



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**Sledování obsahu 3-MCPD v ječmeni, sladu a pivu**

MONITORING OF 3-MCPD CONTENT IN BARLEY, MALT AND BEER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Šálková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1211/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Michaela Šálková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Sledování obsahu 3-MCPD v ječmeni, sladu a pivu

### Zadání diplomové práce:

1) Zpracování literární rešerše na téma:

- a) Vlastnosti a výskyt 3-MCPD v potravinách
- b) Mechanismus vzniku 3-MCPD v potravinách
- c) Možnosti stanovení 3-MCPD v potravinách

2) Experimentální část:

- a) Optimalizace metody GC-MS pro stanovení 3-MCPD v ječmeni, sladu a pivu
- b) Stanovení a vyhodnocení obsahu 3-MCPD v ječmeni, sladu a pivu

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Michaela Šálková  
studentka

-----  
RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá procesním kontaminantem 3-MCPD (3-chlorpropan-1,2-diol), který vzniká při zpracování potravin. Teoretická část práce shrnuje dostupné vědecké poznatky o vlastnostech 3-MCPD, jeho možných účincích na lidský organismus, výskytu v potravinách a způsobech analýzy.

V experimentální části byl sledován obsah 3-MCPD v ječmeni, v základních i speciálních druzích sladu a v pivu. Derivatizace 3-MCPD byla provedena pomocí kyseliny fenylborové (PBA) a deriváty 3-MCPD byly analyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s použitím deuterovaného 3-MCPD jako vnitřního standardu. Mez stanovení metody byla  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pro vzorky ječmene a sladu a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pro vzorky piva. Ve vzorcích ječmene byla zjištěna přítomnost 3-MCPD pod LOQ. Ve sladech byla naměřena koncentrace v rozmezí  $<\text{LOQ}-112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvyšší množství bylo přítomno ve speciálních tmavých sladech používaných k dobarvení piva ( $8,8-112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ve všech měřených vzorcích piva byla koncentrace 3-MCPD opět pod LOQ. Bylo tedy zjištěno, že ječná zrna jako výchozí surovina pro výrobu sladu kontaminant neobsahují. 3-MCPD vzniká v průběhu výroby sladu, konkrétně při hvozdění.

## **ABSTRACT**

The master's thesis focuses on a process contaminant 3-MCPD (3-chloropropane-1,2-diol), which is formed during food processing. The first part of the thesis summarizes scientific knowledge about its chemical and physical properties, toxicity, occurrence in food and methods of analysis.

In the second part is monitored the content of 3-MCPD in barley, in standard and special types of malts and beer. Samples were derivatized with phenylboronic acid (PBA) and 3-MCPD derivatives were analyzed by gas chromatography with a mass detector. Deuterated 3-MCPD was used as an internal standard. The limit of quantification was  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  for barley and malt samples and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in case of beer. The barley samples contained concentration of 3-MCPD below LOQ. In samples of malt was found concentration  $<\text{LOQ}-112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The highest amount of 3-MCPD contained samples of special dark malts used for dying purposes ( $8,8-112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). In all beer samples was concentration of 3-MCPD below LOQ. It was concluded that barley grains as a raw material for malt production does not contain 3-MCPD, so the contaminant has to be formed during kilning of malt.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

3-chlorpropan-1,2-diol, ječmen, slad, pivo

## **KEYWORDS**

3-chloropropane-1,2-diol, barley, malt, beer

ŠÁLKOVÁ, M. *Sledování obsahu 3-MCPD v ječmeni, sladu a pivu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 53 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## OBSAH

1. Úvod .....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Druhy sladu.....	9
2.1.1. Světlé slady plzeňského typu .....	9
2.1.2. Vídeňské slady .....	9
2.1.3. Tmavé slady mnichovského typu .....	10
2.1.4. Pšeničné slady .....	10
2.1.5. Speciální slady.....	10
2.2. Náhražky sladu .....	12
2.2.1. Škrobnaté náhražky sladu.....	13
2.2.2. Cukerné náhražky .....	14
2.2.3. Sladové výtažky .....	14
2.3. Druhy pív .....	14
2.3.1. Druhy pív vyráběné v České republice .....	15
2.3.2. Zahraniční druhy pív .....	15
2.4. Chemické a fyzikální vlastnosti 3-MCPD a chlorpropanolů .....	16
2.5. Toxikologické hodnocení .....	17
2.6. Metabolismus a kinetika 3-MCPD .....	18
2.7. Výskyt 3-MCPD v potravinách .....	19
2.7.1. Kyselé hydrolyzáty bílkovin .....	20
2.7.2. Oleje a tuky .....	21
2.7.3. Kojenecká výživa a mateřské mléko .....	22
2.7.4. Výrobky z obilovin.....	22
2.7.5. Výrobky ze sladu.....	23
2.7.6. Káva a náhražky kávy .....	23
2.7.7. Uzené výrobky .....	24
2.7.8. Maso .....	24
2.7.9. Výrobky z ryb.....	24
2.8. Mechanismy vzniku.....	24
2.8.1. Vznik z triacylglycerolů .....	25
2.8.2. Vznik z fosfolipidů.....	26
2.8.3. Vznik z glycerolu .....	26

2.9.	Regulace obsahu 3-MCPD .....	28
2.10.	Způsoby analýzy .....	28
2.10.1.	Metody s HFB deriváty .....	29
2.10.2.	Metody s PBA deriváty .....	30
2.10.3.	Metody s dioxolanovými deriváty .....	30
2.10.4.	Ostatní metody .....	31
2.10.5.	Metody analýzy esterů 3-MCPD .....	31
2.11.	Plynová chromatografie .....	33
2.11.1.	Princip metody a základní chromatografické charakteristiky .....	33
2.11.2.	Instrumentace .....	35
3.	Experimentální část .....	39
3.1.	Použité chemikálie .....	39
3.2.	Laboratorní přístroje .....	39
3.3.	Materiál .....	39
3.3.1.	Ječmen a slady .....	39
3.3.2.	Piva .....	40
3.4.	Příprava pracovních roztoků .....	40
3.4.1.	Vnitřní standard 3-MCPD-d5 .....	40
3.4.2.	Roztok kyseliny fenylborové (PBA) .....	40
3.4.3.	Roztok standardu 3-MCPD .....	40
3.4.4.	Kalibrační roztoky 3-MCPD .....	40
3.5.	Příprava vzorků sladu .....	40
3.6.	Příprava vzorků piva .....	41
3.7.	Podmínky metody GC/MS .....	41
3.8.	Validace metody .....	41
3.8.1.	Mez detekce .....	41
3.8.2.	Mez stanovitelnosti .....	41
3.8.3.	Kombinovaná standardní nejistota měření .....	42
4.	Výsledky a diskuze .....	43
4.1.	Validační parametry .....	43
4.2.	Optimalizace metody GC/MS .....	43
4.3.	Vyhodnocení obsahu 3-MCPD ve vzorcích .....	43
5.	Závěr .....	49

6. Použité zkratky.....	50
7. Použité zdroje.....	51

# 1. ÚVOD

Potraviny jsou nezbytnou součástí života člověka, kontrola jejich bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti je proto klíčová. Ačkoli je s rozvojem technologií, vytvořením legislativy a založením organizací zabývajících se touto problematikou (např. EFSA, WHO) bezpečnost potravin na vysoké úrovni, stále dochází k odhalování nových zdravotních rizik.

Jedním z těchto rizik je problematika procesních kontaminantů. Procesní kontaminanty jsou nežádoucí látky, které vznikají v potravinách během jejich zpracování z přirozeně se vyskytujících prekurzorů. Mezi procesní kontaminanty řadíme akrylamid, furan, 3-MCPD a další chlorpropanoly. Všechny tyto látky jsou zkoumány jako potenciální lidské karcinogeny a jejich obsah v potravinách je monitorován. Lze je najít v celém spektru různých potravin od chleba a sušenek až po maso, kávu nebo i dětskou výživu.

Procesní kontaminanty vznikají v potravinách z různých prekurzorů, ale ukazuje se, že společným znakem jejich vzniku je většinou použití vyšší teploty při technologických procesech výroby, ať už se jedná o pečení, smažení, pražení nebo sušení.

Poprvé byl 3-MCPD spolu s dalšími chlorpropanoly objeven v kyselých hydrolyzátech bílkovin v roce 1978. Obsah 3-MCPD je od roku 2002 Evropskou komisí legislativně omezen, toto opatření se však vztahuje pouze na sójové omáčky, které prokazatelně obsahovaly velké množství 3-MCPD [1]. Výzkum 3-MCPD a ostatních chlorpropanolů stále není u konce a je potřeba provést další studie zabývající se jejich toxicitou. Dále je nutné ověřit z hlediska 3-MCPD bezpečnost všech potravin, které prošly tepelným zpracováním a zároveň obsahují látky, ze kterých by mohl tento kontaminant vznikat.

Faktorem vzniku tohoto kontaminantu je kromě již zmíněného použití vysoké teploty také dostupnost prekurzorů. 3-MCPD může vznikat v potravinách nebo surovinách, které obsahují vyšší množství tuků, chloridu sodného a mají nízkou aktivitu vody.

Tato práce v teoretické části shrnuje dosavadní shromážděné poznatky o 3-MCPD a v části experimentální monitoruje obsah tohoto kontaminantu v ječmeni, sladu a pivu. Cílem práce je zjistit, zda 3-MCPD vzniká v zrnech ječmene během procesu výroby sladu a posoudit, zda je pivo z hlediska obsahu 3-MCPD bezpečné. Práce byla řešena ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Druhy sladu

Základní surovinou pro výrobu sladu je ječmen setý (*Hordeum vulgare* L., viz obrázek 1). Dnes se ze zrn ječmene po celém světě vyrábějí především světlé slady *plzeňského typu* a tmavé slady *mnichovského typu*. Dále se v menším množství vyrábějí speciální slady, které se používají pro zvýraznění kvalitativních a specifických vlastností základních typů pív nebo pro výrobu speciálních druhů pív. V některých zemích se ve větším množství vyrábějí piva z pšeničného sladu.

Jednotlivé druhy sladů (viz obrázek 2) se získávají úpravami technologie máčení a klíčení zrn ječmene (nebo jiných obilovin). Tím lze regulovat biosyntézu a aktivitu sladových enzymů, které ovlivňují míru degradace vysokomolekulárních látek, redoxní potenciál a aciditu sladu. Tvorbu dalších sloučenin lze ovlivňovat dalšími úpravami v postupu hvozdění. [2, 3]



Obr. 1: Ječmen setý dvouřadý (*Hordeum vulgare* L.) [35]

#### 2.1.1. Světlé slady plzeňského typu

Světlé slady plzeňského typu se používají pro výrobu světlých pív typu ležáků, konzumních pív a také pro výrobu speciálních pív s různou koncentrací původní mladiny. Typickým znakem je nízká hodnota barvy kongresní sladiny (3,0–4,2 jednotek EBC). Dále se vyznačují přiměřeným proteolytickým rozluštěním a dostatečnou aktivitou amylolytických enzymů. Hvozdění tohoto sladu se provádí při teplotách 80–85 °C, kdy dochází k optimální tvorbě barevných a aromatických látek. Pro zajištění přirozené stability by měl tento slad mít optimální obsah nezoxidovaných polyfenolů, nízký obsah dusíkatých prekurzorů koloidních zákalů a také dobrou redukční kapacitu. [2, 3]

#### 2.1.2. Vídeňské slady

Vídeňské slady jsou přechodným typem mezi slady světlými a tmavými. Hodnota barvy tohoto sladu je asi dvakrát vyšší než u světlého plzeňského sladu. V současnosti se vídeňské slady vyrábí velmi málo a používají se pouze pro výrobu některých speciálních druhů pív. [3]

### 2.1.3. Tmavé slady mnichovského typu

Tmavé slady mnichovského typu, také často nazývané *bavorské slady*, se používají pro výrobu tmavých piv. Typické jsou vysokou hodnotou barvy kongresní sladiny (11,0 až 17,3 jednotek EBC). Mají vyšší obsah bílkovin, výrazné aroma, nižší extraktivnost, nižší aktivitu sladových enzymů a v neposlední řadě také vyšší obsah produktů Maillardovy reakce. Tyto sloučeniny vznikají použitím vyšších teplot při hvozdnění (100 až 105 °C). [2]

### 2.1.4. Pšeničné slady

Pšeničné slady se používají pro výrobu svrchně kvašených piv, piv typu Lambic apod. Svrchně kvašená piva s použitím pšeničného sladu se ve větší míře vyrábějí v Německu nebo Belgii. Na našem území používání pšeničných sladů k výrobě piv převažovalo až do 18. století, kdy je postupně začal nahrazovat slad ze zrn ječmene. Od 19. století se v Čechách a na Moravě používá téměř výhradně slad ječný a v současnosti se pšeničná piva připravují pouze v některých malých pivovarech. [3]

Výchozí surovinou je pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) nebo i pšenice špalda (*Triticum aestivum* var. *spelta*). Pšeničný slad ve srovnání s ječným obsahuje o 4–5 % více extraktu, má vyšší podíl dusíkatých a polysacharidických látek. Pšeničný slad se vyznačuje zvláštními chuťovými vjemy, podporuje pěnivost a může být tedy přidáván do piv z ječného sladu se špatnou stabilitou pěny. Slady se vyrábějí podobně jako slady z ječmene, klíčení ale trvá kratší dobu a sušení probíhá při nižších teplotách. [2, 3]

### 2.1.5. Speciální slady

Speciální slady se používají pro výrobu tmavých a speciálních piv. Od běžných sladů se liší enzymovou aktivitou, redoxní kapacitou, kyselostí a v neposlední řadě také barvou a vůní. [4]

#### 2.1.5.1. Slady karamelové

Karamelové slady obsahují velké množství aromatických a barevných složek. Vyrábějí se z dobře rozluštěného zeleného sladu nebo i z hotových sladů po zpětném navlhčení. Karamelizace sladu se následně provádí v rychlopražičích. Nejprve dochází k částečnému zcukření endospermu při teplotách 70 až 75 °C po dobu 30–45 minut. Samotný karamelizační proces se poté provádí při teplotách 120 až 180 °C (podle druhu sladu). Dochází k tvorbě aromatických a barvicích látek z nižších sacharidů a také se mění obsah látek koloidního charakteru, které přispívají k pěnivosti piv. Rozlišují se čtyři typy karamelových sladů. [4]

*Světlý karamel (karapils)* se praží při nejnižší teplotě 120 °C, po dobu 3 hodin. Dalším způsobem výroby je sušení na normálním hvozdně hned po zcukření v pražičích. Barva kongresní sladiny je 3,5–6 jednotek EBC a obsah extraktu minimálně 70 % v sušině.

*Karamel střední* se praží při teplotách 130–150 °C a po dobu 2,5 hodiny. Barva kongresní sladiny je 20–40 jednotek EBC, vůně sladiny je karamelová a chuť sladká.

*Karamel normální* se praží při 150 až 170 °C, opět po dobu 2,5 hodiny. Tento typ karamelového sladu se používá nejčastěji. Barva sladu je 50 až 70 jednotek EBC a extrakt v sušině je minimálně 75 %. Chuť sladiny je karamelová, slabě nahořklá a vůně aromatická.

*Karamel porterový* se používá při vaření velmi tmavých piv typu porterů. Vyrábí se pražením při 180 °C. Barva sladu je 100–120 jednotek EBC, chuť je silně karamelová, nahořklá a vůně aromatická. [3, 4]

#### 2.1.5.2. Slady barvicí

Barvicí slady se používají pro výrobu silně tmavých piv. Přípravují se z hotových, navlhčených sladů upražených s gradací teplot až ke 225 °C. Tím se zajistí vysoká tvorba melanoidinů a postupná degradace škrobu. Ze škrobu vznikají dextriny, karamel, a nakonec hořká látka asamar. Jejich drsnou a natrpklou chuť je potřeba zmírnit nejméně dvoutýdenním odležením. Barvicí slady mají díky vysoké teplotě výrazně pozměněné fyzikálně-chemické, fyziologické a dietetické vlastnosti.

Speciálním výrobkem je *slad čokoládový*, který je typický tmavě hnědou barvou a chutí popisovanou jako suchou, svíravou, kyselou s náznakem sladké chuti. [2]

#### 2.1.5.3. Slady diastatické

Diastatické slady se používají při zpracování enzymově chudých sladů. Pro výrobu se používá ječmen s vyšším obsahem dusíkatých látek. Vysoké hodnoty diastatické mohutnosti se dosahuje studeným vedením a opatrným sušením při teplotě 50 °C. Diastatická mohutnost by měla být okolo 300 jednotek podle Windische a Kolbacha. [2]

#### 2.1.5.4. Slady melanoidinové

Melanoidinové slady se používají pro výrobu tmavých piv. Charakteristická vůně, barva a chuť je docílena prostřednictvím intenzivnějšího průběhu Maillardovy reakce. Vůně je čistě sladová a chuť bez nahořklé příchutě. Barva je 20 j. EBC a extrakt je nejméně 74 % v sušině. [2]

#### 2.1.5.5. Slady proteolytické

Proteolytické slady se používají ke zvýšení kyselosti. Vyrábějí se ze zeleného nebo hotového sladu skrácením mléčnými bakteriemi ve sladince. V hotovém sladu se tak zajistí obsah mléčné kyseliny 0,7 až 4 %. Přidání kyselého sladu pak zlepšuje varní výtěžek, pěnivost a trvanlivost piva. [2]

#### 2.1.5.6. Slady zvyšující redoxní kapacitu piva

Tyto slady se vyrábějí podobně jako melanoidinové slady. Mají výrazné redukční vlastnosti způsobené vyšším obsahem produktů Maillardovy reakce a karamelizačních reakcí. Přidávají se z důvodu oddálení stárnutí chuti při skladování a ke zvýšení biologické trvanlivosti piva. [2]



Obr. 2: Základní a speciální druhy sladu [36]

## 2.2. Náhražky sladu

Za náhražky sladu jsou považovány všechny suroviny poskytující extrakt piva kromě sladu a chmele. V užším pojetí jsou to hlavně škrobnaté obiloviny, které se používají ke zvýšení extraktu ječného sladu. Jejich použití je rozšířené v místech, kde je nedostatek sladu pro výrobu piva. Používají se také pro výrobu specifických druhů piv (např. v Belgii) nebo pro výrobu piva bezlepkového.

