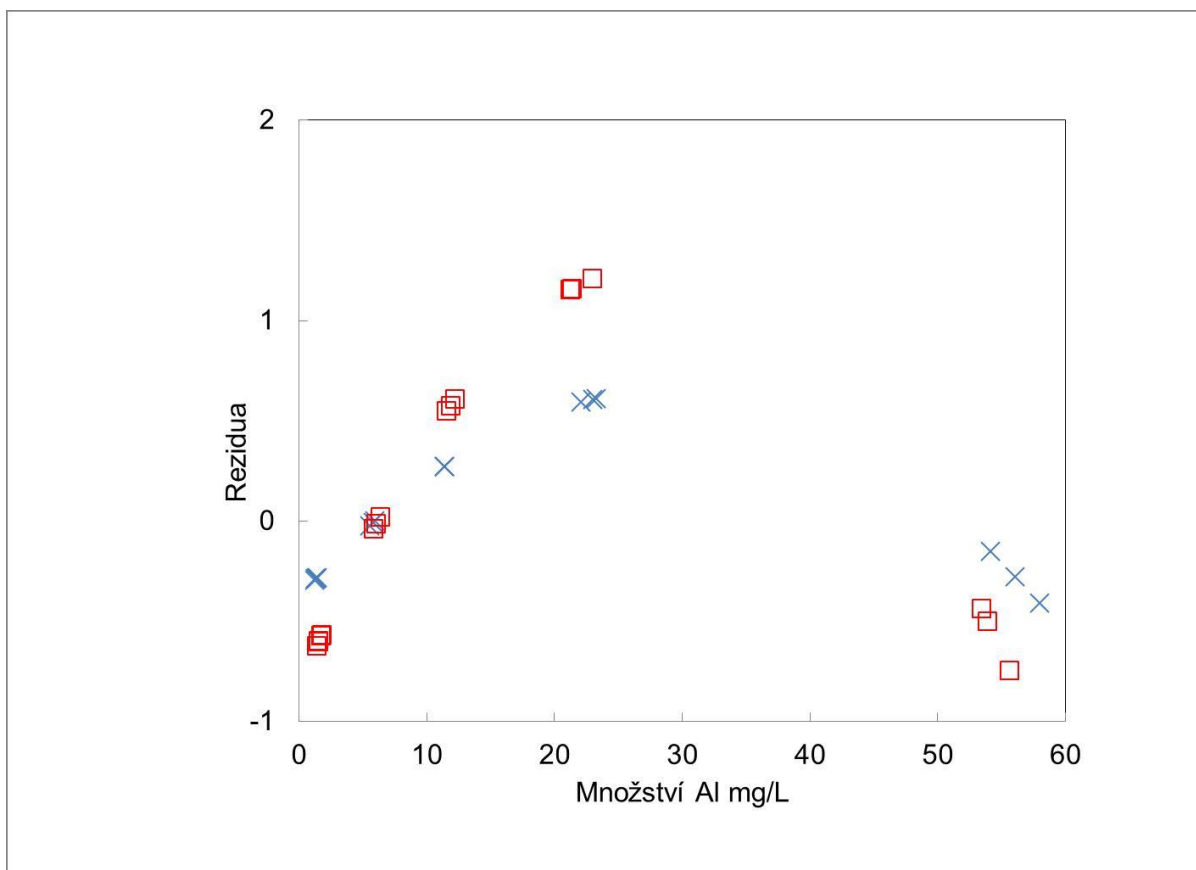


Obr. 20 Lineární korelace metodou nejmenších čtverců

I když se na první pohled kalibrační přímky jeví jako optimální (linearita, poloha nulového bodu), provedli jsme hlubší analýzu s použitím reziduí ($y_i - \hat{y}_i$), viz podkapitola 4.6.5. Ta byla vypočtena s použitím Excelu[®] postupem „data, analýza dat, regrese“. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 21.

Podle Ellisona et al. (2009) a jeho rozboru typických případů v podkapitole 4.6.5 je možno usoudit, že nedochází k systematickým trendům nesprávně určené nulové hodnoty nebo nárůstu chyby s koncentrací. Nejlépe je vyjádřen typ závislosti jako „zakřivená odezva“.

Výsledek: vyhovuje testu



Obr. 21 Rezidua ($y_i - \tilde{y}_i$) pro dvě série z Obr. 20

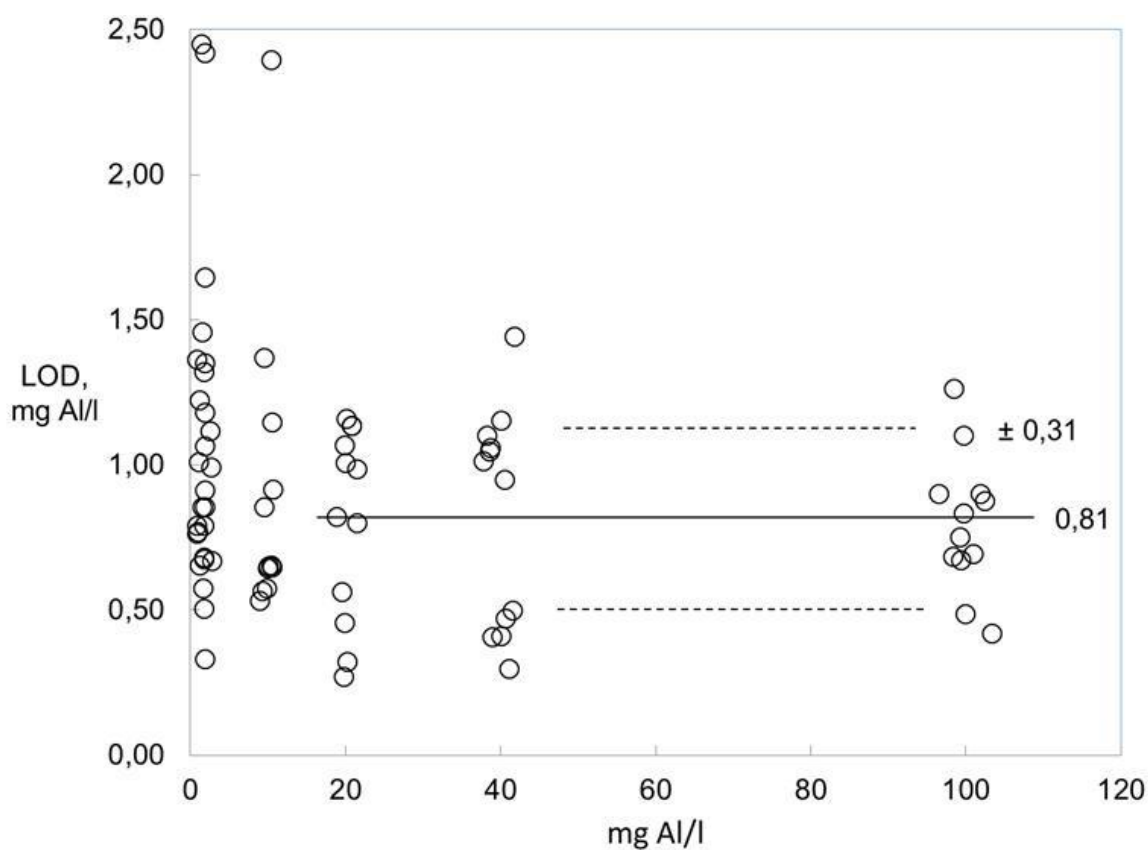
5.4 Mez detekce DL / Mez stanovitelnosti QL

Podle podkapitoly 4.6.3 jsou tyto meze určeny pro HPLC z údajů šumu tak, jak jsou uvedeny v Tabulce 4 a sklonu kalibrační přímky. Zde byly tyto hodnoty vypočteny metodou podle Kazusaki et al. (2012).

Průměrné hodnoty šumu jsou pro první sérii rovny $0,263 \pm 0,14$ a pro druhou sérii $0,124 \pm 0,05$. Tomu odpovídají meze detekce 1,56 a 0,76 mg Al/l a meze stanovitelnosti 4,72 a 2,31 mg Al/l pro 1. a 2. sérii.

V nezávislé sérii bylo měřeno celkem 75 bodů a mez detekce byla stanovena podle výše uvedeného postupu. Výsledky jsou přehledně uvedeny na Obrázku 22. Body pro koncentrace 1, 2 a 10 mg Al/l jsou zatíženy experimentální chybou, proto jsme počítali průměr a standardní odchylku jen pro body s 20, 40 a 100 mg Al/l.

Výsledná hodnota meze detekce je $0,81 \pm 0,31$ mg Al/l. Tento údaj je v perfektní shodě s referenční hodnotou LOD 0,8 mg/kg Al podle práce Mindak a Dolan (2010).

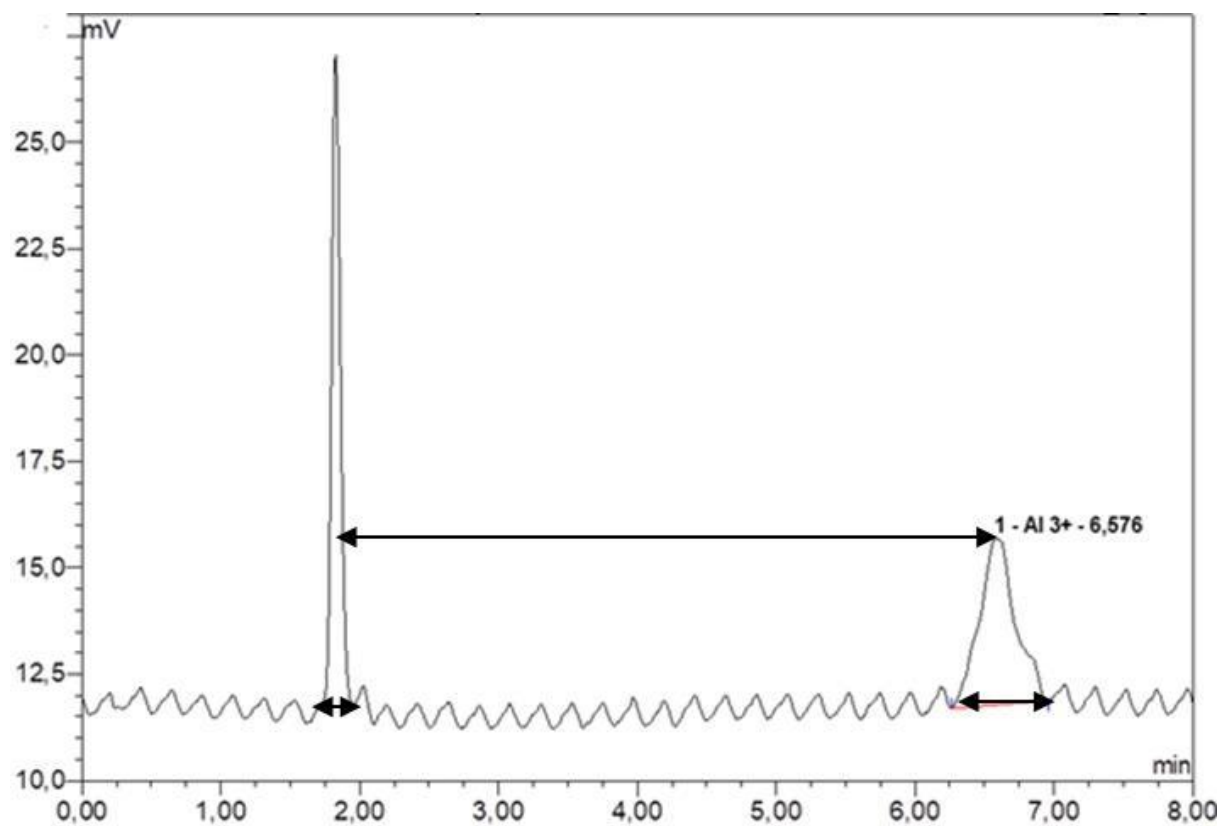


Obr. 22 Mez detekce pro soubor 75 bodů, pevná vodorovná přímka je výsledná hodnota LOD, čárkovanými přímkami je označena standardní odchylka naměřené LOD

