

Mendelova univerzita v Brně

**Agronomická fakulta
Ústav Technologie potravin**



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Možnosti stanovení těkavých látek při výrobě piva

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Markéta Rozsypalová

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Možnosti stanovení těkavých látek při výrobě piva vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis diplomanta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala panu Ing. Tomášovi Gregorovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování mé diplomové práce, za poskytnuté literární podklady a cenné rady. Také bych touto cestou chtěla poděkovat mé rodině a všem mým blízkým za jejich podporu během celého mého studia.

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o možnostech stanovení chlorfenolů v pivu. Literární přehled popisuje komplexní vlastnosti chlorovaných fenolů. Shrnuje jejich fyzikální, chemické i toxikologické vlastnosti a charakterizuje jejich možné vstupy do životního prostředí.

V experimentální části je hlavním tématem stanovení chlorfenolů ve vzorcích piv malých pivovarů a tzv. domácích piv. Jedná se o různé druhy piva, v nichž se množství chlorfenolů stanovuje metodou extrakce na pevné fázi (SPE) s využitím plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (FID). Další část experimentu je zaměřena na prokázání vzniku chlorfenolů v pivu pomocí simulace podmínek při výrobě piva v poloprovozu. Množství chlorfenolů v uvařeném pivu je opět stanovena metodou plynové chromatografie. Vzorky piv jsou vzájemně porovnány v obsahu chlorfenolů. Je vyhodnoceno profilové zastoupení sledovaných chlorfenolů a jejich množství v analyzovaných vzorcích piva.

Klíčová slova:

chlorfenoly, pivo, extrakce na pevné fázi, plynová chromatografie, plamenově-ionizační detektor

ABSTRACT

The thesis discusses the possibilities of determination of chlorophenols in beer. A review of literature describes the complex properties of chlorinated phenols. Summarizes their physical, chemical and toxicological properties and characterizes their possible inputs into the environment.

In the experimental part is the main theme of the determination of chlorophenols in samples of small breweries and beers called as home brew. These are various types of beer, in which the amount of chlorophenols determined using solid phase extraction (SPE) using gas chromatography with flame ionisation detector (FID). Another part of the experiment is aimed at demonstrating the formation of chlorophenols in beer by simulating conditions in the production of beer in the pilot plant. Chlorphenols amount of boiled beer is again determined by gas chromatography. Samples of beers are compared with each other in the content of chlorophenols. It is evaluated sectional representation monitored chlorophenols and their quantity in the analyzed samples of beer.

Keywords:

chlorophenols, beer, solid phase extraction, gas chromatography, flame ionization detector

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Těkavé fenoly a jejich základní charakteristika	12
3.1.1	Chlorfenoly a jejich zdroje v životním prostředí	13
3.1.2	Fyzikálně chemické vlastnosti chlorfenolů	15
3.1.3	Toxikologický profil chlorfenolů	16
3.1.3.1	<i>2-chlorfenol</i>	18
3.1.3.2	<i>4-chlorfenol</i>	19
3.1.3.3	<i>Pentachlorfenol</i>	19
3.1.3.4	<i>2,4-dichlorfenol</i>	19
3.1.3.5	<i>2,4,6-trichlorfenol</i>	20
3.1.4	Možnosti degradace a odstraňování chlorfenolů z životního prostředí	20
3.1.4.1	<i>Fyzikální metody degradace</i>	21
3.1.4.2	<i>Chemické metody degradace</i>	21
3.1.4.3	<i>Mikrobiální degradace</i>	22
3.1.4.4	<i>Fotochemické metody degradace</i>	23
3.1.4.5	<i>Elektrochemické degradace a γ- ozařování</i>	24
3.2	Chlorfenoly jako vedlejší produkty dezinfekce	24
3.2.1	Vznik chlorfenolů během procesu výroby piva	25
3.3	Analytické metody stanovení chlorfenolů	26
3.3.1	Využití moderních metod přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu piva	27
3.3.1.1	<i>Stanovení chlorfenolů pomocí SPME s využitím plynové chromatografie a detektoru MSD</i>	30
3.3.1.2	<i>Stanovení chlorfenolů metodou plynové chromatografie a extrakcí kapalina-kapalina s využitím detektoru ECD či MSD</i>	31
3.3.1.3	<i>Stanovení chlorfenolů pomocí SPE s využitím plynové chromatografie a detektoru ECD</i>	32
3.3.1.4	<i>Stanovení chlorfenolů pomocí SPE s využitím vysoce účinné kapalinové chromatografie s UV/VIS spektrometrickou detekcí</i>	33

4	MATERIÁL A METODIKA.....	35
4.1	Seznam použitých chemikálií a standardů	35
4.2	Přístrojové vybavení.....	36
4.3	Vzorky pro analýzu	36
4.4	Příprava standardních roztoků	37
4.5	Příprava vzorku pro stanovení výtěžnosti metody	38
4.6	Příprava vzorku pro standardní přídavek.....	38
4.7	Simulace podmínek vzniku chlorfenolů v pivu pro následnou GC analýzu	39
4.7.1	Varní proces piva bez chlorfenolů	39
4.7.2	Varní proces piva s chlorfenoly	40
4.8	Příprava vzorků piva pro analýzu	40
4.8.1	Filtrace.....	41
4.8.2	Odstředění	41
4.8.3	Derivatizace.....	41
4.8.4	SPE.....	41
4.9	Vlastní analýza vzorků metodou GC-FID.....	42
4.9.1	Podmínky plynové chromatografie	43
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
5.1	Statistické vyhodnocení naměřených hodnot.....	44
5.1.1	Aritmetický průměr.....	44
5.1.2	Směrodatná odchylka	44
5.2	Stanovení výtěžnosti měření	46
5.3	Standardní přídavek.....	47
5.4	Profilové zastoupení chlorfenolů v analyzovaných vzorcích piva.....	48
5.4.1	Vzorek piva Ale	48
5.4.2	Vzorek piva Světlý ležák	49
5.4.3	Vzorek piva Richard	51
5.4.4	Vzorek piva Pegas.....	52
5.4.5	Vzorek piva Lucky Bastard Black	53
5.4.6	Vzorek piva Lucky Bastard Pale.....	54
5.4.7	Vzorek Pšeničného piva	55
5.4.8	Vzorek piva India Pale Ale	56
5.4.9	Vzorek Polotmavého piva.....	57

5.4.10	Porovnání profilového zastoupení jednotlivých chlorfenolů v analyzovaných vzorcích piva	58
5.4.11	Profilové zastoupení chlorfenolů ve vzorcích uvařeného piva.....	60
5.5	Linearita kalibrační závislosti	62
6	ZÁVĚR	66
7	POUŽITÁ LITERATURA	68
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
9	SEZNAM TABULEK	78
10	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	79

1 ÚVOD

Jednou z hlavních charakteristických a nezaměnitelných vlastností piva je jeho aroma, které vzniká kombinací pocitů nejrůznějších chutí a vůní. Důvodem takto vzniklého souhrnného vjemu je komplexní působení sensoricky aktivních látek, které vznikají především v průběhu kvašení, tedy přirozeně. Tyto produkty spolu tvoří skupinu, zvanou „těkavé látky piva“. Sensorický vliv těkavých látek může být jak pozitivní, tak i negativní. Tyto těkavé látky vykazují vyšší tenzi par, což přímo souvisí s jejich schopností se vypařovat. Jedná se především o látky v kapalném skupenství. Nicméně pojem těkavost, se užívá i ve vztahu k některým pevným látkám, které jsou schopny sublimovat.

Mezi těkavé látky přirozeně vznikající během výroby piva řadíme především CO₂, vyšší alkoholy, karboxylové kyseliny, jako je především kyselina mravenčí či kyselina octová, nenasycené mastné kyseliny a samozřejmě i jejich deriváty, estery a laktony. Dále pak fenoly, aminy, karbonylové sloučeniny, tedy aldehydy, zejména acetaldehyd, ketony a diketony, terpenové uhlovodíky chmelových silic, acetaly a peroxidy. V neposlední řadě patří k těkavým látkám také organické a anorganické sирné sloučeniny, jako je např. dimethylsulfid, SO₂, sulfan a další. Množství těkavých látek v pivu z obecného hlediska závisí na složení použitých surovin, mladině, technologii hlavního kvašení a dokvašování a také na kmenu kvasinek. Podstatně menší vliv na jejich obsah má technologie stáčení, pasterace a způsob uskladnění.

Z pohledu celého pivovarského průmyslu i dílčích kroků technologie výroby piva je velmi důležitý poznatek o možnosti vzniku jiných těkavých látek než výše zmíněných, které vykazují výraznou sensorickou aktivitu a negativně tak ovlivňují finální výrobek. Během procesu výroby piva totiž za daných okolností může dojít k tvorbě specifických těkavých fenolů, k čemuž by však při dodržení jistých požadavků a opatření nemělo docházet. Poslední dobou je ve světě i v ČR věnována zvýšená pozornost látkám, které svou sensorickou aktivitou mohou ovlivňovat kvalitu piva. Na sensorických vlastnostech piva se podílí řada sloučenin ve vzájemně nedefinovaných poměrech. Z toho důvodu by mohlo být stanovení těkavých látek vhodným objektivním doplněním k sensorické analýze piva.

2 CÍL PRÁCE

- Mým cílem, při zpracování diplomové práce, bylo prostudovat dostupné tuzemské a zahraniční zdroje zabývající se problematikou vzniku těkavých látek během výroby piva. Při studiu odborné literatury se zaměřit zejména na těkavé látky mající vliv na sensorickou jakost piva a vybrat konkrétní skupinu těkavých látek s takto výrazným vlivem. Navrhnout způsob jejich izolace, prekoncentrace a analýzy pomocí plynové chromatografie.
- V laboratorních podmínkách provést analýzu na plynovém chromatografu. Pokusit se simulovat dané podmínky vzniku těchto těkavých látek v pivu v laboratorních nebo poloprovozních podmínkách a provést jejich analýzu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Těkavé fenoly a jejich základní charakteristika

Do skupiny fenolů patří zástupci přirozeně se vyskytující, ale i člověkem vyráběné. Jedná se o velmi rozšířené přírodní látky, vznikající činností nejrůznějších rostlin a živočichů. Právě tyto přirozené deriváty fenolů výrazně ovlivňují chuť i barvu některých potravin (WELLS, DICK, 2007).

Fenoly patří společně s alkoholy mezi hydroxysloučeniny. Radíme je mezi těkavé organické aromatické látky, které mají hydroxylovou skupinu navázanou přímo na aromatické jádro. Fenoly dělíme na jednosytné či vícesytné dle počtu hydroxylových skupin obsažených v jejich molekule (KUMŠTA, 2007). Jedná se především o bezbarvé kapaliny nebo krystalické látky, které se projevují svým silným charakteristickým zápachem (HAVKIN-FRENKEL, BELANGER, 2008). Čisté fenoly se na vzduchu barví dočervena až dohněda. Jedná se o látky, které leptají sliznice i pokožku. Jsou málo rozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických rozpouštědlech či roztocích alkalických hydroxidů. Některé fenoly vykazují antiseptické účinky a využívají se k dezinfekci. Jsou výchozí surovinou pro přípravu řady aromatických sloučenin, např. léčiv, barviv, plastů, pesticidů a dalších (DEY, 2012).

Svémi fyzikálními vlastnostmi jsou fenoly podobné alkoholům. Díky tvorbě vodíkových můstků mezi molekulami hydroxysloučenin a molekulami vody, mají vyšší bod varu i vyšší rozpustnost ve vodě než odpovídající aromatické uhlovodíky a halogenderiváty. Svými chemickými vlastnostmi se však poměrně odlišují, což je zapříčiněno tím, že hydroxylová skupina a aromatický systém se vzájemně ovlivňují. Název fenolů je odvozen z jejich nejjednoduššího zástupce, tedy fenolu. Jedná se o bezbarvou krystalickou látku, která na vzduchu a světle rychle tmavne. Projevuje se silným výrazně nasládlým zápachem. Fenol se získává z černouhelného dehtu nebo se vyrábí synteticky z kumenu, který se převádí na kumenhydroperoxid. Používá se jako surovina pro výrobu formaldehydových pryskyřic (př. bakelit), plastů, syntetických vláken, barviv, dezinfekčních prostředků, pesticidů, fungicidů, výbušnin (kyselina pikrová). Dále se používá k výrobě kyseliny salicylové, což je výchozí látka

pro výrobu acylpyrinu. Fenol je také výchozí látkou pro výrobu cyklohexanu a fenolftaleinu (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011).

Jelikož poměrně určitá část fenolů jsou zcela přirozené látky, můžeme tedy za přírodní zdroje emisí označit některé rostliny a živočichy. Tyto přirozené deriváty fenolů však nevznikají ve významném množství. Větší problém představují poměrně velká množství fenolů a jejich derivátů, které unikají do životního prostředí v souvislosti s lidskou činností. Mezi takové zdroje emisí pak lze považovat např. úniky při výrobě fenolů, z chemického průmyslu při dezinfekci vodních potrubních systémů, kontaminace vody z nátěrů obsahující fenoly a jejich deriváty, aplikace fenolů do produktů (fenolové pryskyřice, syntetická vlákna), spalovací motory, cigaretový kouř, otevřená ohniště, únik ze špatně zajištěných skládek odpadů a další (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011).

Fenoly emitované do životního prostředí v rámci lidské činnosti jej mohou negativně ovlivňovat. Tyto emise z důvodu omezené těkavosti těchto látek směřují zejména do vody či půdy. Nechlorované fenoly jsou v aerobním prostředí rozloženy některými mikroorganismy na neškodné produkty. Za nepřístupu vzduchu, např. ve skládkách, podzemních vodách či sedimentech, jsou značně stabilnější. Fenoly vykazují negativní vliv na zdraví člověka i zvířat. Z hlediska toxického působení mají největší význam fenoly jednosytné (tedy fenoly s jednou OH skupinou v řetězci). Jsou toxické zejména pro vodní živočichy řádově v mg.l^{-1} . Mikroorganismy jsou vůči toxickému působení fenolů podstatně odolnější. Jsou schopné se adaptovat na koncentrace 100 mg.l^{-1} . Jedny z nejvýznamnějších zástupců ze skupiny fenolů jsou z toxikologického hlediska chlorfenoly. I z toho důvodu je nutné limitovat koncentrace fenolů (IGBINOSA et al., 2013).

3.1.1 Chlorfenoly a jejich zdroje v životním prostředí

Chlorované fenoly patří mezi látky, které se z větší části podílejí na znečišťování životního prostředí. Jejich hlavním a prakticky jediným zdrojem jsou procesy spojené s lidskou činností. Jejich všudypřítomnost je zapříčiněna podstatně širokým využitím v průmyslu a zemědělství. Chlorfenoly se nachází ve všech sférách životního prostředí, na čemž se značně podílí vliv stálosti a bioakumulace. Dá se říct, že je prakticky

nemožné nenalézt je v půdě, v sedimentech, ve vodě, dokonce i v živých organismech. Chování chlorfenolů v životním prostředí závisí na mnoha fyzikálně chemických faktorech. Hodnota pH vody a půdy je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících jejich mobilitu v prostředí (MICHALOWICZ et al., 2013).

Jedná se o látky, které snadno podléhají různým abiotickým a biotickým degradacím a transformacím. Chlorfenoly se mohou dostávat do prostředí buďto přímou cestou, tedy aplikací fungicidů a insekticidů nebo ve formě degradačních produktů, které vznikají metabolickým rozkladem některých chlorovaných pesticidů. Konkrétně se jedná o pesticidy obsahující ve své molekule substituované fenoly, tedy nitrofenoly či kyselina chlorfenoxyalkanová. Další jejich cestou úniku do životního prostředí může být přeměna chlorovaných benzenů, organofosfátů či nitrobenzenů. Je důležité zmínit, že chlorfenoly jsou prekurzory vzniku PCDD/PCDF (polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů/dibenzofuranů), u kterých je prokázáno, že se jedná o jedny z nejtoxičtějších látek. Některé chlorfenoly jsou intermediáty herbicidů (Triadimefon) či dezinfekčních prostředků (Hexachlorophene, Triclosan), (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Monochlorfenoly slouží jako výchozí látky pro vyšší chlorfenoly nebo jako rozpouštědla (rafinace olejů, extrakce síry z uhlí). Zástupci vyšších chlorfenolů se využívají k ochraně dřeva, při impregnaci textilií, laků, barev, kůže a v neposlední řadě i ke zpracování celulosy. Dříve se k ochraně dřeva využíval pentachlorfenol „Pentalidol“, který je dnes již zakázán. Chlorované fenoly mohou vznikat i nepřímou, zejména z fenolu při procesu chlorace odpadních vod, při spalování komunálního odpadu, nebo mohou unikat do životního prostředí v souvislosti s procesy zpracování dřeva, papíru a celulosy. Tyto těkavé látky se mohou tvořit také během chlorace pitné vody. Během procesu chlorace dochází k nachlorování zejména jednosytných fenolů, čímž vznikají právě zmíněné chlorfenoly. Tak může dojít ke znehodnocení pitné vody z pohledu jejich organoleptických vlastností. Jejich prahové koncentrace se pohybují v rozmezí od 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ do 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Již takto nízká koncentrace v pitné vodě tak způsobuje charakteristický zápach a chuť. Toto sensorické působení chlorfenolů ve vodě se týká zejména níže chlorovaných chlorfenolů. Převážná většina zemí se prosazuje o to, aby byla průmyslová výroba některých chlorfenolů omezena či přímo zakázána (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Malá část chlorovaných fenolů vyskytujících se v životním prostředí pochází z přírodních procesů (lesní požáry, vulkány, geologické projevy). Například 2,6-dichlorfenol je prokázaným sexuální feromonem roztočů a např. 2,5-dichlorfenol se vyskytuje ve slinách kobylek. Co se týká dalších přírodních derivátů chlorovaných fenolů, vznikají působením lidských myeloperoxidase při nemocích (3-chlorotyrosin), nebo jako produkty tlení dřeva některými houbami, konkrétně se jedná o pentachlorfenol (IVANCIUC et al., 2006).

3.1.2 Fyzikálně chemické vlastnosti chlorfenolů

Chlorfenoly svým zařazením patří mezi aromatické uhlovodíky. Chemická struktura chlorfenolů je tvořena aromatickým jádrem, na kterém je navázána reaktivní hydroxylová skupina. Zbylé polohy jsou substituovány 1-5 atomy chloru (tedy monochlorfenol až pentachlorfenol). Může tak existovat 19 isomerů, jejichž fyzikální i chemické vlastnosti se liší v důsledku rozdílné polohy atomu chloru ve vztahu k hydroxylové skupině (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011).

Za běžných podmínek se jedná o látky krystalické. Převážná většina má bod varu nad 200 °C. Výjimku zde tvoří 2-monochlorfenol, který se vyskytuje v kapalném skupenství a jehož bod varu odpovídá hodnotě 175 °C. Chlorfenoly lze zařadit mezi slabé kyseliny, jejichž disociační konstanta (K_a) obecně roste s počtem chlorovaných substituentů. Jejich schopnost adsorpce na povrchu nepolárních látek roste s počtem atomů chloru (tedy s klesající hodnotou pK_a), (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Z obecného hlediska jsou chlorfenoly rozpustné v etheru, ethanolu a jiných organických rozpouštědlech, nerozpustné ve vodě nebo jen velmi málo. Se zvyšujícím se počtem atomů chloru klesá jejich rozpustnost ve vodě (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011).

Tab. 1: *Některé vlastnosti chlorovaných fenolů* (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Chlorovaný fenol	Bod varu [°C]	Bod tání [°C]	Rozpustnost [g.l⁻¹]	pK_a
2-monoCP	174-175	8.10	23,256	9,13
3-monoCP	213-214	33-34	22,19	9,53
4-monoCP	219-220	43-44	26,39	9,7
2,3-diCP	206	58-60	8,215	8,52
2,4-diCP	209-210	42-43	5,547	8,51
2,6-diCP	219-220	65-68	2,625	7,15
3,4-diCP	253-254	66-68	9,256	8,87
2,3,4-triCP	257	79-81	0,915	7,34
2,3,5-triCP	253-254	61-62	0,771	6,92
2,4,5-triCP	252-253	68-70	0,649	7,2
2,4,6-triCP	245-246	69-70	0,708	6,51
2,3,4,5-tetraCP	275	116-117	0,166	5,64
2,3,4,6-tetraCP	275	69-70	0,166	5,22
2,3,5,6-tetraCP	275	114-115	0,166	5,03

3.1.3 Toxikologický profil chlorfenolů

Chlorfenoly patří mezi stále sledované prioritní polutanty především kvůli jejich perzistenci a negativnímu vlivu na živé organismy. Navenek se projevují velmi pronikavým a štiplavým zápachem. Jedná se o nehořlavé látky, které se při vyšších teplotách rozkládají na CO, CO₂ a HCl. Dráždí oči, nos, dýchací cesty a plíce. Způsobují kašel a dušnost, poškozují játra a ledviny. Ke vstřebání

chlorovaných fenolů dochází přes kůži. Vysoké expozice chlorfenolů mají nežádoucí účinky na imunitní systém. Mohou způsobovat bolesti hlavy, svalovou slabost a nevolnost. Chlorfenoly jsou látky vysoce toxické pro vodní organismy (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Toxikologické vlastnosti chlorfenolů jsou úzce spjaty s jejich schopností rozpojit oxidační fosforylaci v dýchacím řetězci a následně tak ukončit přeměnu ADP na ATP. Může tedy dojít k ovlivnění veškerých aerobních eukaryotních forem života. Chlorfenoly jsou z hlediska svých toxikologických účinků fyto toxické, embryotoxické a imunotoxické. Nehrozí zde neurotoxické a teratogenní účinky. Mutagenita a karcinogenita u chlorfenolů nebyla dosud prokázána, stále je však tato oblast v mnohých studiích diskutována (QIN et al., 2014). Některé studie pojednávají o zjištění nádorových onemocnění u lidí, kteří byli po delší dobu vystaveni působení chlorfenolů a jsou tak považovány za potenciální karcinogenní látky (BA-ABBAD et al., 2012).