Ačkoli v tradičních pivovarských zemích je použití náhražek spíše ojedinělé, ve světové produkci je s použitím náhražek sladu vyráběno až 90 % piv. Důvodem použití podílu náhražek sladu může být snížení ceny piva, zlepšení koloidní stability piva a výroba lehčích a světlejších piv. [2, 3]

### 2.2.1. Škrobnaté náhražky sladu

Za škrobnaté náhražky sladu se považují všechny suroviny obsahující vysoký obsah škrobu nebo podobných polysacharidů, které lze zpracovat v pivovarské technologii. Podíl v sypání, který je možno použít, závisí na druhu obiloviny a enzymovém potenciálu současně použitého sladu. Použití náhražek do 10 % sypání je zpravidla bezproblémové, při použití 10–20 % jsou nutné menší technologické úpravy a nad 30 % je už nutný přídavek enzymů a dochází ke změně sensorických vlastností piva. Škrobnaté náhražky se dělí na nesladované obiloviny, škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty a speciální sladové náhražky. [2, 3]

#### 2.2.1.1. Nesladované obiloviny

Nesladovaná zrna **ječmene** patří mezi dlouho používané náhrady sladu, protože jejich použití zachovává původní sensorické vlastnosti piva. Nevýhodou použití zrn ječmene je jejich obtížné mletí, protože jemný šrot může negativně ovlivnit scezování. Zvýšení podíl zrn ječmene může také způsobovat zhoršenou filtrovatelnost nebo nízký stupeň prokvašení. Řešením je přídavek mikrobiálních enzymů nebo použití ječného škrobu. [2, 3]

Podíl nesladovaných zrn **pšenice** se používá pro výrobu tradičních belgických piv (např. Lambic). Výhodou použití pšenice jsou typické organoleptické vlastnosti a lepší pěnivost piva. Nevýhodou je zhoršení průběhu scezování, filtrovatelnosti a koloidní stability. Při použití vhodného kvasničného kmenu mají pšeničná piva typickou vůni a chuť po 4-vinylguajakolu, který připomíná hřebíček.

Při použití **kukuřice** je nutné odstranit klíček, který obsahuje prekurzory staré chuti a lipidy zhoršující pěnivost piva. Kukuřice se používá ve formě šrotu, čištěného šrotu, vloček, kukuřičného škrobu nebo sirupu. Přidává se v množství 10–30 % sypání a rmutuje se dekokčním způsobem za přídavku sladu nebo enzymů.

Použití **rýže** je velmi oblíbené při výrobě amerických piv. Rýže má ze všech náhražek nejvyšší podíl škrobu, obsahuje nízké množství dusíkatých a minerálních látek. Nevýhodou je nižší intenzita kvašení mladin, snížení plnosti chuti a světlá barva piva. Použití rýže také může způsobovat změny sensorických vlastností, jako je aroma fenolové nebo po kouři. Tomu lze předejít použitím určitých ověřených odrůd rýže.

Okrajově se také používají i další obiloviny jako je **žito**, **oves**, **čirok**, **triticale** nebo **proso** (obrázek 3). Oves se používá pro výrobu speciálního belgického piva Blanche de Louvain. Použití těchto obilovin je omezené, protože mohou způsobovat technologické problémy při výrobě piva. Čirok a proso jsou rozšířené v netradičních oblastech výroby piva, především v Africe. [2, 3]



Obr. 3: Triticale (*Triticosecale* Wittm.), proso (*Panicum miliaceum* L.), čirok (*Sorghum vulgare*) [35]

### 2.2.1.2. Škrobnaté výluhy, sirupy a koncentráty

Výluhy, sirupy a koncentráty se vyrábějí ze škrobnatých surovin, kde může být obsah škrobu zachován nebo může být částečně hydrolyzován na nižší sacharidy. Škrobnaté sirupy se vyrábějí pomocí enzymové hydrolyzy. Škrobnaté náhražky získané z ječmene, pšenice, triticales a ovsu lze využít v infuzní přípravě mladiny. [2]

### 2.2.1.3. Speciální sladové náhražky

Mezi speciální sladové náhražky patří naklíčená zrna ječmene a zelený slad. Slad lze nahradit do 10 % sypání naklíčenými zrny ječmene bez výrazných změn chuti vyrobeného piva. Při použití 15 % se zlepšuje pěnivost piva, ale již dochází ke změně sensorických vlastností. Zelený slad lze použít až do 30 % sypání, jeho výraznou nevýhodou je ale omezená trvanlivost. Výhodou speciálních náhražek je především úspora nákladů na hvozdnění a v případě naklíčených zrn ječmene i úspora času na výrobu zeleného sladu. [2]

## 2.2.2. Cukerné náhražky

Výhodou cukerných náhražek je snadnější zpracování než u náhražek škrobnatých. Cukerných náhražek se používá podle druhu cukru 5 až 10 %, zředka do 20 %. Zpravidla se dávkuje do mladiny v průběhu chmelovaru. Při použití cukerných náhražek dochází v mladinách ke snížení obsahu dusíkatých, polyfenolových a růstových látek, zvyšuje se prokvašení a obsah alkoholu. Tyto náhražky také mohou způsobit snížení pěnivosti a plnosti chuti.

Piva vyrobená s použitím *krystalového cukru* (řepného i třtinového) mají světlou barvu a vyšší obsah alkoholu. Nesmí být použit příliš velký podíl cukru, protože může docházet k problémům při hlavním kvašení a fermentace se může zpomalit až zastavit. Použití *surového cukru* se zbytky melasy je vhodné při výrobě tmavých a speciálních piv. I zde mohou nastat komplikace při kvašení mladiny spojené se zbytky třtinové bagasy.

Dále je možné použít dokonale zkvasitelný *invertní cukr* nebo *škrobový cukr*, který pivu dodává plnější chuť a používá se při výrobě piva v Belgii, Anglii, Francii a USA. [2]

## 2.2.3. Sladové výtažky

Sladové výtažky se připravují rmutováním infuzním způsobem ze světlého plzeňského sladu nebo sladu diastatického, kdy má být co nejvíce zachována enzymová aktivita sladových enzymů. Výluhy se po scezení zahušťují na sirupy na vakuové odparce při teplotě 40–55 °C.

Sladové výtažky se dělí na *jedlé sladové výtažky* s medovou barvou prvních podílů separovaného výluhu, *kanditní sladové výtažky* s tmavší barvou ze zahuštěných výstřelků, *pekařské sladové výtažky* ze směsi jednotlivých podílů výluhu a *textilní výtažky*. [2]

## 2.3. Druhy piv

Celosvětově je vyráběno několik set druhů piv. Mohou být rozděleny do dvou typů – Ale a klasický ležák, což také zhruba odpovídá dělení na spodně kvašená a svrchně kvašená piva. Mohou se vyskytovat i hybridní druhy piv, protože spodní kvasinky lze použít i k výrobě svrchních piv, a naopak kvasinky svrchní k výrobě ležáků. Piva lze rozdělit také podle barvy na světlá, tmavá, polotmavá a jejich směsi – piva řezaná. [2, 5]

### 2.3.1. Druhy pív vyráběné v České republice

V České republice jsou tradičně vyráběna spodně kvašená piva. Existuje mnoho způsobů dělení pív, např. podle obsahu původního extraktu, obsahu alkoholu a způsobu konečné úpravy do následujících skupin. [2, 5]

- **Ležáky**: pojem světlý ležák je u nás reprezentován pivem plzeňského typu, které má koncentraci původní mladiny 11–12 %, vyznačuje se výraznou hořkostí, dobrou pěnovostí a plností. Vyrábí se zpravidla dvourmutovým dekokčním způsobem a je středně prokvašené.
- **Výčepní piva**: jsou vyráběna především z ječných sladů a obsahují 7–10 % extraktu původní mladiny.
- **Stolní piva**: jsou převážně z ječných sladů s obsahem extraktu původní mladiny do 6 % hmotnostních včetně.
- **Speciální piva**: jsou vyráběna především z ječných sladů a obsahují extrakt původní mladiny minimálně 13 %.
- **Portery**: jsou tmavá piva, která by měla obsahovat minimálně 18 % extraktu původní mladiny.
- **Piva se sníženým obsahem alkoholu**: obsahují 0,5–1,2 objemových procent alkoholu a nesmějí tedy být požívána řidiči.
- **Nealkoholická piva**: jsou vhodná pro řidiče, neboť obsahují do 0,5 objemových procent alkoholu. Vyrábí se třemi možnými způsoby. Jedním způsobem je přerušení kvašení mladiny o nízkém původním extraktu mladiny (4–6 %). Dále lze z hotového piva odpařit alkohol na vakuové odparce nebo alkohol odstranit pomocí polopropustné membrány. Pivo může mít mladinovou až slabě karamelovou chuť.
- **Piva se sníženým obsahem cukrů**: jsou určena pro diabetiky a jsou to piva hluboce prokvašená s obsahem zatěžujících sacharidů do 7,5 g·l<sup>-1</sup> a bílkovin do 4,0 g·l<sup>-1</sup>.
- **Pšeničná piva**: obsahují podíl extraktu pšeničného sladu větší než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu.
- **Kvasnicová piva**: jsou vyrobená přidáním čisté kvasničné kultury nebo malého podílu rozkvašené mladiny do hotového piva během stáčení. Díky tomu má pivo výrazněji kvasnicovou chuť a je slabě zakalené až zakalené.
- **Ochucená piva**: jsou vyrobená přidávkem látek určených k aromatizaci, potravních doplňků, potravin, surovin s vlastním aromatem nebo lihovin a ostatních alkoholických nápojů. Obsah alkoholu z přidávaných surovin ale nesmí přesáhnout obsah alkoholu v původním pivu. [5, 6]

### 2.3.2. Zahraniční druhy pív

U zahraničních pív se často používá termín **Ale**, který označuje svrchně kvašená piva pocházející z Anglie a Irska. Toto pivo může mít různou barvu i různý obsah původního extraktu. Existuje mnoho druhů pív typu Ale a mezi nejznámější patří Pale Ale, Old Ale, Brown Ale, Cream Ale, Scotch Ale nebo Bitter. [2, 5]

Dalšími druhy jsou **Porter**, což je tmavé, silné, svrchně kvašené pivo a **Scout** – černé plné pivo. Známým pivem typu Porter je pivo Guinness s nízkým obsahem oxidu uhličitého, které je čepované s přidávkem dusíku pro trvanlivou pěnu. [2]

Mezi piva německá patří **Vollbier**, což je světlé nebo tmavé spodně kvašené pivo s nižší hořkostí. Piva s větší hořkostí se nazývají **Pilsener Bier**, **Exportbier Bock** a nejsilnější je bavorský **Doppelbock**. Kvasnicová piva se označují jako **Keller** nebo **Zwickel Bier**. **Märzen** neboli březňák je zase pivo středně silné, tmavší barvy. Německá svrchně kvašená piva jsou **Kölsch** a **Weizenbier**, do kterých se přidává více než 50 % pšeničného sladu. Dále sem patří pivo **Hefeweizen**, které má v láhvi přidány kvasnice a **Kristall**, které je filtrované.

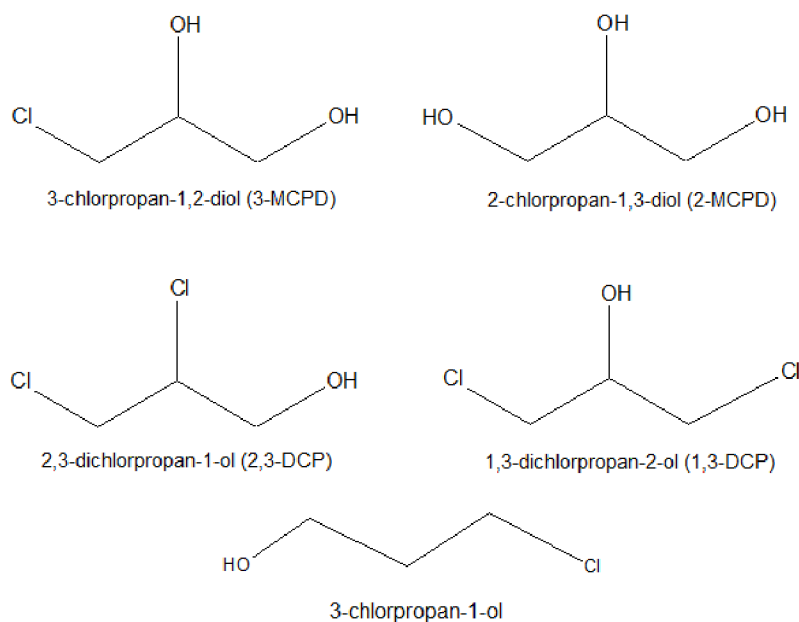
**Berliner Weisse** je další pivo pšeničné, které je ale kvašené za přítomnosti mléčných bakterií a vyznačuje se vysokým obsahem oxidu uhličitého. Další piva bývají označována místem výroby, například Münchener (Mnichovské), Wiener (Vídeňské) nebo Dortmunder (Dortmundské).

Mezi piva belgická patří bílé pivo **Hoegaarden witbier** a také známé pivo **Lambic**, které se vyrábí spontánním kvašením za použití gramnegativních a grampozitivních kultur bakterií a kvasinek. Belgická piva také bývají označovaná jako Tripel (Trippel, Triple Ale), Dubbel a Quadrapel, u nichž je dvakrát až čtyřikrát zvýšená dávka použitého sladu oproti klasickým pivům. Tyto piva jsou sladká a často nefiltrovaná.

Zajímavostí jsou například **piva ledová**. Tento zvláštní druh ležáku pochází původem z Kanady a získává se silným zchlazením, které způsobuje vyloučení krystalků ledu. Krystalky se poté odstraní a zbylé pivo se stáčí. Pivo se vyznačuje výraznou chutí a dobrou pitelností. [2]

## 2.4. Chemické a fyzikální vlastnosti 3-MCPD a chlorpropanolů

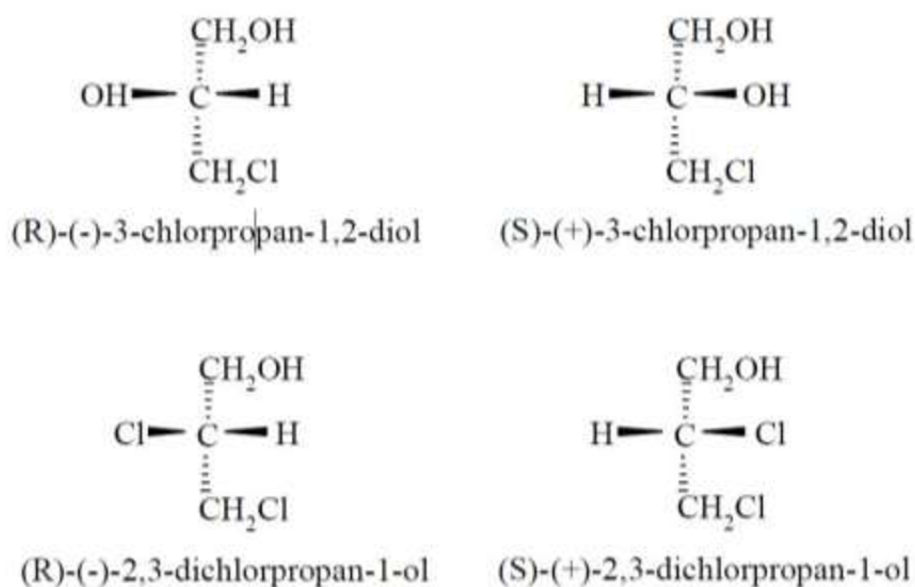
3-chlorpropan-1,2-diol patří do skupiny chlorhydrinů glycerolu nebo také chlorpropanolů. Mezi nejčastěji se vyskytující chlorpropanoly v potravinách patří kromě 3-MCPD také 1,3-dichlor-2-propanol (1,3-DCP). Nalezeny byly ale i 2-chlor-1,3-propandiol (2-MCPD) a 2,3-dichlor-1-propanol (2,3-DCP). Jejich strukturální vzorce jsou znázorněny na obrázku 4. V potravinách byly objeveny také monoestery a diestery chlorpropanolů, u nichž jsou jedna nebo dvě hydroxylové skupiny acylovány zbytkem mastné kyseliny. [7]



Obr. 4: Struktura chlorpropanolů vyskytujících se v potravinách [9]



3-MCPD a 2,3-DCP jsou chirální sloučeniny a přirozeně se tedy v potravinách nachází ve dvou opticky aktivních formách, R- a S-. U 3-MCPD jsou to (2R)-3-chlorpropan-1,2-diol a (2S)-3-chlorpropan-1,2-diol a u 2,3-DCP jsou to izomery (2R)-2,3-dichlorpropan-1-ol a (2S)-2,3-dichlorpropan-1-ol (viz obrázek 5). V potravinách se tyto izomery nacházejí jako racemická směs, tedy v poměru 50:50. [7]



Obr. 5: Opticky aktivní formy 3-MCPD a 2,3-DCP [1]

Jako čistá látka je 3-MCPD bezbarvá, lehce olejovitá kapalina s příjemnou vůní. Tato látka má relativní molekulovou hmotnost  $110,54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Bod varu je  $114\text{--}120 \text{ }^\circ\text{C}$  a bod tání  $213 \text{ }^\circ\text{C}$ . Snadno se rozpouští ve vodě, alkoholech, diethyletheru a acetonu. V minulosti byl 3-MCPD průmyslově využíván například při výrobě barviv, jako rozpouštědlo pro acetát celulózy nebo jako příměs do dynamitu ke snížení teploty mrznutí. 3-MCPD byl pod názvem  $\alpha$ -chlorhydrin používán také jako chemosterilant pro hlodavce. Dnes může být 3-MCPD použit při výrobě atorvastatinu nebo guaifenesinu, který se používá jako lék proti kašli. [8, 9]

## 2.5. Toxikologické hodnocení

3-MCPD se může v potravinách vyskytovat buď ve volné formě nebo vázaný ve formě esterů s mastnými kyselinami. 3-MCPD pravděpodobně může být z monoesterů a diesterů v organismu uvolňován působením střevních lipáz. V případě monoesterů je toto štěpení velmi rychlé, při studiích *in vitro* bylo zjištěno, že po 1 minutě je uvolněno víc než 95 % 3-MCPD. Diestery se štěpí poněkud pomaleji, 95 % 3-MCPD se uvolní až po 90 minutách inkubace s lipázou. [7]

Při studiích účinků chlorpropanolů *in vitro* již byla prokázána genotoxicita a karcinogenita, *in vivo* však genotoxický účinek nebyl potvrzen. Jednotlivé izomery také vykazují různé toxikologické efekty. Například u (S)-enantiomeru bylo při studiích provedených na krysách, kterým byly pravidelně podávány vyšší dávky 3-MCPD, prokázáno ovlivnění plodnosti. Naproti tomu (R)-izomer vykazoval škodlivé účinky na funkci ledvin. Genotoxický potenciál mají jeho degradační produkty a metabolity glycidol a 2-chlormléčná kyselina. U glycidolu byl potvrzen mutagenní účinek v různých testech *in vitro* a *in vivo*. [1, 10, 11]