Výsledek: vyhovuje testu, mez detekce je $0,81 \pm 0,31$ mg Al/l

5.5 Selektivita/Separace/Rozlišení

V našem případě je rozlišení piku Al^{3+} od méně valentních forem Al, Obrázek 23, perfektní. Podle výpočtu stanovená hodnota RS v podkapitole 4.6.7 dle vzorce 4.6.7.1 je pochopitelně velmi vysoká, $\text{RS} = 12,1$.

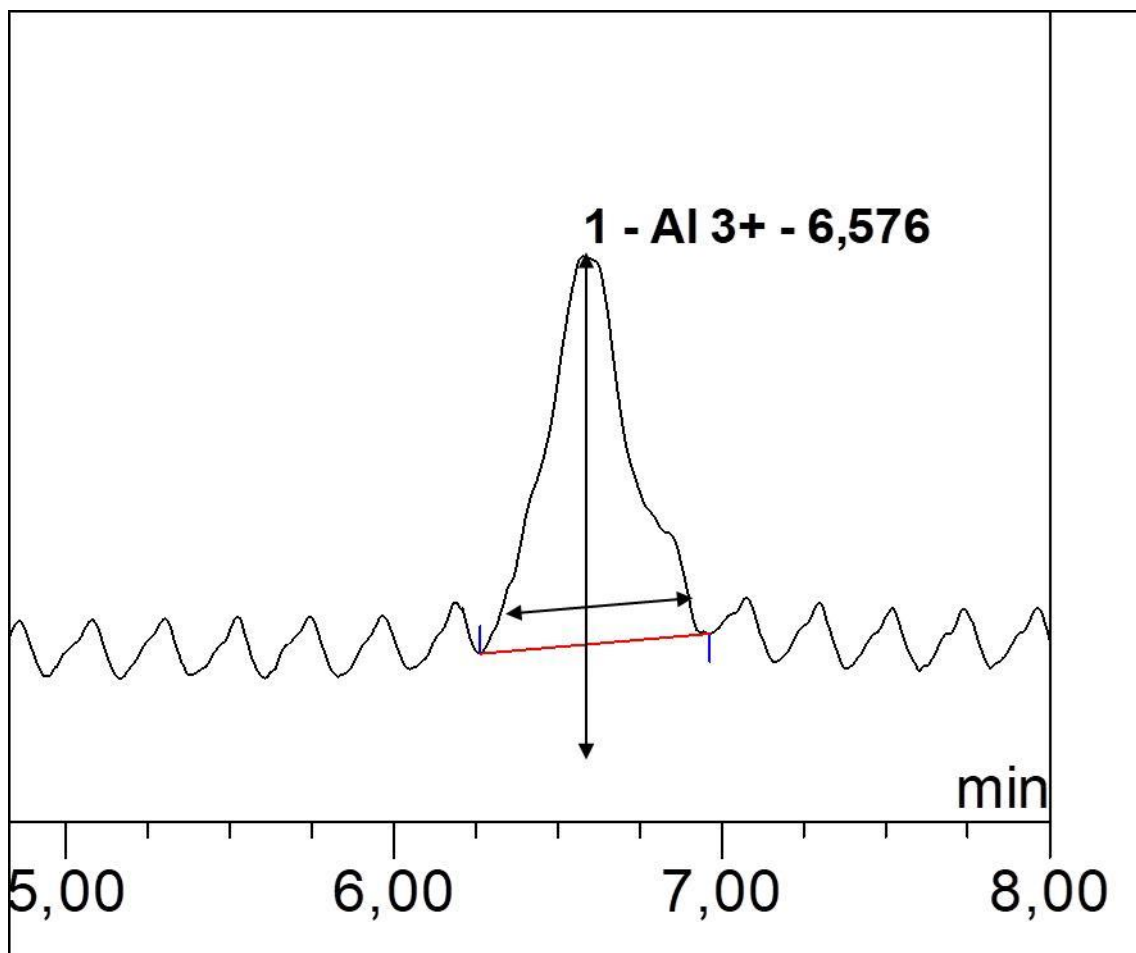


Obr. 23 Separace píkú Al^{3+} od méně valentních Al forem

Výsledek: vyhovuje testu

5.6 Asymetrie píku

Asymetrie Al^{3+} píku je zřejmá z Obrázku 24, viz také podkapitola 4.6.7.



Obr. 24 Asymetrie Al^{3+} píku

Podle výše uvedeného postupu je asymetrie A_s 1,05, což ještě zapadá do kritéria výborný (1 - 1,05). Asymetrie se podstatně nemění v rozsahu měřených koncentrací Al, viz Vodičková (2017).

Výsledek: vyhovuje testu

5.7 Reálné vzorky

Výše uvedený text zabývající se validací analytické metody IC pro stanovení Al se omezuje na nejjednodušší případ stanovení v modelových syntetických roztocích obsahujících pouze Al v různých koncentracích. Jakkoliv je potvrzení validace pro čisté roztoky Al bez dalších příměsí důležité, v praktických případech stanovení Al v půdách různého původu je situace komplikovaná vlivem dalších složek, zejména jiných kationtů, organické hmoty a pH extraktů. Jen částečně byla tato problematika naznačena v kapitole 4.

Vzorky, které jsou v této práci předkládány, byly měřeny naší validovanou metodou na téže přístroji, na kterém byla validace metody prováděna. Původ vzorků pochází z rekultivované výsypky po hnědouhelné těžbě Lítov podle Borůvka a Kozák (2001) odebraných znovu v roce 2018.

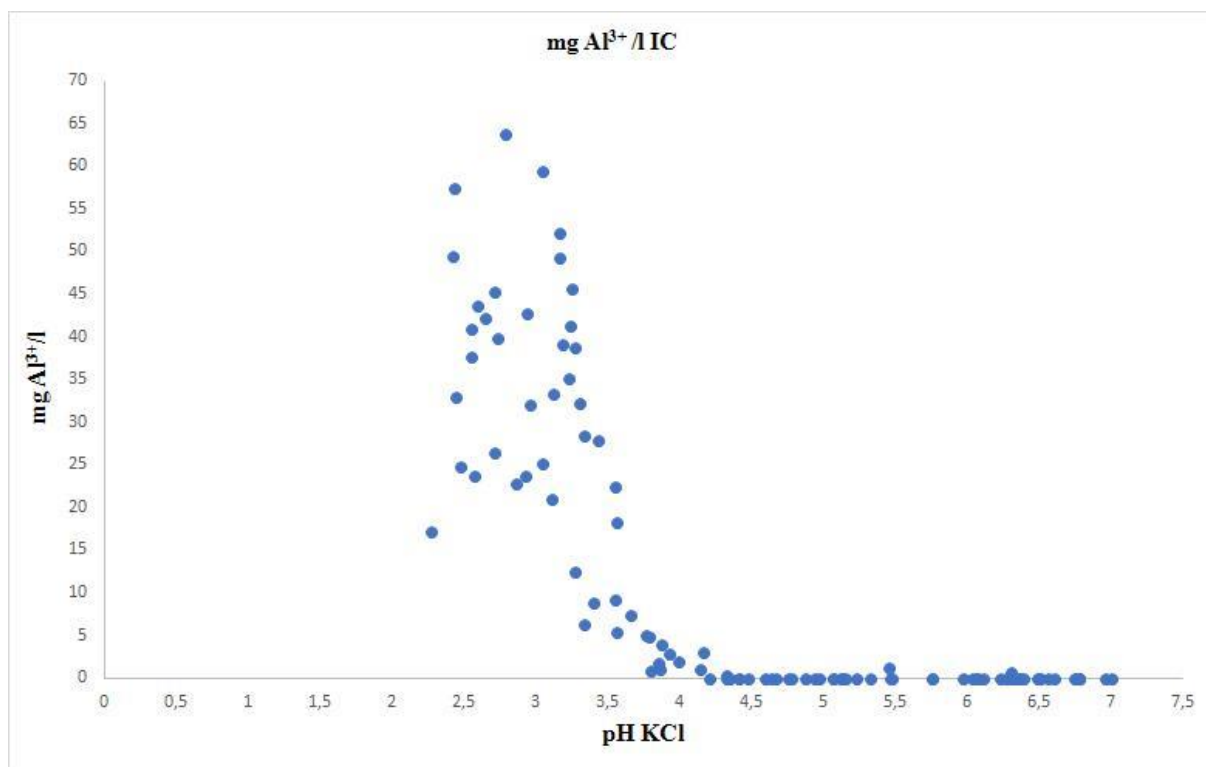
Opakovaný odběr byl proveden znovu na jaře 2018 tak, aby bylo možné zjistit vývoj půdních charakteristik na zkoumané lokalitě.

Výsypka Lítov leží v severozápadních Čechách poblíž Sokolova a byla využívána hlavně v letech 1991-2001 převážně pro překryvné materiály hnědého uhlí. Hlavní složky jsou tvořeny jíly s příměsemi minerálů skupiny pyritů a částicemi hnědého uhlí. Část lokality byla osázena borovicemi a olšemi. Malá plocha byla bažinatá, horní vrstva byla smísená s horní přirozenou vrstvou nebo ponechána bez mísení. Zbytek povrchu nebyl měněn.