Obecně lze říci, že s rostoucím stupněm chlorace se zvyšuje toxicita chlorovaných fenolů, zejména v důsledku jejich lepší rozpustnosti v tucích. Distribuce molekul mezi vodnou a lipidní fází je podstatným znakem v souvislosti s jejich akumulací v životním prostředí. Tato vlastnost je dána rozdělovacím koeficientem oktanol/voda $K_{o/w}$, který popisuje chování a distribuci organických látek v prostředí. Rozdělovací koeficient $K_{o/w}$ je definován jako poměr molární koncentrace dané látky v oktanolu nasyceném vodou c_s^o ku molární koncentraci dané látky ve vodě nasycené oktanolem c_s^w , tedy $K_{o/w} = c_s^o/c_s^w$ (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Z pohledu mikrobiální degradace chlorfenolů má významný vliv poloha atomů chloru na aromatickém jádře. Sloučeniny substituované v poloze meta (3-monoCP, 3,5-diCP) jsou odolnější k mikrobiální degradaci a tedy i více toxické, než sloučeniny substituované v poloze ortho (2,6-diCP). Menší toxicita u sloučenin substituovaných v poloze ortho je spojena s přítomností vodíkové vazby a stíněním skupiny OH chlorem. Vyšší toxicitu vykazují i sloučeniny substituované v poloze para (4-monoCP) (IGBINOSA et al., 2013).

Tab. 2: *Toxikologické vlastnosti vybraných chlorfenolů* (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Chlorfenol	log K_{o/w}	IC₅₀ [mg.l⁻¹]	Chlorfenol	log K_{o/w}	IC₅₀ [mg.l⁻¹]
3-monoCP	2,5	15,78	2,3,5-triCP	4,21	2,28
4-monoCP	2,35	8,07	2,4,5-triCP	3,72	2,08
2,3-diCP	3,19	5,19	2,4,6-triCP	3,69	5,47
2,4-diCP	3,08	2,68	2,3,4,5-tetraCP	4,69	1,76
3,4-diCP	3,37	2,77	2,3,5,6-tetraCP	4,9	2,27

IC₅₀ – inhibiční koncentrace – koncentrace, při které dochází k zamezení růstu 50 % sledovaných jedinců za určitý čas

3.1.3.1 2-chlorfenol

2-chlorfenol patří společně s 3-chlorfenolem a 4-chlorfenolem do skupiny monochlorfenolů. Jedná se o kapalnou bezbarvou látku s charakteristickým zápachem. Dle klasifikace látky z hlediska identifikace nebezpečí vykazuje 2-chlorfenol vysoký toxický potenciál pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. Je zdraví škodlivý při požití, styku s kůží a při vdechování (TU et al., 2014). Jako jediný ze skupiny monochlorfenolů je zařazen do národního seznamu relevantních nebezpečných látek pro hydrosféru v ČR. Může se vyskytovat v odpadních vodách z organických výrob, např. z petrochemického průmyslu, tepelného zpracování uhlí či strojírenského průmyslu. Druhou možností jeho úniku do životního prostředí je při chloraci vody. Dle nařízení vlády č. 61/2003 Sb. je hodnota přípustné úrovně znečištění povrchových vod pro 2-chlorfenol je 0,1 µg.l⁻¹. 2-chlorfenol je mimo jiné sledován komplexním výzkumným monitoringem ČHMÚ a monitorovacími programy podniků Povodí, s. p. (Bezpečnostní list podle 1907/2006/ES, 2014).

3.1.3.2 4-chlorfenol

4-chlorfenol náleží do skupiny monochlorfenolů. Z pohledu chemických a fyzikálních vlastností se jedná o pevnou krystalickou látku bílého zbarvení. Navenek se projevuje fenolovým zápachem. Co se týká toxikologických vlastností, 4-chlorfenol vykazuje leptavé účinky na kůži a sliznici a silné dráždivé účinky s nebezpečím vzniku vážného poškození zraku. Stejně jako 2-chlorfenol je toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky, zdraví škodlivý při požití, styku s kůží a při vdechování. Expozice do životního prostředí spočívá především ve využití 4-chlorfenolu k dezinfekčním účelům nebo jako meziprodukt v chemickém průmyslu (ELGHNIJI et al., 2012).

3.1.3.3 Pentachlorfenol

Pentachlorfenol je za běžných podmínek šedá krystalická látka, která může mít charakter vloček. Jedná se o látku, která za normální teploty téměř nezapáchá. Při zahřátí se však projevuje charakteristickým zápachem (YADID et al., 2013). Je toxický při styku s kůží, při požití a vdechování. Vykazuje vysoký toxický potenciál pro vodní organismy s dlouhodobými účinky. Tato látka je klasifikována Světovou zdravotnickou Organizací (WHO) jako možný karcinogen. Jedná se o látku syntetickou, proto neexistují přírodní neantropogenní zdroje výskytu. Jeho cesty vstupu do životního prostředí spočívají zejména v impregnaci dřeva či zdiv v prostředí, která však nesmí přijít do styku s lidskou či živočišnou potravou. Dalším zdrojem expozice může nastat při nedodržení postupu či havárii v jeho průmyslové výrobě. Využití pentachlorfenolu jako herbicidu je již dnes zakázáno, stejně jako jeho volný prodej (LOU et al., 2011).

3.1.3.4 2,4-dichlorfenol

Jedná se o pevnou krystalickou látku bílého či nažloutlého zbarvení. Cesty vstupu do životního prostředí jsou spojeny s jeho vznikem jako meziproduktu při výrobě pesticidů, insekticidů, dezinfekčních činidel či konzervantů (ANDREOZZI et al., 2011).

Stejně jako u předchozích zástupců, je také 2,4-dichlorfenol toxický pro vodní organismy s možným dlouhodobým účinkem. Je považován za potenciální karcinogen a endokrinní disruptor, tedy exogenní látku, které narušuje funkci endokrinního systému. Důsledkem může být napodobení či narušení působení běžných hormonů v těle, jejich syntézy, transportu, metabolických procesů a vylučování (KARCI et al., 2012)

3.1.3.5 2,4,6-trichlorfenol

2,4,6-trichlorfenol je pevná krystalická látka bílého či světle hnědého zbarvení. Pro své vlastnosti se používal např. jako ochranná látka pro dřevo, fungicid, insekticid či pesticid. Jednou z možných cest do životního prostředí je i vznik 2,4,6-trichlorfenolu jako meziprojektu při výrobě některých chemických látek (KHAN et al., 2012).

Kromě toxického působení na vodní organismy s dlouhodobými účinky je stejně jako pentachlorfenol i tato látka zařazena Světovou zdravotnickou organizací (WHO) mezi možné karcinogenní látky (ANIRUDHAN, RAMACHANDRAN, 2014).

3.1.4 Možnosti degradace a odstraňování chlorfenolů z životního prostředí

Hlavním legislativním nástrojem ES, který upravuje vypouštění chlorfenolů a dalších nebezpečných látek do vodního prostředí je Směrnice Rady 76/464/EHS. Z hlediska národního legislativního rámce pojednávajícího o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod se jedná o nařízení vlády č. 61/2003 Sb. Dle zmíněného nařízení je maximální přípustný limit pro vypouštění jednotlivých chlorfenolů do odpadních vod $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Tyto hodnoty jsou však v praxi vyšší, pohybují se řádově v rozmezí $100 - 1000 \text{ mg.l}^{-1}$ (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011).

Pro oblast degradace a odstraňování těchto látek bylo navrženo několik metod, které můžeme dle principu rozdělit do pěti skupin. Zcela optimální metoda, která by byla vysoce účinná, ekonomicky co nejméně náročná, zároveň šetrná

k životnímu prostředí a jejichž průběh by byl bez rizika vzniku nežádoucích meziproductů, však prozatím neexistuje (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

3.1.4.1 Fyzikální metody degradace

Jedná se o nedestruktivní způsob degradace chlorfenolů. Hlavní podstatou je využití procesu adsorpce či rozdílné distribuce látek mezi dvě různé fáze. Při zpracování odpadních vod se používají polární a nepolární sorbenty, např. přírodní sedimenty, hlíny (typ alumina montmorillonit), aktivní uhlí, bentonit či popílek. Je nutné však následné zpracování sorbentů se zachycenými látkami, která se provádí oxidací chlorfenolů na povrchu MnO_2 . Pro zeminu obsahující chlorfenoly v množství do 500 mg na 1 kg zeminy lze použít sanaci destilací vodní parou. Přehřátá vodní pára s teplotou nad 100 °C prochází přes okyselenou hlínu (pH menší než 2, H_2SO_4), tvoří azeotropní směs s chlorfenoly. Po kondenzaci se látky ve vodě odstraňují metodami pro zpracování odpadních vod (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Při zpracování většího množství odpadních vod lze použít zkoncentrování chlorfenolů extrakcí emulzní fází. Tato emulzní fáze je tvořena vodou, tenzidem, nepolárním solventem a NaOH. Emulzní fáze zde funguje jako kapalná membrána, ve které se chlorfenoly kvantitativně zachycují (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

3.1.4.2 Chemické metody degradace

Hlavním principem je řízená chemická reakce, během které dochází k přeměně chlorfenolů na produkty s podstatně nižším toxickým účinkem. Tato metoda může probíhat destruktivně či nedestruktivně v souvislosti s oxidačně redukčními pochody (KANG et al., 2011).

Rozšířeným způsobem destruktivní metody je proces spalování. Hlavními faktory, které působí na rozklad chlorfenolů je vysoká teplota a optimální čas. Negativum při použití této metody je nebezpečí vzniku sekundárních produktů, např. PCDD či PCDF. Z toho důvodu je nutné velmi citlivé nastavení podmínek spalování,

tak aby v procesu chlazení spalných plynů nedocházelo ke vzniku těchto nežádoucích produktů.

K oxidaci chlorfenolů v odpadních vodách jsou používána oxidační činidla jako peroxid vodíku, chlor či ozon. Reakce se zde účastní hydroxylový radikál. Podstatně vysokou oxidační schopnost vykazuje systém tzv. Advanced Oxidation Processes (AOPs). Ten využívá kombinaci několika oxidačních procesů a to UV/O₃, H₂O₂/Fe²⁺ a UV/H₂O₂. Během reakce chlorfenolů s peroxidem vodíku, která je katalyzována tetrasulfoftalokyaninem železa či modifikovaným aktivním uhlím, nastává oxidační dechlorace, přičemž dochází ke štěpení aromatického jádra. Produktem reakce je směs fenolu, kyseliny chlorfumarové, kyseliny chlormaleinové, CO₂ a Cl⁻ (JAWAD et al., 2014).

Další nabízenou možností, jak odstranit chlorfenoly z odpadních vod je za použití enzymů. Působení křenové peroxidasy v přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje oxidaci chlorfenolů. Tvoří se fenoxylové radikály dávající vznik nerozpustným sedimentujícím polymerům (HAYES, 2013).

Jednou z dalších metod je nedestruktivní proces reduktivní dechlorace chlorfenolů za využití systémů určitých hybridů (např. LiAlH₄-CeCl₃) nebo destrukci pomocí solvatovaných elektronů. Katalytickou dechloraci chlorfenolů lze v kapalně fázi uskutečnit prostřednictvím přechodných kovů (např. Pd/Fe, Pt/C). Zdroj vodíku tvoří voda, NaOH, methanol nebo plynný vodík. Hlavním produktem reakce je fenol (KANG et al., 2011).

Pro aktivaci vodných roztoků bývá užíváno elektromagnetické vlnění o frekvenci 20-530 kHz (ultrazvuk). Jedná se o záření, které vytváří na mikroskopické hladině tlak a teplo a dochází ke kolapsu kavitačních bublin. Vznikají tak vodíkové a hydroxylové radikály, které poté oxidují či redukují pentan na monoCP v závislosti na charakteru prostředí (vzduch, kyslík, argon, peroxid vodíku), (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

3.1.4.3 Mikrobiální degradace

Mikroorganismy potřebují ke svému životu uhlík, který čerpají z nejrůznějších chemikálií. Jedná se o vlastnost, kterou lze využít pro degradaci chlorfenolů. Podmínkou však je, aby zvolený mikroorganismus produkoval enzym

zvaný dehalogenasa, který katalyzuje proces štěpení C-Cl vazeb (OLANIRAN, IGBINOSA, 2011). Tento enzym se může účastnit oxidační nebo redukční dehalogenace. Vznikají látky, kde je chlor substituován vodíkem či hydroxylovou skupinou. Výhodou je široký výběr z mikroorganismů zapříčiněný jejich vysokou adaptabilitou na nový zdroj uhlíku.

Oxidační dehalogenace chlorfenolů jako elektron-donoru ($\text{ArX} \rightarrow \text{ArX}^+ + \text{e}^-$) probíhá v aerobních podmínkách. Je katalyzována monooxygenasami. Vzniklé produkty jsou katecholy nebo chinony (ARORA, BAE, 2014).

Redukční dehalogenace chlorfenolů jako elektron-akceptoru ($\text{ArX} + \text{e}^- \rightarrow \text{ArX}^-$) probíhá v anaerobních podmínkách. Tyto látky mohou degradovat na oxid uhličitý a methan (jedná se o sulfogenní a methanogenní kmeny). Z pohledu reaktivity polohy atomu chloru byla nejnějněji dechlorována poloha *ortho* a v případě dvou *ortho* poloh pak ta, která vedle sebe má atom chloru. Po poloze *ortho* byla dále snadněji dechlorována poloha *meta*. U polohy *para* tak dechlorace probíhala nejobtížněji (KRASTANOV et al., 2013).

3.1.4.4 Fotochemické metody degradace

Přímé působení polychromatického světla způsobuje u chlorfenolů rozkladné procesy. Transformace probíhá přes fotoexcitované stavy s následným homolytickým štěpením vazeb C-Cl a O-H za tvorby chlorfenoxylových radikálů. Redukční dechlorace způsobuje vznik méně chlorovaných fenolů. Během adice hydroxylového radikálu dochází ke vzniku katecholů, benzochinonů a hydrochinonů. Jestliže dochází k oxidaci aromatického jádra, produktem je kyselina dichlormaleinová (DASWAT, MUKHOPADHYAY, 2012).

Velkou nevýhodou při použití této metody je nebezpečí vzniku nežádoucích PCDD/PCDF a celková výkonnost mineralizace je nízká. Dalším nabízeným způsobem je využití fotochemického generování hydroxylového radikálu. Kvalita mineralizačních systémů klesá následovně $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} > \text{UV}/\text{O}_3 > \text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ (ELGHNIJI et al., 2012).

Poměrně rozšířenou metodou v oblasti degradace a mineralizace je využití fotokatalýzy na povrchu polovodičů (např. ZnO, TiO₂). Nevýhodným aspektem

je zde nízký kvantový výtěžek a snadná kontaminace fotokatalyzátoru. Za přítomnosti fotosenzibilátorů (např. porfyriny, methylenová modř) probíhá fotooxidace chlorfenolů pomocí velmi aktivního oxidačního činidla, singletového kyslíku (LIN, 2014).

3.1.4.5 Elektrochemické degradace a γ -ozářování

Hlavním principem elektrochemických metod je elektrolýza vody. Jednou z nejrozšířenějších metod je anodická oxidace. Na anodě se adsorbuje hydroxylový radikál, který se následně podílí na destrukci chlorfenolů (DUAN et al., 2012).

Další možností elektrochemické degradace je využití chemisorpce vodíku na povrchu katody, kterou tvoří uzavřená uhlíková elektroda. Jedná se o katalytickou hydrogenaci, která probíhá v alkalickém prostředí, přičemž vzniká fenol či cyklohexanol (VLKOVÁ, CÍRKVA, 2005).

Využití ionizujícího záření γ -záření spočívá v rozkladu vody a vzniku reaktivních částic, tedy hydratovaného elektronu a hydroxylového radikálu. Následně dochází k procesu jednoelektronové redukce chlorfenolů na konečný produkt, kterým je fenol (PENG et al., 2012).

3.2 Chlorfenoly jako vedlejší produkty dezinfekce

V celém potravinářském a tedy i v kvasném průmyslu je základní a nezbytnou podmínkou používat nejen pro výrobu finálního výrobku, ale také během mytí, oplachů a dalších procesů, vodu, která z legislativního a hygienického hlediska zcela odpovídá kvalitě pitné vody. Požadavky na pitnou vodu upravuje vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu, četnost a rozsah kontroly pitné vody (JANDA et al., 2004). Převážná většina vedlejších dezinfekčních produktů úzce souvisí s použitím chloru a jeho sloučenin jako dezinfekčních prostředků. Chlor totiž patří mezi nejstarší a nejčastěji používané činidlo k dezinfekci vody (CHAO et al., 2011).

Důvodem, proč se stále rozšiřuje spektrum vzniklých vedlejších produktů dezinfekce, může být to, že se stále zlepšují analytické metody používané pro jejich analýzu a neustále roste paleta nově vyvinutých chemických dezinfekčních prostředků (MICHALOWICZ et al., 2011).

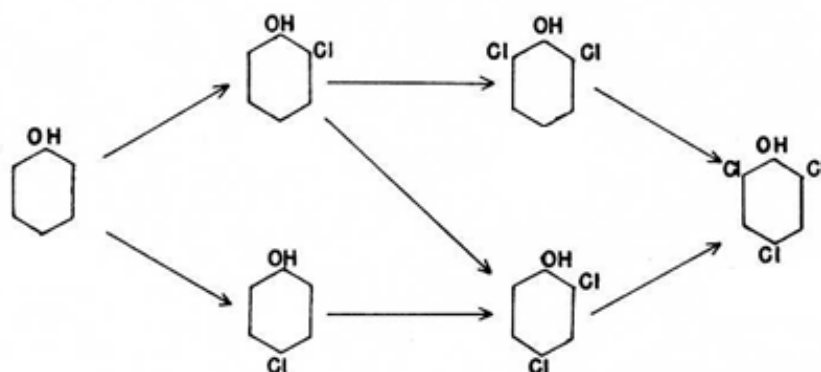
Dalším důvodem, který se ovšem netýká České republiky, ale z globálního pohledu může mít podstatný vliv, je používání méně kvalitních zdrojů z důvodu nedostatku kvalitní pitné vody. Spektrum dezinfekčních prostředků se tak stále rozšiřuje. Jednou ze známých skupin vedlejších produktů, které vznikají v důsledku dezinfekce vody, jsou chlorfenoly (GE et al., 2008).

3.2.1 Vznik chlorfenolů během procesu výroby piva

Během stáčení piva může dojít v souvislosti s předchozím použitím sanitačních prostředků na bázi chloru při procesu čištění či s přímým použitím chlorované vody pro výrobu piva k sekundární tvorbě chlorfenolů.

V důsledku použití těchto dezinfekčních prostředků tak aktivní chlor reaguje s přítomnými aromatickými látkami v pivu, tedy s fenoly a vznikají tak sloučeniny vykazující intenzivní vůni a chuť (BASAŘOVÁ, 1992). Podstatné je zmínit, že k výrazné změně sensorických vlastností ve finálním produktu dochází již při velmi nízkých koncentracích chlorfenolů. Ze sensorického pohledu vykazuje pivo obsahující chlorfenoly výraznou plastovou, vynylovou či medicínální chuť a vůni (EHRENBERGEROVÁ, CERKAL, 2011).

Postupná chlorace fenolu probíhá elektrofilní aromatickou substitucí v polohách 2, 4 a 6 aromatického kruhu. Na začátku reakce se tvoří buďto 2-chlorfenol nebo 4-chlorfenol. Postupnou chlorací z 2-chlorfenolu vzniká 2,4-dichlorfenol nebo 2,6-dichlorfenol. Zatímco u 4-chlorfenolu dochází ke vzniku pouze 2,4-dichlorfenolu. Chlorací 2,4-dichlorfenolu i 2,6-dichlorfenolu dochází k tvorbě 2,4,6-trichlorfenolu. 2,4,6-trichlorfenol dále reaguje s chlorem za vzniku směsi bezfenolových oxidačních produktů (EUMANN, SCHILDBACH, 2012).



Obr. 1: *Reakční schéma chlorace fenolu* (EUMANN, SCHILDBACH, 2012).

3.3 Analytické metody stanovení chlorfenolů

S ohledem na možné riziko vzniku chlorfenolů v souvislosti s přítomností fenolických sloučenin, se stále více klade důraz na nalezení optimální metody pro jejich stanovení, která je rychlá a poskytuje vysokou výtěžnost (KORHOŇOVÁ et al., 2009). Je vyvinutá již poměrně široká škála analytických metod používaných pro detekci chlorfenolů (BASARŇOVÁ, 1993). Žádná z nich však nespĺňuje všechny požadavky na přípravu vzorku a tedy nelze říct, že existuje metoda pro stanovení chlorfenolů, která by byla zcela ideální (MORAIS et al., 2012).

Při stanovení chlorfenolů je nutné zohlednit jejich poměrně vysokou polaritu a nízké tenze par, které mohou způsobit problémy při jejich následné analýze (BASARŇOVÁ, 1993). Z toho důvodu je nutná předchozí derivatizace různými činidly, zejména při použití plynové chromatografie. Poměrně nízké koncentrace chlorfenolů v analyzovaných vzorcích, které se i přes tuto skutečnost výrazně projevují navenek, jsou důvodem, proč se při jejich analýze často vyžaduje předúprava vzorku využívající různé koncentrační metody. K analýze, která přímo nevyžaduje předchozí derivatizaci, se nejčastěji používají metody využívající kapalinovou chromatografii, volumetrii, ampérometrii, kapilární elektroforézy či chromatografii iontových párů (KOVÁCS et al., 2011).

3.3.1 Využití moderních metod přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu piva

Využití plynové chromatografie při analýze především senzory aktivních látek má významnou úlohu a to z důvodu sledování kvality finálního produktu a zkoušení nových technologických postupů (RODRIGUEZ et al., 2011).

Před samotným chromatografickým stanovením je však nutné sledované látky ze vzorku vyextrahovat, zkoncentrovat a popřípadě i přečistit. Tato příprava vzorků před zahájením vlastní analýzy je nedílnou součástí celého procesu stanovení kvůli zlepšení chromatografických vlastností analytu, účinnější izolaci stanovovaných látek z matrice a vyšší schopnosti detekce těchto látek (CSERHÁTI, SZOGVI, 2013).

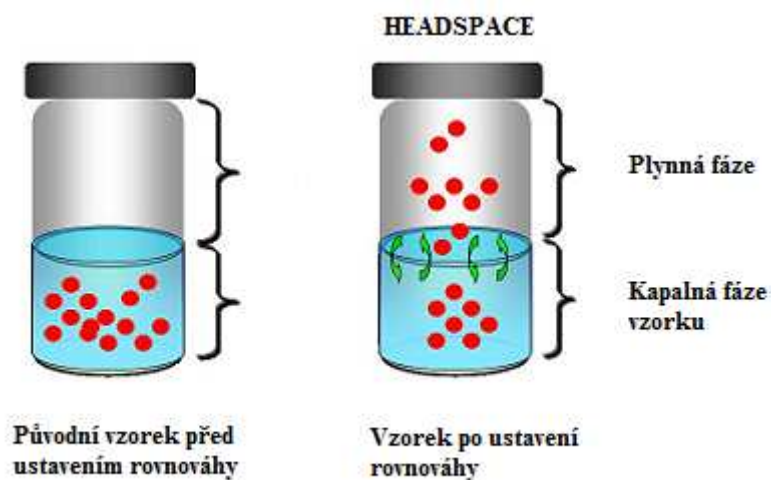
Při použití klasických metod pro přípravu vzorků jako je např. soxhletova extrakce či extrakce založená na systému kapalina-kapalina je potvrzeno, že jsou časově náročnější, pracnější a je zde vyšší pravděpodobnost k možnému výskytu chyb během analýzy. Z toho důvodu se stále více upřednostňují metody s lepší mezí detekce, sníženým množstvím vzorku potřebného pro analýzu, minimalizací použitých organických rozpouštědel i množství vzniklého odpadu a samozřejmě s kratší dobou nutnou pro přípravu vzorků, čímž se docílí zrychlení celého analytického postupu (ŠTĚRBA et al., 2011).