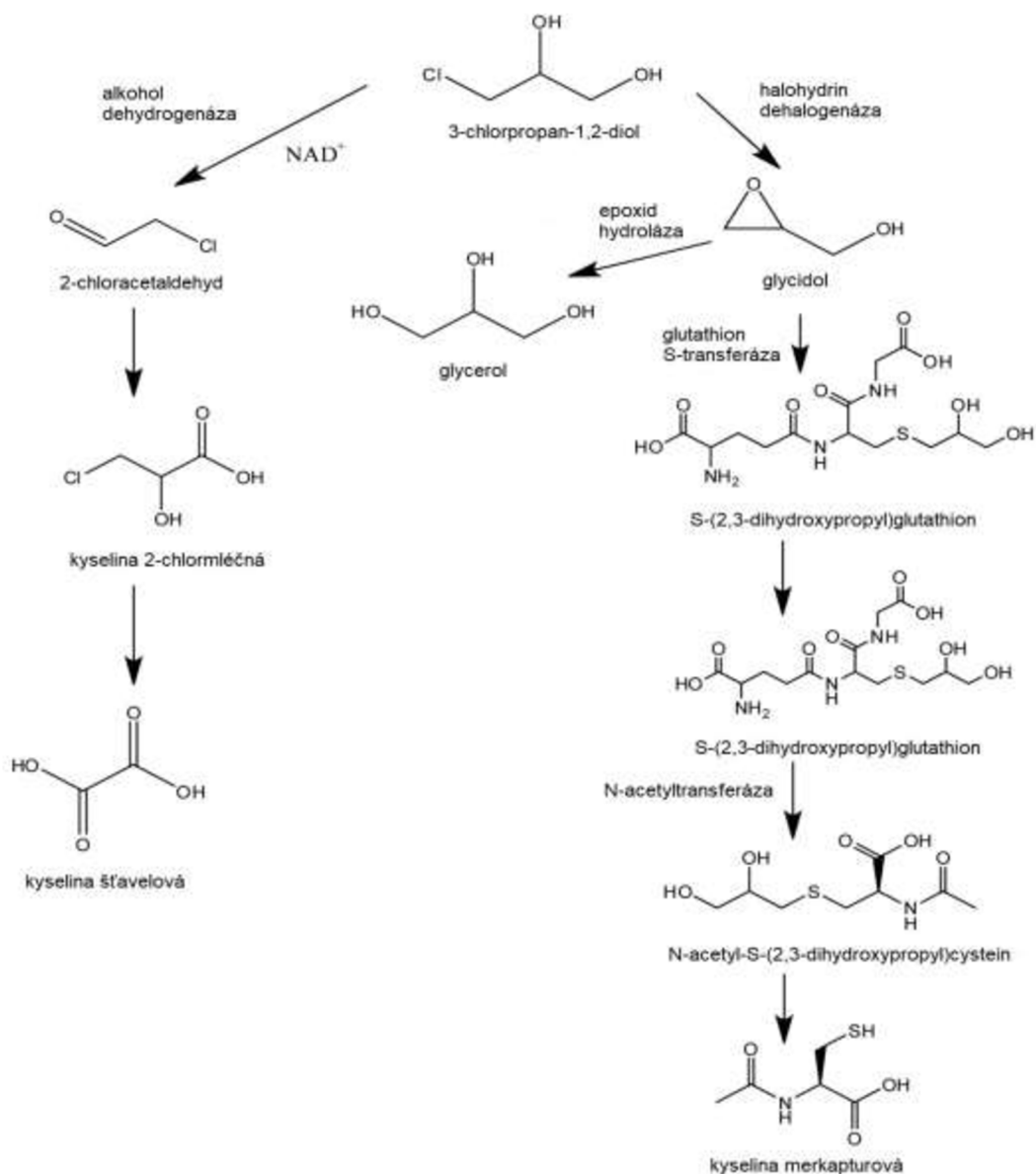
Jak už bylo zmíněno, 3-MCPD má negativní vliv na plodnost jak u zkoumaných hlodavců, tak pravděpodobně i u člověka. Ukazuje se, že 3-MCPD má spermatotoxický efekt, dochází k narušení zrání a mobility spermií. Při podávání 3-MCPD březím samicím docházelo ke snížení tělesné hmotnosti, avšak varlata plodu nebyla nijak poškozena a nezměnila se ani jejich genová exprese plodu. 3-MCPD tedy nejspíše nemá vliv na testikulární organogenezi. [7]

Na základě dostupných toxikologických informací je Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) 3-MCPD klasifikován jako karcinogen třídy 2B, tedy má potenciální karcinogenní účinky pro člověka. Z tohoto důvodu bylo Evropskou unií stanoveno maximální povolené množství  $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pro sójové omáčky a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (sušiny) pro ostatní potraviny obsahující kyselé hydrolyzáty bílkovin. V roce 2017 byl Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) stanoven tolerovatelný denní příjem (Tolerable Daily Intake, TDI) v olejích a ostatních potravinách  $2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tělesné váhy. Potravinářským závodům bylo doporučeno provádět všechny nezbytné kroky při výrobě, které povedou k významnému snížení koncentrace tohoto kontaminantu v potravinách a potravinářských surovinách. Kromě zmíněných bílkovinných hydrolyzátů a sójových omáček však zatím není obsah 3-MCPD v potravinách legislativně omezen. [9, 10, 12, 13]

## 2.6. Metabolismus a kinetika 3-MCPD

Bylo zjištěno, že 3-MCPD se snadno dostává do všech tělesných tekutin, snadno přestupuje přes hemoencefalitickou bariéru do mozku a přes bariéru oddělující krev a tkáň varlat. Snadno přestupuje i přes placentární bariéru a může se tak dostat do všech tkání plodu. [7]

3-MCPD se v organismech nejspíše rozkládá dvěma různými metabolickými cestami (viz obrázek 6). V případě první cesty je počátečním krokem odstranění chlóru prostřednictvím enzymu halohydrin dehalogenázy. Vzniká tak meziprodukt glycidol s mutagenními účinky. Konečným produktem této dráhy je buď glycerol nebo po konjugaci s glutathionem kyselina merkapturová. Druhá cesta vede k tvorbě kyseliny šťavelové a možným toxickým meziproduktem v této dráze je kyselina 2-chlormléčná. První cesta rozkladu 3-MCPD pravděpodobně převažuje u mikroorganismů, zatímco druhá zmíněná cesta převládá u savců, neboť při studiích na krysách bylo v moči objeveno větší množství kyseliny 2-chlormléčné a jen nepatrné množství glycidolu. [9, 11]



Obr. 6: Metabolické cesty vedoucí k odbourání 3-MCPD [9]

## 2.7. Výskyt 3-MCPD v potravinách

Jak již bylo zmíněno, 3-MCPD je procesní kontaminant, tedy látka vznikající při zpracování potravin. Největší množství bylo nalezeno v bílkovinných hydrolyzátech připravených kyselou hydrolýzou, tedy ve výrobcích jako sójová nebo ústřicová omáčka. 3-MCPD byl ale objeven i v širokém spektru dalších potravin jako jsou sušenky, pekařské výrobky, káva, výrobky z masa a ryb, polévky, uzené výrobky a v některých tradičních přísadách jako jsou speciální tmavé slady, upravené škroby a extrakty masa. V menším množství se chloropropanoly nacházejí i v tavených a grilovaných sýrech a fermentovaných salámech (viz tabulka 1 Tabulka 1). Chloropropanoly se do potravin mohou uvolňovat také z vodovzdorných potravinářských obalů. [1, 7, 10]

Tabulka 1: Obsah 3-MCPD v jednotlivých potravinách (upraveno podle Veliška et al. [10])

Potravina	Obsah 3-MCPD ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Potravina	Obsah 3-MCPD ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
chléb	<10–55	káva	<9–19
chlebová kůrka	24–275	slad	<10–850
toasty	20–679	uzená šunka	<10–47
koblihy	11–24	šunka	<5–22
hranolky	<10–15	masové extrakty	<10–14
brambůrky	15	mleté hovězí maso	<10–71
uzené ryby	<10–191	salámy	<10–69
sýry	<10–95	modifikované škroby	<10–488
tuky, oleje	<5–12	česnek (zpracovaný)	5–690

V poslední době jsou také intenzivně studovány estery chlorpropanolů s mastnými kyselinami. Z esterů může volný 3-MCPD vznikat chemickou a enzymovou hydrolýzou při zpracování potravin nebo i působením lipas *in vivo*. Jak je patrné z tabulky 2, obsah esterů v potravinách je mnohdy vyšší než obsah volného 3-MCPD. [10]

Estery chlorpropanolů se nacházejí zejména v rostlinných olejích. Jejich obsah je závislý na technologii zpracování, nejnižší bývá u olejů lisovaných za studena, a naopak výrazně vyšší obsah bývá zjištěn u olejů rafinovaných. [7]

Tabulka 2: Obsah esterů 3-MCPD v potravinách (upraveno podle Veliška et al. [10])

Potravina	Obsah esterů (vyjádřeno v $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3-MCPD)	Potravina	Obsah esterů (vyjádřeno v $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3-MCPD)
salámy	1399–1760	hranolky	230–6100
chléb	6–85	brambůrky	400
chlebová kůrka	547	máslo, sádlo, lůj	<10–140
toasty	86	tuky po smažení	11206
koblihy	200–1690	kojenecká výživa	<72–8470
káva	210–390	Rafinované oleje:	
pražený ječmen	1184	palmový	2821
slad plzeňský	5–11	kokosový	1556
slad pražený	463–650	olivový	<300–24

### 2.7.1. Kyselé hydrolyzáty bílkovin

Hydrolyzáty bílkovin obsahují největší množství 3-MCPD. Toto množství závisí na obsahu lipidů, koncentraci kyseliny chlorovodíkové a použité teplotě při hydrolýze. Chlorpropanoly se nacházejí i v sójových omáčkách, které byly vyrobeny smícháním kyselých hydrolyzáatů s produkty získanými fermentací. Naopak sójové omáčky vyrobené pouze fermentací chlorpropanoly neobsahují.

Tradiční výroba sójových omáček se skládá ze dvou hlavních kroků – koji a moromi fermentace. Ani jeden z těchto kroků nezahrnuje použití vysokých teplot, proto zde nedochází k tvorbě 3-MCPD. U fermentovaných sójových omáček ale byla prokázána přítomnost jiného potenciálně karcinogenního kontaminantu – ethylkarbamátu. [9, 10]

Výchozí surovinou pro výrobu kyselých hydrolyzátů mohou být odtučněné sójové boby, pšeničný lepek nebo kukuřičná mouka. Tyto suroviny jsou hydrolyzovány za použití 4 až 9 molárního roztoku kyseliny chlorovodíkové. Hydrolyza obvykle probíhá při teplotách 103–110 °C po dobu 20 až 35 h. Právě zahřívání za vysokých teplot je považováno za důvod vzniku 3-MCPD, který v tomto případě vzniká z glycerolu, lecithinu a jiných glyceridů obsažených v surovinách. [9]

Od 80. let minulého století jsou proto postupně zaváděny novější technologické postupy výroby, které mají vést ke snížení obsahu chloropropanolů v kyselých hydrolyzátech a sójových omáčkách. Jednou z možností, při které 3-MCPD vůbec nevzniká, je použití hydrolyzy alkalické. Při použití alkalické hydrolyzy se výchozí suroviny nejprve zahřejí, poté se přidá hydroxid sodný, vápenatý nebo draselný. Hydrolyza probíhá při teplotě 27 až 54 °C a trvá několik hodin. Tento způsob výroby hydrolyzátů bílkovin je sice výhodný z hlediska nepřítomnosti 3-MCPD, ale výsledný produkt je zpravidla chuťově nevyhovující a obsahuje rozdílné složení aminokyselin v porovnání s kyselou hydrolyzou. [9]

Dalším způsobem je změna podmínek kyselé hydrolyzy, například snížení koncentrace kyseliny chlorovodíkové. Snížení koncentrace HCl ale také sníží účinnost hydrolyzy, proto je nutné zároveň použít postupné zvyšování teploty, což vede ke zvýšení účinnosti. [9]

Použit lze i úpravu pH po kyselé hydrolyze, neboť v alkalickém prostředí je 3-MCPD nestabilní. Úprava na  $\text{pH} > 6$  v kombinaci s použitím vyšší teploty je účinná metoda pro snížení koncentrace 3-MCPD. Protože tvorba 3-MCPD je závislá na přítomnosti chloridových iontů, další možnou úpravou hydrolyzy může být nahrazení kyseliny chlorovodíkové kyselinou sírovou. Nedostatkem tohoto postupu ale je menší výtěžek aminokyselin než při klasické hydrolyze. [9, 10]

Posledním navrženým způsobem je odstranění 3-MCPD za pomoci enzymů. Tento postup navržený Bornscheuerem a Hesselerem (2010) vychází z již zmíněného metabolismu rozkladu 3-MCPD u mikroorganismů. Enzym halohydrin dehalogenáza, který rozloží 3-MCPD na glycidol je získán z *Arthrobacter* sp. AD2. V dalším kroku je glycidol přeměněn na glycerol působením epoxid hydrolyzy. Tento postup je však časově náročný, vyžaduje optimalizaci a imobilizaci daných enzymů, proto je jeho použití v průmyslovém měřítku zatím nevhodné. [9]

### 2.7.2. Oleje a tuky

Ve studii provedené Zelinkovou et al. (2006) bylo analyzováno 25 vzorků surových a rafinovaných olejů a tuk izolovaný z ořechů. Obsah 3-MCPD v olejích se pohyboval od  $< 3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (LOD) do  $24 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejnižší množství bylo zjištěno v jednom ze vzorků panenského olivového oleje a ve vzorcích kukuřičného oleje. Naopak nejvyšší množství obsahoval pšeničný olej. Stanovován byl i obsah vázaného 3-MCPD, který byl významně vyšší a pohyboval se od  $< 100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (LOD) do  $2462 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Panenské oleje v případě vázaného 3-MCPD obsahovaly relativně malá množství. Protí tomu velká množství byla naměřena u olejů rafinovaných. [14]

Významné množství esterů 3-MCPD bylo zjištěno i v tukových frakcích ze smetan do kávy, šlehaček ve spreji a bujonů (Karšulínová et al., 2007). Množství 3-MCPD se u těchto potravin pohybovalo od 220 do 4480  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku. V této studii bylo vysoké množství 3-MCPD zjištěno i u rafinovaného palmojadrového oleje (850–1400  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), rafinovaného kokosového oleje (1418–1694  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a rafinovaného palmového oleje (1390–4170  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Potraviny upravené smažením v palmovém oleji jako například hranolky nebo bramborové lupínky také obsahují významné množství esterů 3-MCPD (Zelinková et al., 2009). [15, 16]

### 2.7.3. Kojenecká výživa a mateřské mléko

Výskyt 3-MCPD ve výživě malých dětí může být zvláště rizikový, proto bylo zkoumáno, zda může z požitých kontaminovaných potravin přecházet do mateřského mléka. Ukázalo se, že žádný ze vzorků mléka neobsahoval volný 3-MCPD v množství větším než LOD (300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), všechny vzorky ale obsahovaly větší množství vázaného 3-MCPD. Průměrný obsah byl 1014  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  izolovaného tuku, což odpovídá 35,5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  mléka (Velíšek et al., 2007).

Zelinková et al. (2009) analyzovala 14 vzorků kojenecké výživy, která se svým složením podobala mateřskému mléku. Výsledky byly podobné jako u mateřského mléka. Žádný ze vzorků neobsahoval volný 3-MCPD, avšak obsah vázaného 3-MCPD se pohyboval od LOD (300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) do 2060  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku. To odpovídá 62 až 588  $\mu\text{g}$  vázaného 3-MCPD na kg produktu. [15]

### 2.7.4. Výrobky z obilovin

Výrobky z obilovin se zabývala studie provedená Crewsem et al. (2001). V této studii bylo 3-MCPD nalezeno v různých druzích sušenek, keksů a chleba. Nejvyšší obsah 3-MCPD byl zjištěn v opečeném chlebu (88  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). V další studii (Breitling-Utzmannová et al., 2003) bylo objeveno velké množství 3-MCPD v chlebové kůrce (> 400  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Důvodem je vysoká teplota, které je vystavena právě tato část chleba během pečení. U opečených toustů nebo chleba bylo nalezeno množství 3-MCPD ještě vyšší (> 500  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Zdá se tedy, že u výrobků z obilovin má velký vliv na tvorbu 3-MCPD vysoká teplota. [15, 17]

Breitling-Utzmannová et al. (2005) testovala také vliv různých ingrediencí používaných pro pečení na tvorbu kontaminantu. Konkrétně se zabývala tuky, kypřicím prostředkem, kváskem, emulgátory, cukry a kvasnicemi. Kypřicí prostředek obsahoval cukr, mouku, sójovou mouku, síran vápenatý, emulgátor (mono- a diglyceridy mastných kyselin, E471), enzymy a kyselinu askorbovou. Bylo zjištěno, že největší vliv na tvorbu 3-MCPD měl kypřicí prostředek. Ze všech složek použitého kypřicího prostředku nejvíce ovlivnil vznik kontaminantu obsah cukru, ostatní složky ale musely mít synergický efekt. Zmíněný účinek cukru byl pozorován také v další studii, kde obsah cukru neovlivnil tvorbu glycerolu kvasnicemi, ale souvisel se zvýšením obsahu kontaminantu vytvořeného během procesu pečení.

Další složkou pečiva, která by mohla přispívat k tvorbě 3-MCPD, je komerční zlepšující prostředek do mouky. Ten obsahuje kyselinu askorbovou, sójovou mouku a zdroj monoglyceridů (např. glycerol monostearát nebo modifikované diglyceridy). [17]

### 2.7.5. Výrobky ze sladu

Do této skupiny můžeme zařadit slad, sladovou mouku a sladové extrakty, které jsou určeny pro barvení a dochucování. 3-MCPD ve sladech pravděpodobně vzniká při sušení za vyšších teplot. Samotné zrno ječmene zřejmě obsahuje látky, které umožňují tvorbu kontaminantu. [17]

Studie ukázaly, že sladové mouky a světlý slad obsahují pouze malá množství 3-MCPD, zatímco tmavý slad obsahuje velké množství kontaminantu. Ačkoli je kontaminant značně zředěný ve výsledném produktu, je možné, že 3-MCPD by se mohl vázat na další složky obsažené v pivu, například na kyseliny, aldehydy nebo na ethanol. [17]

Světlé slady (pod 9 jednotek EBC) obsahují množství 3-MCPD  $<10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U sladů barevnosti nad 20 jednotek EBC bylo naměřeno množství od  $<30$  do  $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvyšší množství obsahují slady pražené o barevnosti 300–1400 j. EBC (MAGB, 2013). [18]

Ve studii z roku 2007 (Divinová et al.) byl zkoumán obsah volného a vázaného 3-MCPD ve 14 různých druzích sladu. Konkrétně se jednalo o 2 slady plzeňské, 2 slady mnichovské, 4 slady karamelové, 4 tmavé pražené slady, 1 pšeničný slad a 1 slad karapils. Obsah volného 3-MCPD byl relativně nízký ( $<9\text{--}45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Nejvyšší obsah byl podle očekávání naměřen v pražených sladech ( $16\text{--}45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Obsah vázaného 3-MCPD se pohyboval v rozmezí od  $4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  do  $650 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Menší množství obsahovaly slady mnichovské, pšeničný slad, slady plzeňského typu a karamelové slady ( $4,0\text{--}29,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Nejvyšší obsah vázaného 3-MCPD byl opět zjištěn ve sladech pražených ( $463\text{--}650 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). [19]

### 2.7.6. Káva a náhražky kávy

3-MCPD byl nalezen v pražené kávě a ve větším množství také v instantní kávě. Barva pražených kávových zrn je spojena s tvorbou 3-MCPD. Čím tmavší je výsledná barva zrna, tím větší koncentrace kontaminantu je přítomna. Za tvorbu 3-MCPD během pražení je zodpovědné složení zrna, které přirozeně obsahuje chlorid sodný a lipidy. V kávových nápojích ale 3-MCPD bývá přítomen v menších množstvích z důvodu zředění vodou. [17]

V zelené kávě bylo nalezeno pouze stopové množství 3-MCPD. V kávách pražených byla naměřena koncentrace 3-MCPD od 10,1 do  $18,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvyšší množství bylo přítomno ve vzorku instantní kávy a také v kávě pražené po delší dobu. Také bylo zjištěno, že robusta zpravidla obsahuje větší množství 3-MCPD než arabika. Obsah vázaného 3-MCPD v kávě se pohyboval od  $6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  u rozpustné kávy do  $390 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  u vzorků kávy bez kofeinu (Doležal et al., 2005). [19]

3-MCPD je přítomen i v náhražkách kávy. Kurzrock a Speer (2005) analyzovali 10 vzorků různých kávových náhražek a obsah 3-MCPD se pohyboval v rozmezí od  $43 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  do  $759 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Menší množství bylo naměřeno v rozpustných vzorcích (do  $120 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), naopak ve vzorcích nerozpustných byla koncentrace 3-MCPD výrazně vyšší. Obsah 3-MCPD v biovýrobcích a klasických kávových náhražkách se výrazně nelišil.