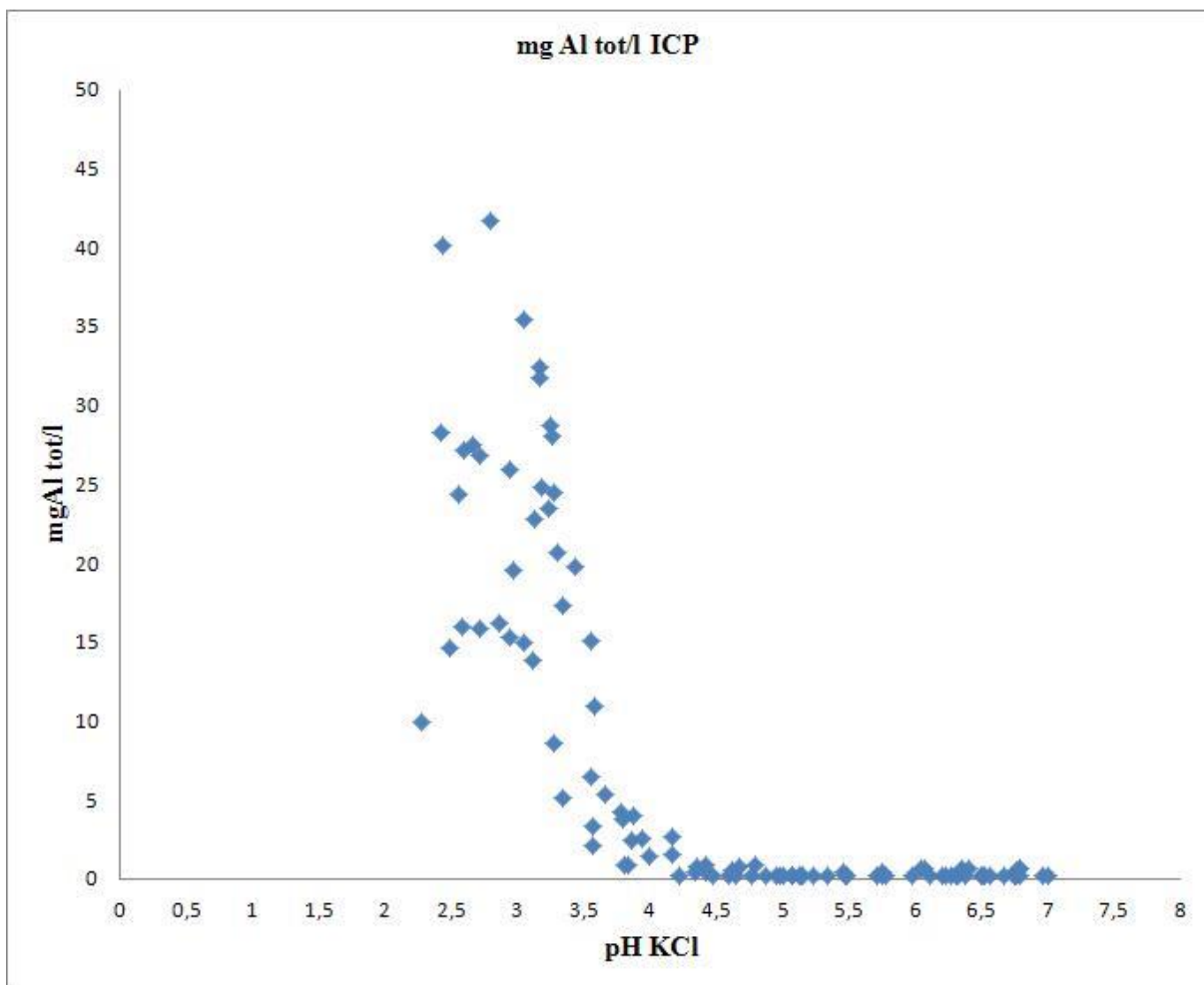
Celková plocha měřené oblasti byla 1,1 km². Vzorky byly odebírány z regulární sítě 100×100 m z hloubky 0-20 cm. Vzorky byly usušeny na vzduchu a přesítovány sítím 2 mm.

Původní labilní Al frakce (Al_{lab}) byla stanovena v 1M KCl extraktu. Směs 10 ml a 1 g vzorku byla protřepávána po dobu 24 hodin a následně centrifugována. Po té byl hliník stanoven metodou navrženou Jamesem (1983) tj. reakcí s 8-hydroxyquinolinem a spektrofotometrickým stanovením. Vybavení (dávkovače, reakční zkumavky a parotěsná uzavíratelná UV-VIS cela) již nejsou ve výbavě KPOP, proto bylo uvažováno nahradit měření labilního hliníku dle Jamese měřením Al³⁺ podle Drábka (2003, 2005) modifikovaném dle bakalářské práce Vodičkové (2017).

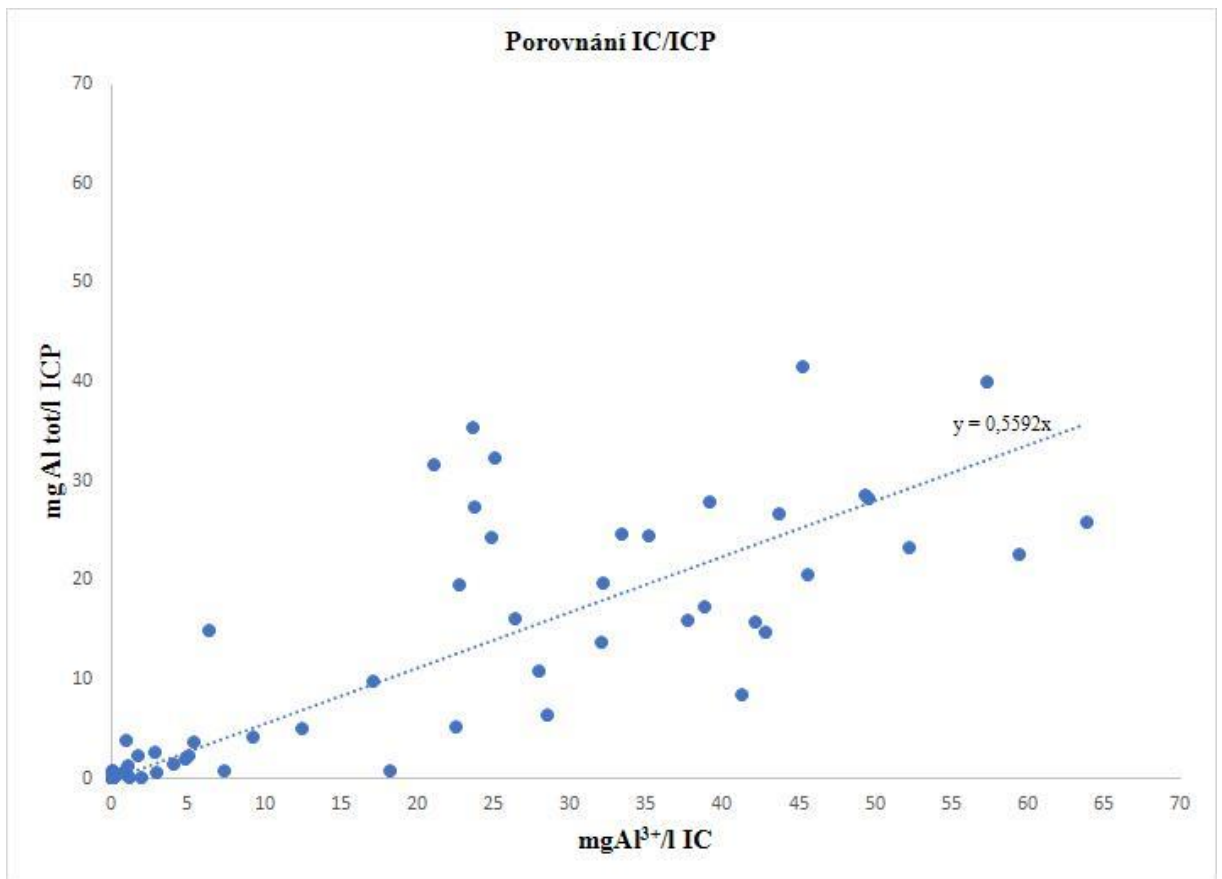
Následující obrázky udávají porovnání dvou metod měření obsahu hliníku. Obsah Al³⁺ byl stanoven IC metodou, Obrázek 24 dokládá závislost obsahu (Al³⁺/mg/l) na pH_{KCl} stanoveného metodou IC. Na následujícím Obrázku 25 je vidět závislost obsahu (Al tot. mg/l) na pH_{KCl} stanoveného metodou ICP. Poslední Obrázek 26 je věnován srovnání metod IC a ICP.



Obr. 25 Závislost obsahu obsahu Al³⁺ mg/l na pH KCl (metoda IC)



Obr. 26 Závislost obsahu Al tot. mg/l na pH KCl (metoda ICP)

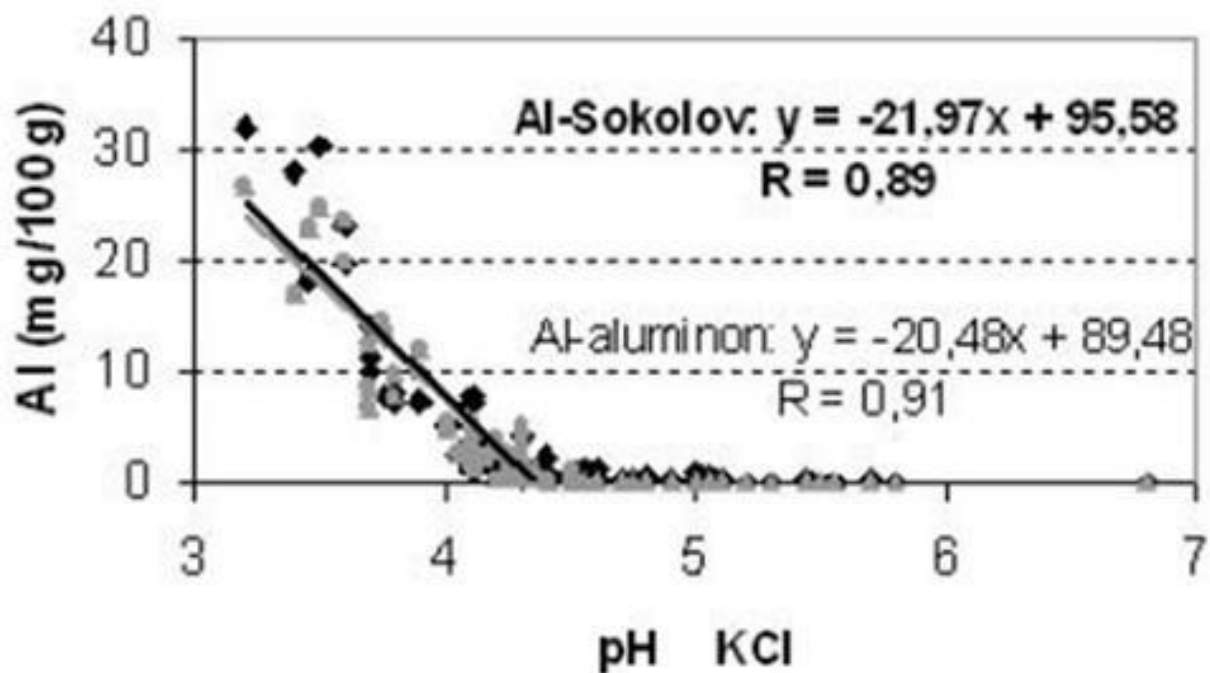


Obr. 27 Porovnání IC s ICP

Z obrázků je zřejmé, že ve všech případech dochází při snížení pH pod hodnotu 4 k prudkému nárůstu hodnot rozpustnosti Al. Formace neutrálního a nerozpustného $\text{Al}(\text{OH})_3$ se uplatňuje při pH vyšším než 5 viz Gregory & Duan (2001), nicméně se zvyšujícím se pH roste i rozmanitost Al specií a klesá množství labilního hliníku.