Headspace

Jedná se o základní techniku často používanou pro stanovení těkavých látek. Na plynovém chromatografu se dávkuje plynná fáze, která je v rovnováze s kapalnou fází vzorku. Vzhledem k tomu, že se k nástřiku používá jen plynná fáze, podstatně se tak snižuje zatížení chromatografického systému nežádoucími interferujícími látkami, což ve výsledku prodlužuje životnost kapilární kolony. Headspace analýzu lze provádět dvěma způsoby (CHARALAMBOUS, 2012).

Statický headspace (HS) je metodou, kdy se ustavuje rovnováha mezi těkavými látkami přítomnými ve vzorku a v parní fázi nad vzorkem v uzavřené plynotěsné vialce. Po ustavení rovnovážného stavu je plynná fáze nástříknuta na kolonu plynového chromatografu (HORÁK et al., 2012).

Druhou metodou je dynamický headspace (purge-and-trap, P & T). Vzorek je proplachován inertním plynem, často heliem, a těkavé látky jsou vytěsněny ze vzorku do trapu s dostatečnou retenční kapacitou (př. aktivní uhlí, křemelina). Po vytěsnění látek se trap zahřeje a zachycené analyty jsou uvolněny na kolonu chromatografu. Tento postup zkoncentrování poskytuje výrazně lepší mez detekce oproti HS analýze (HORÁK et al., 2012).



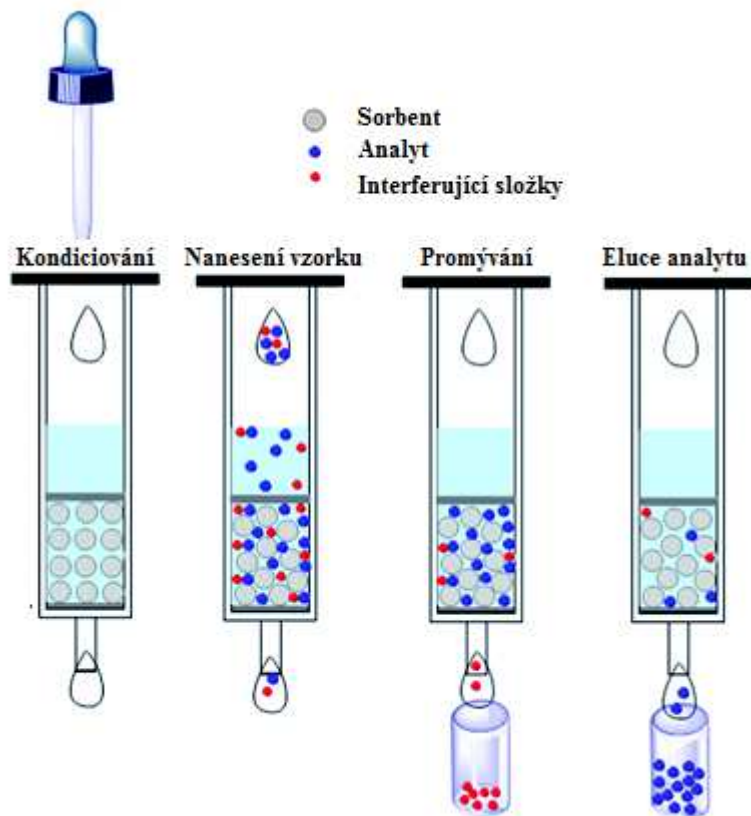
Obr. 2: *Headspace technika* (CHARALAMBOUS, 2012).

SPE

Extrakce na pevné fázi je metoda využívaná převážně k zakoncentrování a také k přečištění stanovovaných látek. Jedná se o jednoduchou techniku, díky tomu se dnes komerčně využívají jednorázové SPE minikolonky naplněné nejrůznějšími sorbenty (např. modifikovaný a nemodifikovaný oxid křemičitý, oxid hlinitý a další (VIDAL et al., 2012)

K protlačení vzorku a promývacího roztoku skrze lože sorbentu lze díky velikosti částic použít poměrně nízkého tlaku. Před samotnou analýzou je potřeba SPE kolonky nejdříve kondiciovat a až poté následuje protlačení konkrétního vzorku se stanovovanými látkami přes kolonku. Zachycené analyty jsou desorbovány organickým rozpouštědlem a následně stanoveny na plynovém chromatografu.

Podstatnou výhodou je, že celý proces extrakce na pevné fázi lze automatizovat a propojit s dávkovačem vzorků na plynovém či kapalinovém chromatografu (AUGUSTO et al., 2013).



Obr. 3: SPE technika (AUGUSTO et al., 2013).

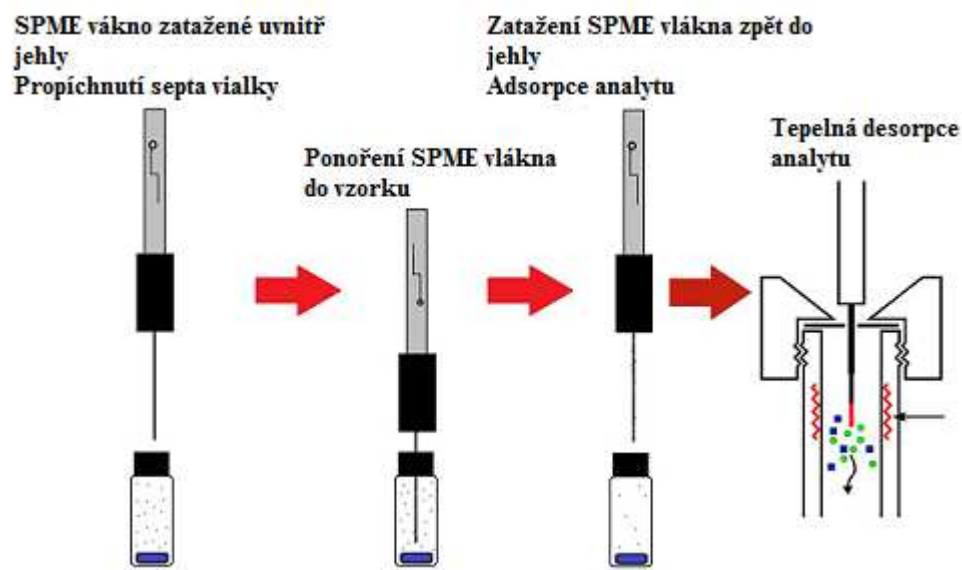
SPME

Základem mikroextrakce na pevné fázi je křemenné vlákno potažené polymerem, které je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle. Křemenné vlákno je zataženo uvnitř jehly a ta propíchně septum v zátce vialky. Posunutím pístu se vlákno dostane do vzorku či do prostoru nad jeho hladinou. Dochází k sorpci analytu do vrstvy pokrývající vlákno. Až dojde k ustavení rovnováhy, vlákno se zasune zpět dovnitř jehly a společně s ní je poté vytaženo z vialky se vzorkem. Jehla je následně zavedena do injektoru plynového chromatografu, kde dochází k tepelné desorpci analytu a nanesení na chromatografickou kolonu (PAWLISZYN, 2011).

Rovnovážný stav závisí na koncentraci analytu obsaženém ve sledovaném vzorku a na typu a tloušťce vrstvy polymeru pokrývající křemenné SPME vlákno. Selektivita

tohoto postupu může být ovlivněna typem polymeru, který pokrývá vlákno (BALASUBRAMANIAN, PANIGRAHI, 2011).

Velkou výhodou při použití této metody je absence potřeby rozpouštědel. Oproti tomu při využití této techniky je potřeba velmi opatrné a zručné zacházení kvůli značné křehkosti SPME vláken (KATAOKA, SAITO, 2011).



Obr. 4: SPME technika (PAWLISZYN, 2011).

3.3.1.1 Stanovení chlorfenolů pomocí SPME s využitím plynové chromatografie a detektoru MSD

Princip metody založené na mikroextrakci tuhou fází s využitím plynového chromatografu a hmotnostně spektrometrického detektoru vychází ze snadného převedení polárních látek na méně polární, což má za následek zvýšení účinnosti sorpce a tak podstatně snadnější izolaci (FALUDI et al., 2013).

Acetylace chlorfenolů přítomných ve 100 ml vzorku se provádí přidáním 5 g NaHCO_3 a po jeho následném rozpuštění 0,5 ml acetanhydridu za vzniku příslušných fenolacetátů, které vykazují příznivější chromatografické vlastnosti než volné

chlorfenoly. SPME je rychlá a nenáročná metoda, při jejichž použití není třeba žádných rozpouštědel. Výhodou při použití této metody je potřeba malého množství vzorku, kdy pro samotnou mikroextrakci je zapotřebí jen několik ml vzorku. Není zde třeba žádných organických rozpouštědel. Detekční limity odpovídající hodnotám $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ zcela vyhovují daným požadavkům na citlivost metod, které jsou používány pro analýzu velmi nízkých koncentrací chlorfenolů obsažených ve vzorcích. Pro SPME je vhodné použít vlákna s naneseným sorpčním polymerem z polydimethylsiloxanu (PDMS) či PDMS vlákno obsahující Carboxen (grafitizovaný uhlík). Separace provedená na plynovém chromatografu lze provést na kapilární koloně z křemenného skla o délce 30 m. Teplotní program použitý pro chromatografickou analýzu začínal na teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C}/3 \text{ min}$, dále $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ do $260 \text{ }^\circ\text{C}$. Nástříkový prostor chromatografu je vyhřátý na $250 \text{ }^\circ\text{C}$, což je teplota, která odpovídá teplotě desorpce ze SPME vlákna, probíhá po dobu 3 min. Během hmotnostní spektrometrie dochází k ionizaci nárazem elektronů o energii 70 eV, teplota iontového zdroje a interface odpovídá hodnotě $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Dominantní pík ve spektru vykazuje ion, jehož m/z odpovídá molární hmotnosti konkrétního volného fenolu (BAGHERI et al., 2012).

3.3.1.2 Stanovení chlorfenolů metodou plynové chromatografie a extrakcí kapalina-kapalina s využitím detektoru ECD či MSD

Jedná se o metodu vycházející z normy ČSN 12673, která je českou verzí evropské normy EN 12673:1998. Tato norma popisuje stanovení 19 chlorfenolů metodou využívající plynovou chromatografii ve vzorcích pitné, podzemní, dešťové, odpadní, mořské a povrchové vody (ESHAGI, 2011).

Využitím této analýzy lze stanovit 2-chlorfenol, 3-chlorfenol, 4-chlorfenol, 2,3-dichlorfenol, 2,4-dichlorfenol, 2,5-dichlorfenol, 2,6-dichlorfenol, 3,4-dichlorfenol, 3,5-dichlorfenol, 2,3,4-trichlorfenol, 2,3,5-trichlorfenol, 2,3,6-trichlorfenol, 2,4,5-trichlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 3,4,5-trichlorfenol, 2,3,4,5-tetrachlorfenol, 2,3,4,6-tetrachlorfenol, 2,3,5,6-tetrachlorfenol a pentachlorfenol. Metodou lze stanovit chlorfenoly v rozmezí hodnot koncentrací $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ až 1 mg.l^{-1} v závislosti na použitém objemu vzorku a na stanoveném chlorderivátu, tedy na stupni chlorace. Platí, že čím je vyšší počet atomů chloru v molekule, tím je mez detekce nižší. Hlavní princip

spočívá stejně jako v předchozí metodě v acetylaci chlorfenolů na méně polární látky za použití acetanhydridu s následnou extrakcí kapalina-kapalina stanovených plynovou chromatografií s využitím detektoru elektronového záchytu (ECD) či hmotnostního detektoru (MSD). K extrakci se využívá organické rozpouštědlo dichlormethan (ESHAGI, 2011).

Nevýhodou při použití postupu založeného na extrakci kapalina-kapalina však při využití extrakčních rozpouštědel jako např. zmíněný dichlormethan poskytuje nižší výtěžnost oproti extrakci a mikroextrakci na pevné fázi, která je horší než 60 %. Dalším negativem je větší časová náročnost a pracnost (NAEENI et al., 2012).

3.3.1.3 Stanovení chlorfenolů pomocí SPE s využitím plynové chromatografie a detektoru ECD

Postatou této metody používané k analýze chlorfenolů je využití extrakce na pevné fázi (SPE). Tento postup poskytuje lepší výtěžnost než klasické metody založené na extrakci kapalina-kapalina, je bezpečnější, rychlejší a poměrně levný. Velkou výhodou této analýzy je eliminace tvorby velmi stabilní a nepříjemné emulze. Z toho důvodu je tato metoda vhodná pro rutinní analýzu chlorfenolů (PADILLA-SÁNCHEZ et al., 2011).

Pro lepší výsledky je nutné opět provést derivatizaci anhydridem kyseliny octové. Dalším krokem je extrakce a zakoncertování pomocí SPE techniky na kolonkách naplněných sorbentem LiChrolut EN a stanovení plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchytu (ECD). Kolonky naplněné sorbentem LiChrolut EN poskytují oproti kolonkám naplněných sorbentem Lichrolut RP u všech stanovovaných chlorfenolů lepší výsledky. Pro plynovou chromatografii lze použít křemennou kapilární kolonou o délce 30 m. Kolonu je nutné vytemperovat na teplotu 75 °C po dobu 0,5 min. Následuje teplotní gradient 30 °C/min do teploty 120 °C a poté vyhřátí kolony rychlostí 10 °C/min do dosažení teploty 255 °C, při které je zapotřebí setrvat po dobu 2 min. K nástřiku je použit injektor vyhříváný na teplotu 260 °C (MORAIS et al., 2013).

Při použití této metody je sledován vliv pH vzorku. K požadované maximální účinnosti zadržení analytu sorbentem je nutné upravit pH vzorku. K tomu slouží

přídavek 1,5 ml borátového pufru o pH 10,4 k 500 ml vzorku. Hodnota pH vzorku měla se tak následně měla pohybovat v rozmezí 8,7 – 9,0. Přídavek 0,5 ml anhydridu kyseliny octové způsobí pokles hodnoty pH na 4,6 – 4,9. Tento rozsah hodnot pH se jeví jako optimální. Takto je možné stanovit chlorfenoly v jednotkách či desítkách ng/l (MORAIS et al., 2013).

3.3.1.4 Stanovení chlorfenolů pomocí SPE s využitím vysoce účinné kapalinové chromatografie s UV/VIS spektrometrickou detekcí

Tato metoda spočívá v předchozím zakoncentrování chlorfenolů a následné chromatografické analýze na koloně HPLC o malém průměru ve spojení s detektorem diodového pole (DAD), (SHARMA et al., 2011). Zakoncentrování se provádí pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Před samotnou extrakcí je nutné provést kondicionování SPE kolonek pomocí 5 ml acetonitrilu, 5 ml methanolu a 5 ml 10 % vodného roztoku KCl nebo NaCl o pH 3,0 (XUE et al., 2014). Roztoky KCl a NaCl slouží jako vysolovací činidla, která zvyšují iontovou sílu roztoku, čímž dochází k vysolení organické látky z roztoku do pevné fáze. K eluci nasorbovaného množství chlorfenolů je vhodné použít 5 až 6 ml acetonitrilu. Následně je eluát odpařen proudem dusíku a poté je množství 10 μ l nastříknuto na chromatografickou kolonu (PADRÓN et al., 2014).

Během HPLC analýzy s DAD detektorem byla teplota kolony vyhřátá na 30 °C. Kolona je plněná sorbentem, který tvoří modifikovaný silikagel C18 (oktadecylsilanizovaný silikagel o velikosti částic 40 μ m, jehož hmotnost v koloně odpovídá 500 mg). K detekci dochází při vlnové délce 230 nm až 305 nm, tedy v oblasti absorpčního maxima těchto látek. Při vlnové délce 230 nm dochází k detekci všech chlorfenolů, ale zároveň i k absorpci interferujících látek obsažených ve vzorku. K zamezení nežádoucího působení interferujících látek lze použít vlnovou délku 280 nm, při níž je však pravděpodobná horší detekční schopnost. Mobilní fáze je tvořena ze dvou složek. První složku tvoří methanol a 10 mmol.l⁻¹ fosfátový tlumič o pH 3,5. Druhá složka obsahuje 100 % methanol (PADRÓN et al., 2014).

Ve srovnání s GC metodami stanovení chlorfenolů, je HPLC analýza podstatně méně časově náročnější a pracnější, ale oproti tomu jsou GC postupy citlivější a poskytují tedy lepší výsledky (FAN et al., 2014).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Seznam použitých chemikálií a standardů

Pro analýzu byly použity následující chemikálie:

- n-hexan: p.a. 99 %, PENTA, ČR
- Methanol: p.a. 99,8 %, Sigma-Aldrich, Switzerland
- Ethanol: 99,8 %, Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Borátový pufr: čistota 9,0, PENTA, ČR
- Kyselina chlorovodíková: 35 %, PENTA, ČR
- Manganistan draselný: 99 %, Lach-Ner, s.r.o., ČR

Tab. 3: *Seznam použitých standardů pro analýzu.*

Standard	Označení
2-Chlorfenol (2-CP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA
2,3-Dichlorfenol (2,3-DCP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA
2,4-Dichlorfenol (2,4-DCP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA
2,5-Dichlorfenol (2,5-DCP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA
2,6-Dichlorfenol (2,6-DCP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA
3,4-Dichlorfenol (3,4-DCP)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich, USA

4.2 Přístrojové vybavení

Pro měření byly použity následující laboratorní přístroje a vybavení:

- Chlazená centrifuga značky Hettich Universal 32R zentrifugen, Německo
- Vakuový manifold SULPECO VISIPREP™ LABICOM s.r.o.
- Strata X 33 µm Polymeric Sorbent 200 mg/3 ml (Phenomenex, USA)
- Chromatograf GC Fisons 8000 series
- FID detektor a HT 300A GC Autosampler (HTA s.r.l.)
- Vialky šroubovací s širokým hrdlem o objemu 2 ml, plastovým uzávěrem se silikonovým septem (Fisher Scientific s.r.o.)
- Běžné laboratorní vybavení

4.3 Vzorky pro analýzu

Pro analýzu byly použity vzorky pív menších pivovarů, jejichž produkce je soustředěna převážně v Brně a jeho bližším okolí. Dále se jednalo o vzorky pív uvařených v prostorách poloprovozu Mendelovy univerzity v Brně. Vzorky, které byly analyzovány, vykazovaly senzorycky prokazatelnou medicínální vůni.

Tab. 4: *Seznam analyzovaných vzorků.*

Název/Typ piva	Specifikace
Richard	11° nepasterizované nefiltrované světlé pšeničné pivo, spodně kvašené
Pegas	16° nefiltrované polotmavé pšeničné speciální pivo bavorského typu, svrchně kvašené
Lucky Bastard Black	14° nefiltrované tmavé speciální pivo, svrchně kvašené
Lucky Bastard Pale	12° nefiltrované světlé pivo, svrchně kvašené
Polotmavé	11° polotmavé, spodně kvašené, MENDELU
India Pale Ale	14° polotmavé, svrchně kvašené, MENDELU
Ale	14° světlé, svrchně kvašené, MENDELU
Pšeničné	12° světlé, svrchně kvašené, MENDELU
Světlý ležák	12° světlé, spodně kvašené, MENDELU

4.4 Příprava standardních roztoků

V první části experimentu byla provedena standardizace. Bylo zakoupeno 6 standardů chlorfenolů (2-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP a 3,4-DCP). Následně byly vytvořeny zásobní roztoky o dané koncentraci. Navážka příslušných standardů byla rozpuštěna v nepolárním rozpouštědle hexanu a doplněna na objem 50 ml (STD2), pětinasobným naředěním byl připraven standard o koncentraci 0,1 mg/ml (STD1). Připravené standardy byly dále naneseny na kolonu plynového chromatografu a analyzovány. Výsledná data sloužila pro porovnání s analyzovanými vzorky.

Tab. 5: Hodnoty navážek a koncentrací připravených standardů.

Chlorfenol	Navážka [g]	Koncentrace STD1 [mg/ml]	Koncentrace STD2 [mg/ml]
2-chlorfenol	0,0255	0,1020	0,510
2,3-dichlorfenol	0,0254	0,1016	0,508
2,4-dichlorfenol	0,0253	0,1012	0,506
2,5-dichlorfenol	0,0258	0,1032	0,516
2,6-dichlorfenol	0,0259	0,1036	0,518
3,4-dichlorfenol	0,0257	0,1028	0,514

4.5 Příprava vzorku pro stanovení výtěžnosti metody

Pro ověření účinnosti stanovení byly připraveny roztoky přidáním 1 ml již připravených standardních roztoků (2-chlorfenol, 2,3-dichlorfenol, 2,4-dichlorfenol, 2,5-dichlorfenol, 2,6-dichlorfenol a 3,4-dichlorfenol) a 10 ml borátového pufru. Směs roztoků se převedla do dělicí nálevky. Obsah dělicí nálevky se protřepával po dobu cca 1 minuty. Za několik minut došlo k oddělení fází, přičemž se spodní fáze odpustila a použila pro následovné měření. Provedla se extrakce na SPE kolonkách, po které následovala chromatografická analýza.

4.6 Příprava vzorku pro standardní přídavek

Metoda standardního přídávku je založená na přidání známého množství standardu ke vzorku. Jednalo se o ověření matricového efektu látek v reálném vzorku piva, zdali nebudou retenční časy jednotlivých chlorfenolů posunuty. Jako standardní přídavek byl použit roztok směsi 6 chlorfenolů (2-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP a 3,4-DCP) rozpuštěných v 50 ml ethanolu (STD2).

Pro standardní přídavek byl použit vzorek piva Richard. Nejdříve došlo k vytřepání vzorku piva pro odstranění CO₂, následovala filtrace a poté odstředění. Pro vytvoření

kalibrační závislosti se k 15 ml vzorku piva přidalo 0 ml, 1 ml, 3 ml a 5 ml směšného roztoku standardu a objem vzorku byl doplněn vždy na 20 ml destilovanou vodou. Poté se provedla extrakce na SPE kolonkách a chromatografická analýza.