Obsah vázaného 3-MCPD v kávových náhražkách byl ve studii Divinové et al. (2007) mnohonásobně vyšší než obsah volného. Koncentrace vázaného 3-MCPD se pohybovala v rozmezí 19 300–50 600  $\mu\text{g}$  na kg tuku, což odpovídá 145–1184  $\mu\text{g}$  na kg výrobku. Nejvyšší obsah byl přítomen v pražených zrnech ječmene. Vysoký obsah vázaného i volného 3-MCPD vysvětluje nejvyšší naměřený obsah tuku a chloridů ze všech analyzovaných kávových náhražek. [19]

### 2.7.7. Uzené výrobky

Další potravinou, ve které byl podle studie uskutečněné v Německu (Kuntzer et al., 2006) nalezen 3-MCPD, jsou uzené masné výrobky. Autoři se zabývali vlivem procesu uzení na tvorbu 3-MCPD u fermentovaných klobás a šunky. Množství vzniklého kontaminantu bylo závislé na délce uzení a druhu použitého dřeva. V této studii bylo uzení provedeno za nízké teploty (28 °C) a bylo zjištěno, že samotný kouř a vzorky ze zdi udirny obsahovaly vysoké koncentrace 3-MCPD. Pelety použité k uzení před uzením kontaminant neobsahovaly. V případě uzených výrobků tedy 3-MCPD pochází z tzv. tekutého kouře (200–760  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), popřípadě může pocházet z kyselých hydrolyzátů použitých jako koření. 3-MCPD v tekutém kouři vzniká z prekurzoru 3-hydroxyacetonu, který vzniká při pyrolýze celulózy. [10, 17]

### 2.7.8. Maso

3-MCPD se může nacházet v pečeném masu a v masných výrobcích (salámy, slanina, šunky atd.). Bohužel v tomto případě není jasný prekurzor, ze kterého 3-MCPD vzniká. Ve studii provedené Crewsem et al. bylo zjištěno, že 3-MCPD se netvoří, pokud je maso upraveno vařením ve vodě nebo v páře. Pravděpodobně je pro jeho tvorbu nezbytná teplota nad 100 °C a nepřítomnost vody. V případě salámu může 3-MCPD pocházet také z použitého obalu obsahujícího epichlorhydrin. [17]

Obsah 3-MCPD naměřený v masných výrobcích se pohyboval v intervalu 14–51,8  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Divinová et al., 2004). Nejmenší množství bylo obsaženo v salámu a nejvyšší naopak ve vzorku klobásy. Ve stejné studii byl analyzován také vzorek grilovaného kuřete, který obsahoval 26  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  kontaminantu. [20]

### 2.7.9. Výrobky z ryb

3-MCPD byl objeven i v některých vzorcích ančoviček v olivovém oleji. Ve studii bylo zjištěno, že 3-MCPD se v tomto případě tvoří až během balení a skladování. Předpokládá se, že kontaminant zde může vznikat působením enzymů na tuky, což by mohlo vést k uvolňování glycerolových prekurzorů, které následně reagují s chloridy (Reece et al., 2005). [17]

Ve studii Divinové et al. (2004) bylo ve vzorku ančoviček naměřeno 14,6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Kromě toho byly analyzovány i vzorky uzené makrely (18,6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a slanečků (28,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). [20]

## 2.8. Mechanismy vzniku

Obecně chlorpropanoly vznikají v potravinách, které současně obsahují vyšší obsah tuků a soli, mají nízkou aktivitu vody a jsou vystavené působení vyšších teplot. [1]

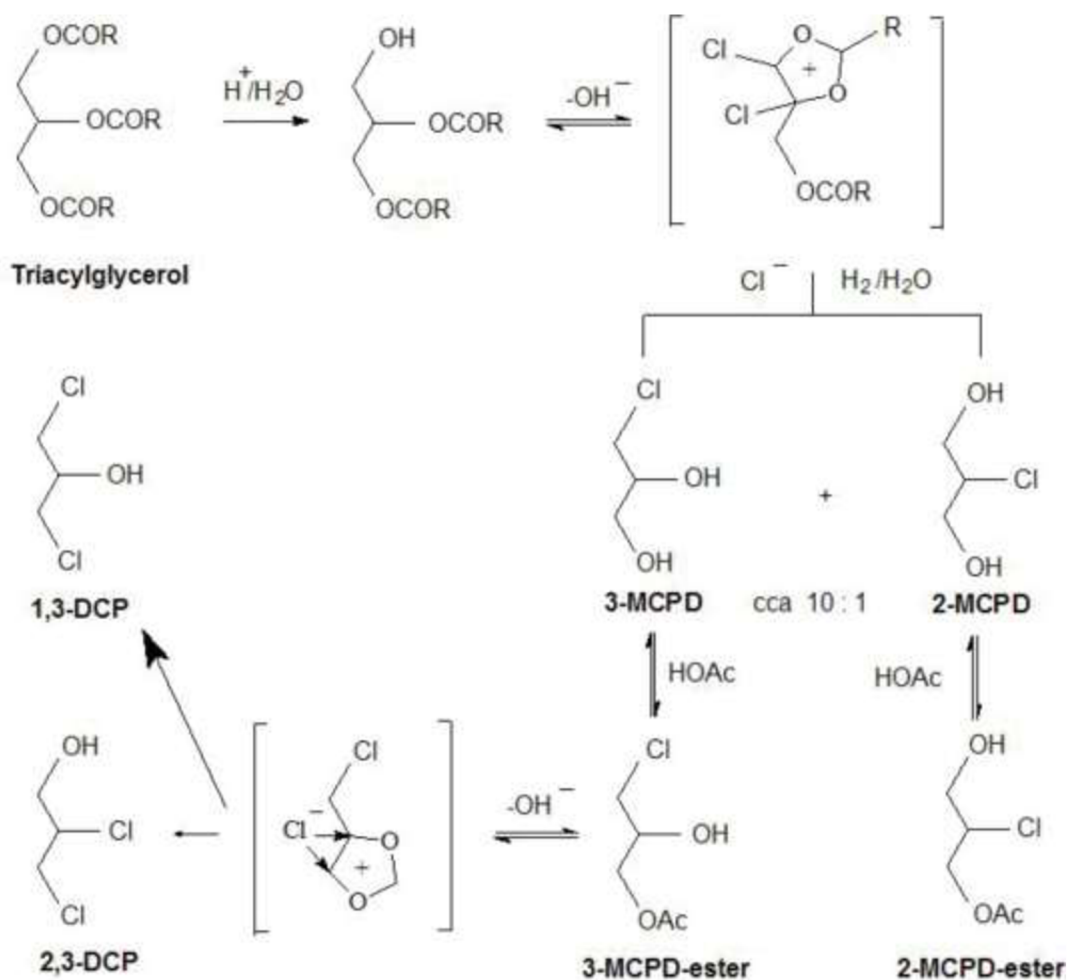
Jak již bylo řečeno, prekurzorem pro vznik chlorpropanolů v potravinách jsou tuky. Především to jsou tři lipidické složky: triacylglyceroly, fosfolipidy a glycerol. Nezbytná je přítomnost chloridů, které jsou v podobě soli přítomné téměř v každé potravine. Primárními produkty reakcí mezi těmito složkami jsou diestery MCPD, které se hydrolyzují na monoestery MCPD. Reakcí esterů MCPD s chloridy vznikají estery DCP a volné chlorpropanoly následně vznikají hydrolýzou esterů. [7]



Významné množství chlorpropanolů se také může tvořit při pyrolytické reakci glycerolu se sukralózou, syntetickým chlorovaným sladidlem. V menší míře byla zjištěna tvorba chlorpropanolů i z allylalkoholu, který je jedním z produktů alliinu nacházejícím se v cibuli, česneku a dalších rostlinách z čeledi česnekovitých (*Alliaceae*). [7]

### 2.8.1. Vznik z triacylglycerolů

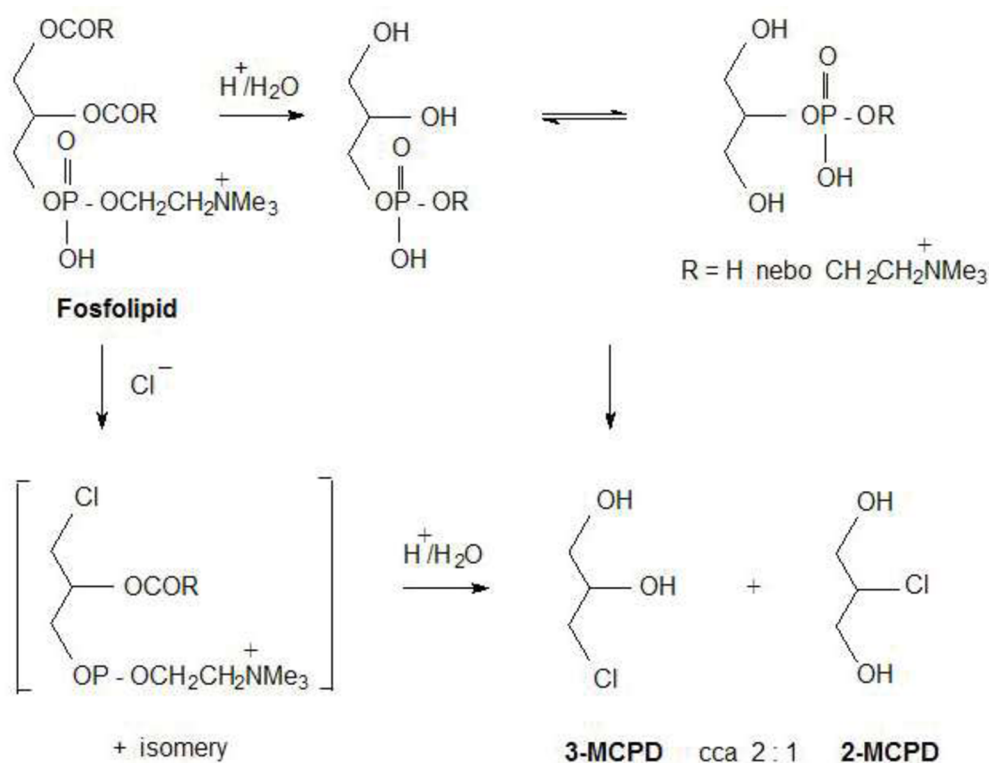
Hlavní reakcí, která vede ke vzniku esterů i volných chlorpropanolů z triacylglycerolů, je pravděpodobně tvorba reaktivních cyklických acyloxoniových kationtů. Reakcí těchto kationtů s chloridovými ionty vznikají diestery 3-MCPD nebo diestery 2-MCPD. Poměr vznikajícího 3-MCPD a 2-MCPD z triacylglycerolů závisí na sterických a dalších vlivech a je přibližně 10:1 (viz obrázek 7Obr. 7). [7] [10]



Obr. 7: Vznik chlorpropanolů z triacylglycerolu [7]

### 2.8.2. Vznik z fosfolipidů

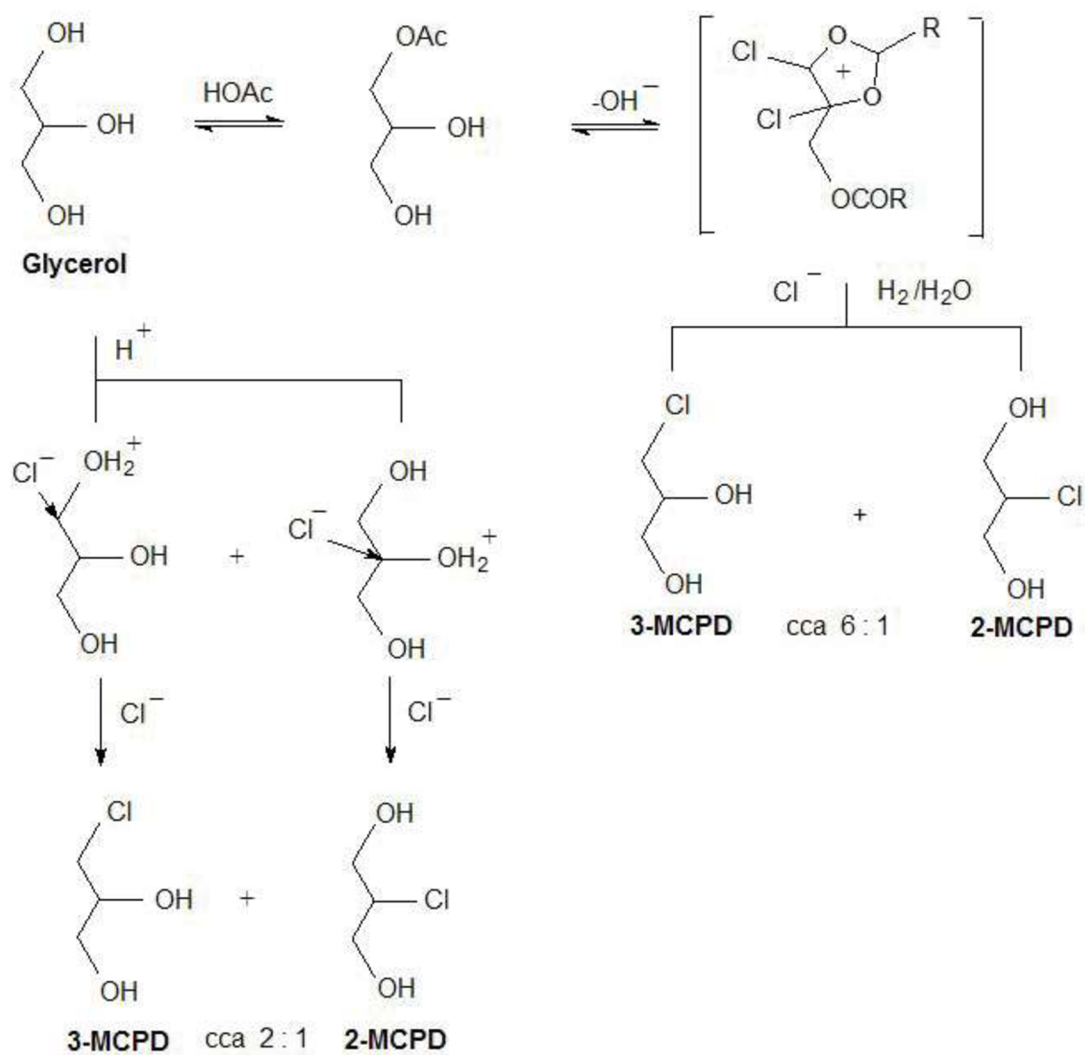
Při vzniku chlorpropanolů z fosfolipidů dochází k hydrolyze fosfolipidu a vzniku deacylovaných produktů (např. 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin poskytuje 1-acyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin, 2-acyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholin a *sn*-glycero-3-fosfatidylcholin). Parciální estery pak poskytují chlorderiváty, které se následně hydrolyzují na směs 3-MCPD a 2-MCPD a to v poměru asi 4:1 (obrázek 8). [7, 10]



Obr. 8: Vznik chlorpropanolů z fosfolipidu [7]

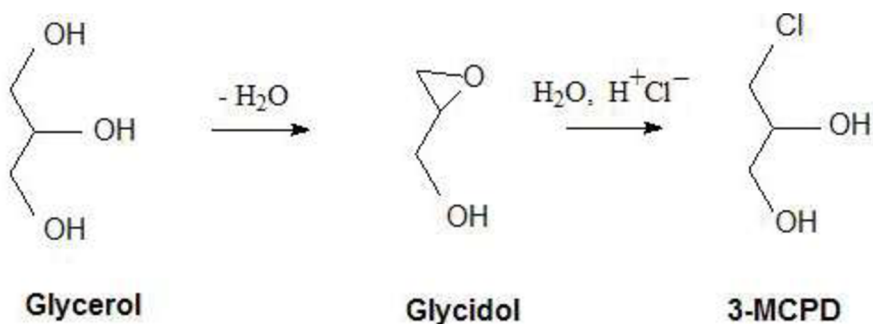
### 2.8.3. Vznik z glycerolu

U glycerolu se v kyselém prostředí bílkovinných hydrolyzátů protonují hydroxylové skupiny za vzniku alkyloxoniových iontů. V případě primárních hydroxyskupin je v dalším kroku voda z alkyloxoniového iontu substituována chloridovým aniontem. Tento krok je stereospecifický a vzniká racemická směs 3-MCPD. Alkyloxoniový kation vzniklý ze sekundární hydroxyskupiny pak disociuje na karbokation a vodu. Karbokation následně reaguje s chloridovým aniontem za vzniku 2-MCPD. Poměr vznikajícího 3-MCPD a 2-MCPD je v tomto případě asi 2:1. Dále mohou také vznikat cyklické acyloxoniové ionty, které s chloridovými ionty tvoří směs 3-MCPD a 2-MCPD v poměru zhruba 6:1 (obrázek 9). [7]



Obr. 9: Vznik chlorpropanolů z glycerolu [7]

Další možnou reakcí je dehydratace karbokationu na kation glycidolu (hydroxymethyloxiran) a následný vznik 3-MCPD nebo 2-MCPD otevřením oxiranového kruhu chloridovými ionty (viz obrázek 10). 3-MCPD a 2-MCPD pak vzniká v poměru 3:1. [7]



Obr. 10: Vznik 3-MCPD z glycerolu [7]

## 2.9. Regulace obsahu 3-MCPD

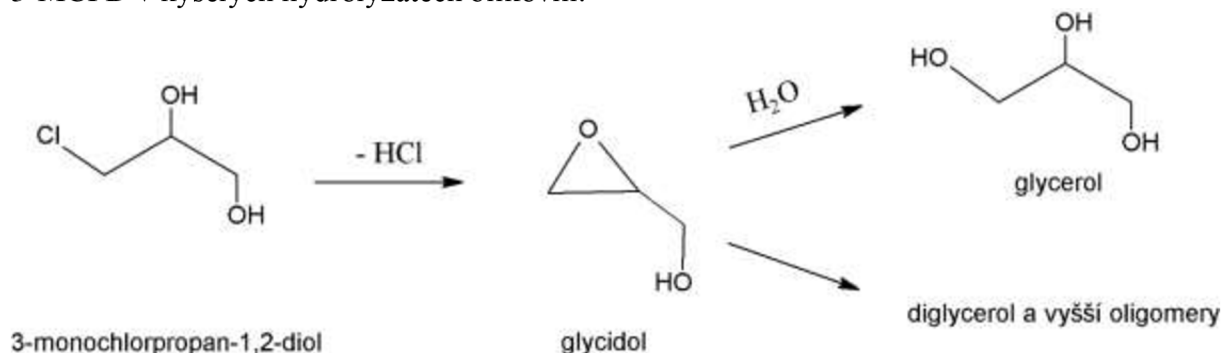
Snížení obsahu 3-MCPD v potravinách není jednoduchý úkol, protože kontaminant může vznikat různými mechanismy a jeho přítomnost je navíc často spojena s přítomností nezbytné suroviny ve výrobku. Mnohdy tedy musí být nalezen kompromis mezi senzoričnými vlastnostmi konečného výrobku a množstvím přísad spojených se vznikem 3-MCPD. [17]

Obecné možnosti snížení obsahu kontaminantu jsou následující:

- zvýšení pH u potravin s vysokým obsahem vlhkosti,
- snížení použité teploty při zpracování potravin,
- snížení obsahu soli,
- omezení obsahu glycerolu, který by v potravině mohl vznikat během zpracování a skladování,
- nahrazení glyceridů jinými aditivy,
- nahrazení koření příslušnými extrakty z koření,
- inaktivace lipáz a esteráz,
- kontrola materiálů, které přicházejí do kontaktu s potravinou, zda neobsahují prekurzory pro tvorbu 3-MCPD.

Další možností by mohlo být využití mikroorganismů, buněčných extraktů nebo enzymů s dehalogenačními vlastnostmi. Ačkoliv provedené modelové studie vykazují dobré výsledky, tento přístup má zatím svá omezení. [17]

Jak už bylo naznačeno v prvním bodě, 3-MCPD je nestabilní v zásaditém prostředí, kdy se rozkládá na glycerol (viz obrázek 11). Této reakce se komerčně využívá při snižování obsahu 3-MCPD v kyselých hydrolyzátech bílkovin.

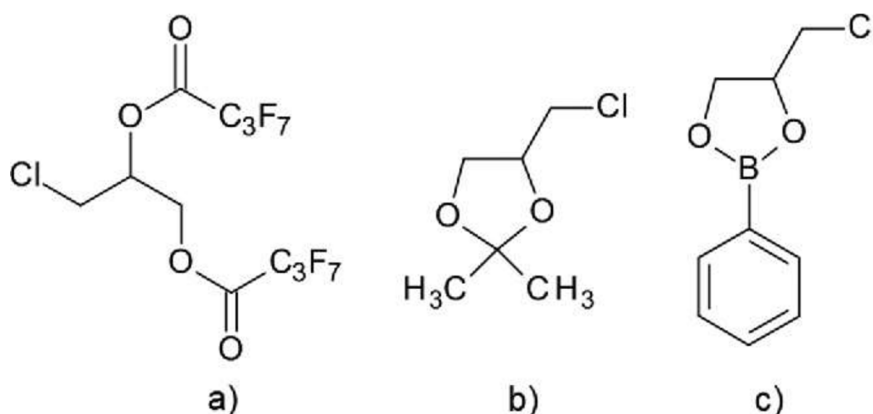


Obr. 11: Rozklad 3-MCPD v alkalickém prostředí (upraveno podle Hamleta et al., 2002) [12]

## 2.10. Způsoby analýzy

Ačkoli má 3-MCPD jednoduchou strukturu, jeho vlastnosti jako je absence vhodného chromoforu, vysoký bod varu a nízká molekulová hmotnost, ztěžují provedení analýzy. Z těchto důvodů je obtížné 3-MCPD stanovit pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Použití plynové chromatografie je také omezené z důvodu nízké těkavosti. Hrozí také nežádoucí interakce stanovované látky s dalšími komponenty vzorku. Pro stanovení 3-MCPD bylo vyvinuto mnoho metod a jejich modifikací, nejčastěji za použití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Přehled vybraných metod je v tabulce 3. [8, 15, 17]

Při stanovení pomocí plynové chromatografie je velmi důležitá derivatizační reakce pro získání těkavého derivátu 3-MCPD. Pro tyto účely bylo jako první derivatizační činidlo použito heptafluorobutyrylimidazolu (HFBI). Později se ale zjistilo, že derivatizace pomocí HFBI není příliš selektivní a dostatečně účinná. Náhradou za HFBI může být kyselina heptafluoromáselná (HFBA) nebo v současnosti nejpoužívanější derivatizační činidlo, kterým je kyselina fenylborová (PBA). Méně často se jako rozpouštědlo a zároveň derivatizační činidlo používá aceton nebo N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA). Struktury vybraných derivátů 3-MCPD jsou znázorněny na obrázku 12. [15]



Obr. 12: Produkty derivatizace 3-MCPD za použití: a) HFBI b) acetonu c) PBA [15]

Před analýzou i derivatizací je ve většině případů ještě nutné vzorek upravit. Pro derivatizaci v nevodném prostředí je potřeba provést extrakci na pevné fázi. 3-MCPD je potřeba nejprve extrahovat do solného roztoku. Tento extrakt je převeden do kolony obsahující křemelinu jako stacionární fázi a jako mobilní fáze je použito protické rozpouštědlo. Získaný eluát je vysušen a může být podroben derivatizaci. K extrakci 3-MCPD je také možné použít již předpřipravené komerční kolony jako je například Chem Elut nebo EXtrelut. [9]

Při použití PBA jako derivatizačního činidla lze derivatizaci provádět ve vodném prostředí, extrakce 3-MCPD ze vzorku se tedy provádí nejprve směsí hexanu a acetonu a následuje extrakce do vody. Po vysušení extraktu do sucha je možné provést derivatizaci. [9]

### 2.10.1. Metody s HFB deriváty

Metoda stanovení pomocí GC/MS využívající jako derivatizační činidlo HFBI je evropskou normou pro stanovení 3-MCPD v potravinách (v ČR pod názvem ČSN EN 14537). Tato norma je založená na metodě Brereton et al. (2001), která byla validována na vzorcích sladových extraktů, polévek v prášku, strouhanek, salámu, náhražek sýru a hydrolyzovaných rostlinných proteinů. Principem metody je smíchání vnitřního standardu (zpravidla deuterované 3-MCPD), roztoku NaCl, pevné matrice (např. křemeliny) a vzorku do homogenní směsi, která je převedena do chromatografické kolony a zbavena nečistot promytím směsí hexanu a etheru. 3-MCPD je poté vyextrahován do diethyletheru, zakoncentrován na vakuové odparce a derivatizován pomocí HFBI. Derivát 3-MCPD je poté analyzován GC/MS. [17]

Na této metodě jsou založeny další metody, které ale umožňují stanovit zároveň jak 3-MCPD, tak 1,3-DCP. Některé metody také používají jako derivatizační činidlo HFBA místo HFBI (např. Chung et al. 2002). Další modifikací je použití injektoru s programovatelnou teplotou (PTV), s nástřikem velkého množství vzorku a spojení tandemu GC/MS/MS (Leon et al., 2008). Tato metoda je citlivější než metoda původní. [17]

Nevýhodou těchto metod je použitá derivatizace, protože HFBI reaguje se všemi nukleofilními molekulami a je tak snížena selektivita. Může také docházet k neúplné derivatizaci a nestabilitě derivátů. [17]

### 2.10.2. Metody s PBA deriváty

BPA jako derivatizační činidlo použili ve své metodě Rodman a Ross (1986). Derivatizace byla provedena v nevodném prostředí a struktura derivátu 3-MCPD byla potvrzena metodou plynové chromatografie s detekcí pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Pesselman a Feit (1988) následně úspěšně 3-MCPD derivatizovali pomocí PBA ve vodném prostředí, extrahovali derivát hexanem a analyzovali metodou GC/ECD. [9, 17]

Další metodou vhodnou pro vzorky hydrolyzovaných rostlinných proteinů je metoda Plantinga et al. (1991). V metodě byl jako nejvhodnější rozpouštědlo pro analýzu 3-MCPD zvolen *n*-hexan. Pozorován byl vliv soli přítomné v roztoku vzorku na extrakci při použití *n*-hexanu, kdy se jako optimální ukázala koncentrace soli 12–20 %. Principem metody je smíchání a homogenizace vzorku a chloridu sodného (výsledná koncentrace NaCl má být 20 % w/v). Vzorek je následně derivatizován PBA, derivát je extrahován do hexanu a analyzován GC/MS nebo GC/FID. Mez detekce metody je 0,5–1 mg·kg<sup>-1</sup>, což naznačuje že metoda není dostatečně citlivá. [9, 17]

Pro zvýšení citlivosti byla navržena metoda detekce derivátu pomocí GC/MS SIM se selektivním sledováním iontů. Použitím GC/MS SIM byla vylepšena mez detekce na 3–10 µg·kg<sup>-1</sup> (IARC, 2004). Na tuto metodu navazuje práce Divinové et al. (2004), která používá značeného 3-MCPD jako vnitřního standardu, je selektivní, jednoduchá a může být použita pro měření obsahu 3-MCPD v sójových omáčkách i v jiných potravinách. [9, 17, 21]

### 2.10.3. Metody s dioxolanovými deriváty

Další možností je použití acetonu jako rozpouštědla i derivatizačního činidla, neboť aceton může reagovat s dioly za tvorby cyklických acetalů a ketalů. Meierhans et al. (1998) vytvořil selektivní metodu s derivatizací acetonem a analýzou pomocí GC/MS. LOD této metody je 0,01·10<sup>-1</sup> mg·kg<sup>-1</sup>. [9]

Modifikaci této metody provedli Rétho a Blanchard (2005) a Dayrit a Niñonuevo (2004). První zmíněná metoda je na rozdíl od metody Meirhanse vhodná pro analýzu širokého spektra potravin s mezí stanovení 5 µg·kg<sup>-1</sup>. Metoda se skládá se ze čtyř hlavních kroků. Prvním je vodná extrakce, kdy je ke vzorku přidán vnitřní standard 3-MCPD-d5 a voda. Směs je míchána po dobu 3 h a poté se nechá stát přes noc. Druhým krokem je extrakce pevnou fází s použitím Extrelutu NT20. Derivatizace je provedena roztokem acetonu (1 mg·ml<sup>-1</sup> monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové v bezvodém acetonu) a následuje analýza GC/MS. [17, 22]

Metoda druhá je podobná výše popsaným a liší se především v použité derivatizaci. Jako derivatizační činidlo je zde použit 4-heptanon z důvodu problematického použití acetonu. Použití acetonu je podle autorů nevhodné ze tří důvodů. Za prvé, derivatizace vyžaduje bezvodné prostředí, což je u acetonu problematické. Druhým důvodem je částečná rozpustnost dioxolanového derivátu ve vodě, což by mohlo vést ke ztrátám při dělení mezi vodou a hexanem. Posledním důvodem je omezení použití vyšší teploty při derivatizaci, neboť bod varu acetonu je 56 °C. [17]

#### 2.10.4. Ostatní metody

Pro stanovení bez derivatizace použil Spyres (1993) přímou detekci 3-MCPD metodou plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD). Mez detekce byla u této metody 1 mg·kg<sup>-1</sup>. [9]

Jednou z metod, která nevyužívá chromatografické metody, je metoda stanovení 3-MCPD pomocí kapilární elektroforézy s elektrochemickou detekcí (CE/ED). Výhodou této metody je pouze malá úprava vzorku a rychlost analýzy. Bohužel metoda byla zatím použita pouze pro sójovou omáčku a její citlivost v porovnání s GC je nižší (Xing a Cao 2007). [17]

Další metoda využívá molekulárně vtištěný polymer (MIP), který funguje jako potenciometrický chemosensor pro 3-MCPD ve vodných vzorcích (Leung et al., 2003). Širší využití této metody je ale omezené kvůli malému rozsahu kvantifikace. 3-MCPD MIP může být využit pro extrakci 3-MCPD ze vzorků a následně může být použita derivatizace a analýza GC/MS. [9]

Dále je nutné zmínit metodu, která je navržena pro stanovení monochlorpropanolů i dichlorpropanolů v koření a výrobcích obsahující koření (Wittman, 1991). V této metodě jsou chlorpropanoly ze vzorku extrahovány v Extrelut koloně ethylacetátem. Přidá se vnitřní standard (1,3-dichloraceton), vzorek je zakoncentrován a analyzován GC/MS. [17]

Crews et al. (2002) vytvořil alternativní metodu stanovení s použitím headspace GC/MS. Metoda má mez detekce 3 µg·kg<sup>-1</sup> a nevyžaduje složitou úpravu vzorku. Bohužel je ale tato metoda navržena pouze pro 1,3 DCP. Další metody využívají headspace v kombinaci s mikroextrakcí tuhou fází (HS-SPME). Huang et al. (2005) nejprve vzorek podrobují derivatizaci s PBA, poté extrakci HS-SPME s využitím polydimethylsiloxanového vlákna a následuje detekce 3-MCPD pomocí GC/MS. Lee et al. (2007) nejprve extrahuje 1,3-DCP a 3-MCPD s použitím vlákna pokrytého vrstvou polyakrylátu a po desorpci následuje HS derivatizace s parami N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (MSTFA). Všechny tyto metody byly navrženy pro analýzu vzorků sójových omáček. [17]

#### 2.10.5. Metody analýzy esterů 3-MCPD

Při analýze esterů 3-MCPD je důležitá úprava vzorku, neboť 3-MCPD musí být z vázané formy uvolněno, a to za pomoci kyselé nebo alkalické transesterifikace. Hamlet a Sadd (2004) ve své práci používají dvě metody stanovení vázaných chlorpropanolů. V první je vysušený vzorek extrahován ethylacetátem, estery jsou izolovány chromatografií na tenké vrstvě a analyzovány GC/MS. Estery jsou kvantifikovány jako 3-MCPD dipalmitát a jako vnitřní standard je použit 5 $\alpha$ -cholestan. Druhá metoda využívá enzymovou hydrolýzu pomocí komerční lipázy *Aspergillus oryzae*. Chlorpropanoly jsou analyzovány jako HFB estery metodu GC/MS. [17]

Již zmíněná metoda Divinové et al. také umožňuje stanovení esterů 3-MCPD. Vzorky jsou předupraveny, podrobeny transesterifikaci roztokem kyseliny sírové v methanolu a analyzovány stejně jako v případě volného 3-MCPD. [17]

Pro vzorky tuků byla nedávno navržena metoda nepřímého stanovení pomocí kyselé transesterifikace (Ermacora a Hrnčirik, 2012), při které by nemělo docházet ke konverzi glycidolu na 3-MCPD jako u transesterifikace bazické. Jako vnitřní standard v této metodě byl vyhodnocen jako nejvhodnější deuterovaný diester 3-MCPD. Metoda transesterifikace je oproti jiným metodám méně časově náročná. Transesterifikace běžně probíhá po dobu 16 h, tato metoda ale potvrdila, že po 4 hodinách transesterifikace se výsledky významně neliší jako po 16 h a tento čas je tedy dostačující pro uvolnění 3-MCPD. [15, 23]

Pro olejnaté vzorky byla také navržena metoda (Jiao et al., 2017) za použití extrakce disperzní tuhou fází v kombinaci s extrakcí kapalina-kapalina (DMSP-SLE) pro odstranění nečistot a analýza GC/MS. Protože se jedná o vzorky olejů, součástí této metody je kyselá transesterifikace pro uvolnění vázaného 3-MCPD. Derivatizačním činidlem pro tuto metodu je HFBI. [24]

Tabulka 3: Přehled vybraných metod stanovení volného a vázaného 3-MCPD [9, 15]

Typ vzorku	Derivatizační činidlo	Způsob detekce	LOD pro 3-MCPD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Autoři metody
Různé vzorky	PBA	GC/MI/FTIR	–	Rodman a Ross (1986)
Vodné vzorky	PBA	GC/ECD	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Pesselman a Feit (1988)
Koření	žádné	GC/MS SIM	500–1000	Wittmann (1991)
KHB	žádné	GC/ECD	1000	Spyres et al. (1993)
Sójové omáčky	žádné	CE/ECD	130	Xing a Cao (2007)
KHB	PBA	HS-SPME/GC/MS	3,87	Huang et al. (2005)
Vodné vzorky, KHB	HFBA	MIP/GC/MS	–	Leung et al. (2003)
Sójové omáčky	HFBA	GC/MS SIM	5	Chung et al. (2002)
KHB, koření	HFBI	GC/MS/MS MRM (iontová past)	5	Hamlet a Sutton (1997)



Tabulka 3 – pokračování

Typ vzorku	Derivatizační činidlo	Způsob detekce	LOD pro 3-MCPD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Autoři metody
Voda	HFBA	GC/ECD	0,7	Matthew a Anastasio (2000)
Různé potraviny	PBA	GC/MS SIM	3–10	Breitling-Utzmannová et al. (2003)
Různé potraviny	PBA	GC/MS SIM	3	Divinová et al. (2004)
Obilné výrobky	žádné	GC/MS Scan	–	Hamlet a Sadd (2004)
Oleje	TSIM	GC/MS SIM	0,14	Cao et al. (2009)
Oleje	PBA	GC/MS SIM	50	Kuhlmann (2010)
Oleje, tuky	žádné	GC/MS	–	Ermacora a Hrnčířik (2012)

## 2.11. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) je separační technika, která pro dělení látek využívá dvou fází – stacionární a mobilní. U této metody jsou složky separované v plynné fázi, všechny složky vzorku tedy musí být vypařeny definovaným způsobem. GC je vhodná pro organické látky s teplotou varu asi do 400 °C. Analyzovat lze i látky anorganické, pokud splňují podmínku těkavosti. Látky netěkavé je možno v některých případech analyzovat po převedení na těkavé deriváty. [25]

### 2.11.1. Princip metody a základní chromatografické charakteristiky

Principem metody plynové chromatografie je postupné a opakované vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi dvěma fázemi. První stacionární fáze je umístěna v koloně (ve vrstvě) a druhá fáze mobilní unáší dělené látky ložem stacionární fáze. Stacionární fáze může mít formu částec tuhé látky o průměru jednotek až stovek mikrometrů nebo to může být kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče. [26]

V případě plynové chromatografie je mobilní fáze plynná. Stacionární fáze působí selektivně na jednotlivé látky a na základě interakcí mezi separovanou látkou a stacionární fází dochází k rozdělení jednotlivých složek a k jejich rozdílné eluci. Jednotlivé složky jsou unášeny nosným plynem z kolony a na výstupu jsou zaznamenávány detektorem. [26]

Charakteristickou veličinou každé separované látky je retenční čas nebo retenční objem ( $t_R$ , resp.  $V_R$ ). Retenční čas je doba, kterou daný analyt stráví v koloně, tedy doba od nástřiku po maximum píku. Analogicky pak retenční objem je objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nástřiku vzorku po maximum eluční křivky. Tyto dvě veličiny lze vyjádřit vztahem

$$V_R = t_R \cdot F \quad (1)$$

kde  $F$  je průtoková rychlost mobilní fáze [ $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ].

Retenční čas, resp. retenční objem je dán součtem dvou veličin

$$V_R = V'_R + V_M, \quad (2)$$

$$t_R = t'_R + t_M \quad (3)$$

kde  $V_M$  je mrtvý objem (objem mobilní fáze od nástřiku přes kolonu až po detektor),  $V'_R$  je redukovaný retenční objem,  $t_M$  je mrtvý čas (retenční čas analytu, který není v koloně zadržován a pohybuje se tedy rychlostí mobilní fáze) a  $t'_R$  je redukovaný retenční čas (čas, který analyt stráví ve stacionární fázi). [26]

Další základní charakteristikou chromatografického systému je míra jeho účinnosti. Účinnost separace klesá s rostoucí rychlostí rozmývání zón separovaných látek. Kinetiku procesu rozmývání zón popisují dvě nejznámější teorie – *teorie chromatografických pater* (Martin a Synge, 1941) a *dynamická teorie* (van Deemter, 1956). [27]

Teorie chromatografických pater vychází z předpokladu, že kolonu je možno rozdělit na elementární jednotky – patra. V každém patře dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Čím více má kolona těchto pater, tím je separace účinnější. Počet teoretických pater kolony lze vypočítat ze vztahu

$$n = 16 \left( \frac{t_R}{Y} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

kde  $Y$  je šířka píku v základně a  $Y_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky.

Údaj o počtu teoretických pater musí být vždy uváděn zároveň s informacemi o délce kolony a použité testovací látce. K porovnání kolon různých délek se používá výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  a platí pro něj vztah

$$H = \frac{L}{n} \quad (5)$$

kde  $L$  je celková délka kolony. [27]

Vztah mezi výškovým ekvivalentem teoretického patra a rychlostí toku mobilní fáze popisuje **dynamická van Deemterova** rovnice:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (6)$$

kde  $A$  je příspěvek turbulentní difúze v mobilní fázi,  $B$  je příspěvek molekulární difúze v mobilní fázi,  $C$  je příspěvek odporu vůči převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi a  $u$  je průtoková rychlost mobilní fáze. [27, 28]

Příspěvek *turbulentní difúze* vzniká v důsledku proudění mobilní fáze mezerami mezi zrny náplně různých tvarů a velikostí. Separované složky mají tedy v různých místech náplně různou rychlost a dochází k vzájemnému předbíhání a opožďování molekul. Z toho vyplývá, že vliv turbulentní difúze je úměrný velikosti částic sorbentu, tvaru a rovnoměrnosti náplně kolony.

*Molekulární difúze* souvisí s šířením molekul z míst o vyšší koncentraci do míst s koncentrací nižší. Tento pohyb se děje po směru i proti směru toku mobilní fáze. Molekulární difúze

bývá ovlivněna tvarem kanálků sorbentu a lineární rychlostí mobilní fáze. V plynové chromatografii má tento příspěvek značný vliv. [29]

Příspěvek *odporu proti převodu hmoty* v podstatě charakterizuje dobu přechodu molekul mezi mobilní a stacionární fází. Ve stacionární fázi difundují separované molekuly do mikropórů a vracejí se pak z různých hloubek do mobilní fáze. V důsledku toho dochází k opožďování a rozšiřování zón. [28, 29]

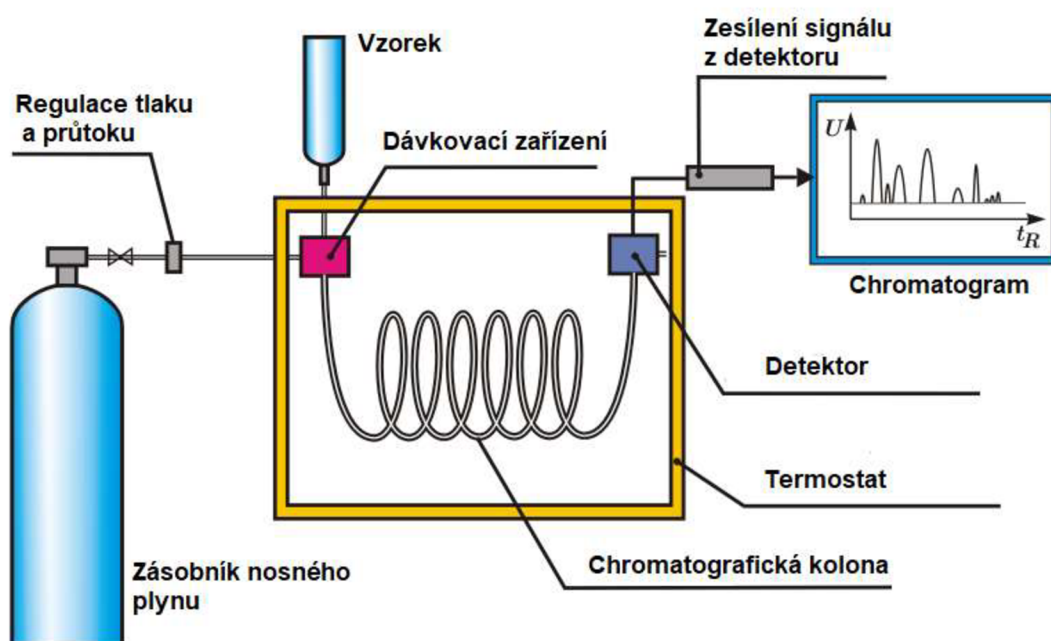
Van Deemterova rovnice se uplatňuje ale především v kapalně chromatografii. V plynové chromatografii je příspěvek turbulentní difúze zanedbatelný, proto se zde využívá Golayovy rovnice:

$$H = \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (7)$$

### 2.11.2. Instrumentace

Plynový chromatograf se skládá z těchto základních částí (viz obrázek 13):

- zdroj nosného plynu
- regulátor tlaku a průtoku nosného plynu
- dávkovací zařízení
- chromatografická kolona
- termostat
- detektor
- počítač s příslušným programem



Obr. 13: Schéma plynového chromatografu

#### 2.11.2.1. Zdroj nosného plynu

Zdrojem nosného plynu jsou tlakové lahve, které jsou značeny příslušnými barvami podle obsaženého plynu. Nejčastěji používanou mobilní fází bývá vodík a helium, méně často se používá dusík, argon nebo oxid uhličitý. Čistota plynů se označuje pomocí dvojčísla X.Z, kde X je počet devítek a Z je číslo následující za devítkami (tedy např. označení čistoty 4.5 znamená čistotu plynu 99,995 %, plyn obsahuje 50 ppm nečistot). [28]

#### 2.11.2.2. Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení slouží k vpravení vzorku do chromatografické kolony. Vzorek může být v plynném stavu nebo častěji může být rozpuštěný v organickém rozpouštědle. Teplota dávkovacího zařízení má být o několik stupňů vyšší, než je bod varu nejvýše vroucí složky vzorku. [29]

Dávkování vzorku se provádí buď přímo na kolonu (v případě kapilárních kolon) nebo nad ústí kolony umístěné na konci injektoru (náplňové kolony). Dávkování vzorku přímo na kolonu může být provedeno různými způsoby. Nejpoužívanější metody jsou: dávkování s děličem toku (split injector), dávkování bez děliče toku (splitless injector), dávkování přímo do kapilární kolony (on column injector) a dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku.

Dávkování s děličem toku se používá, pokud vzorek obsahuje velké množství analyzovaných složek. Vzorek se po vypaření smíchá s nosným plynem, rozdělí se na dvě části a pro vlastní analýzu je následně používána pouze část (0,1–10 %) a zbytek tvoří odpad. Způsob je vhodný pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Dávkování bez děliče toku se využívá pro analýzu zředěných vzorků a při přísných požadavcích na kvantitativní stanovení složek vzorku. Dávkování přímo do kolony se v případě kapilárních kolon provádí speciální mikrostříkačkou a je vhodné pro analýzu vzorků, jejichž složky se těsně nad bodem varu rozkládají. Vzorek se vnáší do křemenné kapiláry na začátku kolony, která má deaktivovaný povrch a dochází zde ke kondenzaci vzorku v úzké zóně. [30]

#### 2.11.2.3. Chromatografické kolony

V plynové chromatografii se využívají dva druhy kolon: kapilární a náplňové. Do roku 1957 se používaly výhradně kolony náplňové, dnes se tyto kolony používají méně, především pro analýzu nízkomolekulárních látek (alkoholy, estery atd.) a také pro separaci směsi plynů. Kapilární kolony se hojně využívají pro separaci vysokomolekulárních látek, těkavých látek a všude, kde je potřeba dosáhnout vyšších separačních účinností. [29]

Kapilární kolony jsou křemenné kapiláry, které bývají pokryté ochranou vrstvou polyimidu. Délka těchto kapilár bývá 15–100 m a vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí 100–700  $\mu\text{m}$ . Stacionární fáze je buď uchycena na vnitřní stěně kapiláry (vrstva je silná 0,1–10  $\mu\text{m}$ ) nebo může být kapilára naplněna stacionární fází v celém objemu. Podle charakteru stacionární fáze se rozlišují kolony WCOT (Wall Coated Open Tubular), které mají kapalnou stacionární fázi a PLOT kolony (Porous Layer Open Tubular), které mají vrstvu pevného aktivního sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry. [30]

#### 2.11.2.4. Termostat

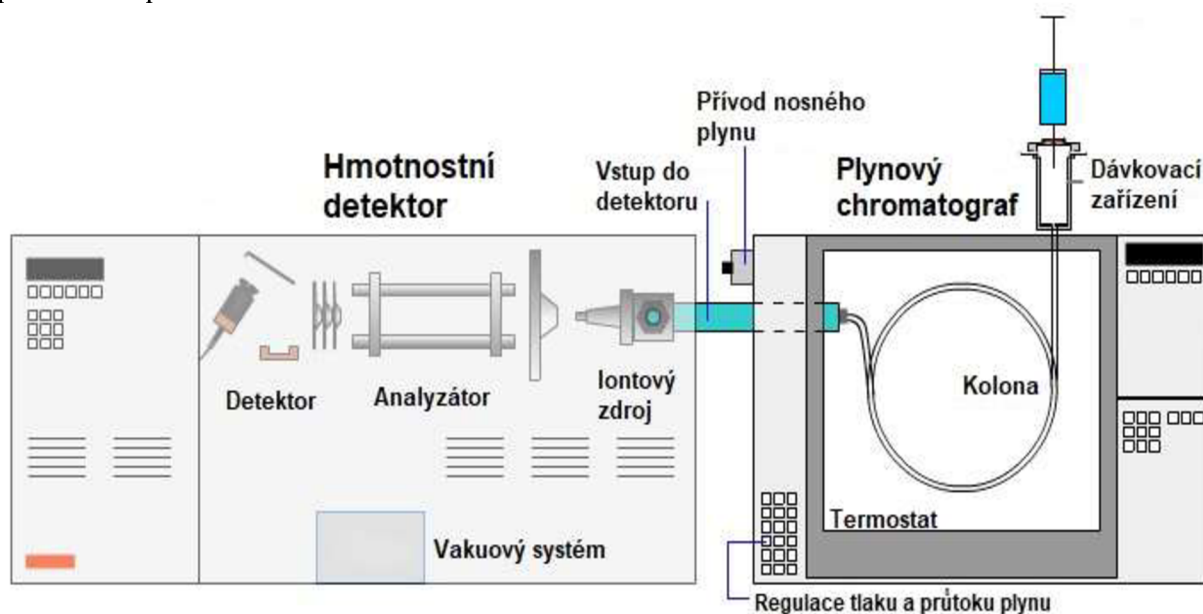
Funkcí termostatu je udržet konstantní teplotu kolony a injektoru. Termostat také umožňuje tvorbu teplotního programu pro gradientovou eluci. Teplotní gradient je vhodné provádět pro separaci složek směsi s širokým rozsahem bodů varu. Teplota kolony se může zvyšovat buď kontinuálně nebo skokově. Požadavkem na termostat je teplotní stabilita ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), možnost změny teploty po  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  za časovou jednotku a teplotní rozsah do  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.11.2.5. Detektory

Detektor slouží k detekci jednotlivých složek vzorku po separaci v koloně. Detektor by měl splňovat několik požadavků: měl by být dostatečně citlivý, mít co nejnižší mez detekce a okamžitou odezvu. Univerzální detektor, který by splňoval všechny požadavky, ale neexistuje. V praxi se proto používají různé typy detektorů. Mezi nejpoužívanější patří hmotnostní detektor, plamenový ionizační detektor a detektor elektronového záchyty. [29]

**Hmotnostně spektrometrický** detektor je v současnosti nejčastěji používaným detektorem ve spojení s plynovou chromatografií (obrázek 14). Technika GC/MS je vhodná pro analýzu složitých směsí organických látek ale i směsí látek organokovových a anorganických, pokud se jedná o směsi těkavé.

Detektor je založen na interakci iontů s elektrickým nebo magnetickým polem. Analyzované ionty jsou separovány na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor, detektor, vakuový systém a zařízení pro sběr a zpracování dat.



Obr. 14: Schéma spojení plynového chromatografu s hmotnostním detektorem [31]

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul na ionty. Pro plynné vzorky se nejčastěji využívá ionizace elektronová (EI) a chemická (CI). Pro prvkovou analýzu je vhodná ionizace pomocí indukčně vázaného plazmatu (ICP).

Analyzátor slouží k rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  (označovaného jako efektivní hmotnost). Analyzátoři se dělí podle fyzikálních principů, které využívají. První skupinou jsou sektorové analyzátoři, které využívají odchýlení trajektorie v magnetickém a elektrickém poli. Do druhé skupiny patří kvadrupól, sférická iontová past a lineární iontová past. Tyto analyzátoři využívají oscilace v elektrickém poli vytvářením kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Analyzátor doby letu funguje na principu měření doby letu iontů a konečně orbitrap využívá absorpci energie při cykloidálním pohybu v elektrickém poli.

Detektory hmotnostního spektrometru převádí intenzitu iontového toku na elektricky měřitelnou a zpracovatelnou veličinu. Používá se zde elektronásobič s kontinuální dynodou, s diskrétními dynodami nebo mikrokanálová destička. [28]

**Tepelně vodivostní detektor** (TCD, katarometr) je univerzální a nedestrukční detektor. Detektor sleduje změnu tepelné vodivosti nosného plynu vycházejícího z kolony v porovnání s čistým nosným plynem. V průtokové cele detektoru jsou umístěny spirálky z wolframu nebo platiny, které obtéká nosný plyn s vyšší vodivostí než mají separované látky. Když se do detektoru dostane analyt, sníží se tepelná vodivost a změní se napětí na spirálce. Při rozdílu vodivosti vzniká proud úměrný obsahu složky v nosném plynu. TCD se používá především pro detekci neuhlovodíkových plynů a nízkomolekulárních uhlovodíků. [30]

**Plamenově ionizační detektor** (FID) je univerzální detektor používaný ke stanovení organických sloučenin. Součástí tohoto detektoru jsou dvě elektrody, mezi kterými hoří vodíko-vzduchový plamen. Anodou je kovová část tělesa hořáku, katodou je kovová síťka nebo trubička. Organické sloučeniny poskytují v plameni radikály, které následně přechází na ionty a ty poté zvyšují vodivost plamene. Detektorem pak probíhá proud úměrný koncentraci analyzované organické sloučeniny. [30]

**Detektor elektronového záchytu** (ECD) obsahuje beta zářič (nejčastěji  $^{63}\text{Ni}$ ), jehož elektrony vyvolávají ionizaci nosného plynu a produkci elektronů. Pokud jsou pak přítomny sloučeniny obsahující prvky s velkou elektronovou afinitou, dojde k pohlcení energeticky chudých elektronů. Tyto nové částice jsou méně pohyblivé a sráží se s přítomnými kladnými částicemi a dochází tak k eliminaci a snížení celkového počtu negativních částic a tím i hodnoty ionizovaného proudu. Detektor detekuje selektivně látky, které zachycují elektrony za vzniku stabilních iontů a vyžaduje vysokou čistotu nosného plynu. [30]

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Použité chemikálie

- 3-MCPD-d5, Sigma-Aldrich
- kyselina fenylborová purum ( $\geq 97,0\%$ ), Sigma-Aldrich
- aceton pro plynovou chromatografii SupraSolv, Merck
- chlorid sodný p.a., Lach-Ner s.r.o.
- 3-MCPD, Sigma-Aldrich
- *n*-hexan pro kapalinovou chromatografii LiChrosolv, Merck
- helium 5.5, Siad
- deionizovaná voda

### 3.2. Laboratorní přístroje

- plynový chromatograf Trace GC Ultra Finnigan s hmotnostním detektorem Trace DSQ Thermo Finnigan
  - kapilární kolona SLB-5MS, Supelco
- tyčový homogénizátor DI 18 basic, IKA
- analytické váhy, Denver Instrument
- předvážky GE512-OCE, Sartorius
- mlýnek, Bühler-Miag
- rotační vakuová odparka RV 10, IKA
- ultrazvuková lázeň Elmasonic S 60, Elma Schmidbauer GmbH
- chlazená centrifuga 3-16K, Sigma Laborzentrifugen GmbH
- vyhřívaný termoblok, EVATERM
- mikropipeta, Hamilton
- mikropipeta, Eppendorf Research

### 3.3. Materiál

#### 3.3.1. Ječmen a slady

Pro analýzu obsahu 3-MCPD byly použity vzorky nesladovaného zrna ječmene, dále vzorky komerčně vyráběných sladů: 5 vzorků světlých plzeňských sladů, 2 vzorky mnichovského sladu a vzorky některých speciálních sladů: 1 vzorek světlého karamelového sladu, 1 vzorek tmavého karamelového sladu, 5 vzorků tmavých barvicích sladů, 5 vzorků pšeničných sladů a 1 vzorek žitného fermentovaného sladu.

Pro simulaci závislosti tvorby 3-MCPD na teplotě při hvozdění byl použit zelený slad, který byl sušen v laboratorní sušárně. Počáteční teplota v sušárně byla 60 °C a gradient teploty sušení byl 5 °C za hodinu. Vzorek byl odebírán každé dvě hodiny a konečná teplota byla 210 °C, celkem tedy bylo odebráno 16 vzorků.

### 3.3.2. Piva

Pro analýzu obsahu 3-MCPD v pivu byly použity vzorky komerčně dostupných piv. Jednalo se o 2 vzorky světlého výčepního piva, 3 vzorky světlého ležáku a 5 vzorků tmavého piva.

## 3.4. Příprava pracovních roztoků

### 3.4.1. Vnitřní standard 3-MCPD-d5

Navážka 0,00229 g 3-MCPD-d5 byla převedena do 25 ml odměrné baňky a doplněna po rysku deionizovanou vodou. Tento roztok byl následně naředěn dvakrát tak, aby výsledná koncentrace byla  $45,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ke každému měřenému vzorku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku.

### 3.4.2. Roztok kyseliny fenylborové (PBA)

Navážka 1 g kyseliny fenylborové byla rozpuštěna ve 4 ml směsi acetonu a vody (19:1, v/v).

### 3.4.3. Roztok standardu 3-MCPD

Navážka 0,02482 g 3-MCPD byla převedena do 25 ml odměrné baňky a doplněna po rysku 20% roztokem NaCl. Výsledná koncentrace tedy byla  $0,9928 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 3.4.4. Kalibrační roztoky 3-MCPD

Pracovní roztok standardu 3-MCPD byl dále použit pro přípravu kalibračních roztoků. Ředěním 20% roztokem NaCl do 25 ml odměrných baněk byly připraveny kalibrační standardy o koncentracích 0,005; 0,02; 0,1; 0,5; 1,5 a 3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Z takto připravených roztoků byly napipetovány 2 ml do 10 ml vialek, bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku vnitřního standardu a 0,4 ml roztoku derivatizačního činidla (PBA). Vialky byly uzavřeny septem a zahřívány v termobloku při 90 °C po dobu 20 minut. Po vychlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 2 ml hexanu a derivát 3-MCPD byl intenzivním třepáním extrahován. 1 ml hexanové fáze byl analyzován metodou GC/MS.

## 3.5. Příprava vzorků sladu

Vzorek sladu byl rozemlet na prášek a 5 g tohoto prášku bylo naváženo kádinky. Bylo přidáno 30 ml směsi hexan/aceton (1:1, v/v) a 50  $\mu\text{l}$  roztoku deuterovaného vnitřního standardu. Tato směs byla homogenizována po dobu 1 minuty tyčovým homogenizátorem a poté extrahována 20 minut na ultrazvuku. Kapalná fáze byla slita do centrifugačních zkumavek a pevný zbytek byl dvakrát promyt 10 ml směsi hexan/aceton. Spojené kapalné fáze byly centrifugovány po dobu 15 minut při 6500 ot/min. Supernatant byl přenesen do dělicí nálevky obsahující 10 ml vody. Po extrakci byla spodní vodná vrstva oddělena a organická vrstva byla opět extrahována 10 ml vody. Spojené vodné extrakty byly odpařeny na vakuové odparce při teplotě 55 °C do sucha. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn ve 2 ml 20% roztoku chloridu sodného. Roztok byl přenesen do 10 ml vialky, bylo přidáno 0,4 ml roztoku PBA a vialka byla uzavřena septem. Vzorek byl zahříván v termobloku při teplotě 90 °C po dobu 20 minut. Po vychlazení bylo přidáno 2 ml hexanu a derivát 3-MCPD byl třepáním extrahován do hexanu. Do vialky byl odebrán 1 ml hexanové fáze, vialka byla uzavřena septem a následovala analýza GC/MS.



### 3.6. Příprava vzorků piva

Vzorek piva byl odplyněn po dobu 20 minut v ultrazvukové lázni a po odplynění bylo 10 ml tohoto vzorku napipetováno do vialky o objemu 20 ml. Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku vnitřního standardu, 1 g chloridu sodného a 1 ml roztoku kyseliny fenylborové. Vialka byla uzavřena septem a zahřívána při teplotě 90 °C po dobu 20 min. Po zchladnutí na pokojovou teplotu byl do vialky přidán 1 ml hexanu a derivát 3-MCPD byl intenzivním třepáním extrahován do hexanu. Do mikrozkušavky Eppendorf byl odebrán 1 ml hexanové fáze a byl stočen po dobu 5 minut na centrifuze. Do vialky bylo odebráno 300  $\mu$ l hexanové fáze, vialka byla uzavřena septem a vzorek byl analyzován metodou GC/MS.

### 3.7. Podmínky metody GC/MS

Pro analýzu derivátu 3-MCPD ve vzorcích byl použit plynový chromatograf Trace GC Ultra Finnigan s hmotnostním detektorem Trace DSQ Thermo Finnigan. Pro separaci byla použita kapilární kolona SLB-5MS (délka kolony 60 m x vnitřní průměr 0,25 mm x tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m). Injektor byl udržován při teplotě 250 °C (splitless).

Kolona byla vyhřívána na teplotu 80 °C s výdrží 1 minutu, poté stoupala teplota s gradientem 10 °C za minutu až do 250 °C s výdrží 37 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium a průtok nosného plynu byl 1,5 ml za minutu. Objem nástřiku vzorku byl 1  $\mu$ l. Detekce byla provedena hmotnostním detektorem Trace DSQ Thermo Finnigan. Detektor měřil v SIM módu s pozitivní elektronovou ionizací (EI) při 70 eV. Sledovány byly specifické ionty m/z 91, 147, 196 (3-MCPD) a m/z 93, 150, 201 (3-MCPD-d5).

### 3.8. Validace metody

Validace slouží k ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. U stanovení 3-MCPD metodou GC/MS byly stanoveny tyto validační parametry: mez detekce, mez stanovitelnosti a kombinovaná standardní nejistota měření. [32]

#### 3.8.1. Mez detekce

Mez detekce metody (limit of detection – LOD) je definována jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno. LOD se stanovuje analýzou blanku za podmínek metody. Hodnota LOD pak odpovídá trojnásobku velikosti šumu. [32] [33]

#### 3.8.2. Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (limit of quantification – LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s přijatelnou úrovní nejistoty. Teoreticky lze přibližnou hodnotu LOQ vypočítat jako trojnásobek hodnoty LOD nebo může být zvolena jako dolní mez pracovního rozsahu metody. Experimentálně se LOQ stanovuje měřením 1 až 3 velmi naředitých vzorků a určením nejnižší hodnoty, při které je dosaženo požadované přesnosti. [34] [32]

### **3.8.3. Kombinovaná standardní nejistota měření**

Nejistota měření je parametr související s výsledkem měření, který charakterizuje rozptýl hodnot, které by bylo možno důvodně přiřadit měřené veličině (tímto parametrem může být např. směrodatná odchylka, její násobek nebo šířka intervalu spolehlivosti). Každý výsledek měření je ovlivněn řadou faktorů, může docházet k chybám v různých fázích analýzy. Nejběžnější zdroje nejistot jsou odběr vzorků, chyby přístrojů, čistota chemikálií, podmínky měření, efekt vzorku, výpočetní vlivy, kontaminace (ze vzorků, skla, prostředí), subjektivní chyba operátora a náhodné vlivy. [34]

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Validační parametry

Mez stanovení metody GC/MS byla stanovena na  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pro pevné vzorky a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  pro vzorky piva. Mez detekce pro pevné vzorky byla určena na  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a pro stanovení 3-MCPD v pivu na  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Kombinovaná standardní nejistota měření metody byla stanovena z opakovatelnosti, která byla vypočítána z 10 měření. Pro pevné vzorky tato nejistota byla 13 % a pro vzorky piva 18 %.

### 4.2. Optimalizace metody GC/MS

Při analýze vzorků metodou GC/MS je důležitý výběr vhodných podmínek stanovení tak, aby bylo dosaženo dobré reprodukovatelnosti, požadovaného rozlišení a zároveň aby nedocházelo ke koeluci s jiným analytem. Tvar píků by měl být gaussovský a nemělo by docházet např. k jejich chvostování nebo frontování.

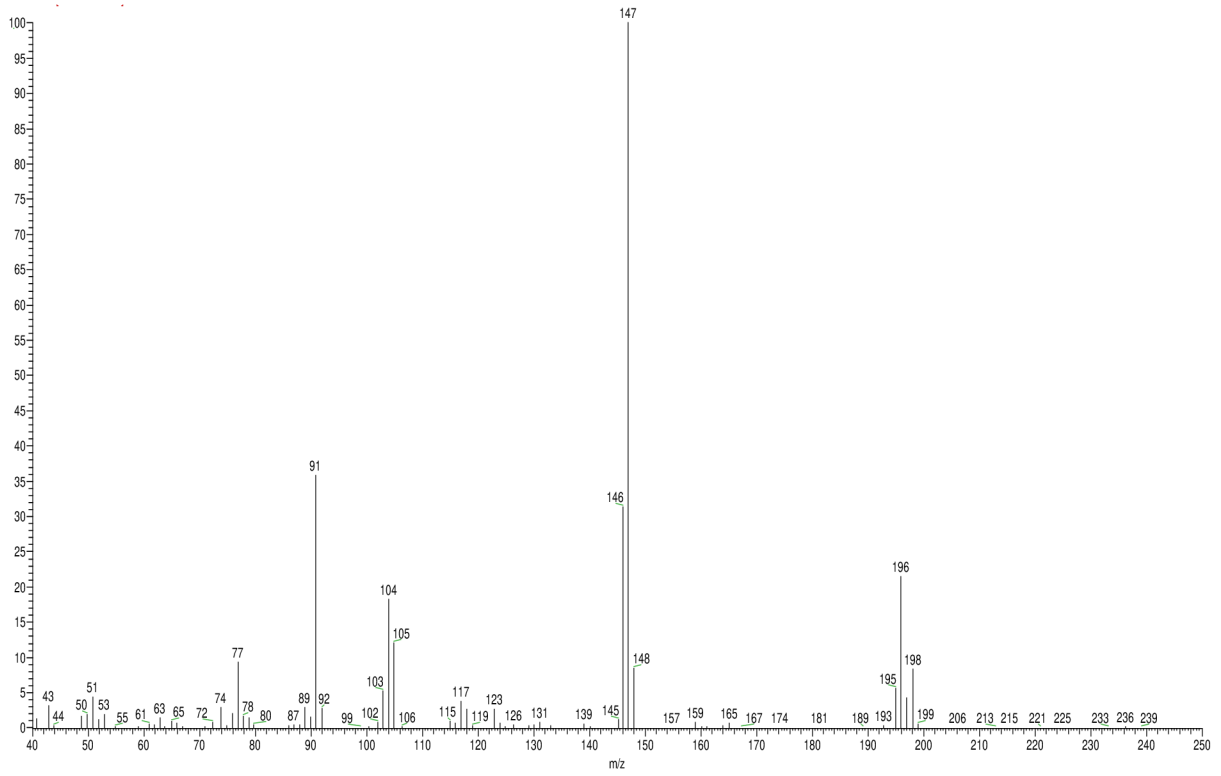
Základním parametrem byl výběr vhodné chromatografické kolony. Pro účely stanovení polárního 3-MCPD byla vybrána nepolární inertní kapilární kolona SLB-5MS (Supelco) vhodná pro MS detektor. Pro dosažení dobrého rozlišení separovaných zón je klíčové nastavení teplotního programu kolony. Nastavení teploty kolony závisí na bodu varu separovaných složek vzorku. Obecně lze optimálního rozlišení dosáhnout s minimální teplotou kolony, problémem je pak ale zvyšování retenčních časů složek [30]. Jako nejvhodnější teplotní program byl zvolen program s počáteční teplotou  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  s výdrží 1 minutu a konečnou teplotou  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  s výdrží 37 minut a s gradientem  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  za minutu.

Průtok nosného plynu byl optimalizován tak, aby docházelo co nejméně k rozšiřování zón. Průtok nosného plynu má také významný vliv na rychlost analýzy. Optimální průtok helia, který splňoval podmínku co nejmenšího rozšiřování zón a zároveň přijatelnou rychlost analýzy, byl  $1,5 \text{ ml/min}$ .

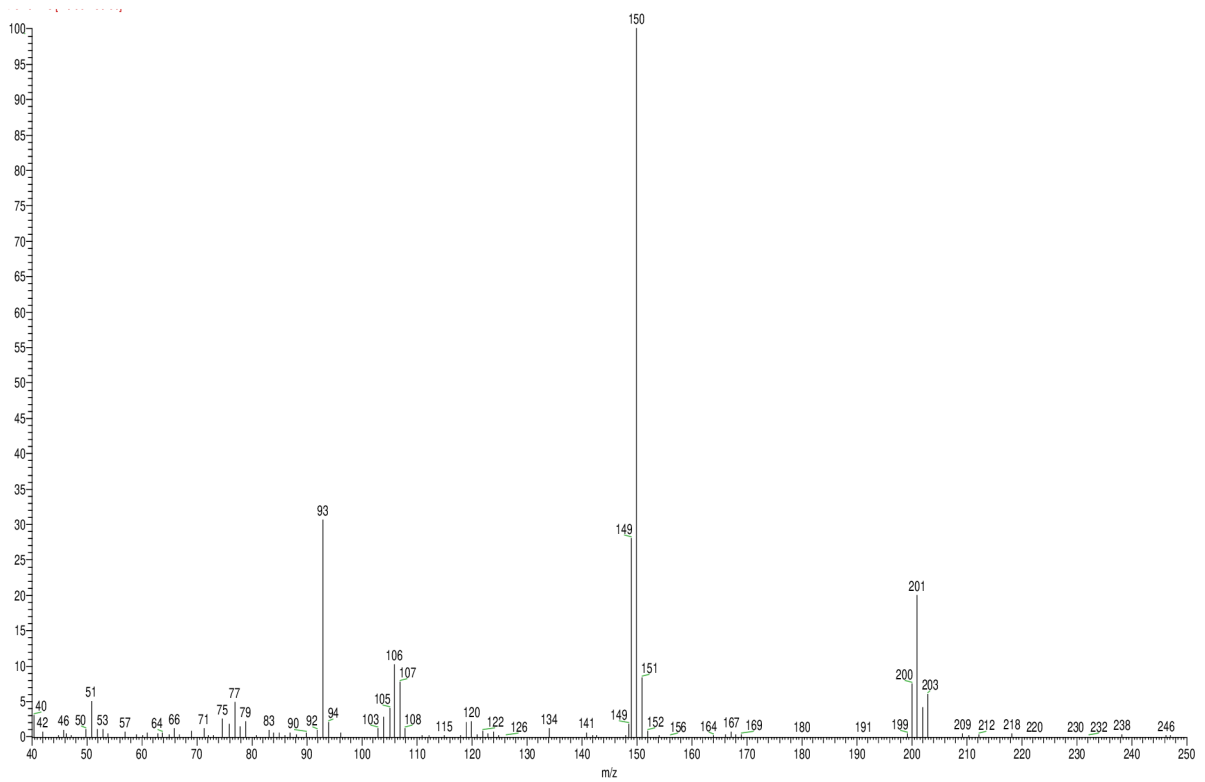
Dávkování vzorku bylo provedeno za použití splitless injektoru (dávkování bez děliče toku), neboť toto dávkování je vhodné při analýze zředěných vzorků a v případě přísných kvantitativních požadavků. [30]

### 4.3. Vyhodnocení obsahu 3-MCPD ve vzorcích

Pro vyhodnocení analýzy GC/MS byl proveden full-scan hmotnostního spektra derivátu 3-MCPD (obrázek 15) a derivátu deuterovaného 3-MCPD-d5 (obrázek 16). Pro kvantitativní analýzu pak byly sledovány charakteristické ionty o poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) 147 pro 3-MCPD a 150 pro deuterované 3-MCPD. Pro kvalitativní analýzu byly sledovány charakteristické ionty o  $m/z$  91 a 196 pro 3-MCPD a 93 a 201 pro 3-MCPD-d5.



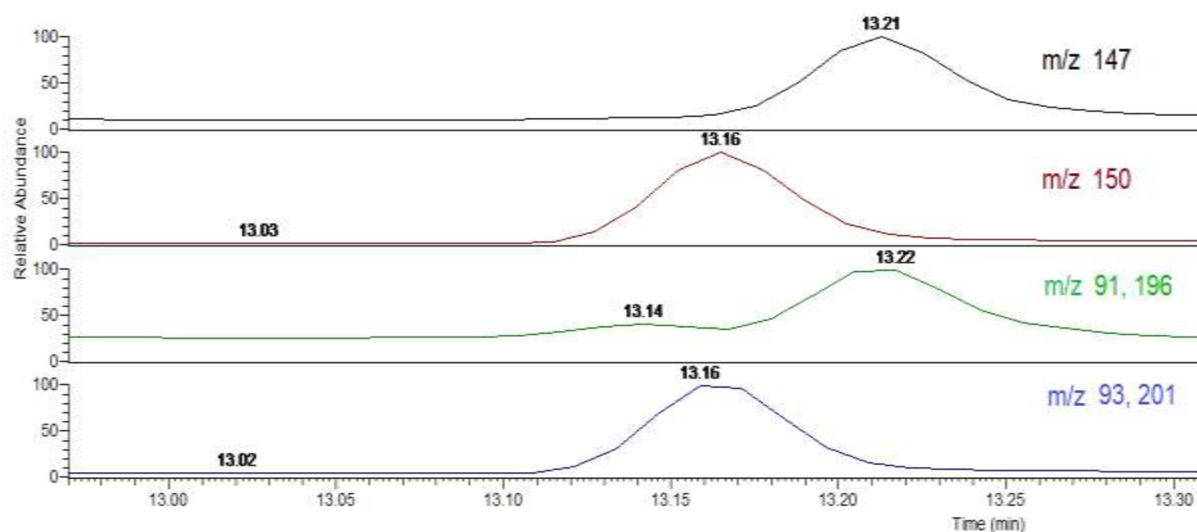
Obr. 15: Hmotnostní spektrum derivátu 3-MCPD



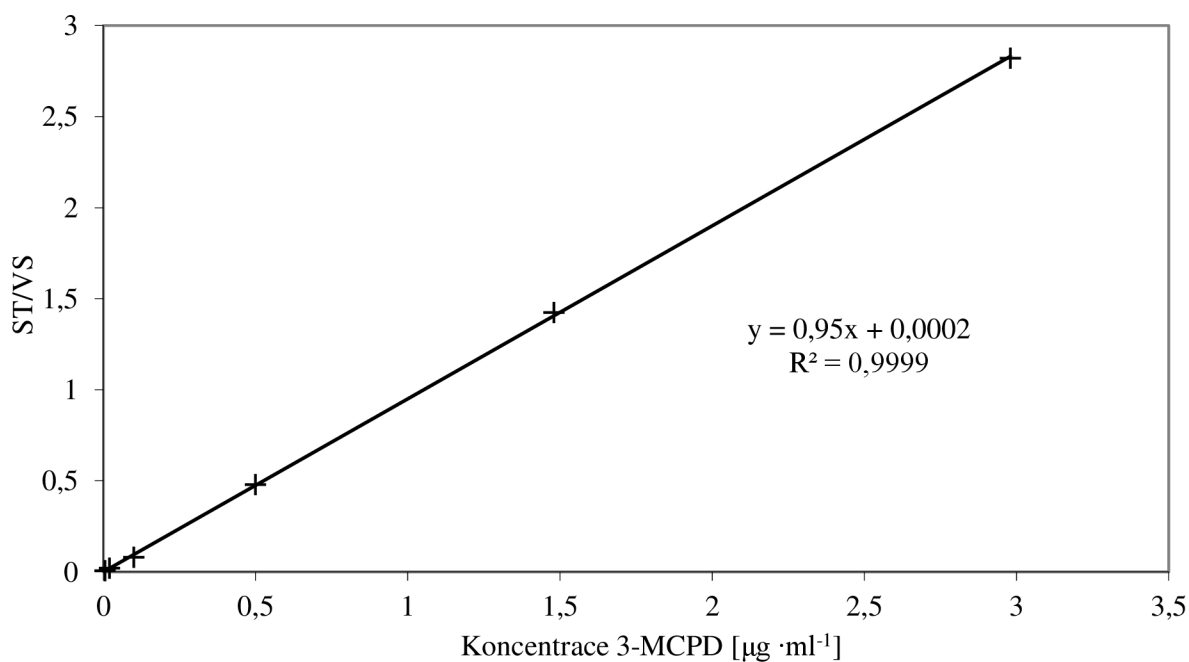
Obr. 16: Hmotnostní spektrum derivátu 3-MCPD-d5

Pro stanovení koncentrace 3-MCPD ve vzorcích byla použita metoda s izotopicky značeným vnitřním standardem. V získaných chromatogramech (viz obrázek 17) byly podle retenčních časů a odpovídajících charakteristických iontů nalezeny píky odpovídající 3-MCPD a 3-MCPD-d5 a pomocí programu byla zjištěna jejich plocha.