https://www.amazon.com/Chemistry-Soils-Garrison-Sposito/dp/0195313690#reader_0195313690

Podobný průběh byl zjištěn i v jiných studiích, např. Mrvić et al. (2008), viz jejich obrázek, Obrázek 28.



Obr. 28 Závislost uvolněného Al na pH (1M KCl) a Al stanoveného aluminonem, jedná se o Obrázek 2 z práce Mrvić et al. (2008), černé a šedé body označují metodu analýzy, jak je uvedeno v obrázku

Podle Hussona (2013) hraje při Al speciaci hlavní roli pro kyselost půdy. Molekuly vody se vážou na Al ionty za formace $\text{Al}(\text{OH}_2)^{3+}_6$ iontů a tak umožňují disociaci vody s produkcí protonů. Jeden Al^{3+} může uvolnit až tři H^+ .

6 Diskuze

Původním cílem této práce bylo upřesnění speciálních charakteristik hliníku v půdních prostředích, dále validace použitých metod a návrh dalších postupů stanovení a speciace Al, tak jak to vyplývalo z bakalářské práce autorky, s cílem testovat použitelnost nové chromatografické kolony CS 5 DIONEX 4*250 mm pro analýzu forem hliníku. Jako pracovní hypotéza bakalářské práce byl použit předpoklad, že je možné adaptovat stávající chromatografickou metodu pro speciaci hliníku na nový typ iontové kolony (Vodičková 2017). V diplomové práci bylo experimentálním cílem ověření speciace Al pomocí IC. Zatímco úkoly spojené se zpracováním literárních dat byly splněny, praktická část byla omezena vzhledem k omezením daným přístrojovým zařízením.

Použitá chromatografická sestava (5.1.2 Použitá zařízení a postupy) byla z větší části pořízena v roce 2005, s výjimkou automatického dávkovače Triathlon (Sparks) z roku 1997. Bohužel dlouhodobě bezporuchová sestava zaznamenala během tvorby diplomové práce tři fatální kolapsy. Nejprve se neopravitelně porouchala původně používaná chromatografická pumpa (ICS 1000, (Dionex)), která však byla bez větších potíží nahrazena pumpou GP 50. Vzápětí nato se neopravitelně porouchal detektor diodového pole PDA 100 (Dionex). Tento detektor byl s drobnou komplikací nahrazen starším a méně citlivým detektorem UVD 200 (Watrex). Z detektoru UVD 200 bylo třeba odpojit regulátor zpětného tlaku. Jeho použití znemožňovalo dodávku derivatizačního činidla Tiron. Toto činidlo se dodává pomocí pneumatického dávkovače RDU 10 (Dionex), pro který byl nastavený zpětný tlak příliš vysoký. Odpojení regulátoru zpětného tlaku sice umožnilo dodat derivatizační činidlo do směšovacího „T“ kusu, nicméně mělo další neblahý následek na stabilitu systému. Bez zvýšeného zpětného tlaku docházelo k častému „vypadávání“ - tvorbě bublin v měřící cele detektoru UVD 200. To vedlo k nestabilitě chromatografické základní linie „baseline“ a častému přerušení měření, kdy bylo nutné měřicí sekvenci ukončit. Cela pak byla od vzdušněna propláchnutím 50% acetonitrem ve vodě. Po zrovnovážení systému bylo možné pokračovat v měření, ale vždy s novou kalibrací. Spolu s poruchou detektoru se porouchal i automatický dávkovač vzorků Triathlon. Systém se dodnes nepodařilo plně a spolehlivě zprovoznit. Zprvu se systém zasekával po několika vzorcích a je třeba jej vypnout, znovu zapnout a mechanicky uvolnit zaseklý pojezd dávkovací jehly. Proto není možné automatické měření větších sekvencí. Za druhé systém přestal dávkovat. Nejprve nedávkoval vůbec, nicméně po několika servisních zákrocích dvou rozdílných firem, byl přístroj uveden do nouzového režimu, kdy reprodukovatelně dávkuje jeden fixní objem 25 μ l. Nicméně, původně systém umožňoval volitelné dávkování objemů v rozmezí 0,1-150 μ l.

Protože použitá IC sestava vykazuje značné fyzické i morální opotřebení, a protože byla již ukončena výroba náhradních dílů, uvažuje se o nahrazení jinou v současné době dostupnou chromatografickou sestavou, která by umožňovala postkolonovou derivatizaci, nebo on-line připojení k ICP-OES iCap 7000 (Thermo), viz Thermo Scientific (2013).

V oblasti validace metody nebylo provedeno stanovení robustnosti systému, podkapitola 4.6.8. Pro určení robustnosti je potřeba dlouhodobé pozorování změny podmínek, např. detektoru teploty, složení mobilní fáze, koncentrace derivatizačního činidla, případně posouzení mezilaboratorní shody výsledků.

Z časových důvodů (dlouhodobá nefunkčnost chromatografické sestavy) nebylo možno tento parametr spolehlivě testovat a následně vyhodnotit.

V části 5.7 „Reálné vzorky“ jsme očekávali potvrzení shodného nálezu koncentrace Al dvěma analytickými postupy pro vzorky identického původu. Celkový (ICP-OES) se očekával vyšší než Al^{3+} (IC), protože k němu se ještě přičítají další rektivní i nereaktivní komplexy viz Vodičková (2017). Nicméně, experimentálně byl ale nalezen nižší celkový výměnný (Drábek et al 2003a 2005) obsah Al stanovený metodou ICP-OES než byl obsah výměnný Al^{3+} podle metody IC. Tento paradoxní závěr ukazuje, že buď měřené hodnoty Al^{3+} podle metody IC jsou nesprávně vyšší než Al_{tot} , nebo naopak že metoda ICP-OES dává nesprávně nižší hodnoty Al_{tot} než jsou ve skutečnosti.

První varianta by mohla být, že by se s Al^{3+} koeluoval další trivalentní kation jako např. Mn^{3+} a Fe^{3+} . Tyto interference nebylo možné prověřit. Prověřovaly se s negativním výsledkem jen v první metodě (Drábek 2003), teď by bylo na místě udělat sérii experimentů, kde by se použily blanky, standardy a reálné vzorky „spikované“ různými koncentracemi nejen Fe^{3+} , Mn^{3+} , ale i dalšími možnými interferenty např. Cr^{3+} , ale i jinými kationty běžně se vyskytujícími v půdním KCl extraktu. Nicméně to z hlediska funkčnosti přístroje nebylo stíhnutelné a také proto, že se systém bude obměňovat, tak je výhodnější provést zmíněné experimenty až na novém zařízení.

Druhá varianta je podle literárních údajů možná pravděpodobnější. Podle Mindaka a Dolana (2010) je pro kvantitativní převod vzorku do měřitelné formy pomocí ICP-OES nutné zpracovat vzorek mikrovlnným rozkladem a následně použít pneumatickou nebulizaci. I při provedení těchto postupů může být obsah Al falešně nižší zejména za přítomnosti křemíku („It should be noted that aluminum results could be biased low in some samples because of insoluble aluminum compounds especially if silica is present“). Autoři měřili obsah toxických elementů (mimo další i Al) v potravinových maticích jako je mléko, sýr, šunka, tuňák, vajíčka a další. Je možno předpokládat, že v půdních maticích proměnlivého složení komponent bude situace ještě složitější.

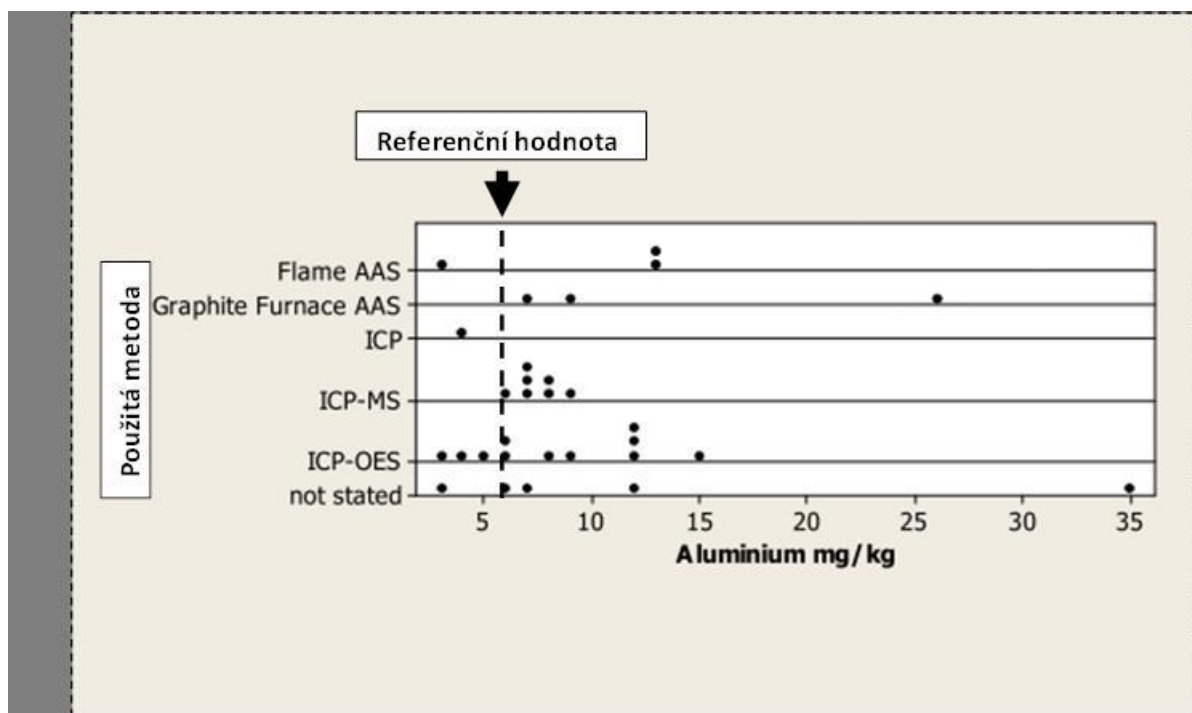
Další data pro stanovení Al v potravinových maticích jsou obsažena v databázi FAPAS[®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme). Srovnání mezilaboratorních výsledků pro stanovení Al v sojové mouce je uvedeno ve FAPAS[®] 0787 Proficiency Test, (Earnshaw et al. 2008).