4.7 Simulace podmínek vzniku chlorfenolů v pivu pro následnou GC analýzu

Jedním z bodů zadání diplomové práce bylo cíleně vytvořit podmínky pro vznik vybraných těkavých látek v pivu. Na základě toho bylo tedy nutné uvařit pivo za předem zvolených podmínek vhodných pro vytvoření chlorfenolů.

První část zahrnovala varní proces piva bez chlorfenolů, které sloužilo jako slepý vzorek. Druhá část varního procesu byla změřena na výrobu piva obsahující chlorfenoly. Proces simulace vzniku těchto látek byl proveden v poloprovozních podmínkách.

4.7.1 Varní proces piva bez chlorfenolů

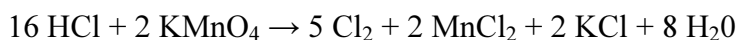
Pro výrobu piva bylo použito 4 l pitné vody a 800 g světlého sladu vyrobeného ve sladovně Bernard. Teplotní a časové podmínky varního procesu byly následující. Do 40 °C vyhřáté vody se přidalo zmíněné množství sladu. Při této teplotě se setrvalo po dobu 5 minut. Následovalo zvýšení teploty na 52 – 55 °C po dobu 15 minut. Opětovné zvýšení teploty na 62 °C na dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut následovala opět zvýšení teploty na 85 °C po dobu 5 minut. Následně došlo ke zchlazení a přidání 10 g chmele, jehož dávkování se provádělo po částech. Pro chmelovar byla použita odrůda Žatecký poloraný červeňák. Na začátku chmelovaru se přidala první část chmele, v polovině doby chmelovaru druhá část a třetí část se přidala 15 minut před koncem. Sladina s přidáním chmelem se povařila při teplotě 100 °C po dobu 90 minut. Po chmelovaru následovalo zchlazení, scezení a vložení do zákvasné nádoby, do které se současně přidalo 10 ml spodních pivovarských kvasnic (kmen č. 95, VÚPS Praha). Zákvasné nádoby se umístily v chlazené místnosti. Po uplynutí 7 dní se do piva přidal cca 1 g cukru a pivo se nechalo 14 dní zrát.

Poté opět následovala úprava vzorku vytřepáním, filtrací a odstředěním. 15 ml odstředěného vzorku piva se následně nanoslo na SPE kolonku a provedla se extrakce. Pro každý vzorek se provedlo opakování. Připravené vzorky se nanosly na chromatografickou kolonu a následovala analýza.

4.7.2 Varní proces piva s chlorfenoly

Základem simulace vzniku chlorfenolů je použití chlorované vody pro proces výroby piva. Pro vytvoření chlorované vody je nutné mít k dispozici aparaturu na vývoj plynů. Aparatura naplněná vodou se vložila do digestoře. Pro výrobu chlorované vody bylo přidáno silné oxidační činidlo KMnO_4 . Následně se přidávala HCl tak, aby se rovnoměrně vyvíjel plynný chlor.

Reakce vzniku chloru



Pro varní proces byly použity 4 l chlorované vody. Teplotní i časové podmínky procesu výroby piva obsahující chlorfenoly jsou identické s výše zmíněnými. Před začátkem chmelovaru byla přidána opět chlorovaná voda v množství cca 2 dcl. Po 90 minutách chmelovaru následovalo zchlazení, scezení a předvedení do zákvasné nádoby spolu s kvasnicemi, která se přemístila do chlazené místnosti. Do 7denního piva se následně přidal cukr a nechalo se dalších 14 dní zrát. Po 14 dnech se následně opět vzorek piva upravil vytřepáním, zfiltrováním a odstředěním. Poté se provedla extrakce na SPE kolonkách a chromatografická analýza.

4.8 Příprava vzorků piva pro analýzu

Pivo je poměrně složitý matriční komplex, který před samotnou analýzou vyžaduje úpravu. Úprava vzorků zahrnovala několik kroků. Při analýze chlorfenolů ve vzorcích piva je tedy nutné nejdříve analyty zbavit možných interferujících látek, které by mohly

znesnadňovat vlastní analýzu a tím následně i zkreslovat výsledek experimentu. Dalším nezbytným krokem je dané analyty z příslušné matrice vyextrahovat. Z jednotlivých vzorků piva bylo pro analýzu odebráno vždy 15 ml a pro každý vzorek byly provedeny 2 paralelní stanovení.

4.8.1 Filtrace

Vzorky analyzovaných piva se před samotnou analýzou nejdříve protřepou. Tento krok má za cíl odstranění co možná největší množství CO_2 , jehož přítomnost je pro tuto analýzu nežádoucí. Poté se vzorky zfiltrují přes skládaný filtrační papír.

4.8.2 Odstředění

Zfiltrované vzorky se následně odstřeďují na chlazené centrifuze značky Hettich Universal 32R zentrifugen, Německo. Zvolený centrifugační program je 10 minut při 4000 otáčkách/minutu. Odstředění je nutné pro odstranění kalu a získání požadovaného čirého vzorku piva pro následující extrakci a vlastní analýzu.

4.8.3 Derivatizace

Principem derivatizace vzorku je změna vlastností analytu pro jeho následnou snadnější extrakci. Pro derivatizaci vzorků piva byl použit proces acetylace. Ke vzorku piva bylo přidáno 1,5 ml borátového pufru a 0,5 ml acetanhydridu. Vzniklé acetylchlorfenoly vykazují nižší polaritu a jsou tak snadněji izolovány.

4.8.4 SPE

K extrakci na pevné fázi (SPE – solid phase extraction) byl použitý vakuový manifold SULPECO VISIPREP™ LABICOM s.r.o. Manifold je vybaven víkem s 12 pozicemi, přičemž každá pozice má svůj on/off ventilek pro možnost uzavření

pozice při nevyužití plné kapacity přístroje či pro regulaci průtoku dané kapaliny. Další součástí přístroje je skleněná komora s těsnícím krytem a držákem. Jako ukazatel tlaku slouží manometr pro měření vakua. Poslední částí je stojánek umožňující použití různých sběrných nádob. SPE kolonky Strata-X 33 μm byly naplněné polárním sorbentem 200 mg/3 ml. Kolonky Strata-X vykazují díky vysokému měrnému povrchu 33 μm částic sorbentu extrémně vysokou kapacitu této fáze.

Těsně před samotnou SPE analýzou je nutné příslušné kolonky nejdříve kondicionovat. Kondicionování se provádělo promytím 2 ml methanolu a 3 ml borátového pufru. Po provedení kondicionace kolonek následovalo nanesení 20 ml jednotlivých vzorků piv. Pomocí vakua dochází k protlačení vzorků přes sorbent. Před samotnou elucí bylo provedeno promytí kolonek pomocí borátového pufru z důvodu odstranění nežádoucích rušivých složek matrice vzorku. Ze SPE kolonek je nakonec nutné eluovat extrakty pomocí nepolárního rozpouštědla. Eluce proběhla nanesením 1 ml hexanu a následně protlačení přes sorbent do sběrné nádoby. Vzniklá směs se pomocí automatické pipety přenesla do skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem a následovala chromatografická analýza.

4.9 Vlastní analýza vzorků metodou GC-FID

Vlastní analýza těkavých chlorfenolů ve vzorcích piv byla provedena pomocí plynové chromatografie. Stanovení probíhalo na plynovém chromatografu GC Fisons 8000 series s plamenově ionizačním detektorem (FID) a kapilární kolonou 5inch cage, DB-23 (60 m, 0,25 mm, 0,25 μm). Vialky se vzorky byly vloženy do autosampleru HT 300A GC a následovalo měření s využitím teplotního gradientu. Teplota kolony byla regulována dle předem nastaveného teplotního programu.

Po chromatografické analýze následovala identifikace stanovovaných chlorfenolů pomocí srovnání se standardy. Poté se provedlo kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení na počítači vybaveném programem Clarity pracující pod operačním systémem Windows.

4.9.1 Podmínky plynové chromatografie

- **Nosný plyn**

Jako nosný plyn byl použit dusík při tlaku 150 kPa.

- **GC kolona**

Pro analýzu chlorfenolů byla použita 60 m dlouhá křemenná kapilární kolona s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu stacionární fáze 0,25 μm .

- **Teplota injektoru**

K nástřiku byl použit injektor, který byl vyhříván na teplotu 260 °C.

- **Teplotní program**

Kolona se vytemperovala na teplotu 75 °C po dobu 1 min. Poté následoval teplotní gradient 30 °C/min do 120 °C. Kolona byla dále vyhřívána rychlostí 10 °C/min do teploty 240 °C. Doba, po kterou byla ponechána při této teplotě, odpovídala 2 min.

- **Objem nástřiku**

Objem nástřiku eluentu na kolonu činil 1 μl .

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Statistické vyhodnocení naměřených hodnot

Pro experimentální data naměřená u jednotlivých vzorků byla provedena statistická analýza, která zahrnovala výpočet aritmetického průměru a směrodatné odchylky. Jednotlivé parametry byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2007. Byly vytvořeny grafy znázorňující profilové zastoupení jednotlivých chlorfenolů a jejich množství ve vzorcích piva.

Pro sledování rozdílu v obsahu jednotlivých chlorfenolů ve vzorcích byl použit program STATISTICA 12 firmy StatSoft. Rozdíl v obsahu všech stanovovaných chlorfenolů mezi jednotlivými vzorky piva byl statisticky vyhodnocen pomocí metody analýzy rozptylu Anova s následným provedením Post-hoc testů.

Po provedení analýzy byl zjištěn statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$ v obsahu 2-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP a 3,4-DCP v analyzovaných vzorcích.

5.1.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je statistickou veličinou vyjadřující míru polohy. Jedná se o součet všech hodnot vydělený jejich počtem. Aritmetický průměr je dán vztahem:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{HENDL, 2004})$$

5.1.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka charakterizuje míru variability. Výpočtem směrodatné odchylky se zjistila rozptýlenost hodnot x_i kolem aritmetického průměru. Pro tento

experiment charakterizuje směrodatná odchylka míru přesnosti série paralelních stanovení a je dána vztahem:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{HENDL, 2004})$$

Tab. 6: *Vypočítané statistické parametry jednotlivých chlorfenolů ve vzorcích.*

Vzorek	Průměr ze 2 stanovení [mg/l]					
	2 CP	2,3 CP	2,4 CP	2,5 CP	2,6 CP	3,4 CP
Ale	0,071	0,003	0,019	0,008	0,017	0,002
Světlý ležák	0,144	0,004	0,048	0,021	0,015	0,006
Polotmavé	0,099	0,012	0,043	0,073	0,088	0,004
India Pale Ale	0,039	0,003	0,018	0,015	0,017	0,001
Lucky Bastard Black	0,125	0,012	0,047	0,042	0,027	0,006
Lucky Bastard Pale	0,094	0,02	0,057	0,079	0,044	0,002
Pšeničné	0,144	0,008	0,056	0,004	0,078	0,006
Richard	0,016	0,002	0,005	0,013	0,007	0,001
Pegas	0,012	0,001	0,007	0,002	0,01	0,001

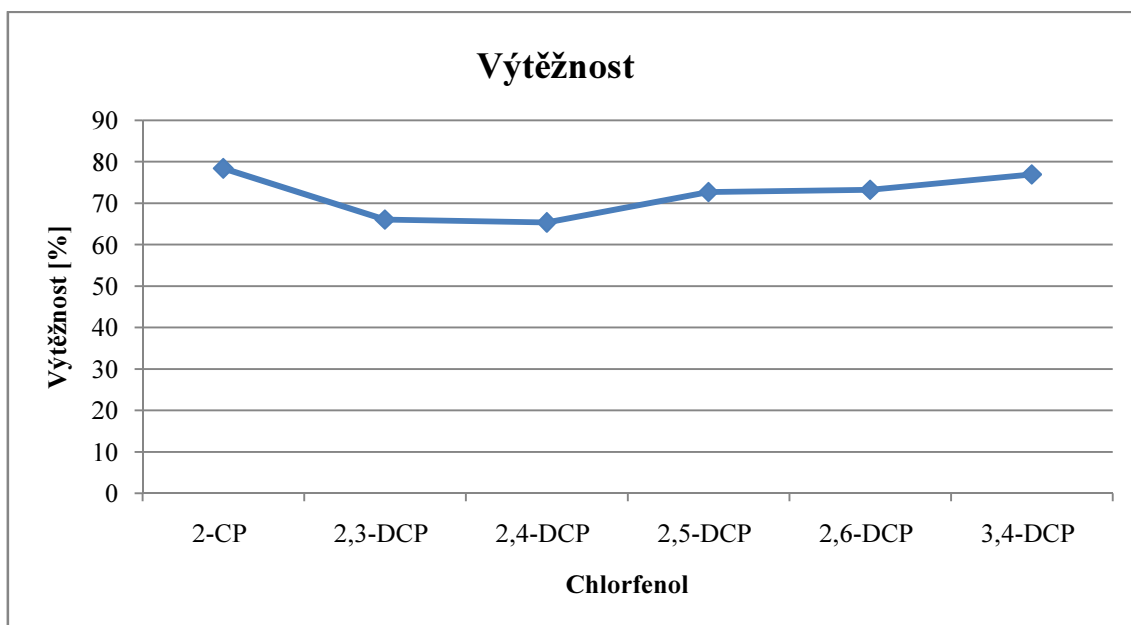
Vzorek	Směrodatná odchylka					
	2 CP	2,3 CP	2,4 CP	2,5 CP	2,6 CP	3,4 CP
Ale	0,001	0,001	0,002	0,002	0,004	0,003
Světlý ležák	0,001	0,001	0,004	0,004	0,004	0,002
Polotmavé	0,002	0,003	0,002	0,003	0,004	0,005
India Pale ale	0,002	0,002	0,002	0,002	0,006	0,005
Lucky Bastard Black	0,004	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002
Lucky Bastard Pale	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002
Pšeničné	0,001	0,001	0,004	0,001	0,003	0,001
Richard	0,004	0,005	0,005	0,005	0,002	0,002
Pegas	0,004	0,001	0,004	0,005	0,005	0,002

5.2 Stanovení výtěžnosti měření

Výtěžnost byla stanovena pomocí roztoků obsahující standardy jednotlivých chlorfenolů (2-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP, 3,4-DCP), které byly měřeny za stejných podmínek jako analyzované vzorky. Výtěžnost lze zjistit pomocí průměrné koncentrace látky (x) a původní připravené koncentrace (x_D). Vyjadřuje se v %. Pro výpočet výtěžnosti jsem použila vztah: $R = 100x / x_D$.

Tab. 7: Výtěžnost použité metody u jednotlivých chlorfenolů.

Chlorfenol	Výtěžek z 1. měření [%]	Výtěžek z 2. měření [%]	Průměrná výtěžnost [%]
2-CP	78,55	78,23	78,39
2,3-DCP	65,78	66,40	66,09
2,4-DCP	65,12	65,59	65,36
2,5-DCP	72,43	72,98	72,71
2,6-DCP	73,45	73,10	73,28
3,4-DCP	77,17	77,76	76,97

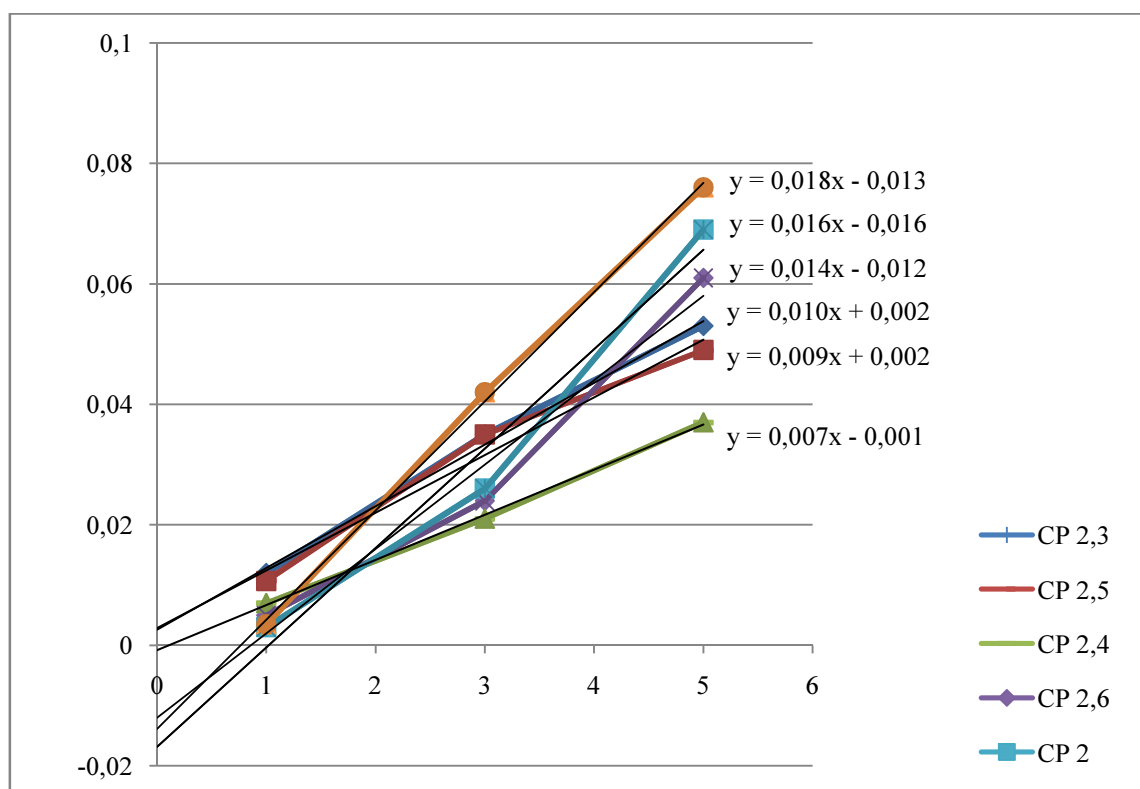


Obr. 5: Porovnání výtěžnosti měření jednotlivých chlorfenolů.

Z tabulky i grafu je patrné, že nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo u 2-CP, jehož hodnota odpovídala 78,39 %. Naopak nejnižší výtěžnost byla stanovena u 2,4-DCP a to 65,36 %.

5.3 Standardní přídavek

Touto metodou byl ověřen vliv matrice vzorku na stanovení jednotlivých chlorfenolů v koncentračním rozsahu od 0 do 0,5 mg/ml a také skutečnost, že kvalitativní odezva chlorfenolů zůstává stejná i při analýze reálného vzorku piva. Jako modelové pivo posloužil vzorek piva Richard. Na obrázku 6 jsou kalibrační křivky standardních přídavek jednotlivých chlorfenolů. Proložená přímka je ve všech případech s korelačním faktorem vyšším jak 0,95, vykazuje tedy lineární závislost. Vliv matrice je tedy při analýze jednotlivých piv minimální.

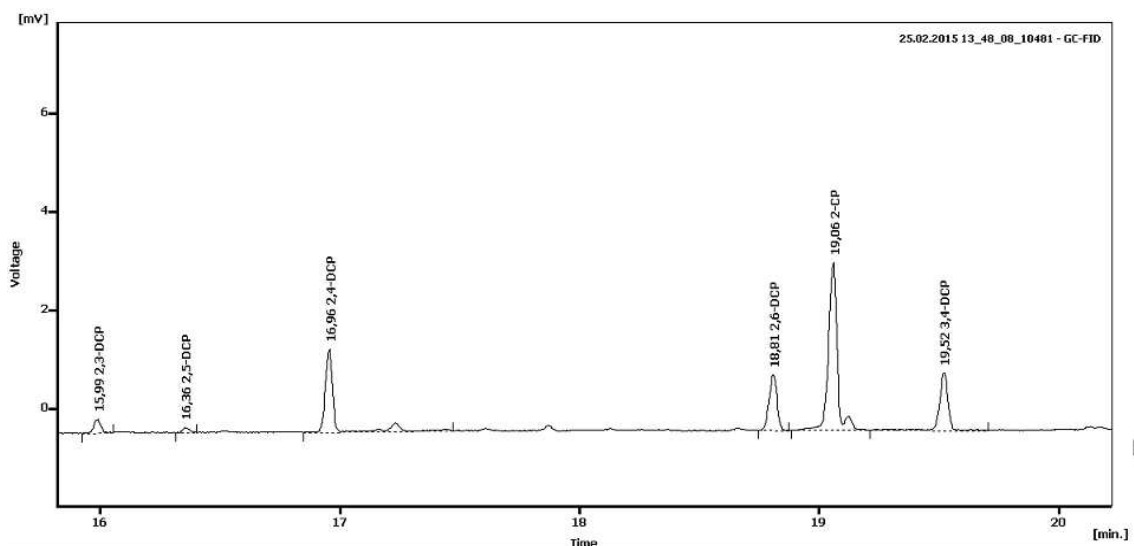


Obr. 6: Kalibrační závislost standardních přídavek jednotlivých chlorfenolů.

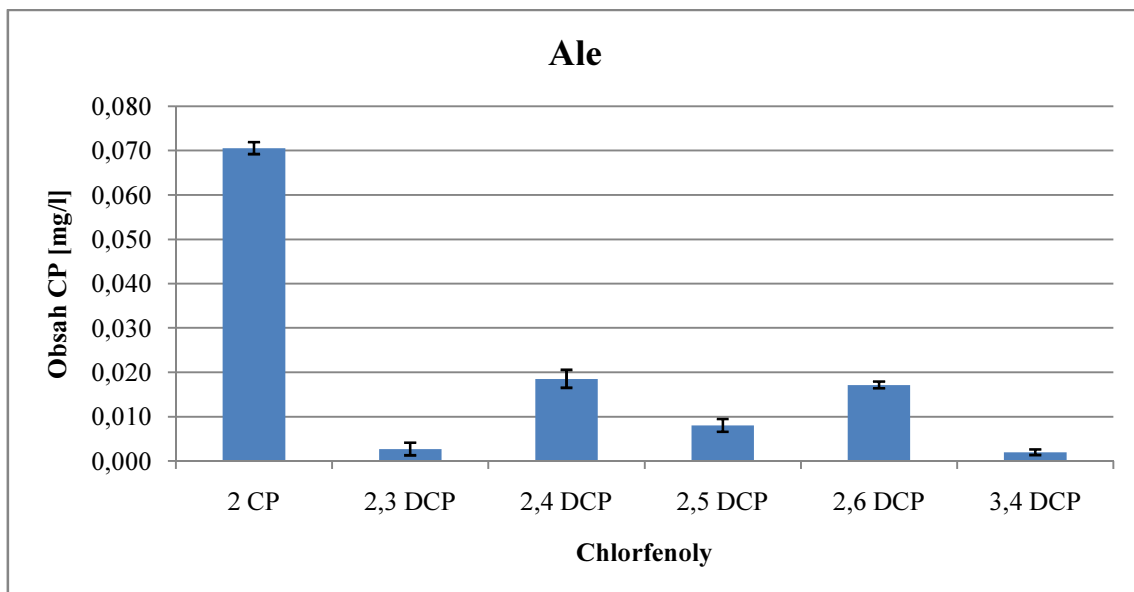
5.4 Profilové zastoupení chlorfenolů v analyzovaných vzorcích piva

Následující chromatogramy znázorňují přítomnost a koncentraci chlorfenolů v jednotlivých vzorcích piva. Retenční čas 2-CP ve zkoumaných vzorcích odpovídá hodnotě $19,067 \pm 0,02$ minuta. 2,3-DCP byl eluován v retenčním čase $15,983 \pm 0,02$ minuta. 2,4-DCP byl eluován v retenčním čase $16,957 \pm 0,01$ minuta. 2,5-DCP byl eluován v retenčním čase $16,350 \pm 0,01$ minuta. 2,6-DCP byl eluován v retenčním čase $18,811 \pm 0,02$ minuta a 3,4-DCP byl eluován v retenčním čase $19,526 \pm 0,01$ minuta. Grafy popisují profilové zastoupení jednotlivých chlorfenolů v mg/l v analyzovaných vzorcích piva.