Z poměrů plochy píků standardu a vnitřního standardu a koncentrací standardů byla sestavena kalibrační křivka (obrázek 18). Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 0,005–2,98  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (to odpovídá 1–596  $\mu\text{g}$  3-MCPD na 1 kg vzorku) s koeficientem determinace 0,9999.



Obr. 17: Ukázka chromatogramu vzorku tmavého barvicího sladu



Obr. 18: Kalibrační křivka (závislost poměru plochy píku standardu a vnitřního standardu na koncentraci 3-MCPD)

Obsah 3-MCPD byl sledován ve 3 vzorcích zrna ječmene, 20 vzorcích sladů a 10 vzorcích piv. Konkrétně bylo analyzováno 5 světlých sladů plzeňského typu, 2 mnichovské slady, 1 žitný fermentovaný slad, 5 sladů pšeničných, 1 karamelový slad tmavý, 1 karamelový slad světlý a 5 tmavých sladů barvicích. Vzorky byly upraveny podle výše zmíněných postupů a analyzovány metodou GC/MS. Obsah 3-MCPD ve vzorcích byl vypočten z rovnice kalibrační křivky (viz Obr. 18). Každý vzorek byl měřen dvakrát a výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr těchto dvou měření.

Koncentrace 3-MCPD ve všech vzorcích zrna ječmene byla pod LOQ, což potvrzuje že samotné zrno ječmene jako surovina pro výrobu sladu 3-MCPD neobsahuje a kontaminant vzniká až při výrobě sladu. V plzeňských sladech se obsah 3-MCPD pohyboval od <LOQ do  $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ve sladech pšeničných <LOQ– $9,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , světlý i tmavý karamelový slad obsahovaly množství pod LOQ, v mnichovském sladu bylo naměřeno množství od <LOQ do  $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a největší množství obsahovaly tmavé barvicí slady  $8,8$ – $112,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Přehled výsledků je uveden v tabulce 4.

Z těchto výsledků je patrné, že vznik 3-MCPD ve sladu s největší pravděpodobností závisí na použité teplotě při hvozdní, neboť světlé slady, které se hvozdí při teplotách  $60$ – $85 \text{ }^\circ\text{C}$  obsahovaly pouze malé koncentrace 3-MCPD, zatímco slady barvicí, které se hvozdí při teplotách až  $225 \text{ }^\circ\text{C}$ , obsahovaly množství mnohonásobně vyšší.

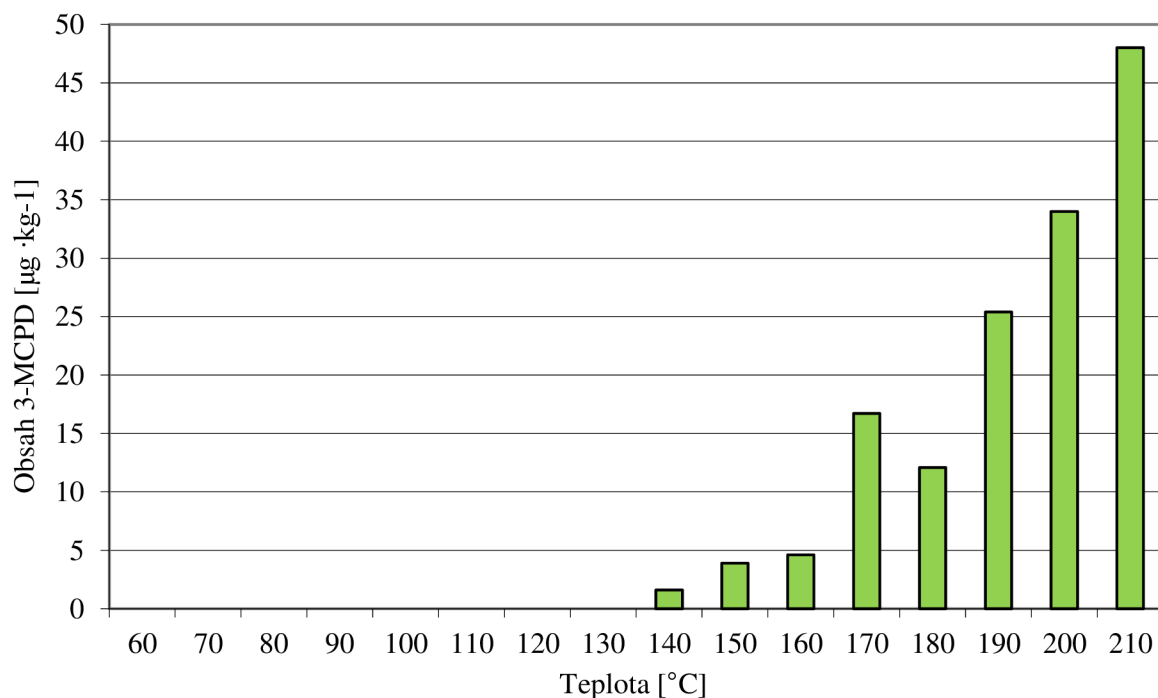
Výsledky korespondují s výsledky Divinové et al. [19], která ve své práci naměřila koncentrace 3-MCPD ve sladech  $<9,0$ – $45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a největší obsah 3-MCPD byl také zjištěn v tmavých sladech ( $16$ – $45 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Výsledky se výrazněji liší jen u dvou vzorků tmavých sladů. Dva vzorky měřené v této práci převyšovaly přibližně dvakrát obsah 3-MCPD ve srovnání s nejvyšším naměřeným obsahem Divinové et al., což může být způsobeno rozdílnými podmínkami při výrobě těchto speciálních sladů (např. použitím vyšších teplot při pražení).

Vyšší obsah 3-MCPD v tmavých sladech ve srovnání se světlými je i v dokumentu zveřejněném MAGB [18]. Na rozdíl od předchozí práce je zde ale obsah 3-MCPD v tmavých sladech o  $300$ – $1\ 400$  jednotkách EBC několikanásobně vyšší ( $50$ – $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Tento rozdíl může být opět způsoben rozdílnými podmínkami při výrobě sladů (např. se může lišit výroba klasického barvicího sladu a sladu čokoládového).

Pro ověření, že 3-MCPD skutečně vzniká během výroby sladu při hvozdní bylo 16 vzorků zeleného sladu podrobeno simulaci hvozdní v sušárně. Slady byly sušeny při teplotách od  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $210 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jak ukazuje obrázek 19, u vzorků sušených při teplotě  $60$  až  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  byly naměřeny hodnoty 3-MCPD pod LOQ, při těchto teplotách se tedy ještě 3-MCPD ve větší míře netvoří. Zlom pak pravděpodobně nastává při teplotách kolem  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při teplotě  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  byla naměřena koncentrace 3-MCPD  $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a při teplotě  $210 \text{ }^\circ\text{C}$  byla již koncentrace 3-MCPD  $48,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obsah 3-MCPD se tedy zvyšoval se zvyšující se teplotou použitou k sušení. Tento experiment potvrzuje, že 3-MCPD vzniká ve sladech během procesu hvozdní a vznik významného množství v ječných sladech je podmíněn použitím vysoké teploty při zpracování (nad  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Tabulka 4: Naměřený obsah 3-MCPD ve vzorcích sladu

Vzorek	Obsah 3-MCPD [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	Vzorek	Obsah 3-MCPD [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]
Zrna ječmene		Pšeničný slad	
1	<1,0	1	1,5
2	<1,0	2	9,0
3	<1,0	3	1,5
Plzeňský světlý slad		4	<1,0
1	2,3	5	<1,0
2	1,8	Tmavý karamelový slad	<1,0
3	2,2	Tmavý barvicí slad	
4	<1,0	1	55,1
5	<1,0	2	98,2
Mnichovský slad		3	8,8
1	1,5	4	112,0
2	<1,0	5	57,6
Světlý karamelový slad	<1,0	Žitný fermentovaný slad	<1,0



Obr. 19: Závislost vzniku 3-MCPD ve sladech na teplotě použité při hvozdění

Protože v některých sladech byla potvrzena přítomnost 3-MCPD, bylo nutné ověřit, zda bude tento kontaminant přítomen i v pivu. Pro tento účel byly analyzovány 2 vzorky světlého výčepního piva, 3 vzorky světlých ležáků a 5 vzorků tmavých piv. Z výsledků shrnutých v tabulce 5 je patrné, že v žádném analyzovaném pivu nebyla naměřena koncentrace piva nad LOQ.

Tabulka 5: Naměřený obsah 3-MCPD ve vzorcích piva

Vzorek piva	Obsah 3-MCPD	Vzorek piva	Obsah 3-MCPD
Světlá výčepní piva	<10,0	Tmavá piva	<10,0
1	<10,0	1	<10,0
2	<10,0	2	<10,0
Světlé ležáky	<10,0	3	<10,0
1	<10,0	4	<10,0
2	<10,0	5	<10,0
3	<10,0		

Z těchto výsledků vyplývá, že obsah 3-MCPD v pivu je zanedbatelný, neboť při vystírání se používá na 100 kg sypání 5 až 6 hl vody u světlých piv a 4 až 5 hl vody při přípravě piv tmavých a dochází tak k velkému naředění. Také barvicí slady, které obsahují největší koncentrace 3-MCPD, se používají ve velmi malém množství 1 až 2 % sypání [2].

Problematický by ovšem mohl být obsah tohoto kontaminantu v ostatních výrobcích ze sladu, u kterých nedochází k naředění vodou. Sušený ječný slad se například používá do výrobků vhodných pro diabetiky, vyrábějí se z něj tyčinky nebo sladké pomazánky. Populární jsou také sladové sirupy (sladěnka, sladovit) s nízkým glykemickým indexem. Slad může být přísadou i v pečivu nebo cukrovinkách. Všechny tyto výrobky by mohly obsahovat 3-MCPD a jejich bezpečnost z tohoto hlediska by měla být sledována.



## 5. ZÁVĚR

V této práci byl sledován obsah 3-MCPD ve vzorcích zrna ječmene, sladu a piva metodou GC/MS. 3-MCPD ve vzorcích byl derivatizován pomocí PBA, derivát byl extrahován do hexanu a analyzován. Jako vnitřní standard bylo použito deuterované 3-MCPD. Mez stanovení metody pro vzorky ječmene a sladu byla  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a pro vzorky piva  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Standardní kombinovaná nejistota měření byla 13 % pro ječmen a slad a 18 % pro pivo.

Pro vyhodnocení obsahu 3-MCPD byly sledovány ionty o  $m/z$  147 pro 3-MCPD a 150 pro 3-MCPD-d5 (kvantitativní analýza) a ionty o  $m/z$  91 a 196 pro 3-MCPD a 93 a 201 pro 3-MCPD-d5 (kvalitativní analýza). Kvalitativní charakteristikou byl také retenční čas a kvantitativní poměr odezvy. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí  $0,005\text{--}2,98 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , což odpovídalo  $1\text{--}596 \mu\text{g}$  3-MCPD na 1 kg vzorku ( $R^2 = 0,9999$ ).

Ve vzorcích zrna ječmene byl zjištěn obsah 3-MCPD pod LOQ. Ve vzorcích sladů byla naměřena koncentrace v rozmezí  $<\text{LOQ}\text{--}112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvyšší obsah 3-MCPD byl přítomen ve vzorcích speciálních tmavých sladů, které se používají k dobarvení piva ( $8,8\text{--}112 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ve všech analyzovaných vzorcích piv byla koncentrace 3-MCPD pod LOQ. Bylo tedy prokázáno, že zrno ječmene jako výchozí surovina pro výrobu sladu kontaminant neobsahuje a 3-MCPD vzniká až při výrobě sladu, konkrétně při hvozdění. Čím vyšší je použitá teplota hvozdění, tím větší koncentrace 3-MCPD je přítomna v hotovém sladu. Při laboratorním experimentu s hvozděním zeleného sladu se 3-MCPD začal ve větší míře tvořit při teplotách nad  $140^\circ\text{C}$ .

Při výrobě piva nicméně dochází k několikanásobnému naředění sladu vodou a z hlediska obsahu 3-MCPD je tedy konzumace piva bezpečná a neměl by být přesáhnut tolerovatelný denní příjem stanovený EFSA, který je  $2 \mu\text{g}$  3-MCPD na kg tělesné váhy. Není v tomto případě potřeba ani žádných úprav technologických postupů při výrobě sladu ani piva.

## 6. POUŽITÉ ZKRATKY

1,3-DCP – 1,3-dichlor-2-propanol

2-MCP – 2-chlor-1,3-propandiol

2,3-DCP – 2,3-dichlor-1-propanol

3-MCPD – 3-chlorpropan-1,2-diol

GC – plynová chromatografie

GC/ECD – plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu

GC/MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

HFBA – kyselina heptafluoromáselná

HFBI – heptafluorobutyrylimidazol

KHB – kyselé hydrolyzáty bílkovin

LOD – mez detekce metody

LOQ – mez stanovení metody

MIP – molekulárně vtištěný polymer

MS – hmotnostní spektrometrie

PBA – kyselina fenyloborová

TSIM – 1-trimethylsilylimidazol

## 7. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] KOCOUREK, Vladimír a Jana HAJŠLOVÁ. *Přehled aktuálních problémů v oblasti chemické bezpečnosti potravin*. Praha: Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí, 2007.
- [2] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [3] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Vyd. 1. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.
- [4] BASAŘOVÁ, Gabriela a Jaroslav ČEPIČKA. *Sladařství a pivovarnictví*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985.
- [5] KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000. ISBN 80-902-6586-3.
- [6] Odstavec předpisu Vyhlášky Ministerstva zemědělství č.335/1997 Sb.: Fyzikální a chemické požadavky na jakost piva. In: *EAGRI* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, © 2009-2018 [cit. 2018-04-07]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100055967.html>
- [7] PATOČKA, Jiří a Šárka ANDĚLOVÁ. Zdravotní rizika chloropropanolů v potravinách. *KONTAKT: Časopis pro ošetrovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2012, **14**(2), 185-199. ISSN 1212-4117.
- [8] *Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water*. Lyon: IARC Press, 2013. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 101. ISBN 978-928-3213-246.
- [9] LEE, Bai a Sook KHOR. 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Soy Sauce: A Review on the Formation, Reduction, and Detection of This Potential Carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015, **14**(1), 48-66. ISSN 15414337.
- [10] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [11] EL RAMY, R., M. OULD ELHKIM, S. LEZMI a J.M. POUL. Evaluation of the genotoxic potential of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and its metabolites, glycidol and  $\beta$ -chlorolactic acid, using the single cell gel/comet assay. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, **45**(1), 41-48. ISSN 02786915.
- [12] HAMLET, C., P. SADD, C. CREWS, J. VELÍŠEK a D. BAXTER. Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Additives and Contaminants*. 2002, **19**(7), 619-631.

- [13] Revised safe intake for 3-MCPD in vegetable oils and food. *European Food Safety Authority* [online]. Parma: EFSA, 2018 [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180110>
- [14] ZELINKOVÁ, Z., B. SVEJKOVSKÁ, J. VELÍŠEK a M. DOLEŽAL. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*. 2006, **23**(12), 1290-1298.
- [15] JęDRKIEWICZ, Renata, Magdalena KUPSKA, Agnieszka GŁOWACZ, Justyna GROMADZKA a Jacek NAMIEŚNIK. 3-MCPD: A Worldwide Problem of Food Chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, **56**(14), 2268-2277. ISSN 1040-8398.
- [16] KARŠULÍNOVÁ, Lenka, Blanka FOLPRECHTOVÁ, Marek DOLEŽAL, Jana DOSTÁLOVÁ a Jan VELÍŠEK. Analysis of the Lipid Fractions of Coffee Creamers, Cream Aerosols, and Bouillon Cubes for Their Health Risk Associated Constituents. *Czech J. Food Sci.* 2007, **25**(5), 257-264.
- [17] BAER, Ines, Beatriz DE LA CALLE a Philip TAYLOR. 3-MCPD in food other than soy sauce or hydrolysed vegetable protein (HVP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **396**(1), 443-456. ISSN 1618-2642.
- [18] *The MAGB HACCP protocol for malting*. Version 4. Maltsters Association of Great Britain, 2013. Dostupné také z: <http://www.ukmalt.com/>
- [19] DIVINOVÁ, Veronika, Marek DOLEŽAL a Jan VELÍŠEK. Free and Bound 3-Chloropropane-1,2-diol in Coffee Surrogates and Malts. *Czech Journal of Food Sciences*. 2007, **25**(1), 39-47.
- [20] DIVINOVÁ, V., B. SVEJKOVSKÁ, O. NOVOTNÝ a J. VELÍŠEK. Survey of 3-chloropropane-1,2-diol and its precursors in foods in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*. 2004, **22**(-), 267-271.
- [21] DIVINOVÁ, Veronika, Blanka SVEJKOVSKÁ, Marek DOLEŽAL a Jan VELÍŠEK. Determination of Free and Bound 3-Chloropropane-1,2-diol by Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection using Deuterated 3-Chloropropane-1,2-diol as Internal Standard. *Czech Journal of Food Sciences*. 2004, **22**(5), 182-189.
- [22] RÉTHO, C. a F. BLANCHARD. Determination of 3-chloropropane-1,2-diol as its 1,3-dioxolane derivative at the  $\mu\text{g kg}^{-1}$  level: Application to a wide range of foods. *Food Additives & Contaminants*. 2005, **22**(12), 1189-1197.
- [23] ERMACORA, Alessia a Karel HRNCIRIK. Evaluation of an Improved Indirect Method for the Analysis of 3-MCPD Esters Based on Acid Transesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012, **89**(2), 211-217.
- [24] JIAO, Bo, Hui HU, Aimin SHI, Hongzhi LIU, Li LIU, Qiang WANG, Wusheng FU a Benu ADHIKARI. An improved method for the measurement of 3-monochloropropanediol esters by matrix solid-phase dispersion supported liquid-liquid extraction. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017, **52**(11), 2404-2411. ISSN 09505423.
- [25] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.

- [26] HOLZBECHER, Závaš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. První. Praha: SNTL, 1987.
- [27] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [28] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří ŠEVČÍK. *Analyza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [29] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. 1. vydání. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [30] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie 2*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [31] Schematic Diagram of a typical GC-MS system. In: *CHROMacademy* [online]. Duluth (Minnesota): Glen Murry, 2010 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: [http://www.chromacademy.com/resolvernovember2010\\_understanding\\_gcms\\_part\\_1.html](http://www.chromacademy.com/resolvernovember2010_understanding_gcms_part_1.html)
- [32] FRIEDECKÝ, Bedřich, Luděk ŠPRONGL a Josef KRATOCHVÍLA. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. In: *Česká společnost klinické biochemie* [online]. Praha: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2010 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/doporučení/valid/Validace\\_2010.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporučení/valid/Validace_2010.pdf)
- [33] BAREK, Jiří. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, **94**(7), 439-444.
- [34] BARWICK, Vicki a David MILDE, Zbyněk PLZÁK. *Kvalimetrie: Průvodce kvalitou v analytické chemii*. Druhé české přepracované vydání. Praha: Eurachem, 2017. ISBN 978-80-86322-10-0.
- [35] In: *Katalog plodin* [online]. EpaX, 2018 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://krv.agrobiologie.cz/atlas/katalog/plodiny>
- [36] Druhy sladů. In: *Sladovny Soufflet ČR* [online]. Prostějov: SLADOVNY SOUFFLET ČR, a. s., b.r. [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: <http://www.slad.cz/slady.php>