Výsledky mezilaboratorních testů jsou uvedeny na Obr. 29. Z obrázku je vidět značná variabilita výsledků. Podle nejspolehlivější metody ICP-MS je průměrná naměřená hodnota 7,22 mg Al/kg. ICP-OES je méně spolehlivá metoda s rozsahem Al koncentrací 2-15 mg Al/kg. Z těchto výsledků je možný rozptyl výsledků jednotlivých měřících postupů poměrně vysoký a tento fakt by se měl odrazit i v analýze reálných půdních vzorků.

Obecně se metoda IC jeví jako spolehlivější z toho hlediska, že existence píků podle předpokladu odpovídá individuálním komponentám, zvláště při kombinaci s specifickou detekcí či detekcí umožňující další separaci analytů – např. IC-ICP-MS Seubert A (2001). Nicméně stále hrozí možná koeluce interferujících kationtů. Nicméně ta se dá vyloučit na základě podrobného testování a použití ICP-MS detekce - viz výše.

Pro půdní vzorky bylo například provedeno srovnání tří technik v práci Kožuh et al. (1997), Milačič et al. (1998). Jako základ použili metodu HPLC kombinovanou s ICP-OES, dále použili chelatační iontovýmennou mikrokolonu s AAS a jako třetí krok 8-hydroxychinolinovou spektrofotometrii. Podle autorů kombinace těchto tří technik umožňuje stanovení všech základních forem Al v půdních vzorcích.

Autoři stanovili celkový obsah Al pomocí ICP-OES po $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$ digesci (varianta rovnocenná mikrovlnnému rozkladu). Podle autorů je možno tímto postupem stanovit Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. AlF_2^+ koeluuje s $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, zatímco $\text{Al}(\text{SO}_4)^+$, AlF_2^+ a záporně nabitě Al organické komplexy koelují s $\text{Al}(\text{OH})_2^+$.



Obr. 29 Upraveno na základě Obrázku 4: Methods used for Aluminium Analysis in FAPAS® 0787 Proficiency Test, Earnshaw et al. (2008).

Nověji byla speciace hliníku studována kombinací metod GF-AAS, ICP-AES, ICP-MS a modelování anorganických komplexů studována v práci Frankowski et al. (2011). Jednalo se o specifický případ podzemních vod v okolí Poznaně a autoři použili Mineql+ program. Studium potvrdilo výskyt hydroxo- a fluoridových komplexů. Navzdory nadbytku síranů a organické hmoty ve vzorcích, jejich zastoupení v komplexech nebylo významné.

K podobnému závěru prevalence fluoridových komplexů došli autoři nedávné práce Ziola-Frankowska et al. (2018). Autoři použili k analýze vysoce účinnou iontovou chromatografii s detekcí pomocí diodového pole (High Performance Ion Chromatography with Diode Array Detection (HPIC-DAD)).

HPLC ICP-MS metoda byla úspěšně použita také v práci Ziola-Frankowska et al. (2015). Autoři konstatují závěrem článku, že tato metoda s použitím post-column derivatizací je výhodná pro stanovení volného Al a Al fluoridových komplexů. Metoda zabraňuje zhášení plazmy v ICP-MS spektrometru a doba analýzy vzorku je méně než 4 minuty.

Na základě těchto poznatků si dovolejeme navrhnout pořízení nového IC umožňujícího jednak klasický přístup ve formě DAD (detektor diodového pole) detekcí - po příslušné postoklonové derivatizaci, tak i on-line připojení ke stávající technice ICP-OES iCAP 7000 (Thermo), viz Thermo Scientific (2013).

Ze získaných výsledků je možno navrhnout další postup experimentálních prací na novém zařízení:

- Zjistit zda při eluci Al^{3+} nedochází ke kontaminaci píku současným vymýváním dalších kationtů jako Fe^{3+} nebo Mn^{3+} .
- Zjistit jak předběžná úprava vzorků směsí kyselin ovlivňuje stanovenou hodnotu Al_{tot} při ICP-OES analýze, použití referenčních materiálů pro zajištění kvality analytických výsledků.
- Zjistit robustnost procesu, tj. jeho změny za podmínek změn např. detektoru, teploty, složení mobilní fáze, koncentrace derivatizačního činidla atd.

7 Závěr

- V předkládané diplomové práci byla studována speciace hliníku s ohledem na kyselé a neutrální půdy. Za tím účelem byl koncipován přehled konstant stability jednotlivých forem Al s nejběžnějšími ligandy za použití více než dvanácti originálních a přehledných publikací a výsledky byly kriticky vyhodnoceny.
- V druhé části práce byla uvedena podle literatury zjištěná kritéria pro validaci procesu založených na IC.
- V oblasti validace bylo zjištěno, že analytické stanovení Al^{3+} metodou IC splňuje požadavky na přesnost, linearitu, mez detekce, selektivitu a asymetrii píku a to v následujících parametrech:
 - Přesnost nalezena lepší než 6 % RSD (relativní směrodatná odchylka) pro > 10 mg Al/l, požadováno ve farmacii < 15 %
 - Linearita kalibrační přímky dána korelačním koeficientem $R = 0,99984$ nebo $R = 0,99935$, požadováno $R = 0,999$ nebo lepší
 - Nebyl nalezen žádný významný společný trend odchylek bodů
 - Mez detekce $0,81 \pm 0,31$ mg Al/
 - Selektivita, separace píků je vyšší než $RS = 12,1$, požadována ideální minimální hodnota je 1,5-2
 - Asymetrie píku byla $A_S = 1,05$, hodnoty 1-1,05 jsou považovány za výborné.
- V průběhu prací byl nalezen paradoxní výsledek při studiu reálných vzorků, a to že metodou ICP-OES, která by měla udat celkovou koncentraci Al, poskytla nižší výsledky než metoda IC, zaměřená převážně na Al^{3+} . Možné příčiny byly diskutovány.
- Během práce jsme se potýkali s dlouhodobou nefunkčností přístroje – IC sestavy. Z tohoto důvodu nebyly všechny problémy uspokojivě experimentálně vyřešeny.

8 Literatura

- Aglan RF, Mohamed GG, Mohamed HA. 2012. Determination of Aluminum (III) by Using a Modified Carbon Paste Selective Electrode. *Journal of Pharmacy Research* **5**:4748-4754.
- Ahmed MJ, Hoque MR, Khan ASMSH, Bhattacharjee C. 2010. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Aluminum in Some Environmental, Biological, Soil and Pharmaceutical Samples Using 2-Hydroxynaphthaldehydebenzoylhydrazone. *Eurasian J. Anal. Chemistry* **5**:1-15.
- Auxtero E a Madeira M. 2011. Extractability of Aluminium And Forms In Solution of Soils Derived From Granite in Portugal, *Revista de Ciencias Agrarias* **34**:65-79.
- Barnes RB. 1975. The Determination of Specific Forms of Aluminum in Natural Water. *Chemical Geology* **15**:177-191.
- Bertsch PM, Anderson MA. 1989. Speciation of Aluminum in Aqueous Solutions Using Ion Chromatography. *Anal. Chemistry* **61**:535-539.
- Bertsch PM. 1990. The hydrolytic products of aluminum and their biological significance. *Environmental Geochemistry and Health*. **12**:7-14.
- Bi S, Yang X, Zhang F, Wang X, Zou G. 2001. Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples - a review. *Fresenius J. Anal. Chemistry* **370**:984-996.
- Blamey FPC, Edwards DG, Asher CJ. 1983. Effects of Aluminium OH:Al and P:Al Molar Ratios and Ionic Strength on Soybean Root Elongation in Solution Culture. *Soil Science* **136**:197-207.
- Blanc P, Piantone P, Lassin A, Bumol A. 2006. Thermochimie: Sélection de constantes thermodynamiques pour les éléments majeurs, le plomb et le cadmium. ANDRA. Available from http://www.mkg.se/uploads/Arende_SSM2011_2426/SSM20112426_049_Ytterligare_Svar_till_SSM_pa_begaran_angaende_fortydligande_information_om_loslighetsberakningar_bilaga_3.pdf (accessed October 2018).
- Bloom PR, Erich MS. 1996. The Quantitation of Aqueous Aluminum. *The Environmental Chemistry of Aluminum*. Edited by Sposito G. Lewis Publishers, CRC Press LLC, Boca Raton.
- Bondy SC. 2010. The Neurotoxicity of Environmental Aluminum is Still an Issue. *NeuroToxicology* **31**:575-581.
- Borůvka L, Kozák J. 2001. *Geostatistical Investigation of a Reclaimed Dumpsite Soil with Emphasis on Aluminum*, *Soil & Tillage Research* **59**:115-126.
- Boudot JP, Becquer T, Merlot D, Rouiller J. 1993. Aluminium Toxicity in Declining Forests: A General Overview with a Seasonal Assessment in a Silver Fir Forest in The Vosges Mountains. *Annales des Sciences Forestieres* **51**:27-51.