5.4.1 Vzorek piva Ale



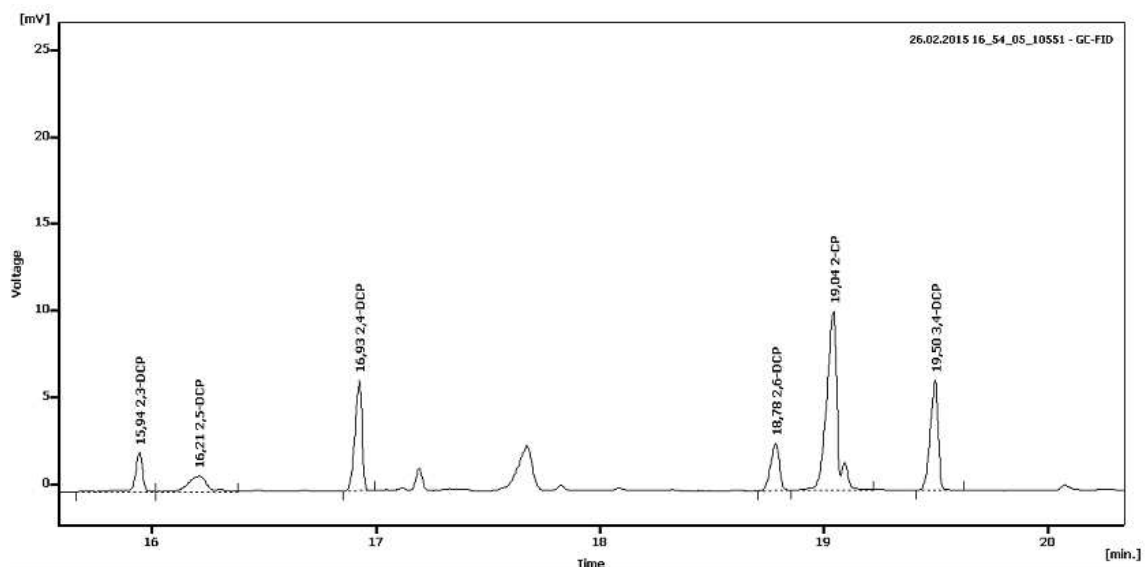
Obr. 7: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Ale.



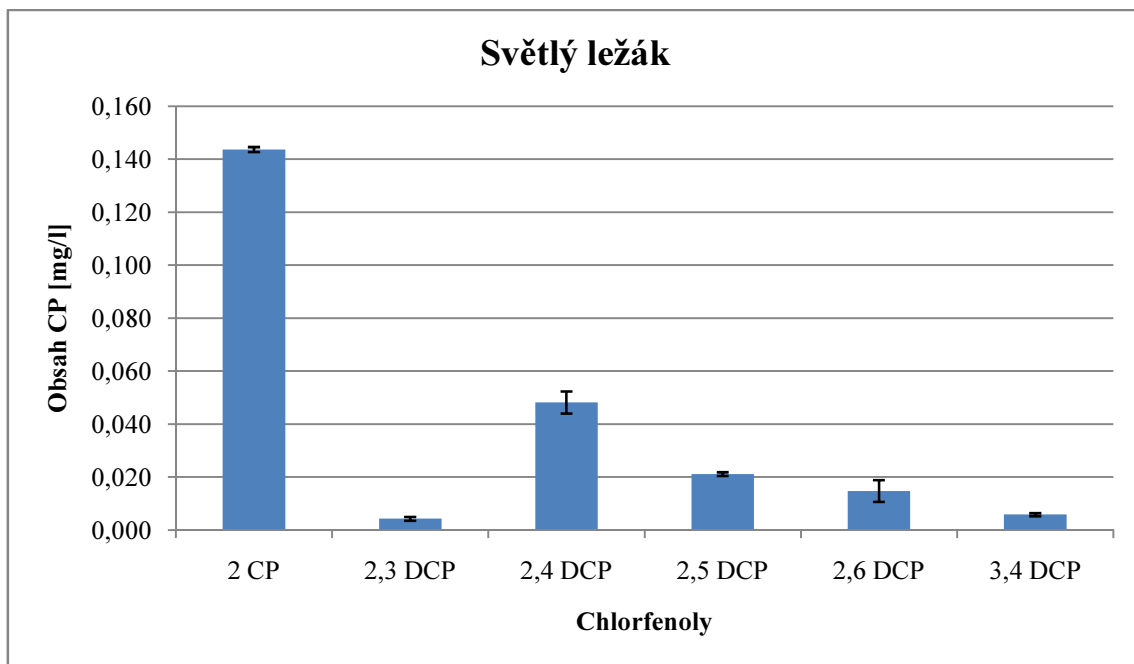
Obr. 8: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Ale.

Z grafu vyplývá, že největší zastoupení ve vzorku piva Ale tvoří 2-CP, jehož množství odpovídá 0,071 mg/l. Naopak v nejnižším množství je přítomný 3,4-DCP a to 0,002 mg/l. V porovnání s 2-CP jsou zastoupeny ostatní chlorfenoly v poměrně nízkém množství. V množství 0,019 mg/l je obsažen 2,4-DCP. Množství 2,6-DCP odpovídá 0,017 mg/l. V nižších hodnotách je dále obsažen 2,5-DCP, jehož množství ve vzorku odpovídá 0,008 mg/l. Množství 2,3-DCP ve vzorku je 0,003 mg/l.

5.4.2 Vzorek piva Světlý ležák



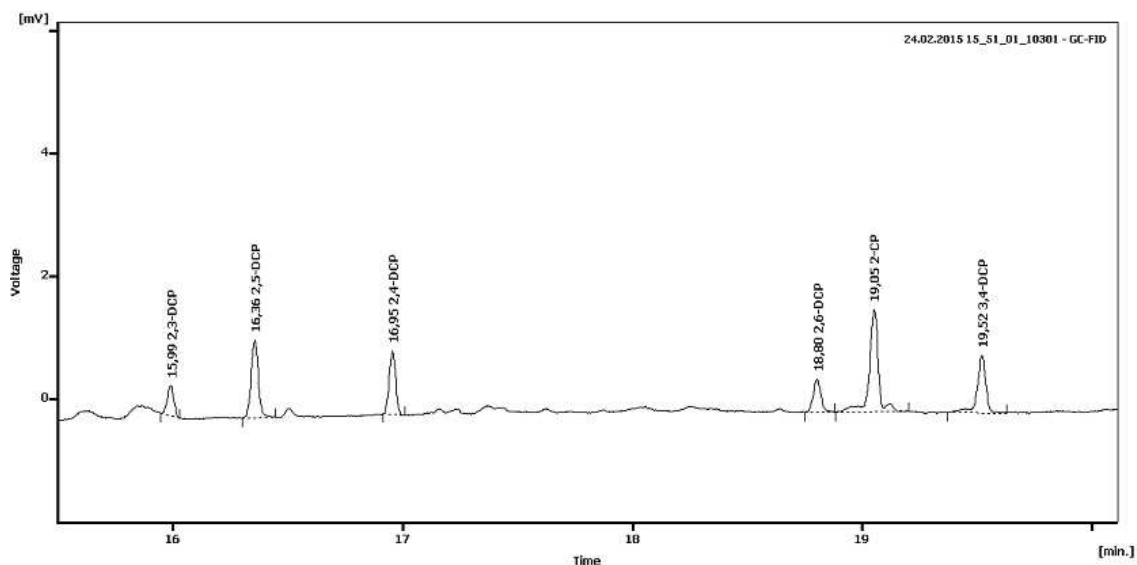
Obr. 9: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Světlý ležák.



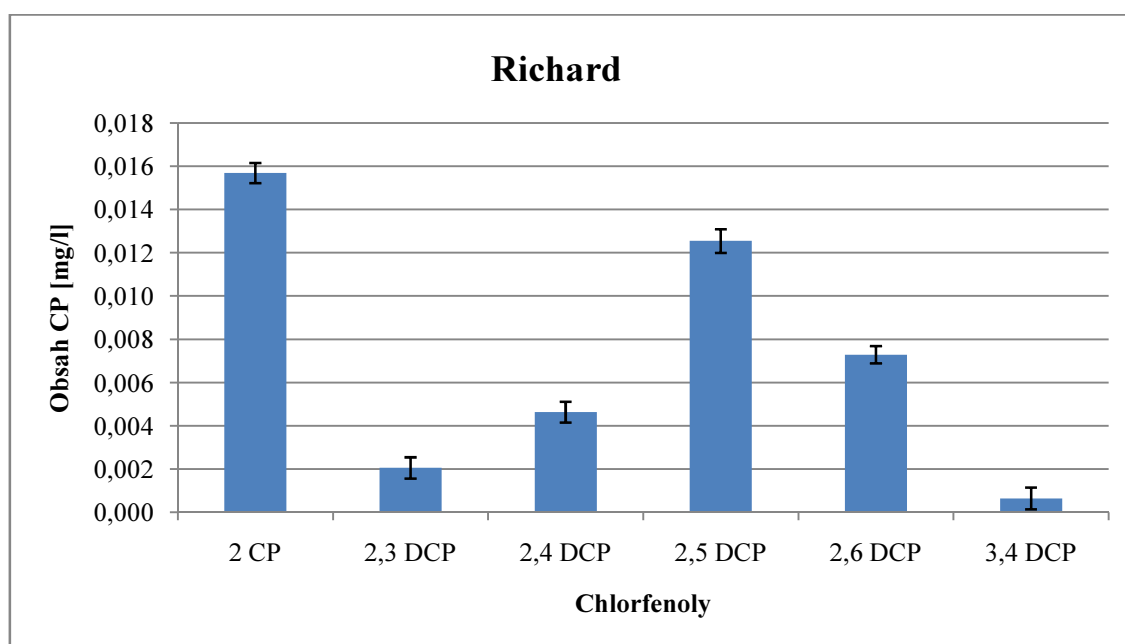
Obr. 10: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Světlý ležák.

Na tomto grafu je patrné, že největší množství chlorfenolů ve vzorku připadá na 2-CP, který je přítomen v 0,144 mg/l. V nejnižším množství je zastoupen 2,3-DCP, který odpovídá hodnotě 0,004 mg/l. Zastoupení ostatních chlorfenolů ve vzorku je vzhledem k 2-CP poměrně nízké. 2,4-DCP dosahuje hodnoty 0,048 mg/l. Množství 2,5-DCP odpovídá 0,021 mg/l. 2,6-DCP je obsažen ve vzorku v množství 0,015 mg/l. Nízké hodnoty dále odpovídá 3,4-DCP, jehož množství ve vzorku je 0,006 mg/l.

5.4.3 Vzorek piva Richard



Obr. 11: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Richard.

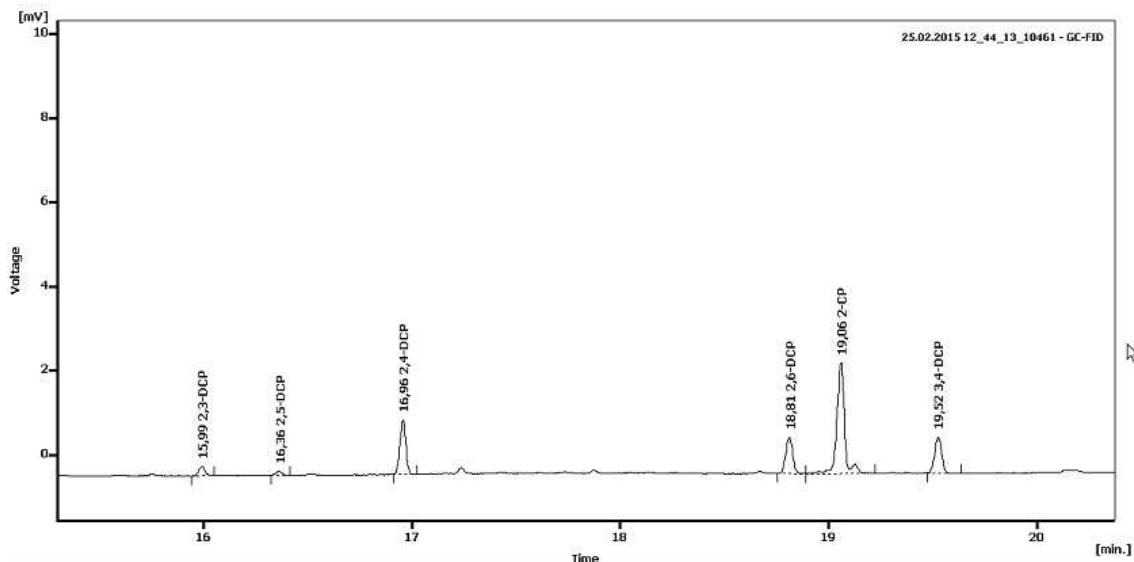


Obr. 12: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Richard.

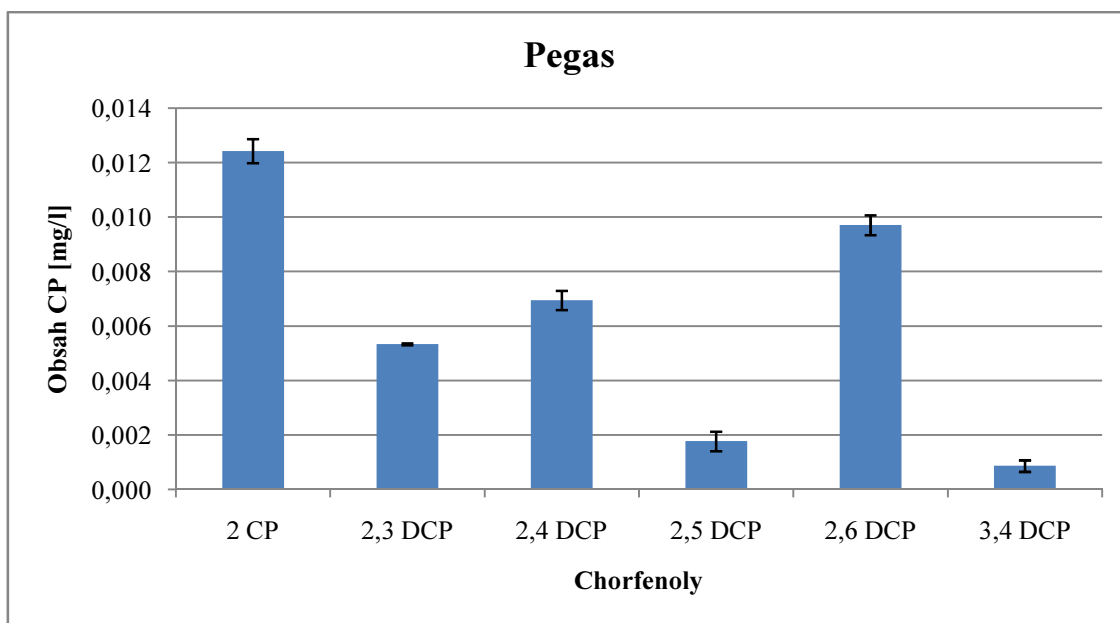
Jak je vidět z grafu, největší množství ve vzorku piva Richard zaujímá 2-CP, jehož hodnota odpovídá 0,016 mg/l. V nejmenším množství je zastoupen 3,4-DCP, jehož množství je jen 0,001 mg/l. Ve vyšším množství je dále obsažen 2,5-DCP, jehož hodnota odpovídá 0,013 mg/l. 2,6-DCP je obsažen v množství 0,007 mg/l.

V množství 0,005 mg/l je ve vzorku obsažen 2,4-DCP. V nižším množství je dále obsažen 2,3-DCP, jehož hodnota odpovídá 0,002 mg/l.

5.4.4 Vzorek piva Pegas



Obr. 13: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Pegas.

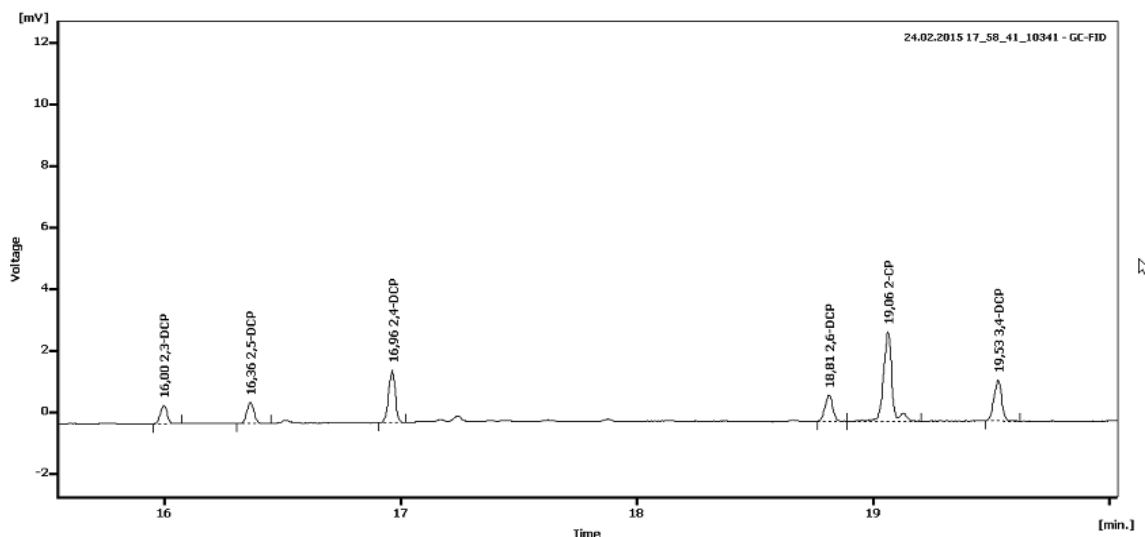


Obr. 14: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Pegas.

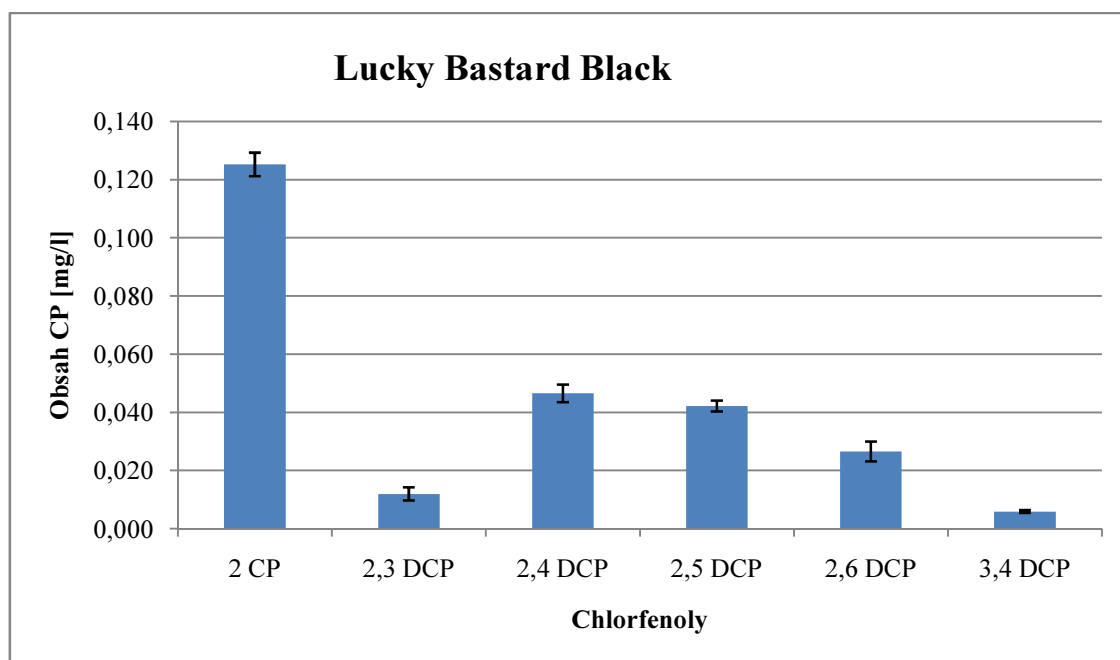
Ve vzorku piva Pegas je v největším množství zastoupen 2-CP, jehož hodnota odpovídá 0,012 mg/l. Nejméně je zde 2,3-DCP, jehož množství ve vzorku je pouze 0,001 mg/l. V poměrně vyšším množství ve vzorku je dále obsažen 2,6-DCP, u kterého hodnota odpovídá 0,009 mg/l. 2,4-DCP je obsažen v množství 0,007 mg/l.

Množství 2,5-DCP odpovídá 0,002 mg/l. Nízké množství vykazuje 2,4-DCP, kterého je ve vzorku pouze 0,001 mg/l.

5.4.5 Vzorek piva Lucky Bastard Black



Obr. 15: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Black.

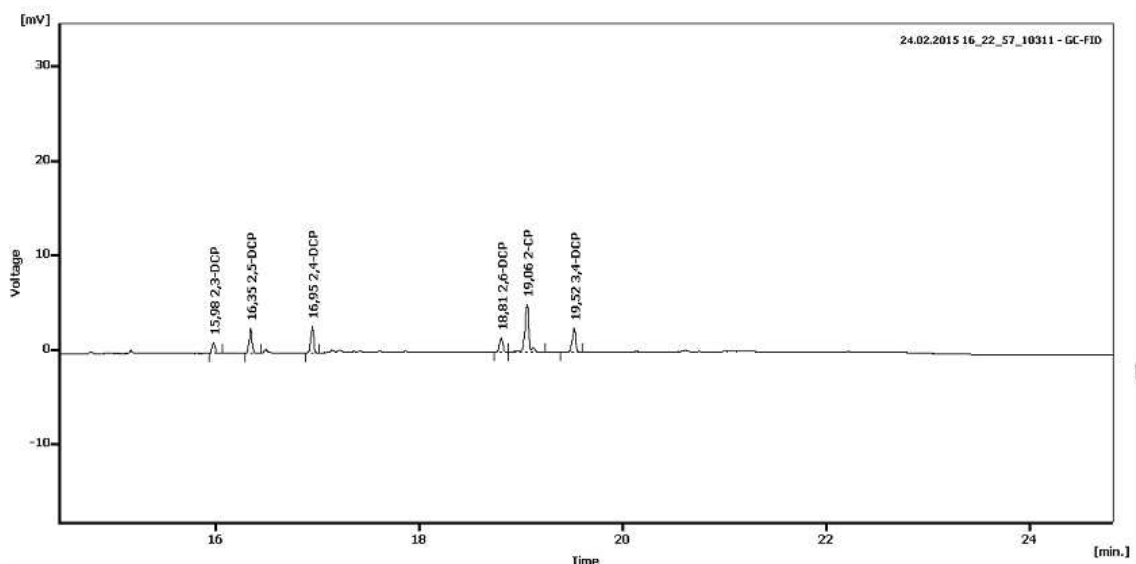


Obr. 16: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Black.

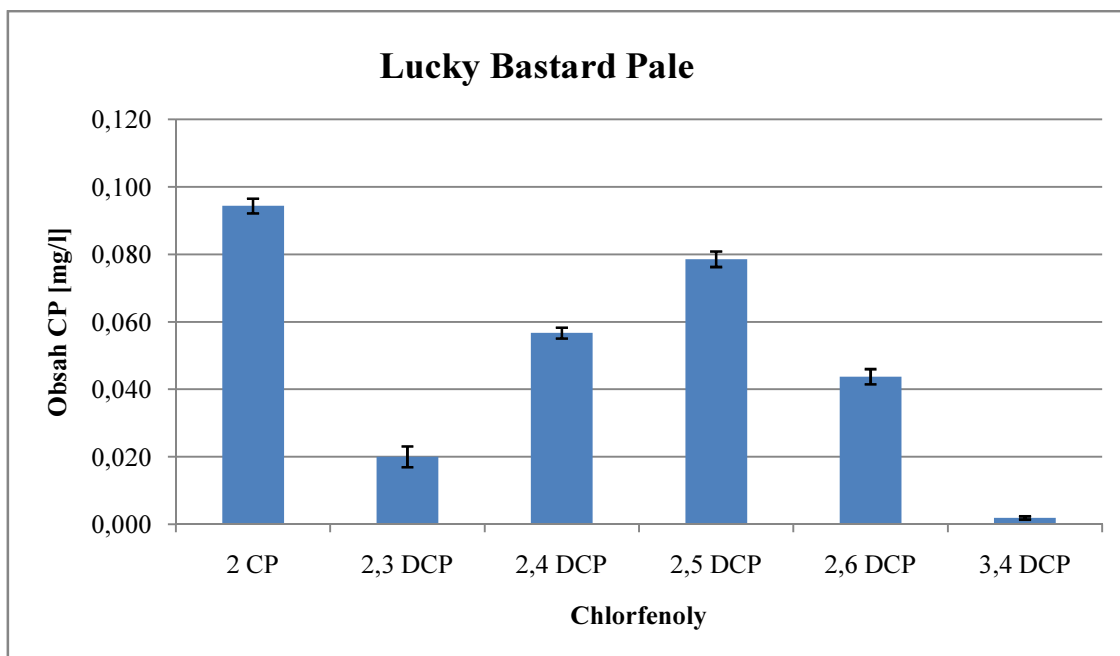
Vzorek piva Lucky Bastard Black obsahuje ze všech chlorfenolů nejvíce 2-CP, který je přítomný v množství 0,125 mg/l. Nejméně je zde obsažen 3,4-DCP, jehož množství je 0,006 mg/l. V nižším množství je obsažen dále 2,4-DCP,

jehož hodnota odpovídá 0,047 mg/l. Množství 2,5-DCP ve vzorku je 0,042 mg/l. 2,6-DCP je obsažen v množství odpovídající 0,027 mg/l. V množství 0,012 mg/l je přítomný 2,3-DCP.

5.4.6 Vzorek piva Lucky Bastard Pale



Obr. 17: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Pale.

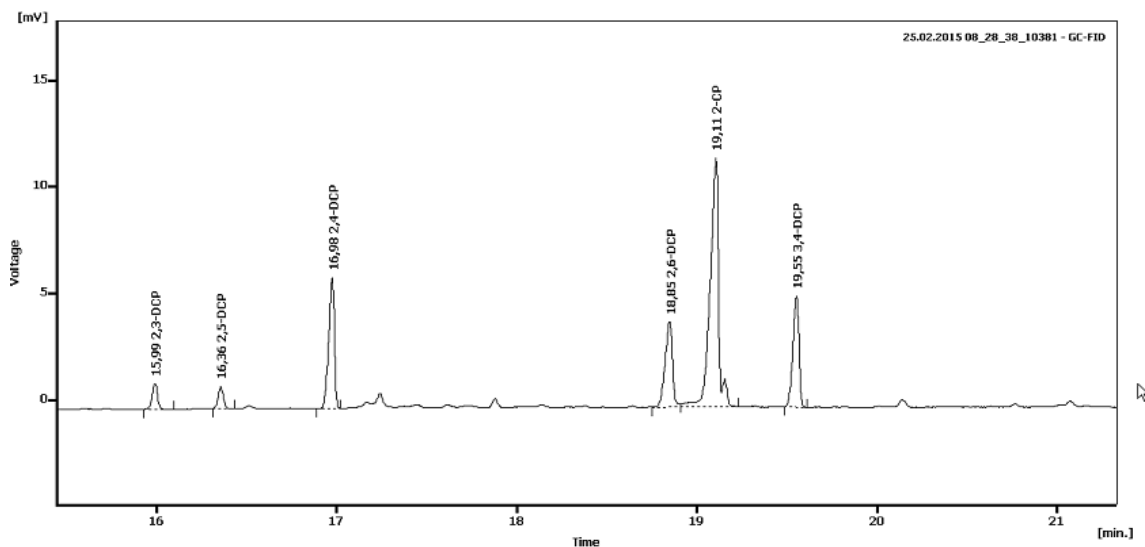


Obr. 18: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Pale.

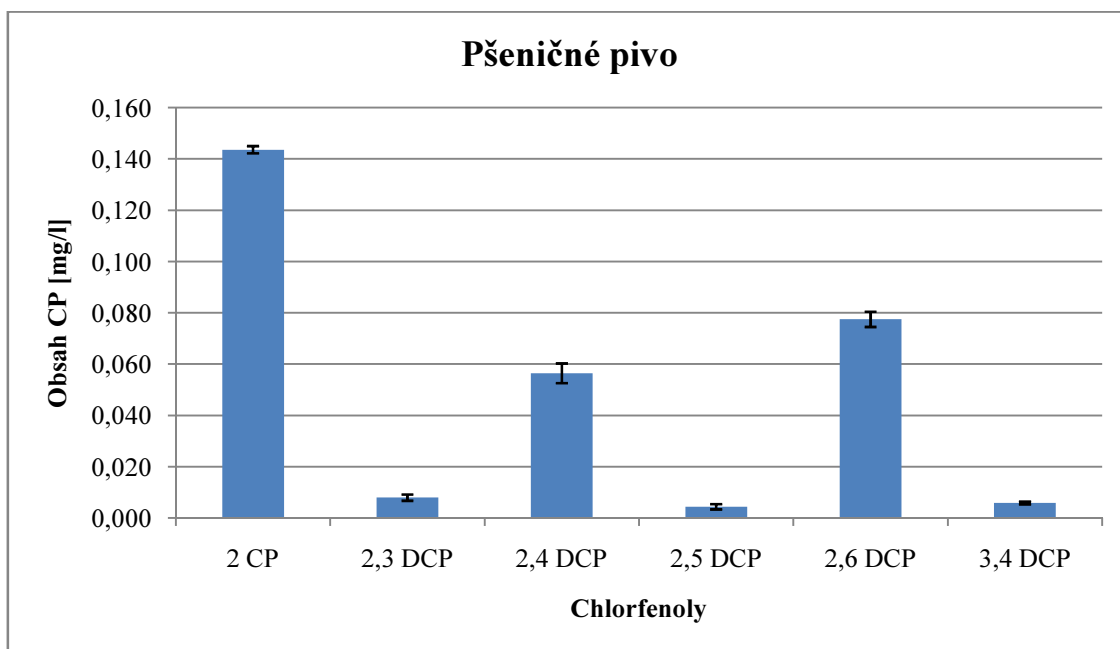
Ve vzorku piva Lucky Bastard Pale je nejvíce 2-CP, který je zastoupen v množství 0,094 mg/l. Nejnižší množství připadá na 3,4-DCP, jehož hodnota odpovídá

pouze 0,002 mg/l. V poměrně vyšším množství je ve vzorku dále obsažen 2,5-DCP, jehož hodnota odpovídá 0,079 mg/l. V množství 0,057 mg/l je zde obsažen 2,4-DCP. Množství 2,6-DCP ve vzorku odpovídá 0,044 mg/l. 2,3-DCP je zastoupen v množství 0,020 mg/l.

5.4.7 Vzorek Pšeničného piva



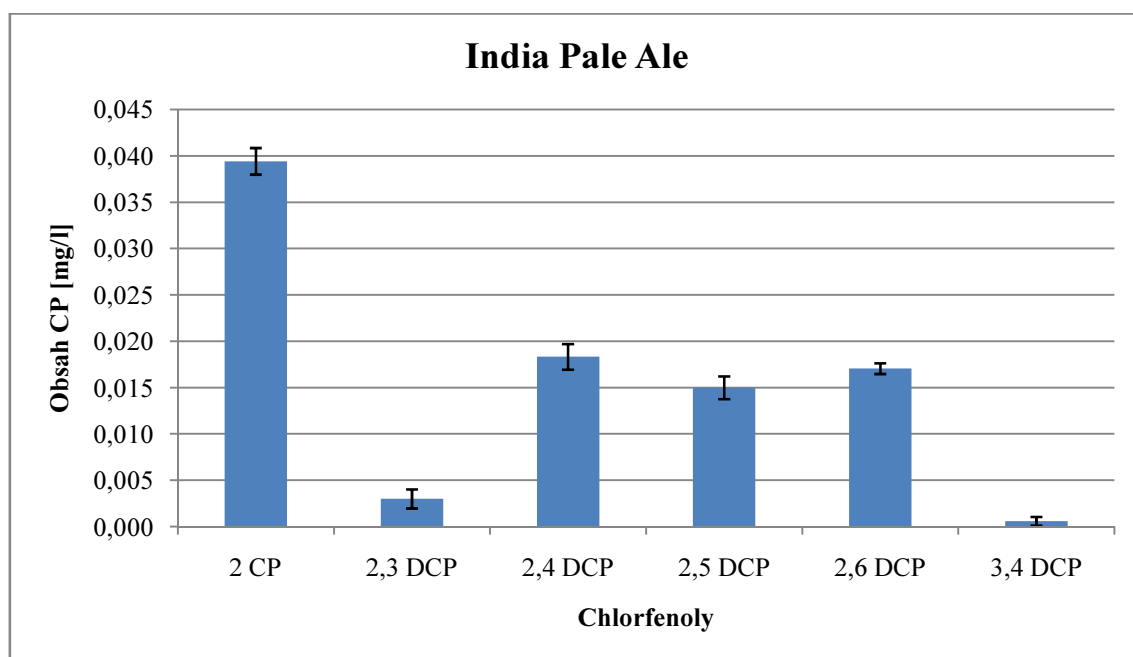
Obr. 19: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku Pšeničného piva.



Obr. 20: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku Pšeničného piva.

V Pšeničném pivu je obsažen v největším množství 2-CP, jehož hodnota odpovídá 0,144 mg/l. Nejméně je zde 2,5-DCP, který je přítomný v množství 0,004 mg/l. Množství 2,6-DCP ve vzorku je 0,078 mg/l. 2,4-DCP je zde přítomný v množství 0,056 mg/l. V nižším množství je přítomný 2,3-DCP, jehož hodnota je 0,008 mg/l a 3,4-DCP, jehož hodnota odpovídá 0,006 mg/l.

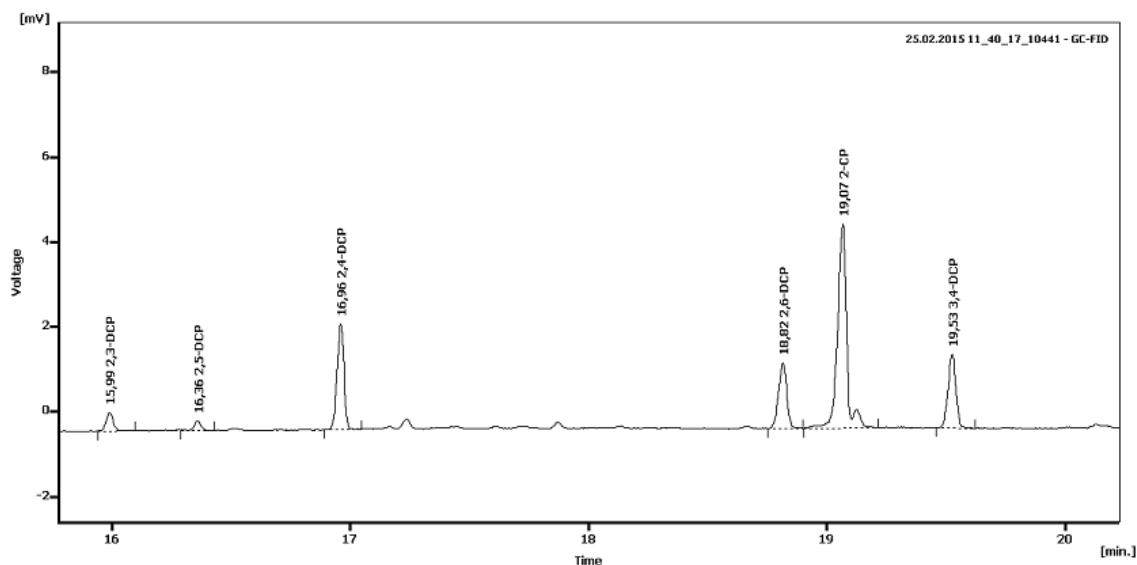
5.4.8 Vzorek piva India Pale Ale



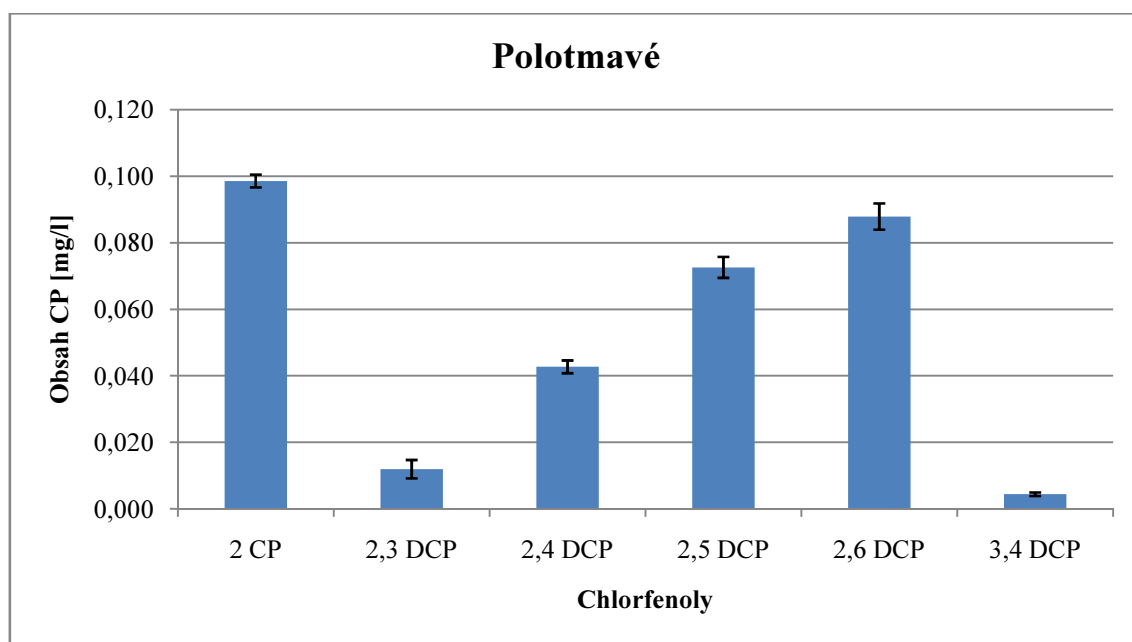
Obr. 21: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva India Pale Ale.

Největší množství ve vzorku piva India Pale Ale připadá na 2-CP, jehož hodnota odpovídá 0,039 mg/l. Naopak nejméně je zde 3,4-DCP a to jen 0,001 mg/l. Množství 2,4-DCP ve vzorku odpovídá 0,018 mg/l. 2,6-DCP je zde zastoupen v množství 0,017 mg/l. Množství 2,5-DCP ve vzorku je 0,015. Množství 2,3-DCP odpovídá 0,003 mg/l.

5.4.9 Vzorek Polotmavého piva



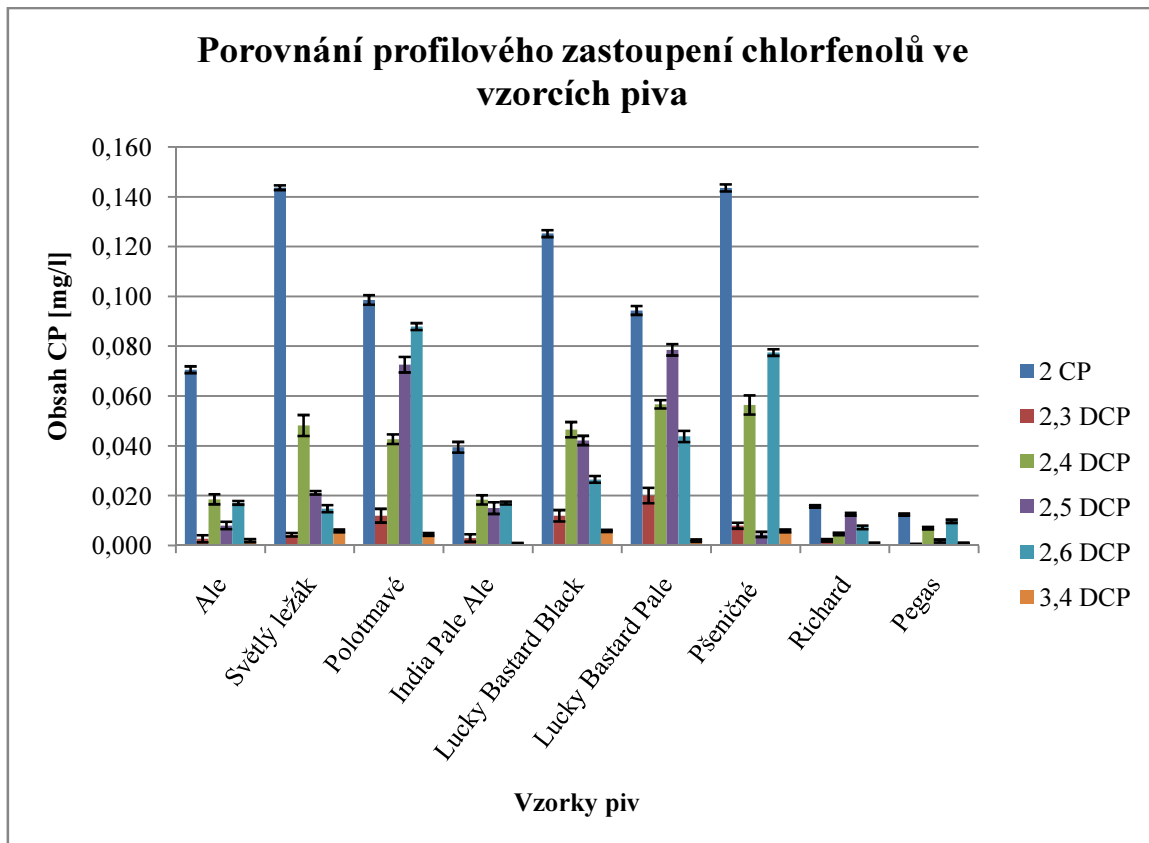
Obr. 22: Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Polotmavé.



Obr. 23: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku Polotmavého piva.

Z grafu je patrné, že nejvíce je obsažen 2-CP a to v množství 0,099 mg/l. V nejnižším množství je přítomný 3,4-DCP, jehož množství je 0,004 mg/l. V poměrně větším množství je obsažen 2,6-DCP, jehož obsah ve vzorku je 0,088 mg/l a 2,5-DCP v množství 0,073 mg/l. 2,4-DCP je zde v množství 0,043 mg/l. 2,3-DCP je zastoupen v množství 0,012 mg/l.

5.4.10 Porovnání profilového zastoupení jednotlivých chlorfenolů v analyzovaných vzorcích piva



Obr. 24: Porovnání analyzovaných vzorků piva v obsahu jednotlivých chlorfenolů.

Následující graf porovnává analyzované vzorky piva v obsahu jednotlivých chlorfenolů. Z grafu můžeme vidět, že ve všech vzorcích piva je nejvíce zastoupen 2-CP. Množství 2-CP se ve vzorcích pohybuje v rozmezí 0,012 mg/l až 0,144 mg/l. Nejvyšších hodnot v obsahu 2-CP dosahují vzorky piva Světlý ležák a Pšeničné pivo. Hodnoty odpovídající množství 2-CP v těchto vzorcích jsou shodné 0,144 mg/l. Naopak nejnižších hodnot v obsahu 2-CP dosahuje vzorek piva Pegas, ve kterém je 2-CP obsažen v množství 0,012 mg/l.

Velmi nízké hodnoty jsou patrné v obsahu 3,4-DCP všech analyzovaných piv, které se ve vzorcích pohybují v rozmezí 0,001 mg/l až 0,006 mg/l. Nejvyšší hodnoty v obsahu 3,4-DCP vykazují vzorky piv Světlý ležák a Lucky Bastard Black, ve kterých je stejné množství 3,4-DCP odpovídající 0,006 mg/l. Nejnižší množství 3,4-DCP

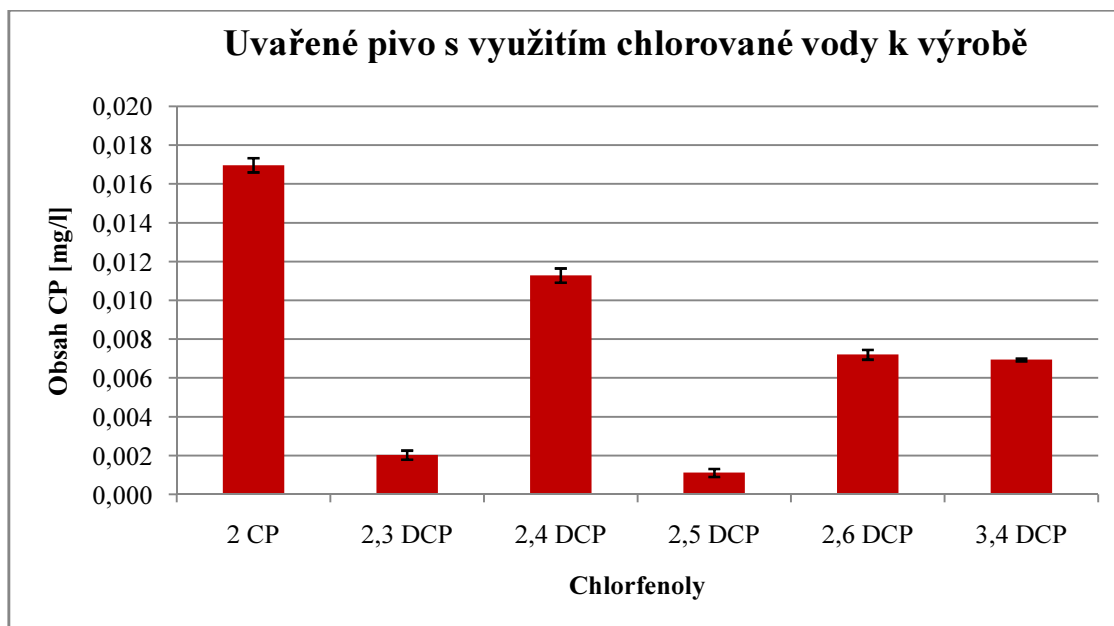
je obsaženo ve vzorcích piva Richard, India Pale Ale a Pegas, ve kterých jeho hodnota odpovídá 0,001 mg/l.

Množství 2,3-DCP se v analyzovaných vzorcích pohybuje v rozsahu 0,001 mg/l až 0,020 mg/l. Nejvyšší množství 2,3-DCP vykazuje vzorek Lucky Bastard Pale. Množství 2,4-DCP je stanoveno v rozsahu hodnot 0,005 mg/l až 0,057 mg/l. I zde dosahuje největšího množství vzorek Lucky Bastard Pale. Množství 2,5-DCP se u analyzovaných vzorků pohybuje v rozmezí 0,002 mg/l až 0,079 mg/l. Nejvyšší obsah 2,5-DCP vykazuje opět vzorek piva Lucky Bastard Pale. Množství 2,6-DCP se pohybuje v rozsahu 0,007 mg/l až 0,088 mg/l. Největší množství 2,6-DCP obsahuje vzorek piva Polotmavé.

HORÁK et al. (VÚPS, 2008) se zabýval možnostmi stanovení chlorfenolů ve varní vodě a pivu. Metoda byla založena na SPE extrakci a následné GC analýze s využitím detektoru elektronového záchytu. Analýze byly podrobeny vzorky piv, které sensoricky nevykazovaly medicínální vůni. Byly stanoveny chlorfenoly v množství odpovídající řádově desítkám ng/l.

Množství chlorfenolů stanovené v mnou analyzovaných vzorcích, u kterých byla sensoricky prokazatelně zaznamenána medicínální vůně, tak po převedení na ng/l odpovídalo stokrát vyšším hodnotám v porovnání s experimentem, který popsal HORÁK et al. (VÚPS, 2008) a v němž analyzované vzorky nevykazovaly žádnou medicínální vůni.

5.4.11 Profilové zastoupení chlorfenolů ve vzorcích uvařeného piva



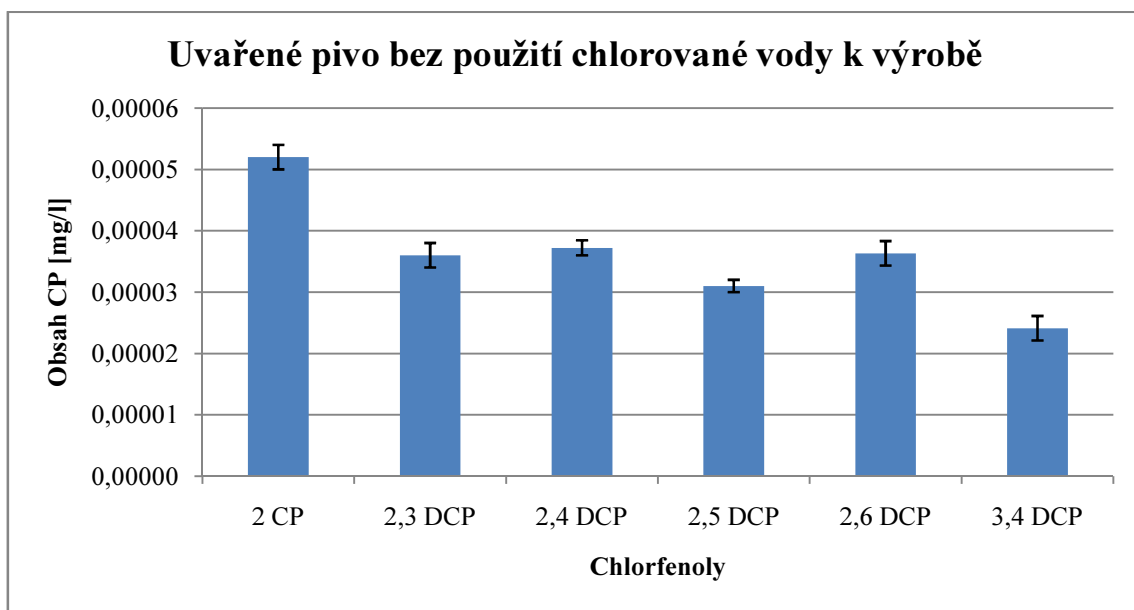
Obr. 25: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva uvařeného s využitím chlorované vody k výrobě.

Následující graf znázorňuje profilové zastoupení jednotlivých chlorfenolů ve vzorku uvařeného piva za použití chlorované vody k jeho výrobě. Cílem této části experimentu bylo uvařit pivo, které bude obsahovat sledované chlorfenoly a tím dokázat vznik chlorfenolů v pivu.

Z grafu vyplývá, že největší množství ve vzorku piva připadá na 2-CP, jehož hodnota odpovídá 0,017 mg/l. V nejnižším množství je obsažen 2,5-DCP, který odpovídá hodnotě 0,001 mg/l. Vyšší hodnoty je dále dosaženo u 2,4-DCP, který je obsažen v množství 0,011 mg/l. Obdobné hodnoty vykazují 2,6-DCP a 3,4-DCP, jejichž množství ve vzorku uvařeného piva odpovídá 0,007 mg/l. 2,3-DCP je obsažen v množství 0,002 mg/l.

Vzorek uvařeného piva vykazuje stejně jako analyzované vzorky piv nejvyšší hodnotu v obsahu 2-CP. Množství 0,017 mg/l 2-CP v uvařeném pivu, tak odpovídá rozsahu hodnot stanoveného množství 2-CP v analyzovaných vzorcích piva. Množství 2,3-DCP 0,020 mg/l, 2,4-DCP 0,011 mg/l a 2,6-DCP 0,007 mg/l v uvařeném vzorku piva také odpovídá rozsahu hodnot stanoveného u analyzovaných vzorků piv. Oproti tomu v obsahu 2,5-DCP je zaznamenán nepatrný rozdíl v porovnání

s analyzovanými vzorky. Rozsah hodnot stanoveného množství 2,5-DCP u vzorků piva je 0,002 mg/l až 0,079 mg/l, zatímco množství 2,5-DCP v uvařeném vzorku piva odpovídá hodnotě 0,001 mg/l. V uvařeném pivu je tedy množství 2,5-DCP nižší oproti analyzovaným vzorkům piva.



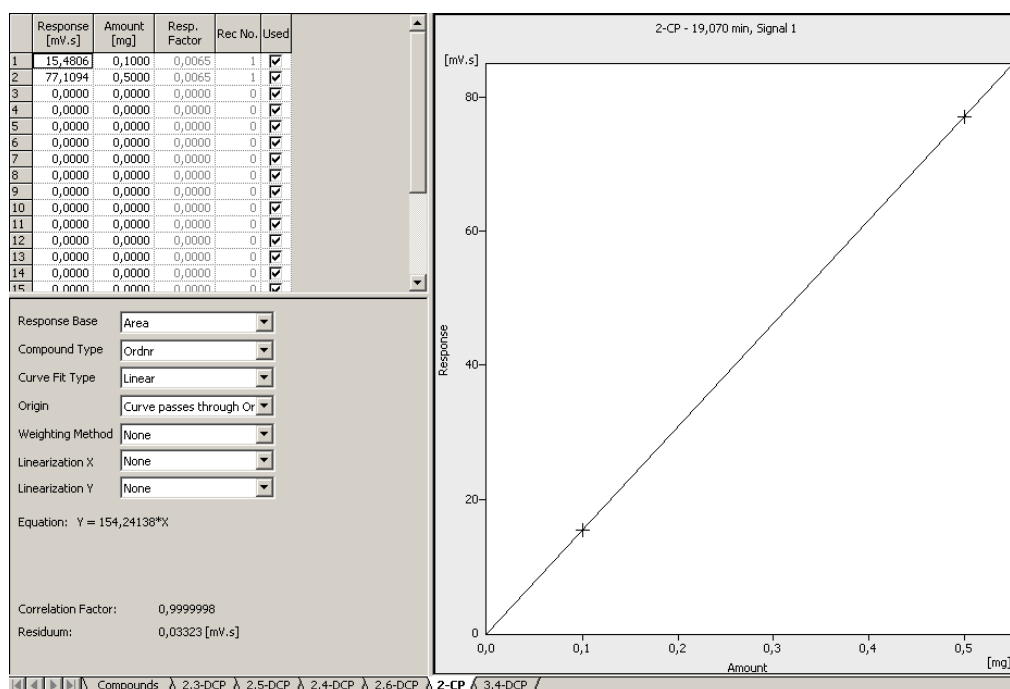
Obr. 26: Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva uvařeného bez použití chlorované vody k výrobě.

Obrázek 26 znázorňuje stanovené množství sledovaných chlorfenolů ve vzorku uvařeného piva, pro jehož výrobu nebyla použita chlorovaná voda. Z grafu je zřejmé, že množství chlorfenolů dosahuje podstatně nižších hodnot oproti vzorku uvařeného piva s využitím chlorované vody. Nejvyšší hodnoty dosahuje 2-CP, jehož množství odpovídá 0,0000520 mg/l. Nejnižší množství bylo stanoveno u 3,4-DCP a to 0,0000241 mg/l. Množství ostatních chlorfenolů ve vzorku se pohybovalo v rozmezí hodnot 0,0000310 mg/l až 0,0000372 mg/l.

Množství stanovených chlorfenolů v pivu, pro jehož výrobu nebyla použita chlorovaná voda, tak řádově odpovídá desítkám ng/l, stejně jako v experimentu, který popisuje HORÁK et al. (VÚPS, 2008). Použitím této metody je tedy možné stanovit chlorfenoly v desítkách ng/l v pivech, které sensoricky nevykazují medicínální vůni.

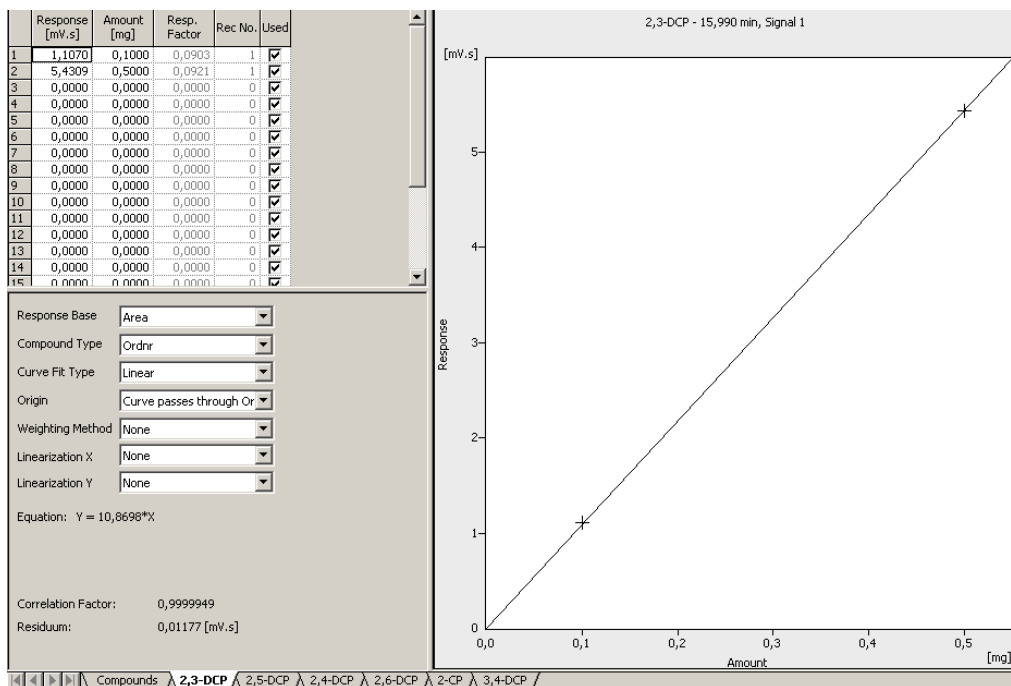
5.5 Linearita kalibrační závislosti

U jednotlivých grafů kalibrační závislosti lze sledovat stoupající trend odpovídající množství připraveného standardu STD1 a STD2. Kalibrační grafy pro obsah jednotlivých chlorfenolů v pivu jsou lineární v mnou použitým koncentračním rozsahu a všechny měřené vzorky spadají do tohoto koncentračního limitu.



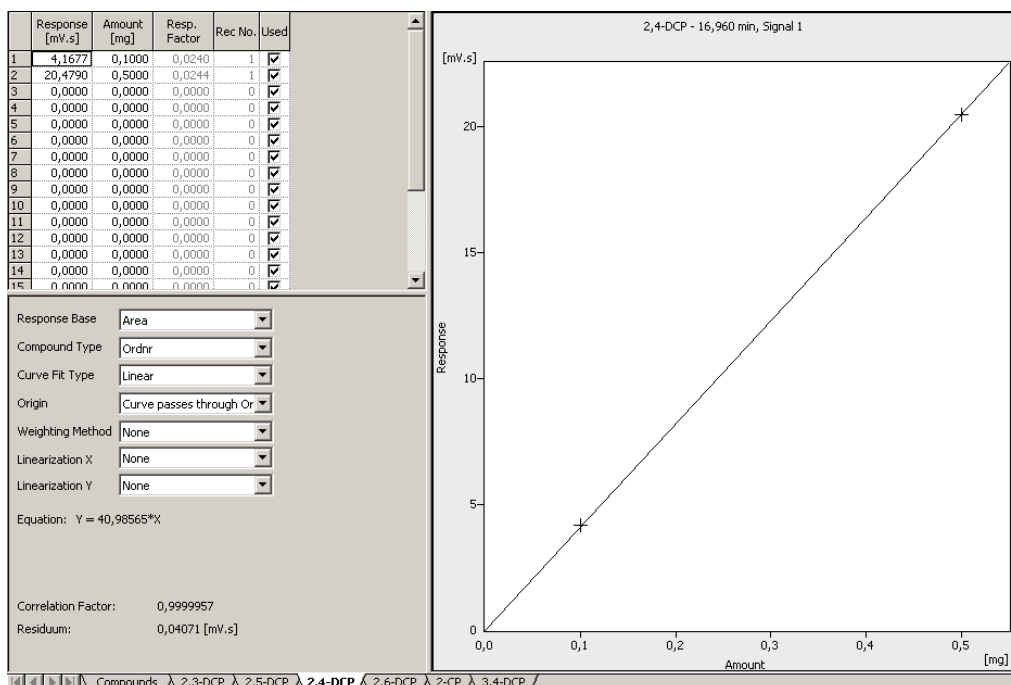
Obr. 27: Kalibrační závislost standardního přídávku 2-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 154,24138 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999998$.



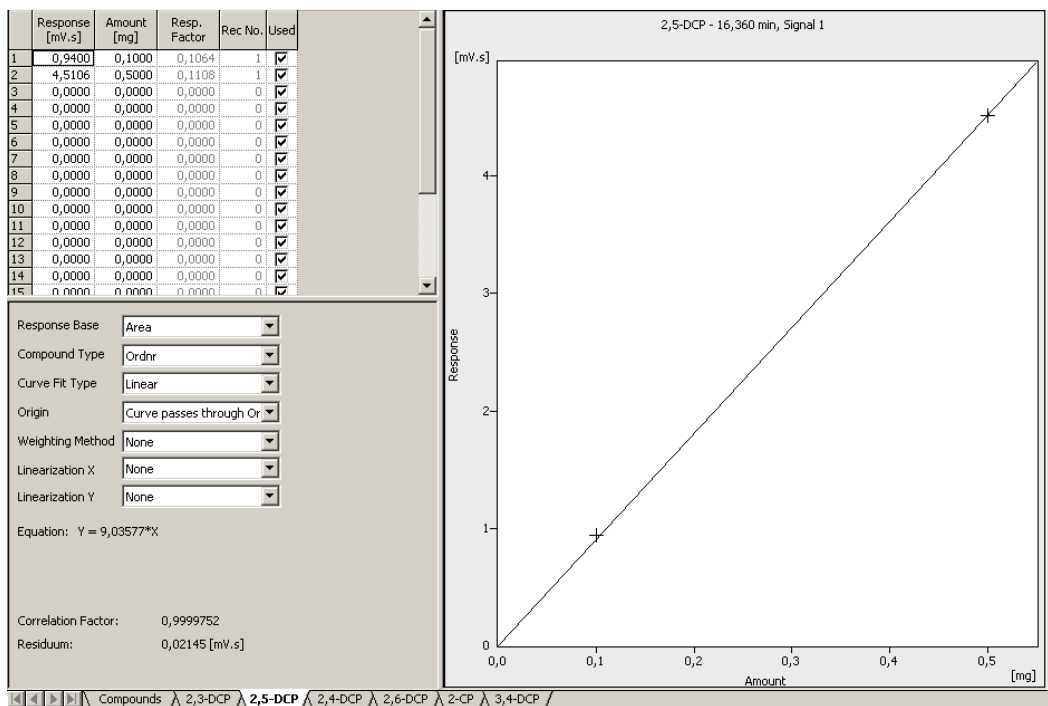
Obr. 28: Kalibrační závislost standardního přídatku 2,3-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 10,8698 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999949$.



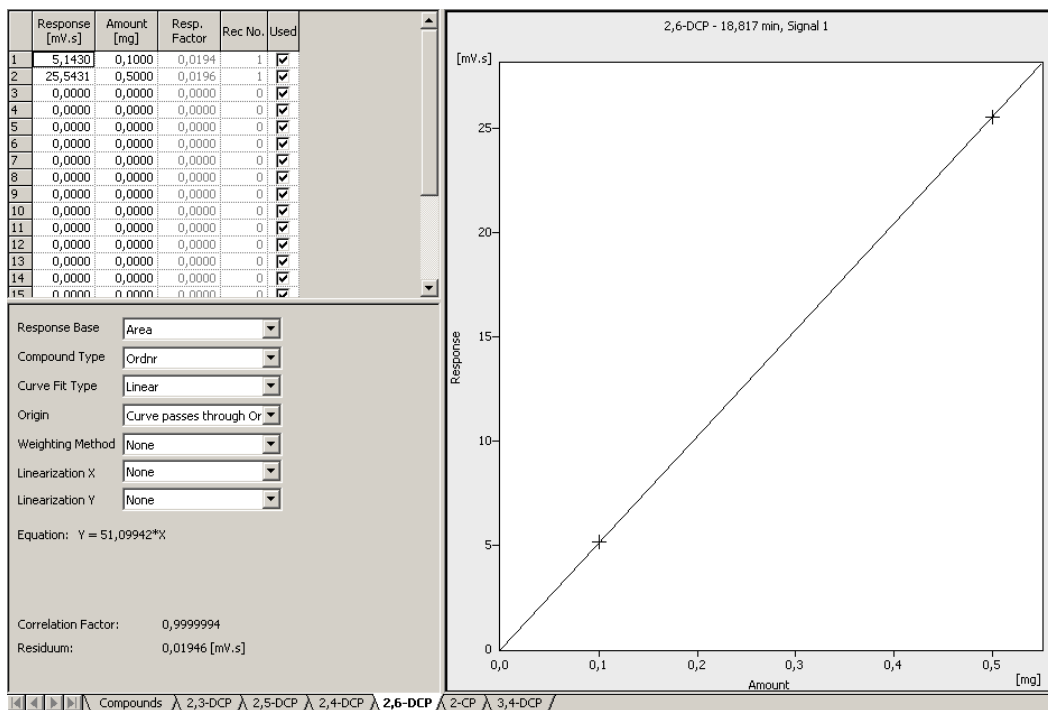
Obr. 29: Kalibrační závislost standardního přídatku 2,4-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 40,98565 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999957$.



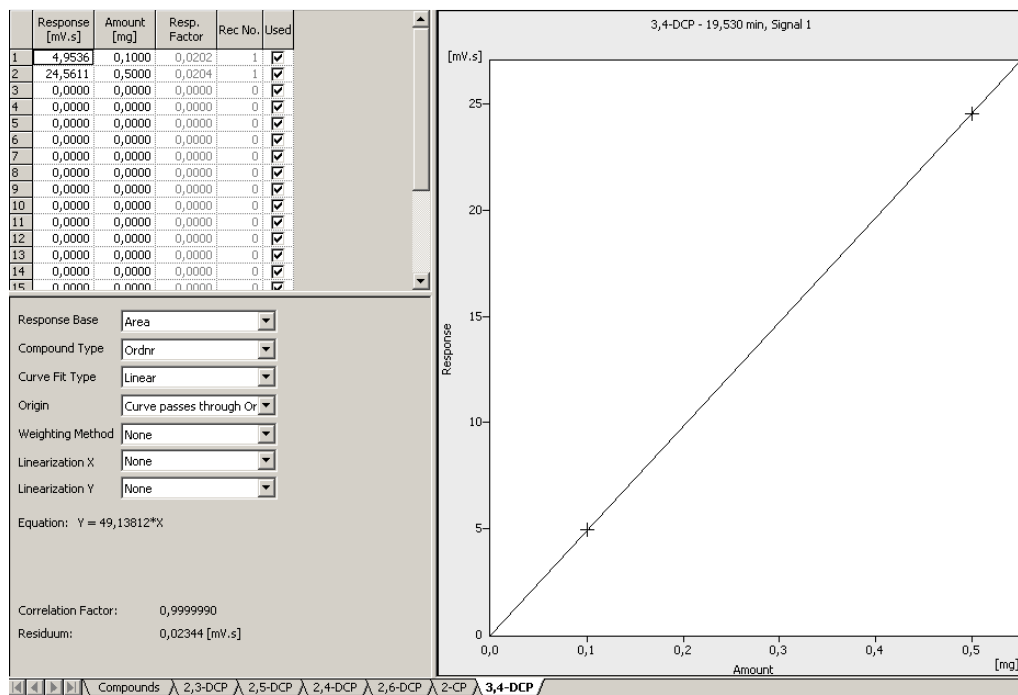
Obr. 30: Kalibrační závislost standardního přídávku 2,5-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 9,03577 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999752$.



Obr. 31: Kalibrační závislost standardního přídávku 2,6-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 51,09942 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999994$.



Obr. 32: Kalibrační závislost standardního přídatku 3,4-CP.

Rovnice regrese má tvar $Y = 49,13812 * X$, korelační faktor odpovídá $R = 0,9999990$.

6 Závěr

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo provést stanovení chlorfenolů s ohledem na jejich množství a profilové zastoupení v pivu. Jako vzorky pro analýzu byly vybrány různé druhy piv pocházejících především z malých pivovarů a piva uvařená v poloprovozu Mendelovy univerzity v Brně. Všechny vzorky, které byly podrobeny analýze, vykazovaly senzorké změny, projevující se výraznou medicínální vůní. Analyzovanými vzorky byla piva Ale, Světlý ležák, India Pale Ale, Polotmavé, Pšeničné, Richard, Pegas, Lucky Bastard Black a Lucky Bastard Pale.

Použitá metoda stanovení chlorfenolů v pivu zahrnovala úpravu vzorku, extrakci na pevné fázi a následnou plynovou chromatografií s využitím plamenově-ionizačního detektoru. Z chromatogramů byly následně odečteny výsledky odpovídající množství jednotlivých chlorfenolů v analyzovaných vzorcích piva.

Z naměřených hodnot vyplynulo, že v nejvyšším množství byl ve všech vzorcích piv obsažen 2-CP, jehož obsah se pohyboval v rozsahu hodnot 0,012 mg/l až 0,144 mg/l. Nejvyšší množství 2-CP bylo stanoveno ve vzorku piva Světlý ležák a Pšeničné s hodnotou 0,144 mg/l. Naopak ve velmi nízkých hodnotách se vyskytoval 3,4-DCP, jehož množství ve vzorcích odpovídalo rozmezí 0,001 mg/l až 0,006 mg/l. Množství ostatních chlorfenolů se v jednotlivých vzorcích poměrně lišilo.

V další části experimentu, který byl zaměřen na výrobu piva v poloprovozních podmínkách, se analyzovaly vzorky uvařeného piva, pro jejichž výrobu se použila chlorovaná a nechlorovaná voda. Po provedení plynové chromatografie se množství přítomných chlorfenolů v uvařeném pivu porovnávalo s množstvím chlorfenolů v reálných vzorcích. Bylo prokázáno, že množství jednotlivých chlorfenolů v uvařeném pivu za použití chlorované vody odpovídá rozsahu hodnot chlorfenolů obsažených v reálných vzorcích piv. Nejvyšší množství připadalo stejně jako u analyzovaných vzorků na 2-CP, jehož obsah zde činil 0,017 mg/l. Jistého rozdílu bylo pozorováno u 2,5-DCP, jehož rozsah hodnot ve vzorcích byl stanoven na 0,002 mg/l až 0,079 mg/l, zatímco v uvařeném pivu jeho hodnota odpovídala 0,001 mg/l. Množství 2,5-DCP bylo tedy nižší než v reálných vzorcích piv.

Množství chlorfenolů v uvařeném pivu, pro jehož výrobu nebyla použita chlorovaná voda a u něhož sensoricky nebyla zaznamenána medicínální vůně, vykazovalo podstatně nižší hodnoty oproti pivu uvařeného za použití chlorované vody. Jejich množství se pohybovalo řádově v desítkách ng/l.

Jako metoda stanovení chlorfenolů v pivu byl zvolen postup, který je poměrně rychlý, jednoduchý a levný. Použitá metoda se jeví jako optimální postup vhodný pro rutinní analýzy chlorfenolů ve vzorcích piva.

Jednou z hlavních zásad, jak zabránit vzniku chlorfenolů v pivu, je nepoužívat sanitační prostředky na bázi chlóru k čištění nádob či prostředků, které přicházejí do kontaktu s pivem. Další možností, jak se vyhnout tomuto nežádoucímu jevu, je nepoužívat chlorovanou vodu pro výrobu piva. Pro tyto účely je vhodné používat vodu, která slouží k chlazení mladiny, kdy vysoká teplota způsobí vytěkání přebytečného chlóru. Velmi účinnou metodou je také dechlorace vody s využitím aktivního uhlí. Během tohoto procesu dochází k zachycení chlóru na filtračním loži aktivního uhlí, čímž se zamezí nežádoucímu vzniku chlorfenolů v konečném produktu.

7 Použitá literatura

ANDREOZZI, R., DI SOMMA, I., MAROTTA, R., PINTO, G., POLLIO, A., SPASIANO, D., 2011: Oxidation of 2,4-dichlorophenol and 3,4-dichlorophenol by means of Fe (III)-homogeneous photocatalysis and algal toxicity assessment of the treated solutions. *Water Research*. 45 (5): 2038-2048 s.

ANIRUDHAN, T. S., RAMACHANDRAN, M., 2014: Removal of 2,4,6-trichlorophenol from water and petroleum refinery industry effluents by surfactant-modified bentonite. *Journal of Water Process Engineering*. (1): 46-53 s.

ARORA, P. K., BAE, H., 2014: Bacterial Degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*. (13): 712-749 s.

AUGUSTO, F., HANTAO, L. W., MOGOLLÓN, N. G. S., BRAGA, S. C. G. N., 2013: New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 43: 14-23 s.

BA-ABBAD, M. M., KADHUM, A. A. H., AL-AMIERY, A. A., MOHAMAD, A. B., TAKRIFF, M. S., 2012: Toxicity evaluation for low concentration of chlorophenols under solar radiation using zinc oxide (Zno) nanoparticles. *International Journal of the Physical Sciences*. 7 (1): 48-52 s.

BAGHERI, H., AGHAKHANI, A., BAGHERNEJAD, M., AKBARINEJAD, A., 2012: Novel polyamide-based nanofibers prepared by electrospinning technique for headspace solid-phase microextraction of phenol and chlorophenols from environmental samples. *Analytica Chimica Acta*. 716: 34-39 s.

BALASUBRAMANIAN, S., PANIGRAHI, S., 2011: Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. (4): 1-26 s.

BASAŘOVÁ, G., 1992: *Pivovarsko-sladařská analytika I*. Praha: Merkanta, 385 s.

- BASAŘOVÁ, G., 1993: *Pivovarsko-sladařská analytika 2*. Praha: Merkanta, 399 s.
- BASAŘOVÁ, G., 1993: *Pivovarsko-sladařská analytika 3*. Praha: Merkanta, 647 s.
- CARLO ERBA REAGENTS, 2014: *Bezpečnostní list podle 1907/2006/ES, Článek 31*.
- CSERHÁTI, T., SZOGVI, M., 2013: Chromatography of beer. *European Chemical Bulletin*. 2 (4): 154-159 s.
- DASWAT D. P., MUKHOPADHYAY, M., 2012: Photochemical degradation of chlorophenol industry wastewater using peroxy acetic acid (PAA). *Chemical Engineering Journal*. 209: 1-6 s.
- DEY, P. M., 2012: Phenols and Phenolic Acids. *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, 608 s.
- DUAN, X. Y., MA, F., CHANG, L. M., 2012: Electrochemical degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution using modified PbO₂ anode. *Water Science and Technology*. 66 (11): 2468-2474 s.
- EHRENBERGEROVÁ, J., CERKAL, R., 24. Pivovarsko-sladařské dny. 8. 9. 2011 - 9. 9. 2011, Mendelova univerzita v Brně.
- ELGHNIJI, K., HENTATI, O., MLAIK, N., MAHFOUDH, A., KSIBI, M., 2012: Photocatalytic deradation of 4-chlorophenol under P-modified TiO₂/UV systém: Kinetics, intermediates, phytotoxicity and acute toxicity. *Journal of Environmental Sciences*. 24 (3): 479-487 s.
- ESHAGHI, Z., 2011: Extrction and Determination of Three Chlorophenols by Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction – Spectrophotometric Analysis and Evaluation Procedures Using Men Centering of Ratio Spectra Method. *American Journal of Analytical Chemistry*. (2): 1-8 s.
- EUMANN, M., SCHILDBACH, S., 2012: Water sources and treatment in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 118: 12-21 s.

FALUDI, T., ANDRASI, N., VASANITS-ZSIGRAI, A., ZÁRAY, GY., MOLNÁR-PERL, I., 2013: Systematic derivatization, mass fragmentation and acquisition studies in the analysis of chlorophenols, as their silyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1302: 133-142 s.

FAN, C., LI, N., CAO, X., 2014: Determination of chlorophenols in honey samples using in-situ ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 174: 446-451 s.

GE, F., ZHU, L., WANG, J., 2008: Distribution of chlorination products of phenols under various pHs in water disinfection. *Desalination*. 225: 156-166 s.

HAVKIN-FRENKEL, D., BELANGER, F. C., 2008: *Volatile phenols. Biotechnology in Flavor Production*. Blackwell Publishing Ltd., 180 s. ISBN 978-1-4051-5649-3.

HAYES, R. P., 2013: Enzymatic degradation of polychlorophenols. *Research Exchange*.

HORÁK, T., ČULÍK, J., JUROKOVÁ, M., ČEJKA, P., KELLNER, V., DVOŘÁK, J., HAŠKOVÁ D., 2012: Head-space analýzy v pivovarské analytice. *Kvasný průmysl*. 58 (1): 2-5. ISSN 0023-5830.

CHAO, Z., NAIYUN, G., LEI, L., WENHAI, C., Removal of Disinfection by-products p-chlorophenol in drinking water. *Technology of Water Treatment*. 2011-09.

CHARALAMBOUS, G., 2012: *Analysis of Food and Beverages. Headspace Techniques*. Academia Press INC LTD., 408 s. ISBN 0-12-161950-4.

IGBINOSA, E. O., ODJADJARE, E. E., CHIGOR, V. N., IGBINOSA, I. H., EMOGHENE, A. O., EKHAISE, F. O., IGIEHON, N. O., IDEMUDIA, O. G., 2013: Toxicological Profile of Chlorophenols and Their Derivatives in the Environment: The Public Health Perspective. *The Scientific World Journal*. 11 s. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/460215>.

IVANCIUC, T., IVANCIUC, O., KLEIN, D. J., 2006: Prediction of Environmental Properties for Chlorophenols with Posetic Quantitative Super-Structure/Property Relationships (QSSPR). *International Journal of Molecular Sciences*. (7): 358-374 s.

JANDA, V., PECH, P., PECHOVÁ, M., 2004: Desinfection of water and its undesirable by-products. *Kvasný průmysl*. 50 (11-12): 335-340. ISSN 0023-5830.

JAWAD, A., LU, X., CHEN, Z., YIN, G., 2014: Degradation of Chlorophenols by Supported Co-Mg-Al Layered Double Hydroxide with Bicarbonate Hydrogen Peroxide. *The Journal of Physical Chemistry*. 118 (43): 10028-10035 s.

KANG, S. W., SHIM, S. B., PARK, Y. K., JUNG, J., 2011: Chemical degradation and toxicity reduction of 4-chlorophenol in different matrices by gamma-ray treatment. *Radiation Physics and Chemistry*. 80 (3): 487-490 s.

KARCI, A., ARSLA-ALATON, I., OLMEZ-HANCI, T., BEKBOLEL, M., 2012: Transformation of 2,4-dichlorophenol by H₂O₂/UV-C, Fenton and photo-Fenton processes: Oxidation products and toxicity evolution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 230 (1): 65-73 s.

KATAOKA, H., SAITO, K., 2011: Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54 (5): 926-950 s.

KHAN, M. Z., MONDAL, P. K., SABIR, S., TARE, V., 2012: Degradation pathway, toxicity and kinetics of 2,4,6-trichlorophenol with different co-substrate by aerobic granules in SBR. *Bioresource Technology*. 102 (13): 7016-7021 s.

KORHOŇOVÁ, M., VEVERKA, L., HEJDOVÁ, R., BALÍK, J., BEDNÁŘ, P., BARTÁK, P., 2009: Comparison of different extraction techniques for determination of volatile compounds in Grappa distillates.

KOVÁCS, Á., MORTL, M., KENDE, A., 2011: Development and optimization of a method for analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples

by gas chromatography-mass spectrometry, after solid-phase extraction and trimethylsilylation. *Microchemical Journal*. 99 (1): 125-131 s.

KRASTANOV, A., ALEXIEVA, Z., YEMENDZHIEV, H., 2013: Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*. 13 (1): 76-87 s.

KUMŠTA, M., 2007: Hydroxyskořicové kyseliny – část 2.: Těkavé fenoly. *Vinařský obzor*. (7-8): 364-365 s. ISSN 1212-7884.

LIN, Y. H., 2014: Kinetics of Photocatalytic Degradation of 2-chlorophenol in a TiO₂ Catalyst. *Research Journal of Modeling and Simulation*. 1-7 s.

LOU, L., WU, B., WANG, L., LUO, L., XU, X., HOU, J., XUN, B., HU, B., CHEN, Y., 2011: Sorption and ecotoxicity of pentachlorophenol polluted sediment amended with rice-straw derived biochar. *Bioresource Technology*. 102 (5): 4036-4041 s.

MICHALOWICZ, J., OLCZYK-STUFKA, J., MILCZAREK, A., MICHNIEWICZ, M., 2011: Analysis of Antal fluctuations in the content of phenol, chlorophenols and their derivatives in chlorinated drinking water. *Environmental Sciences and Pollution Research*. 18: 1174-1183 s.

MICHALOWICZ, J., STUFKA – OLCZYK, J., MILCZAREK, A., MICHNIEWICZ, M., 2013: Comparative Study of the Occurrence of Chlorophenols and Other Chloroaromatics in Surface – derived and Underground – derived Tap Waters. *Annual SetThe Environment Protection*. (15): 151-166 s.

MORAIS, P., STOICHEV, T., BASTO, M. C. P., VASCONCELOS, T. S. D., 2012: Extraction and preconcentration techniques for chromatographic determination of chlorophenols in environmental and food samples. *Talanta*. 89: 1-11 s.

MORAIS, P., STOICHEV, T., BASTO, M. C., VASCONCELOS, M. T., 2013: Chromatographic Methods for Determination of Chlorophenols as Biomarkers

of Exposure to Pesticides and Organochlorine Substances. *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe*. 201-207 s.

NAEENI M. H., YAMINI, Y., REZAEI, M., SEIDI, S., 2012: Microwave-assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a new approach to determination of chlorophenols in soil and sediments. *Journal of Separation Science*. 35 (18): 2469-2475 s.

OLANIRAN, A. O., IGBINOSA, E. O., 2011: Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*. 83: 1297-1306 s.

PADILLA-SÁNCHEZ J. A., PLAZA-BOLANOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., BARCO-BONILLA, N., MARTÍNEZ-VIDAL, J. L., GARRIDO-FRENICH, A., 2011: Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Talanta*. 85 (5): 2397-2404 s.

PADRÓN, M. E. T., ALFONSO-OLIVARES C., SOSA-FERRARA, Z., SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J., 2014: Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples. *Molecules*. 19 (7): 10320-10349 s.

PAWLISZYN, J., 2011: Handbook of Solid Phase Microextraction. Elsevier, 496 s. ISBN 978-0-12-416017-0.

PENG, Y., HE, S., WANG, J., GONG, W., 2012: Comparison of different chlorophenols degradation by gamma irradiation under reducing conditions. *Radiation Physics and Chemistry*. 81 (10): 1629-1633 s.

QIN, H., LIU, J., ZHANG, Z., LI, J., GAO, G., YANG, Y., YUAN, X., WU, D., 2014: In situ electrochemical assessment of cytotoxicity of chlorophenols in MCF-7 and HeLa cells. *Analytical Biochemistry*. 462: 60-66 s.

RODRIGUES, J. A., BARROS, A. S., CARVALHO, B., BRANDAO, T., GIL, A. M., FERREIRA, A. C. S., 2011: Evaluation of beer deterioration by gas chromatography-mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. *Journal of Chromatography A*. 1218 (7): 990-996 s.

SHARMA, N., JAIN, A., SINGH V. K., VERMA, K. K., 2011: Solid-phase extraction combined with headspace single-drop microextraction of chlorophenols as their methyl ethers and analysis by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Talanta*. 83 (3): 994-999 s.

ŠTĚRBA, K., DOSTÁLEK, P., KARABÍN, M., 2011: Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*. 105: 603-610 s.

TU, Y., XIONG, Y., TIAN, S., KONG, L., DESCORME, C., 2014: Catalytic wet air oxidation of 2-chlorophenol over sewage sludge-derived carbon-based catalysts. *Journal of Hazardous Materials*. 276: 88-96 s.

VIDAL, L., RIEKKOLA, M. L., CANALS, A., 2012: Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 175 (17): 19-41 s.

VLKOVÁ, L., CÍRKVA, V., 2005: Chlorované fenoly a způsoby jejich degradace. *Chemické Listy*. 99: 125-130 s.

WELLS, DICK., 2007: Halophenols. Organohalogen Taints in Food. Databáze online [cit. 4. 11. 14]. Dostupné na: http://www.svenska-forpackningsforeningen.se/assets/svenska_forpackningsforeningen/archive/woodfood/OrganohalogenTaintsinFoods.pdf

XUE, J., QIAO, N., WU, Y., 2014: Study on the performance condition optimization of analytic method for p-chlorophenol compounds by high performance liquid chromatography conditions. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6 (3): 955-958 s.

YADID, I., RUDOLPH, J., HLOUCHOVA, K., COPLEY, S. D., 2013:
Sequestration of a highly reactive intermediate in an evolving pathway for degradation
of pentachlorophenol. *National Acad Sciences*. 110 (24): 2182-2190 s.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Reakční schéma chlorace fenolu</i>	26
Obr. 2: <i>Headspace technika</i>	28
Obr. 3: <i>SPE technika</i>	29
Obr. 4: <i>SPME technika</i>	30
Obr. 5: <i>Porovnání výtěžnosti měření jednotlivých chlorfenolů</i>	46
Obr. 6: <i>Kalibrační závislost standardních přídavek jednotlivých chlorfenolů</i>	47
Obr. 7: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Ale</i>	48
Obr. 8: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Ale</i>	49
Obr. 9: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Světlý ležák</i>	49
Obr. 10: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Světlý ležák</i>	50
Obr. 11: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Richard</i>	51
Obr. 12: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Richard</i>	51
Obr. 13: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Pegas</i>	52
Obr. 14: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Pegas</i>	52
Obr. 15: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Black</i>	53
Obr. 16: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Black</i>	53
Obr. 17: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Pale</i>	54
Obr. 18: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva Lucky Bastard Pale</i>	54
Obr. 19: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku Pšeničného piva</i>	55
Obr. 20: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku Pšeničného piva</i>	55
Obr. 21: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva India Pale Ale</i>	56
Obr. 22: <i>Chromatogram obsažených chlorfenolů ve vzorku Polotmavého piva</i>	57
Obr. 23: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku Polotmavého piva</i>	57
Obr. 24: <i>Porovnání analyzovaných vzorků piv v obsahu jednotlivých chlorfenolů</i>	58
Obr. 25: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku piva uvařeného s využitím chlorované vody k výrobě</i>	60
Obr. 26: <i>Množství jednotlivých chlorfenolů ve vzorku uvařeného piva bez použití chlorované vody k výrobě</i>	61
Obr. 27: <i>Kalibrační závislost standardního přídávku 2-CP</i>	62

Obr. 28: <i>Kalibrační závislost standardního přídatku 2,3-CP</i>	63
Obr. 29: <i>Kalibrační závislost standardního přídatku 2,4-CP</i>	63
Obr. 30: <i>Kalibrační závislost standardního přídatku 2,5-CP</i>	64
Obr. 31: <i>Kalibrační závislost standardního přídatku 2,6-CP</i>	64
Obr. 32: <i>Kalibrační závislost standardního přídatku 3,4-CP</i>	65

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: <i>Některé vlastnosti chlorovaných fenolů</i>	16
Tab. 2: <i>Toxikologické vlastnosti vybraných chlorfenolů</i>	18
Tab. 3: <i>Seznam použitých standardů pro analýzu</i>	35
Tab. 4: <i>Seznam analyzovaných vzorků</i>	37
Tab. 5: <i>Hodnoty navážek a koncentrací připravených standardů</i>	38
Tab. 6: <i>Vypočítané statistické parametry jednotlivých chlorfenolů ve vzorcích</i>	45
Tab. 7: <i>Výtěžnost použité metody u jednotlivých chlorfenolů</i>	46

10 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
C	Uhlík
Cl ⁻	Chloridový aniont
CO ₂	Oxid uhličitý
CO	Oxid uhelnatý
CP	Chlorfenol
ČR	Česká republika
DAD	<i>Diode Array Detector</i> , Detektor diodového pole
DCP	Dichlorfenol
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> , Detektor elektronového záchytu
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> , Plamenově-ionizační detektor
Fe	Železo
GC	<i>Gas Chromatography</i> , Plynová chromatografie
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Vysokoučinná kapalinová chromatografie
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
KCl	Chlorid draselný
KMnO ₄	Manganistan draselný
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i> , Hmotnostně-spektrometrický detektor
NaHCO ₃	Hydrogenuhličitan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
OH	Hydroxylová skupina
PCDD	Polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
Pd	Palladium
PME	<i>Solid Phase Microextraction</i> , Mikroextrakce na pevné fázi
Pt	Platina

STD1	Standardní přídavek 1
STD2	Standardní přídavek 2
SO ₂	Oxid siřičitý
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Extrakce na pevné fázi
TetraCP	Tetrachlorfenol
TriCP	Trichlorfenol