- Clarke N, Danielsson LG, Sparén A. 1996. Analytical Methodology for the Determination of Aluminium Fractions in Natural Fresh Waters. *Pure and Applied Chemistry* **68**:1597-1638.
- Casey WH, Phillips BL, Furrer G. 2001. Aqueous Aluminum Polynuclear Complexes and Nanoclusters. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **44**:167-190.
- De la Fuente-Martínez JM, Herrera-Estrella L. 1999. Advances in the understanding of aluminum toxicity and the development of aluminum-tolerant transgenic plants. *Advances in Agronomy* **66**:103-120.
- Derome K, Derome J, Lindroos AJ. 1998. Techniques for Preserving and Determining Aluminium Fractions in Soil Solution from Podzolic Forest Soils. *Chemosphere* **36**:1143-1148.
- Drabek O, Boruvka L, Mladkova L, Kocarek M. 2003. Possible method of aluminium speciation in forest soils. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**:8-15.
- Drábek O, Kiplagat IK, Komárek M, Tejnecký V, Borůvka L. 2015. Study of Interactions between Relevant Organic Acids and Aluminium in Model Solutions Using HPLC and IC. *Soil & Water Res* **10**:172-180.
- Driscoll CT. 1984. A Procedure for the Fractionation of Aqueous Al in Dilute Acidic Waters. *Journal Envir. Anal. Chemistry* **16**:267.
- Driscoll CT, Schecher WD. 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environmental Geochemistry and Health* **12**:28-49.
- Earnshaw A, Prenton L, Owen L. 2008. Aluminium Analysis - A Proficiency Testing Study, Conference Proceedings, 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology "Innovations for Food Science and Production" "FOODBALT-2008", April 17-18, 2008, Jelgava, Latvia. Available from <http://lufb.llu.lv/conference/foodbalt/2008/Foodbalt-Proceedings-2008-130-133.pdf> (accessed April 2019).
- Exley 2016. The Toxicity Of Aluminium In Humans, *Morphologie* **100**:51-55.
- Fairman B, Sanz-Medel A. 1995. Determination of aluminium species in natural waters, Quality Assurance for Environmental Analysis. (eds. Quevauviller, Maier, Griepink). Elsevier Science b.v., Amsterdam.
- Frankowski M, Ziola-Frankowska A, Kurzyca I, Novotný K, Vaculovič T, Kanický V, Siepak M, Siepak J. 2011. Determination of Aluminium in Groundwater Samples by GF-AAS, ICP-AES, ICP-MS and Modelling of Inorganic Aluminium Complexes, *Environ Monit Assess* **182**:71-84
- Frant MS, Ross JW. Jr. 1966. Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution. *Science* **154**:1553-1554.
- Gensemer RW, Playle RC. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments, *Critical Reviews in Environmental. Science and Technology* **29**:315-450.

- Gregory J, Duan J. 2001. Hydrolyzing metal salts as coagulants. *Pure Applied Chemistry* **73**:2017-2026.
- Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, Zecca LRM, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha KS. 2005. Aluminium in Alzheimer's disease are we still at a crossroad? *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**:143-158.
- Gustafsson JP. 2018. Visual MINTEQ version 3.1. Available from <https://vminteq.lwr.kth.se/download/> (accessed November 2018).
- Hara H, Kobayashi H, Maeda M, Ueno A, Kobayashi Y. 2001. Speciation of Aluminum in Rainwater Using a Fluoride Ion-Selective Electrode and Ion-Exchange Chromatography with Fluorometric Detection of the Aluminum-Lumogallion Complex. *Anal. Chemistry* **73**:5590-5595.
- Hashimoto I, Jackson ML. 1960. Rapid dissolution of allophane and kaolinite–halloysite after dehydration. *Clays Clay Minerals* **7**:102-113.
- Hayden PL, Rubin AJ. 1974. Ann Arbor Science Publishers. Pages 317–381. Systematic investigation of the hydrolysis and precipitation of aluminum (III). In *Aqueous Environmental Chemistry of Metals*, Michigan.
- Heena Kumar HJ, Rani S, Malik AK. 2015. Development of a Rapid and Sensitive Method for the Determination of Aluminum by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using a Fluorescence Detector. *Journal of Chromatographic Science* **53**:800-806.
- Hendershot WH, Duquette M. 1986. A simple barium chloride method for determining cation exchange capacity and exchangeable cations. *Soil Sci. Soc. Am. Journal* **50**:605-608.
- Holmgren GGS. 1967. A rapid citrate dithionite extractable iron procedure. *Soil Sci. Soc. Am. Proceedings* **31**:210-211.
- Hsu NV. 1963. Effect of Initial pH, Phosphate and Silicate on the Determination of Aluminium with Aluminon. *Soil Science* **96**:230-238.
- Hubová P, Tejnecký V, Ash Ch, Borůvka L, Drábek O. 2017. Low-Molecular-Mass Organic Acids in the Forest Soil Environment, *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **14**:75-84.
- Husson O. 2013. Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy, *Plant Soil* **362**:389-417
- James BR, Clark CJ, Riha SJ. 1983. *An 8-hydroxyquinoline method for labile and total aluminum in soil extracts*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**:893-897.
- Jou ASR, Kamprath EJ. 1979. Copper chloride as an extractant for estimating the potentially reactive aluminum pool in acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. Journal* **43**:35-38.
- Kim SD, Lee DH, Kim JS. 2008. Fluorescence Spectrometric Determination of Aluminum(III) Ion in Water Using 4-Chloro-2-phenyliminomethylphenol. *Bull. Korean Chem. Society* **29**:245-248.

- Klotz K, Weistenhöfer Neff F, Hartwig A, van Thriel C, Drexler H. 2017. The Health Effects of Aluminum Exposure, *Dtsch Arztebl Int* **114**:653-659.
- Kožuh N, Milačić R, Gorenc B, Abollino O a Sarzanini C. 1997. Speciation of Aluminium in Environmental Water Samples Employing Microcolumn Chelating Ion-Exchange Chromatography - ETAAS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **67**:1-4, 27-40.
- Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz, AM, Rondeau V. 2007. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. Critical Reviews* **10**:1-269.
- Lalande H, Hendershot H. 1986. Aluminum Speciation in Some Synthetic Systems: Comparison of the Fast-Oxine, pH 5.6 Extraction and Dialysis Methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sciences* **43**:231-34.
- Lambert J, Buddrus J, Burba P. 1995. Evaluation of Conditional Stability Constants of Dissolved Aluminum Humic Substance Complexes by Means of ²⁷Al Nuclear Magnetic Resonance. *Fresenius J. Anal. Chemistry* **351**:83-87.
- Larssen T, Vogt RD, Seip HM, Furuberg G, Liao B, Xiao J, Xiong J. 1999. Mechanisms for aluminum release in Chinese acid forest soils. *Geoderma* **91**:65-86.
- LaZerte, BD. 1984. Forms of Aqueous Aluminum in Acidified Catchments of Central Ontario: A Methodological Analysis. *Can. I. Fish. Aquat. Sciences* **41**:766-776.
- Lian H, Kang Y, Bi S, Arkin Y, Shao D, Li D, Chen Y, Dai L, Tian L. 2004. Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Talanta* **62**:43-50.
- Liu XL, Yuan R, Xu WJ, Ma YH, Chai YQ. 2011. Aluminum(III)-selective PVC Membrane Electrode Based on Salicylaldehyde Salicyloyl Hydrazone. *Journal of the Chinese Chemical Society* **58**:482-487.
- Marešová V. 2007. Vývoj, optimalizace a validace metod. Základní pojmy. Problematika nejistot v toxikologii. *Klinická biochemie a metabolismus* **15**:48-49.
- Matúš P, Kubová J. 2002. Špeciácia Hliníka vo vodách a pôdných roztokov. *Chem. Listy* **96**:174-181.
- Matúš P, Kubová J, Bujdoš M, Medved' J. 2005. Determination of operationally defined fractions of aluminium in reference materials and acid attacked environmental samples. *Analytica Chimica Acta* **540**:33-43.
- Matúš P. a Kubová J. 2008. Recent Developments in the Determination, Fractionation and Speciation Analysis of Aluminium by Spectrochemical Analytical Methods and Computer Modeling : Soil Contamination: New Research ISBN: 978-1-60456-144-9, Editor: Anton N. Dubois 43-72, Nova Science Publishers.

- Marin C, Tudorache A, Vlădescu L. 2010. Aluminium Determination and Speciation Modelling in Groundwater from the Area of a Future Radioactive Waste Repository. *Rev. Chim. (Bucharest)*. **61**:431-438.
- Martin RB. 1988. Aluminium and its Role in Biology, in *Metal Ions in Biological System*. Vol. 24. Eds. H. Sigel & A. Sigel, Marcel Dekker, New York.
- Mckeague JA, Day JH. 1966. Dithionite- and oxalate-extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. *Canadian Journal of Soil Science* **46**:13-22.
- Mckeague JA. 1967. An evaluation of 0.1 M pyrophosphate and pyrophosphate-dithionite in comparison with oxalate as extractants of the accumulation products in podzols and some other soils. *Canadian Journal of Soil Science* **47**:95-99.
- Milačić R, Kožuh N, Mitrović B. 1998, Combination of Three Analytical Techniques for Speciation of Al in Environmental Samples, *Mikrochim. Acta* **129**:139-145
- Milačić R. 2005. Speciation of Aluminum in the Environment, in *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, (ed. R. Cornelis) John Wiley & Sons, Ltd - Chichester UK.
- Mindak WR a Dolan SP.2010. 4.4 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometric Determination of Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion in *Elemental Analysis Manual for Food and Related Products*, FDA U. S. Food and Drug Administration. Available from <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479974.pdf> (accessed April 2019).
- Mitrović B, Milačić R, Pihlar B, Simončič P. 1998. Speciation of Trace Amounts of Aluminium in Environmental Samples by Cation-Exchange FPLC – ETAAS. *Analisis* **26**:381-388.
- Mrvić V, Jakovljević M, Stevanović D, Čakmak D, Zdravković M. 2008. *Methods for the determination of the form of aluminium: Pseudogley soils*, J. Serb. Chem. Soc. **73**:673-680.
- Nordin JP, Sullivan DJ, Phillips BL, Casey WH. 1999. Mechanisms for fluoride-promoted dissolution of bayerite [β -Al(OH) $_3$ (s)] and boehmite [γ -AlOOH]: 19F-NMR spectroscopy and aqueous surface chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**:3513-3524.
- Nordstrom DK, May HM. 1996. CRC Press. Pages 39 - 80. Aqueous Equilibrium Data for Mononuclear Aluminum Species, CHAPTER 2, In: *The Environmental Chemistry of Aluminum*. Sposito, G., ed., 2nd edition, Boca Raton, Florida.
- Öhman LO, Forsling W. 1981. Equilibrium and Structural Studies of Silicon(IV) and Aluminium(III) in Aqueous Solution. 3. Potentiometric Study of Aluminium(III) Hydroxo Carbonates in 0,6 M Na(Cl). *Acta Chemica Scandinavica A* **35**:795-802.
- Parker DR, Bertsch P M. 1992. Identification and Quantification of the Al $_{13}$ Tridecameric Polycation Using Ferron. *Environmental Science and Technology* **26**:908-914.
- Parker DR. 2005. Aluminum Speciation, v *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier Academic Press, New York.

- Pavlu L, Drábek O, Stejskalová Š, Tejnecký V, Hradilová M, Nikode A, Borůvka L. 2018. Distribution of Aluminium Fractions in Acid Forest Soils. Influence of Vegetation Changes Forest **11**:721-727.
- Pettit LD, Powell KJ. 2008. SC-database and Mini-SC Database. Available from <https://www.worldcat.org/title/sc-database-and-mini-scdatabase/oclc/312429664> (accessed November 2018).
- Pokrovskii VA, Helgeson HC. 1995. Thermodynamic properties of aqueous species and the solubilities of minerals at high pressures and temperatures: The system $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-H}_2\text{O-NaCl}$. Amer. J. Sci. **295**:1255-1342.
- Pokrovskii VA, Helgeson HC. 1997. Thermodynamic properties of aqueous species and the solubilities of minerals at high pressures and temperatures: the system $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-H}_2\text{O-KO}$. Chemical Geology **137**:221-242.
- Ponette Q, Andre D, Dufey JE. 1996. Chemical Significance of Aluminium Extracted From Three Horizons of an Acid Forest Soil, Using Chloride Salt Solutions. European Journal of Soil Science **47**: 89-95.
- Porebska G, Mulder J. 1996. The chemistry of aluminium in strongly acidified sandy soil in Poland. European Journal of Soil Science **47**:81-87.
- Powell KJ, Pettit LD. 1997. Sol Eq Stability Constants. Academic Software. 2006. IUPAC Stability Constants Database, SC-Database - the definitive database of metal-complex stability constants. Available from <https://old.iupac.org/publications/scdb/index.html> (accessed September 2018).
- Quevauviller P. 1998. Method Performance Studies for Speciation Analysis. The Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 4WF. UK.
- Saritha B, Reddy TS. 2014. Direct Spectrophotometric determination of Aluminum (III) using 5-Bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde-Phydroxybenzoic hydrazone. IOSR. Journal of Applied Chemistry **7**:5-10.
- Saukkoriipi 2010. Theoretical study of the hydrolysis of aluminum complexes. Acta Universitatis Oulensis. A Scientiae Rerum Naturalium 554. Available from <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9789514261831.pdf> (accessed September 2018).
- Sarpola A, Hietapelto V, Jalonen J, Jokela J, Laitinen RS. 2004. Identification of the hydrolysis products of $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ by electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry **39**:423-430.
- Sarpola A, Hietapelto VK, Jalonen JE, Jokela J, Rämö JH. 2006. Comparison of hydrolysis products of $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in different concentrations by electrospray ionization time of flight mass spectrometer (ESI TOF MS). International Journal of Environmental Analytical Chemistry **86**:1007-1018.
- Sarpola A. 2007. The Hydrolysis of Aluminium, A Mass Spectrometric Study. Thesis, Acta Univ. Oul. C 279. Available from <http://jultika.oulu.fi/files/ISBN:9789514285578.pdf> (Accessed October 2018).

- Seubert A. 2001. On-line coupling of ion chromatography with ICP–AES and ICP–MS, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **20**:274-287.
- Shaw CA, Tomljenovic L 2013. Aluminum In The Central Nervous System (CNS): Toxicity in Humans and Animals, Vaccine Adjuvants, and Autoimmunity. *Immunol Res.* **56**: 304-316.
- Smith RM, Martell AE. 1976. Critical Stability Constants, Volume 4. Inorganic complexes. Plenum Press, New York.
- Sordet-Guépet H, Manckoundia P. 2014. Alzheimer Disease and Environmental Exposure to Neurotoxic Factors. A Controversy *British Journal of Medicine and Medical Research* **4**:5298-5311.
- Sposito G. 1996. The Environmental Chemistry of Aluminium. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Street R, Drábek O, Száková J, Mládková L. 2007. Total Content and Speciation of Aluminium in Tea Leaves and Tea Infusions. *Food Chemistry* **104**:1662-1669.
- Sullivan DJ, Nordin JP, Phillips BL, Casey WH. 1999. The rates of water exchange in Al(III)-salicylate and Al(III)-sulfosalicylate complexes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**:1471-1480.
- Sullivan TJ, Seip HM, Muniz IP. 1986. A Comparison of Frequently Used Methods for the Determination of Aqueous Aluminum. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **26**:61-75.
- Sutheimerová SH, Cabaniss SE. 1995. Aqueous Al (III) Speciation by High-Performance Cation Exchange Chromatography with Fluorescence Detection of the Aluminum-Lumogallion Complex. *Anal. Chemistry* **67**:2342-2349.
- Ščančar J, Milačič R. 2006. Aluminium speciation in environmental samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**:999-012.
- Šrámek V, Borůvka L, Drábek O, Fadrhonsová V, Novotný R, Tejnecký V, Vortelová L. 2011. Metody analýz forem hliníku v lesních půdách, půdním roztoku a kořenech dřevin – Certifikovaná metodika. *Lesnický průvodce* č. 8/2011. Available from http://www.vulhm.cz/sites/File/vydavatelska_cinnost/lesnicky_pruvodce/LP_8_2011.pdf (Accessed September 2018).
- Tagirov B, Schott J. 2001. Aluminum speciation in crustal fluids revisited. *Geochim. Cosmochim. Acta (Helgeson's special issue)*. **65**:3965-3992.
- Tehrani MS, Ghasemi JB, Baharifard MT. 2013. Selective Spectrophotometric Determination of Aluminium with Xylenol Orange in Acidic Media Using Partial Least Square Method. *Asian Journal of Chemistry* **25**:2506-2512.
- Thermo Scientific (2013) Thermo Scientific iCAP 7000 Series ICP-OES: Innovative ICP-OES Optical Design Technical Note 43153. Available from <https://static.thermoscientific.com/images/D21747~.pdf> (Accessed April 2019).

- Thyne GD. 2007. PHREEQC 2007 Manual for Short Course. Available from https://www.researchgate.net/publication/293655512_PHREEQC_2007_Manual_for_Short_Course (Accessed October 2018).
- Tomljenovic L. 2011. Aluminum and Alzheimer's Disease: After a Century of Controversy. *Journal of Alzheimer's Disease* **23**:567-598.
- Ure AM, Davidson CM. 2002. *Chemical Speciation in the Environment*, Blackwell Science Ltd Library of Congress.
- Walna B, Spychalski W, Siepak J. 2005. Assessment of potentially reactive pools of aluminium in poor forest soils using two methods of fractionation analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**:1807-1816.
- Wang CY, Bi SP, Luo MB. 2002. Advancement of Studies on the Formation of Polynuclear Hydroxyl Aluminum Species and Their Transformation Laws in Aqueous Systems and Soil Solutions. A Review. Chapt. 17 in *Group 13 Chemistry*, ACS Symposium Series, American Chemical Society **822**:246-258.
- Wesolowski DJ, Palmer DA. 1994. Aluminum speciation and equilibria in aqueous solution: V. Gibbsite solubility at 50°C and pH 3-9 in 0.1 molal NaCl solutions (a general model for aluminum speciation; analytical methods). *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**:2947-2969.
- Wickstrøm T, Clarke N, Derome K, Derome J, Røgeberg E. 2000. Comparison study of five analytical methods for the fractionation and subsequent determination of aluminium in natural water samples. *Journal Environ. Monitoring* **2**:171-181.
- Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhathi N, Wisniewski TM, Arnold IMF, Momoli F, Krewski D. 2014. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit. Rev. Toxicology* 2014 October **44**:1-80.
- Yokel RA. 2012. The Pharmacokinetics and Toxicology of Aluminum in the Brain. *Current Inorganic Chemistry* **2**:54-63.
- Zhao H, Liu H, Qu J. 2009. Effect of pH on the aluminum salts hydrolysis during coagulation process: Formation and decomposition of polymeric aluminum species. *Journal of Colloid and Interface Science* **330**:105-112.
- Zioła-Frankowska A, Frankowski M. 2018. Speciation Analysis of Aluminium in Plant Parts of *Betula Pendula* and in Soil, *Journ. of Envir. Science*, **65**:153-161.
- Zioła-Frankowska A, Kuta J, Frankowski M. 2015. Application of a new HPLC-ICP-MS method for simultaneous determination of Al³⁺ and aluminium fluoride complexes, *Heliyon*, e00035.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

Da: Dalton.

DOC: Dissolved organic carbon, rozpuštěný uhlík.

DOM: Dissolved organic matter, rozpustěná organická hmota.

DTPA: Diethylenetriamine pentaacetic acid, kyselina diethylentriaminpentaoctová.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová .

ESI-MS: Electrospray ionization mass spektrometry, hmotnostní spektrometrie s elektrosprayovou ionizací.

ES-MS-MS: Electrospray tandem mass spektrometry, elektrospray tandemová hmotnostní spektrometrie.

ETAAS: Electrothermal atomic absorption spektrometry, atomová absorpční spektroskopie s elektrotermickou atomizací.

FAAS: Plamenná atomová absorpční spektroskopie, Flame atomic absorption spectroscopy

FIA: Flow injection analysis, průtoková injekční analýza.

FPLC: Fast protein liquid chromatography, rychlá proteinová kapalinová chromatografie.

GF AAS: Graphite Furnace AAS: Plamenná atomová absorpční spektroskopie s použitím grafitové píčky

HPLC: High-performance liquid chromatography, vysoce účinná kapalinová chromatografie.

HMM: High molecular mass, vysoká molekulární hmotnost.

IC: Ion chromatography, iontová chromatografie.

ICP-AES Inductively coupled plasma-atomic, emission, indukčně vázaná plasma – atomová emisní spektrometrie.

ICP ES: Inductively coupled plasma (ICP)-emission spectroscopy, emission, indukčně vázaná plasma – emisní spektrometrie.

ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spektrometry, indukčně vázané plazma hmotností spektrometrie.

ICP-OES: Inductively coupled plasma optical emission spektrometry, indukčně vázané plazma optická spektrometrie.

LOD: Limit of detection, mez detekce, také detekční limit (DL).

LOQ: Limit of quantitation, mez stanovitelnosti, také QL.

NMR: Nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance.

NTA: Nitrilotriacetic acid, kyselina nitrilotrioctová.

SE: Size exclusion chromatography, chromatografie s vyloučením velikosti.

ULQ: Upper limit of quantitation, horní mez stanovitelnosti.

QL: Quantification limit, kvantifikační limit.

$[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$, $\epsilon\text{-Al}_{13}$ (ϵ -Kegginův izomer částice $[\text{MO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$, také triskaidekaaluminium, Keggin Al13

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 - Kompilace doporučených kumulativních konstant stability log β pro jednotlivé částice Al při 298oK. Vysvětlivky: Ox – oxalát, Cit – citrát, Ac – acetát, mal – malonát, a počet hodnot, z kterých byl vzat průměr Nordstromem a Mayem (1999) je uveden za symbolem Φ , tučně vytištěné průměrné hodnoty těchto autorů byly použity s dvojitou vahou při výpočtu hodnot v posledním sloupci, b tučně vytištěné viz a, c, kurzivou hodnoty z databáze LLNL.

	Sullivan et al. 1986	Bertsch Anderson 1989	Sullivan et al. 1999	Nordin et al. 1999	Nordstrom & May 1999 ^a	Gregory & Duan 2001	Ure & Davidson 2002	Wang et al. 2002	Parke r2005	Blanc & al 2006 ^b	Marin et al. 2010 ^c	Pettit & Powell 2008	Průměr (Směrodatná odchylka)
Al(OH) ²⁺	5,65		5,52	5,52	5,0±0.04 Φ 22	4,95	4,97	5,52; 5,0	5,0	4,95	4,96		5,15 (±0,28)
Al(OH) ₂ ⁺	11,35		11,30	11,30	9,65±0.8 Φ 10	10,55	9,30	8,71-11,3	10,1	10,58	10,60		10,4 (±0,85)
Al(OH) ₃	18,59		17,3	17,3	16,1±1 Φ 5	17,25	15,0		16,8	16,42			16,7 (±0,96)
Al(OH) ₄ ⁻			23,46	23,46	23±1 Φ 23	22,85	23,0	23,46	23,0	22,87	22,87		23,1 (±0,25)
Al ₃ (OH) ₄ ⁵⁺			13,57										13,6
Al ₁₃ O ₄ (OH) ₂₄ ⁷⁺			109,2					97-109,2			98,73		103,5(±6,6)
AlF ²⁺	6,92	6,7		6,43	7,0±0.1 Φ 6				7,0	6,98	7,0		6,87(±0,21)
AlF ₂ ⁺	12,75	12,0		11,63	12,7±0.2 Φ 5				12,7	12,50	12,6		12,4(±0,41)
AlF ₃		16		15,50	16,8±0,3 Φ 5				16,8	16,55	16,7		16,4(±0,51)
AlF ₄ ⁻		19,2		18,30	19,4±0,4 Φ 5				19,4	18,93	19,1		19,1(±0,4)
AlF ₅ ²⁻				19,40	20,6±0,5 Φ 3				20,6		20,79		20,4(±0,56)
AlF ₆ ³⁻				19,8	20,6±1 Φ 3				20,6		21,69		20,7(±0,67)
Al(OH) ₂ F										4,21	5,70		4,95(±1,05)
Al(OH) ₂ F ₂ ⁻										1,99	1,66		1,82(±0,23)
AlOHF ₂										0,21			0,21
Na ₃ AlF ₆ (s)				19,9									19,9
AlH ₃ SiO ₄ ²⁺		3,2								2,38			2,79(±0,58)
AlSO ₄ ⁺		3,2			3,5±0,5 Φ 5				3,5	3,17	3,01		3,31(±0,21)
Al(SO ₄) ₂ ⁻	3,20				5,0±0,5 Φ 2				5,0		4,9		4,62(±0,80)
AlH ₂ PO ₄ ⁺					~3				~3				~3
AlHPO ₄ ⁻					~7				~7				~7
AlOx ⁺		7,4			4,9-6,1							7,73	6,53(±1,30)
AlOx ₂ ⁻		12,5			9,33-17,5							13,41	13,2(±3,37)
AlCit		10,7			6,65-11,7							9,98	9,76(±2,19)
AlCitH ⁺		13,0										12,85	12,9(±0,11)
AlCitH ₂		14,1											~14,1
AlCit ₂ ³⁻					12,95							14,83	13,9(±1,33)
AlAc ²⁺		2,1											~2,1

Al mal ⁺					6,26								4,65	5,45(±1,14)
---------------------	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	------	--------------------

Příloha č. 2 - Konstanty stability některých polymerních forem podle Wanga et al. (2002)

Legenda: Zkratky analytických metod: ab: potenciometrická acidobazická titrace; c: kationtová iontová výměna; d : dialyzační technika; e: iontově selektivní elektroda; f: flow injection analysis; IR: infračervená spektroskopie; I: l: rozptyl světla; N : 27 Al - NMR ; t: z modelu; u: ultracentrifuge; sx: small-angle x-ray diffraction;

code	Al species	lg β	method	definie	condition	ref.
Al ₁	Al(OH)(H ₂ O) ²⁺	-5.52	c,e	**		8
		-5.0	--		pH=4.0-	7
	Al(OH) ₂ (H ₂ O) ₄ ⁺	-8.71	c,e	**	5.5	9
		-10.1	--			7
		-11.3	--			8
	Al(OH) ₄ ⁻	-23.46	c,e,	**		7, 10
	Al(OH) ₅ ²⁻	--	c,e,	0	pH>9	7
Al ₂	Al ₂ (OH) ₂ (H ₂ O) ₈ ⁴⁺	-6.3	ab,N,u,sx	**		9, 16
	Al ₂ (OH) ₅ ⁺	--	--	0		11
Al ₃	Al ₃ (OH) ₄ (H ₂ O) ₁₀ ⁵⁺	-13.57	ab	**		8
		-13.74	ab			9
Al ₄	Al ₃ (OH) ₈ ⁺	--	I	0		11
	Al ₄ (OH) ₈ ⁴⁺	--	I	0		7
	Al ₄ (OH) ₁₀ (H ₂ O) ₈ ²⁺	--	I	0		7
Al ₅	Al ₅ (OH) ₁₃ ³⁺	--	I	0		7
Al ₆	Al ₆ (OH) ₁₅ ³⁺	-47.0	ab,u	**	[Al ³⁺]>	9, 17
	Al ₆ (OH) ₁₂ (H ₂ O) ₁₂ ⁶⁺	--	c,d	**	10 ⁻² mol/l	7
	Al ₆ (OH) ₁₀ ⁸⁺	--	--	0	B<2.2	7
Al ₇	Al ₇ (OH) ₁₇ ⁴⁺	-48.8	ab	*		7, 9
	Al ₇ (OH) ₁₆ ⁵⁺	--	--	0		11
Al ₈	Al ₈ (OH) ₂₀ (H ₂ O) _x ⁴⁺	-68.70	ab,IR,N	**		7, 9
	Al ₈ (OH) ₁₂ (H ₂ O) ₁₂ ⁶⁺	--	--	0		13
Al ₉	Al ₉ (OH) ₁₈ ⁹⁺	--	I	0		7, 13
Al ₁₀	Al ₁₀ (OH) ₂₂ (H ₂ O) ₁₆ ⁸⁺	--	--	0		13
Al ₁₃	Al ₁₃ O ₄ (OH) ₂₄ (H ₂ O) ₁₂ ⁷⁺	-97.6	f,N,sx	**		14, 20
		-109.2	N,sx			8
	Al ₁₃ O ₄ (OH) ₂₈ ³⁺	-105	N,sx	0		7
	Al ₁₃ (OH) ₃₂	--	ab,sx,u,	0		7
	Al ₁₃ (OH) ₃₀ (H ₂ O) ₁₈ ⁹⁺	--	sx	0		13
	Al ₁₃ (OH) ₃₄ ⁵⁺	-97.60	sx	*		7
	Al ₁₃ O ₄ (OH) _{10^{4+z}} ^{(7-z)+}	--	N	0	[Al ³⁺]>	7
Al ₁₄	Al ₁₄ (OH) ₃₂ ⁸⁺	--	ab	0	10 ⁻² mol/l	15
	Al ₁₄ (OH) ₃₄ ⁷⁺	--	ab	*	1.5<B<	7
Al ₁₅	Al ₁₅ (OH) ₃₈ ¹⁰⁺	--	--	0	2.8	7
Al ₁₆	Al ₁₆ (OH) ₃₈ ¹⁰⁺	--	--	0		18
Al ₂₄	Al ₂₄ (OH) ₆₀ (H ₂ O) ₂₄ ¹²⁺	--	--	*		13
Al ₅₄	Al ₅₄ (OH) ₁₄₄ (H ₂ O) ₃₆ ¹⁸⁺	--	t	*		13
	Al(OH) ₃ (aq)	-16.0	d,u	**		8, 9
	Al(OH) ₃ (am)	-10.4	d,u	**	pH>7,	9
Al _X	Al _X (OH) _Y ^(3X-Y)	--	N	*	B>3	6, 15
Al _m	Al _m (OH) _{3m}	--	N	*		13

** : tato forma prokazatelně existuje za příslušných podmínek; * : může existovat; 0 : existence nejistá; -- : existence neznámá

Vybrané citace: 7: Sposito (1996), 8: chybná citace, má být asi: Sullivan D. J., Nordin J. P., Phillips B. L, Casey W. H. (1999) *The rates of water exchange in Al(III)-salicylate and Al(III)-sulfosalicylate complexes*, 63, (10), pp.1471-1480, 9: Luan, Z. K; Tang, H. X. Huanjing Kexue Xuebao. (1995), 15(1), 39 – nedostupné, 13: Hsu, P. H. *Aluminum Hydroxides and Oxyhydroxides*; in *Minerals in Soil Environment*, 2nd, Eds, Dixon, J. B.; Weed, S. B., Soil Sci. Soc. of Am., Madison, WI, 1988, p.99-143.

Příloha č. 3 - Hodnoty konstant stability kompilované Sarpolou (2007)

Částice	$\text{Al}_2(\text{OH})_4^{2+}$	$\text{Al}_2(\text{OH})_3^{3+}$	$\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$	$\text{Al}_3(\text{OH})_4^{5+}$	$\text{Al}_3(\text{OH})_3^{6+}$	$\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$
Log β	16,0	1,4-11,6	7,2 – 8,0	13,1– 13,8	9,8	104-109,5

Částice	$\text{Al}_5(\text{OH})_{12}^{3+}$	$\text{Al}_6(\text{OH})_{15}^{3+}$	$\text{Al}_{10}(\text{OH})_{24}^{6+}$	$\text{Al}_8(\text{OH})_{20}^{4+}$	$\text{Al}_9(\text{OH})_{23}^{4+}$	$\text{Al}_7(\text{OH})_{17}^{4+}$
Log β	43,3	53,8	81,2	68,7-69,8	80,1	59,5

Hodnoty konstant stability kompilované Sarpolou (2007) v jeho dizertaci. Hodnoty většinou odkazují na starší práci Öhmana a Forslinga (1981), data byla získána potenciometricky v prostředí 0,6M NaCl. Údaje zde uvedené jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo.