



Gıdalarda Bulunan 3-Monokloropropan-1,2-diol ve Glisidil Esterlerinin Analiz Yöntemleri, Azaltılmalarına Yönelik Çalışmalar ve Sağlık Üzerine Etkilerine İlişkin Güncel Gelişmeler

Aslı Yıldırım, Aslı Yorulmaz*

Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 09100 Aydın, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Derleme Makale

Geliş 17 Şubat 2017
Kabul 13 Ekim 2017

Anahtar Kelimeler:
3-monokloropropan-1,2-diol
Glisidil esterleri
Glisidol
Kloropropanol
Analiz

*Sorumlu Yazar:
E-mail: asliyorulmaz@adu.edu.tr

ÖZET

Kloropropanoller, çeşitli gıdaların işlenmesi sırasında açığa çıkan istenmeyen gıda bulaşanları olarak bilinmektedir. Kloropropanoller sınıfında yer alan özellikle 3-monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD), 2-monokloropropan-1,3-diol (2-MCPD) ve glisidoller ile bunların esterlerinin sağlık üzerine olan olumsuz etkilerinin anlaşılmasından sonra bu bileşiklerin gıdalarda tespiti ve azaltılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kloropropanoller sınıfından, gıdalarda miktarı diğerlerine göre daha yüksek olan 3-MCPD, genel olarak bitkisel yağlarının rafinasyon işlemlerinden özellikle deodorizasyon sırasında meydana gelmektedir. 3-MCPD ve diğer kloropropanollerin tespit edilmesine yönelik analiz metotları sürekli olarak güncellenmektedir. Ancak günümüzde temel olarak direkt ve indirekt analiz metotları olarak 2 temel grup bulunmaktadır. Direkt analiz metotları her bir ester için ayrı ayrı tanımlanmasına imkân verse de çok fazla standart madde kullanımı gerektirdiğinden günümüzde indirekt analiz metotları daha geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Kloropropanollerin gıdalardaki miktarını azaltmanın ilk adımı doğru analiz yönteminin seçilmesidir. Bu derlemede gıdalarda yüksek miktarda bulunan çeşitli kloropropanoller ile ilgili genel bilgiler, analiz yöntemleri, miktarlarını azaltmaya yönelik çalışmalar, bu bileşiklere ilişkin toksikolojik veriler ve güncel gelişmeler hakkında bilgi verilmiştir.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 5(12): 1497-1507, 2017

The Analysis Methods Of 3-Monochloropropane-1,2-Diol and Glycidyl Esters in Foods, Mitigation Studies, and Current Developments About their Effects on Health

ARTICLE INFO

Review Article

Received 17 February 2017
Accepted 13 October 2017

Keywords:
3-monochloropropane-1,2-diol
Glycidyl esters
Glycidol
Chloropropanol
Analysis

*Corresponding Author:
E-mail: asliyorulmaz@adu.edu.tr

ABSTRACT

Chloropropanols are known as undesired food contaminants liberated during the processing of various food products. When the adverse effects of chloropropanols, especially 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD), 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD) and glycidols along with their esters were first understood, the studies about the detection and mitigation of these compounds were accelerated. 3-MCPD, which was detected in food products in higher amounts when compared to other chloropropanols, usually occurs during refining process of vegetable oils, especially in deodorisation step. The novel methods in terms of the analysis of 3-MCPD and other chloropropanols are continuously updated. However, there are two basic methods today namely direct and indirect methods. Direct methods enable to detect all of the esters individually, yet, due to the necessity of a huge number of reference standards, indirect methods are currently more preferred. The first essential step of reducing chloropropanols in food products is to determine the proper analysis method. In this review, general information, new developments in analysis methods, mitigation studies and the toxicological data about various chloropropanols were summarized.

DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i12.1497-1507.1192>

Giriş

3-monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD), 3-karbon iskeletinden oluşan yapılarında bir veya iki atomun klor atomu ile yer değiştirmesi sonucu oluşan, temel olarak 3-monokloropropan-1,2-diol (3-MCPD), 2-monokloropropan-1,3-diol (2-MCPD), 3-monokloropropan-1-ol, 1,3-dikloropropan-2-ol (1,3-DCP) ve 2,3-dikloropropan-1-ol (2,3-DCP) isimli 5 farklı bileşiğe sahip olan kloropropanoller (Şekil 1) sınıfına dahil olan kimyasal bir bileşiktir (Lee ve Khor, 2015; Stadler, 2015). 3-MCPD ayrıca, non-genotoksik olarak bilinen karsinojen bir bileşiktir ve yapısında 2 adet fonksiyonel alkol grubu ve klor içermekte olup bağıl molekül ağırlığı 110,54 g/mol'dür. Molekül formülü ise $C_3H_7ClO_2$ 'dir (Lee ve Khor, 2015).

3-MCPD, ilk kez 1978 yılında Velíšek ve ark. tarafından gıdalarda lezzet artırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesi olan asit ile hidroliz edilmiş bitkisel proteinlerde (HVP) tespit edilmiştir (Rahn ve Yaylayan, 2011). Daha sonraki yıllarda ise ısıl işlem görmüş ekmek kabuğu, tost ve bisküvi gibi tahıl bazlı ürünler (Hamlet ve Sadd, 2004; Breitling-Utzmann ve ark., 2003), kahve (Doležal ve ark., 2005), malt kaynaklı ürünler (Hamlet ve Sadd, 2004), kızartılmış peynirler (Crews ve ark., 2001) ve tütülenmiş bazı gıdalarda (Kuntzer ve Weißhaar, 2006) da 3-MCPD'ye rastlanılmıştır (Weißhaar, 2011). Bazı gıda maddelerinde tespit edilen 3-MCPD miktarları Tablo 1'de gösterilmiştir.

3-MCPD'nin karakteristik özellikleri sıvı ve renksiz bir bileşik olmasına rağmen renginin açık sarıya dönme eğilimi göstermesidir. Ayrıca 3-MCPD su, alkol, dietil eter ve asetonla çözünebilmektedir (Lee ve Khor, 2015; IARC, 2013). Endüstriyel olarak 3-MCPD, dinamitin donma noktasını düşürme amaçlı olarak, boya ara maddesi olarak, kemirgenlere karşı kemosterilant olarak ve selüloz asetatın çözücüsü olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde ise 3-MCPD asit ile hidroliz edilmiş bitkisel proteinlerin yan ürünü olarak açığa çıkmaktadır. Bitkisel proteinlerin asitle hidrolizi, fermantasyon işlemi olmadan kısa sürede yapay soya sosu üretmek için uygulanmaktadır (Lee ve Khor, 2015).

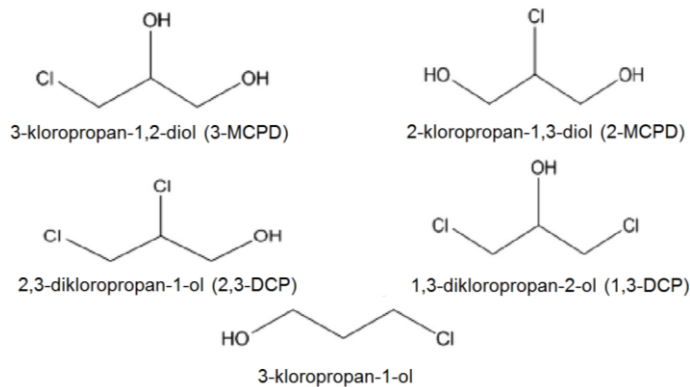
3-MCPD ve diğer kloropropanol esterleri miktarının gıdalarda serbest kloropropanol miktarından genel olarak 5-396 kat daha fazla olduğunun anlaşılmasından sonra, bu esterlerin tespitine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Rahn ve Yaylayan, 2011; Zelinková ve ark., 2009; Divinová ve ark., 2007; Karsulinova ve ark., 2007;

Zelinková ve ark., 2006; Doležal ve ark., 2005; Svejková ve ark., 2004). Farklı araştırmalarda 3-MCPD'nin gıdalarda sadece serbest formda değil, yağ asitlerinin mono- ve di- esterleri şeklinde bağlı formda da bulunabildiği tespit edilmiştir (Karl ve ark., 2016; IARC, 2013; Seefeldter ve ark., 2008). Kloropropanol esterleri ısı, asit veya mikrobiyal ve intestinal lipazlar yardımıyla hidroliz edilerek (Seefeldter ve ark., 2008; Hamlet ve ark., 2004; Myher ve ark., 1986) serbest formdaki kloropropanollere dönüştürülebilmektedir (Rahn ve Yaylayan, 2011). Ancak çeşitli kloropropanol esterlerinin tamamıyla serbest forma dönüştürülmesi bazı gıdalarda ek 3-MCPD kaynağı oluşturabilmektedir. Bu durum ise Avrupa Komisyonu tarafından belirlenen ve hidroliz edilmiş bitkisel proteinler ve soya sosu için 20 µg/kg olan üst limiti aşma potansiyeli taşımaktadır (Rahn ve Yaylayan, 2011; Svejková ve ark., 2004). Kloropropanol esterlerinin, proses sırasında üretilen kontaminantlar olmakla birlikte, diyetle tüketilen kaynaklara bağlı olarak memeli sütünde de ortaya çıkabildikleri bilinmektedir (Rahn ve Yaylayan, 2011; Zelinková ve ark., 2008; Myher ve ark., 1986; Kuksis ve ark., 1986).

3-MCPD esterlerine benzer şekilde glisidil esterleri epoksi halka yapısına sahip olmalarından dolayı sağlık için yüksek oranda risklidirler. Glisidol yapısının genotoksik ve karsinojen olduğu bilinmektedir. 2000 yılında ise glisidol, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer) tarafından karsinojenik bir bileşik olarak sınıflandırılmıştır (Pudel ve ark., 2011). Bu derlemede çeşitli gıdaların işlenmesi esnasında ortaya çıkan 3-MCPD ve glisidil esterlerinin analiz yöntemleri, miktarlarını azaltmaya yönelik çalışmalar ve bu bileşiklerin sağlık üzerine olası etkileri ile ilgili bilgi verilmektedir.

Analiz Yöntemleri

Yapılan araştırmaların 3-MCPD ve glisidil esterlerinin sağlık üzerine potansiyel olarak riskli olabileceklerinin anlaşılmasından sonra (Bakhiya ve ark., 2011), bu bileşiklerin kantitatif olarak belirlenmesine yönelik yeni metodların geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Miyazaki ve Koyama, 2016; Crews ve ark., 2013; Ermacora ve Hrnčirik, 2013; Kuhlmann, 2011).



Şekil 1 Kloropropanollerin sınıflandırılması ve kimyasal yapıları (Lee ve Khor, 2015)

Tablo 1 Farklı gıdalarda tespit edilen 3-MCPD esterleri

Gıda maddesi	3-MCPD miktarı (mg/kg)	Referans
Tahıl ürünleri	< 0,010 – 0,134	MacMahon ve ark., 2013b
Salam	< 0,010 – 0,069	MacMahon ve ark., 2013b
Jambon	< 0,010	MacMahon ve ark., 2013b
Kürlenmiş balık	< 0,010 – 0,081	MacMahon ve ark., 2013b
Süt ürünleri (peynir ve krema)	< 0,010 – 0,031	MacMahon ve ark., 2013b
Çorba ve soslar	< 0,010	MacMahon ve ark., 2013b
Pizza	< 0,010 – 0,016	MacMahon ve ark., 2013b
Çay	< 0,010 – 0,016	MacMahon ve ark., 2013b
Şekerlemeler	< 0,010 – 0,016	MacMahon ve ark., 2013b
Maltlı içecekler	< 0,010 – 0,016	MacMahon ve ark., 2013b
Baharatlı krakerler	0,014	Jędrkiewicz ve ark., 2016b
Ekmek içi	0,030	Jędrkiewicz ve ark., 2016b
Kızartılmış dana etli sandviç	0,008 – 0,009	Zelinková ve ark. 2006
Bulyon	< 0,005	Zelinková ve ark. 2006
Piştirilmiş parmesan peyniri	0,068 – 0,117	Zelinková ve ark. 2006
Piştirilmiş mozzarella peyniri	0,005 – 0,079	Zelinková ve ark. 2006
Kahve kreması	0,130 – 0,730	Karsulinova ve ark., 2007
Sprey krema	0,050 – 0,730	Karsulinova ve ark., 2007
Patates kızartması	0,100 – 0,258	Zelinková ve ark. 2009
Patates cipsi	0,229 – 1,000	Zelinková ve ark. 2009
Margarin	0,164 – 0,441	Becalski ve ark. 2015
Tatlı bisküviler	0,017	Sadowska-Rociek ve Ciešlik, 2016
Tuzlu krakerler	0,025	Sadowska-Rociek ve Ciešlik, 2016

Kloropropanollerin analizi ile ilgili olarak, model sistemlerden ve gıda lipidlerinden esterlerin ayrıştırılması için geliştirilen ilk metotta yağ bileşenlerinin, özellikle açilgliserollerin ayrımı klasik olarak ince tabaka kromatografisiyle (İTK) gerçekleştirilmiştir (Crews ve ark., 2013; Davidek ve ark., 1980; Velisek ve ark., 1979). Bu metotta kloropropanol esterleri, ince tabakadan solvent yardımıyla ekstrakte edilmiş ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir (Crews ve ark., 2013). Gardner ve ark. (1983) tarafından İspanya'da tüketilen bazı yağlı yapılmış yemeklik yağlarda 3-MCPD esterlerinin varlığı, ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılan metotlarda silika kolon kullanılarak tespit edilmiş, esterler ise GC-MS yardımıyla kantitatif olarak belirlenmiştir. Cerbulis ve ark. (1984) tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde, İTK/silika kolon kromatografisi clean-up tekniği kullanılarak keçi sütünde bulunan 3-MCPD esterlerinin miktarı tespit edilmiştir. Çalışmada, asit-katalizli transesterifikasyon ile yağ asidi metil esterleri ve serbest 3-MCPD oluşumu sağlanmış ve sonrasında GC-MS ile analiz gerçekleştirilmiştir (Crews ve ark., 2013).

Esterlerin hidrolizine dayalı metotlar daha çok 2004 yılında ön plana çıkmıştır (Crews ve ark., 2013). Divinová ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, asit-katalizli transesterifikasyon kullanılarak gıdaların yağ ekstraktlarında bulunan serbest 3-MCPD açığa çıkarılmış ve fenilboronik asit (PBA) ile türevlendirme yapılarak toplam ve serbest 3-MCPD miktarları GC-MS ile tespit edilmiştir. Bağlı olan 3-MCPD miktarı ise toplam miktar ile serbest miktar arasındaki fark hesaplanarak bulunmuştur (Crews ve ark., 2013).

Hamlet ve Sadd (2004) ise tahıl ürünlerinin yağ ekstraktlarında bulunan bağlı formdaki 3-MCPD'den serbest formdaki 3-MCPD'yi oluşturmak için enzimatik

hidroliz gerçekleştirmiş ve heptaflorobütirilimidazol ile türevlendirme işleminden sonra hem örnekteki hem de hidroliz edilmiş yağdaki 3-MCPD miktarı gaz kromatografisi-kütle dedektöründe tayin edilmiştir (Crews ve ark., 2013).

Asit-katalizli transesterifikasyon sırasında ek 3-MCPD oluşma ihtimalinden dolayı, sodyum metoksit kullanılarak bazik-transesterifikasyon temeline dayanan yeni bir metot geliştirilmiştir (Crews ve ark., 2013; Weißhaar, 2008). Bu metot ise daha ileriki çalışmalarda, bazik koşullarda 3-MCPD'nin degradasyonunu engellemek için ve prosedürün bir parçası olan sodyum klorür ilavesinden sonra 3-MCPD oluşum problemi engellemek için bazı modifikasyonlara uğratılmıştır. Baz-katalizli transesterifikasyon, Alman Yağ Bilimcileri Topluluğu (DGF-Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft) ve Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (AOCS) tarafından da resmi analiz metodu olarak kabul edilmiştir (Crews ve ark., 2013).

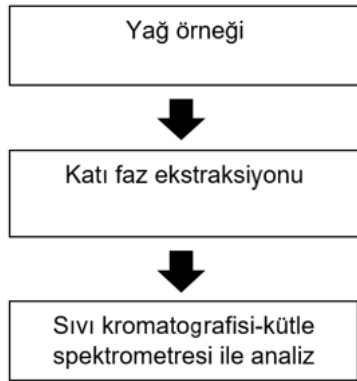
Kloropropanol esterlerini analiz etmeye yönelik farklı analitik prosedürler güncellenerek geliştirilmeye devam edilmektedir (Crews ve ark., 2013; Jira, 2010; Divinová ve ark., 2004). Günümüzde çeşitli gıdalarda 3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve glisidil esterlerini analiz etmeye yönelik metotlar direkt ve indirekt analiz metotları olarak 2 temel başlık altında toplanmıştır (Koyama ve ark., 2016; Crews ve ark., 2013).

Direkt Analiz Metotları

Direkt analiz metotları temel olarak, ester kompozisyonu hakkında detaylı bilgi sağlamaları yönünden avantajlı olarak görülmektedir. Ancak her bir ester kantitatif olarak belirlenmesi çok fazla referans standart gerektirdiğinden bu metotların kullanımını sınırlandırmaktadır (Karl ve ark., 2016).

3-MCPD esterleri, 2-MCPD esterleri ve glisidil esterlerini direkt olarak analiz etmeye dayalı metotlarda temel olarak örnek maddesi katı-faz ekstraksiyonu ile saflaştırılır ve daha sonra esterler ayrı ayrı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (ör: LC-MS, LC-MS/MS, LC-TOFMS) ile kantitatif olarak analiz edilir (Şekil 2) (Jeđrkiewicz ve ark., 2016a; Koyama ve ark., 2016). Direkt analiz metotlarında her bir yağ asidi esterleri, mono- ve di- esterler de dahil olmak üzere tek tek analiz edilmektedir (Jeđrkiewicz ve ark., 2016a). Shiro ve ark. tarafından geliştirilen bir direkt analiz metodu, Japon Yağ Kimyacıları Derneği (JOCS) ve Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (AOCS) ile ortak yürütölen bir çalışma sonucu valide edilmiş ve glisidil esterlerini direkt olarak belirlemeye yönelik AOCS Resmi Metodu (Cd 28 10) (Miyazaki ve Koyama, 2016) ve JOCS Standart Metodu (JOCS Standard Method for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials 2.4.13-2013) (Koyama ve ark., 2016) olarak kayıt altına alınmıştır.

3-MCPD esterlerini direkt olarak belirlemeye yönelik farklı metotlar Yamazaki ve ark. (2013) ve Hori ve ark. (2012a, 2012b), Haines ve ark. (2011) ve MacMahon ve ark. (2013a, 2013b) tarafından da bildirilmiştir. 3-MCPD, farklı yağ asitleriyle mono- ve di- esterler oluşturabildiği için direkt metotlarda çok fazla standart madde kullanılması ve örnek saflaştırmada farklı prosedürler uygulanması gerekliliği bu metotların uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Direkt metotlar genel olarak, her bir bileşimin ayrı ayrı toksikolojik olarak değerlendirilmesi ve her bir bileşimin oluşum mekanizmasının tespitinde daha uygun olarak görölmektedir (Koyama ve ark., 2016). Bu nedenle lipit örneklerinde bulunan 3-MCPD esterlerini indirekt olarak belirleme metotları pratikte daha fazla uygulama alanı bulmaktadır (Jeđrkiewicz ve ark., 2016a).



Şekil 2 3-MCPD'lerin direkt analiz metotlarında izlenen adımlar (Pudel ve ark., 2016; León ve ark., 2008).

İndirekt Analiz Metotları

İndirekt analiz metotlarında, 3-MCPD esterleri ile 2-MCPD esterlerinin hidrolizi sonucu açığa çıkan 3-MCPD ve 2-MCPD miktarları ile glisidil esterlerinin hidrolizi ve brominasyonu sonucu açığa çıkan 3-bromo-1,2-propanediol (3-MBPD) miktarı kantitatif olarak analiz edilmektedir. Örnekler fenilboronik asit (PBA) ile türevlendirildikten sonra 3-MCPD, 2-MCPD ve 3-MBPD miktarları GC-MS kullanılarak belirlenmektedir (Miyazaki ve Koyama, 2016). Yani indirekt analiz metotlarında temel olarak esterler hidroliz edilmekte ve ortaya çıkan gliserol iskeleti gaz kromatografisi-kütle

spektrometresi ile analiz edilmektedir (Koyama ve ark., 2016). İndirekt tespit yöntemleri, direkt tespit metotlarına göre uygulama kolaylığı nedeniyle rutin analizler ve kalite kontrolü için daha sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde MCPD esterleri ve/veya glisidil esterlerinin analizinde kullanılan indirekt analiz yöntemleri Tablo 2'de verilmiştir (Ermacora ve Hrnčirik, 2014b).

2013 yılında 3 farklı indirekt belirleme yöntemi AOCS tarafından tescil edilmiştir (Cd 29a 13, Cd 29b 13, Cd 29c 13). Yöntemlerin birbirlerinden farkı, 3-MCPD, 2-MCPD ve glisidil esterlerini ayırma işlemlerinde uygulanan farklı prosedürlerden kaynaklanmaktadır (Koyama ve ark., 2016; Miyazaki ve Koyama, 2016). Cd 29a metodunda, esterlerin hidrolizi asidik koşullarda gerçekleştirilirken, Cd 29b metodunda hidroliz bazik ortamda gerçekleştirilmektedir. Her iki metotta da hidroliz süresi 10 saati geçmektedir. Cd 29c metodunda ise esterlerin hidrolizi bazik koşullarda ve daha kısa sürede gerçekleşmektedir, ancak bu metotla 2-MCPD esterleri kantitatif olarak analiz edilememektedir. Bu AOCS metotlarının tümünde ester ayrıştırılmalarının etkinliğini arttırmak ve analitler arasındaki istenmeyen reaksiyonları önlemek için hem referans standart, hem de ester formunda döteryumlanmış bir iç standart kullanmak gerekmektedir. Ancak ester formunda bir referans standart kullanımı, kalibrasyon grafiği oluşturmak için tıpkı analiz edilecek örnekte olduğu gibi uzun bir hidroliz süresi gerektirmektedir (Koyama ve ark., 2016). İndirekt analiz metotlarında kritik basamak transesterifikasyon reaksiyonudur, çünkü transesterifikasyon sırasında eđer reaksiyon alkali koşullarda gerçekleşiyorsa orijinal 3-MCPD bileşimi kısmen glisidole dönüştürebilmektedir. Bu problemin çözümü olarak ise reaktifin pH'ını düşürme veya transesterifikasyon reaksiyonunu asidik koşullarda gerçekleştirme işlemleri önerilmektedir (Jeđrkiewicz ve ark., 2016b; Ermacora ve Hrnčirik, 2013; Hrnčirik ve ark., 2011).

AOCS tarafından önerilen metotlara alternatif olarak esterleri ayırma işleminin enzimatik olarak gerçekleştirildiği yeni bir metot Miyazaki ve ark. (2012) tarafından geliştirilmiş ve Japon Yağ Kimyacıları Derneği (JOCS) ile yürütölen ortak bir çalışma ile metotta bazı iyileştirmeler yapılmıştır (Koyama ve ark., 2016; Miyazaki ve Koyama, 2016; Koyama ve ark., 2015). AOCS Cd 29a ve Cd 29b metotlarında esterlerin ayrılması oldukça uzun bir sürede gerçekleşirken (>10 saat), enzimatik hidroliz ile esterler 30 dakikada ayrılabilir (Miyazaki ve Koyama, 2016).

Ermacora ve Hrnčirik (2014a) tarafından geliştirilen farklı bir analitik metotta, yağ içeren gıdalarda MCPD esterleri ve glisidil esterlerinin eşzamanlı olarak tespiti, örnekler AOCS Cd 29a metoduna göre analiz edilmeden önce bir yağ ekstraksiyon basamağı uygulanarak (AOCS Cd 30-15) gerçekleştirilmiştir (Miyazaki ve Koyama, 2016). Benzer şekilde, aynı bileşiklerin farklı gıdalardaki hem serbest hem de ester formlarının tespiti için Wenzl ve ark. (2015) tarafından, temeli AOCS Cd 29a metoduna dayanan ve ek olarak yağ ekstraksiyon basamağı içeren bir metot ortaya konulmuş ve metot 600 farklı gıda üzerinde denenmiştir (Miyazaki ve Koyama, 2016).

Yağlardaki MCPD ve glisidil esterlerini indirekt olarak tespit etme metotlarının büyük çoğunluğu temel olarak metanollü sodyum hidroksit veya sodyum metoksit

ile baz-katalizli transesterifikasyon, ardından açığa çıkan 2-MCPD ve 3-MCPD'nin fenilboronik asit ile türevlendirilmesi ve son olarak GC-MS ile miktarlarının tayin edilmesine dayanmaktadır (Şekil 3) (Karl ve ark., 2016). Alman Yağ Bilimcileri Topluluğu tarafından geliştirilen DGF standart metodlarında da 3-MCPD ve glisidil esterleri indirekt olarak analiz edilmektedir (DGF, 2009; 2011).

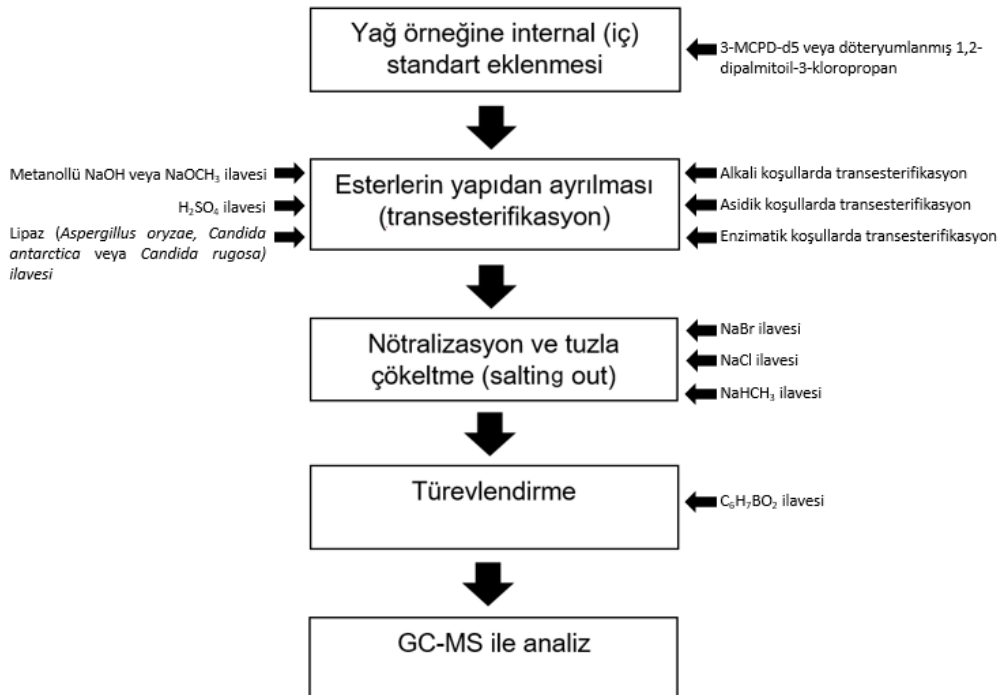
DGF C-VI 17 (10) standart metodunda, örnek hazırlama işlemi esnasında ortamdaki NaCl'nin varlığı glisidil esterlerinin neredeyse tamamen 3-MCPD'ye dönüşmesine neden olmakta ve bu durum da 3-MCPD esterlerini ve glisidil esterlerini birbirinden ayırt etmeyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle 2010 yılında DGF C-VI 18 (10) standart metodu geliştirilmiştir. Metot temel olarak 2 farklı bölümden oluşmaktadır. İlk aşamada 3-MCPD ve glisidil esterlerinin toplam miktarı belirlenmekte, ikinci aşamada ise yalnızca 3-MCPD esterlerinin miktarı belirlenmektedir. Her iki basamak da hedef analitler olan 3-MCPD ve glisidolün oda sıcaklığında, alkali katalizöründe esterlerinin ayrıştırılması temeline dayanmaktadır. Birinci aşamada asitlendirilmiş sodyum klorür (NaCl) çözeltisi reaksiyonu durdurmak ve sonrasında glisidolü uyarılmış MCPD'ye dönüştürmek için kullanılmaktadır. Dolayısıyla metodun ilk bölümünde 3-MCPD ve glisidol birbirlerinden ayrılmaz hale gelmekte ve toplam miktarları tespit edilmektedir (Karl ve ark., 2016).

Metodun ikinci aşamasında (B) ise glisidolün 3-MCPD'ye dönüşümünü engellemek için reaksiyon asitlendirilmiş, sodyum içermeyen bir tuz çözeltisi (NaBr) eklenerek durdurulmaktadır. Dolayısıyla metodun ikinci aşamasında saf 3-MCPD miktarı bulunmaktadır. Örneğin glisidol içeriği ise, glisidolün 3-MCPD'ye transformasyon oranı belirlenerek, deneyin her iki aşamasında elde edilen sonuçların farkı alınarak bulunur. DGF C-VI 18 (10) metodu, AOCS tarafından da valide edilmiş ve AOCS Cd

29c 13 resmi metodu ismini almıştır (Karl ve ark., 2016). AOCS Cd 29c 13 metodunda, diğer iki resmi AOCS (29a 13 ve 29b 13) metodunda yaklaşık 24-36 saatte gerçekleşen ve özellikle kalite laboratuvarlarında arzu edilmeyen uzun transesterifikasyon süresi oldukça kısa sürede gerçekleşmekte ve sonuçlar yalnızca birkaç saat içerisinde hazır hale gelmektedir (Zwagerman ve Overman, 2015).

DGF metodlarının her ikisinde de 3-MCPD'nin pozisyon izomeri olan 2-MCPD'nin miktarı tespit edilememektedir (Karl ve ark., 2016). Ancak Sato ve ark. (2013) 3-kloropropandiol-1,2-bis-palmitoil ester-d5'i iç standart olarak kullanarak bağlı 2-MCPD miktarını kantitatif olarak tespit etmişlerdir (Zelinková ve ark., 2006). Fakat günümüzde, izotop işaretli 2-MCPD yağ asidi esterleri ticari olarak bulunabilir olduğundan, DGF C-VI 18 (10) metodunun ikinci basamağında, bağlı 2-MCPD miktarının tespiti için izotop işaretli 2-MCPD yağ asidi esterlerinin kullanım olanağı bulunmaktadır (Karl ve ark., 2016).

Alkali koşullarda hidroliz etme prensibine dayalı olarak geliştirilen bir diğer metot, SGS 3-in-1 metodu ismiyle ortaya çıkmıştır. Metodun özelliği hidroliz ile esterlerin ayrılması işleminin hafif alkali koşullarda gerçekleştirilmesidir. Metotta, serbest hale geçen glisidol, kararlı 3-MBPD'ye dönüştürülmekte ve bu durum bağlı glisidol, bağlı 2-MCPD ve bağlı 3-MCPD'nin paralel olarak belirlenmesine imkan sağlamaktadır. Hidrolizin hafif alkali ortamda gerçekleşmesi, serbest hale geçen 3-MCPD'nin uyarılmış olan glisidole istenmeyen dönüşümünü engellemektedir. Bu istenmeyen reaksiyon, oda sıcaklığında gerçekleşen DGF metodlarında engellenememektedir. Hafif alkali koşullarda hidroliz temeline dayalı bu metot AOCS tarafından valide edilmiş ve AOCS Cd 29b 13 resmi metodu ismini almıştır (Karl ve ark., 2016).



Şekil 3 MCPD esterlerini indirekt belirleme yöntemlerinde izlenen basamaklar (Nagy ve ark., 2011; Hamlet ve ark., 2005; Ooi ve ark., 1996)

Tablo 2 MCPD esterleri ve/veya glisidil esterlerinin analizinde yaygın olarak kullanılan indirekt analiz yöntemleri (Ermacora ve Hrnčirik, 2014b)

Koşullar	Metot ismi	Analiz edilen bileşikler	Metot ile ilgili bilgiler	Referanslar
Alkali	Weißhaar metodu	3-MCPD esterleri ve glisidil esterlerinin toplamı	-	Weißhaar, 2008
	DGF C-VI 18 (09) A + B	3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri	Metot 2011 yılında kaldırılmıştır	Weißhaar ve Perz, 2010; DGF, 2009
	BfR metodu 82 FC-009-01 ve 02	3-MCPD esterleri	-	Wöhrlin ve ark., 2011
	DGF metodu C-VI 18 (10) A + B	3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri	Güncel AOCS Cd 29c-13 metodu	DGF, 2009
Hafif Alkali	SGS 3-in-1 metodu bölüm A + bölüm B	2- ve 3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri	Güncel AOCS Cd 29b-13 metodu	Kuhlmann, 2011a; Kuhlmann, 2011b
	ICT metodu	3-MCPD esterleri	-	Zelinková ve ark., 2006; Divinová ve ark., 2004
Asit	BfR metodu 82 FC-008-02	3-MCPD esterleri	-	Wöhrlin ve ark., 2011
	Nestlé metodu	2- ve 3-MCPD esterleri	-	Dubois ve ark., 2012; Seefelder ve ark., 2008
	Unilever standart metodu	2- ve 3-MCPD esterleri	-	Ermacora ve Hrnčirik, 2012
	Unilever kombine metodu	2- ve 3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri	Güncel AOCS Cd 29a-13 metodu	Ermacora ve Hrnčirik, 2013
Enzimatik	Lipaz (<i>Aspergillus oryzae</i>)	2- ve 3-MCPD esterleri	-	Hamlet ve Sadd, 2004; Hamlet, 1998
	Lipaz (<i>Candida antarctica</i>)	2- ve 3-MCPD esterleri	-	Chung ve Chan, 2012
	Lipaz (<i>Candida rugosa</i>)	3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri	-	Miyazaki ve ark., 2012

MCPD'lerin tespiti için geliştirilen metotlar arasında en yeni olanı Ermacora ve Hrnčirik (2013) tarafından geliştirilen metottur. Metotta glisidolün 3-MBPD'ye dönüşümü temel alınmış, ancak bu işlem esterlerin ayırımından önce gerçekleştirilmiştir. Açığa çıkan 3-MBPD mono- esterleri ile 2-MCPD ve 3-MCPD'nin yağ asidi esterleri sonraki aşamada asit katalizli alkolizis ile ayrıştırılmıştır (Karl ve ark., 2016; Ermacora ve Hrnčirik, 2013). Aynı zamanda Unilever metodu olarak da adlandırılan bu metot, AOCS tarafından valide edilmiş ve AOCS Cd 29a 13 resmi metodu ismini almıştır. Ayrıca DGF ve SDS metotlarındaki örnek hazırlama prosedürlerinden dolayı, örnek içerisinde bulunan serbest formdaki analitler sonuçları etkileyebilmekte ve sonuçlarda artış meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla sonuçlara bakılarak serbest ve bağlı formdaki analitler birbirlerinden ayıramamaktadır. Ancak Unilever metodunda serbest analitler hariç tutulmakta ve dolayısıyla sonuçlar yalnızca bağlı analitlerin miktarını göstermektedir (Karl ve ark., 2016).

Toksikolojik Veriler

Kloropropanollerin olası toksik etkilerine ilişkin araştırmalar henüz tamamlanmamış olmasına rağmen (Samaras ve ark., 2016), orta ve yüksek düzeyde 3-MCPD tüketiminin özellikle böbreklerin ve üreme organlarının yetmezliğine neden olduğu yapılan çalışmalarda ortaya

konulmuştur (Lee ve Khor, 2015). Ayrıca, uzun vadede yüksek dozda 3-MCPD tüketen deney farelerinde böbrekler ve üreme organlarında hiperplazi ve tümör oluşumu saptanmıştır. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 3-MCPD karsinojen bir bileşik olarak sınıflandırılmaktadır (Li ve ark., 2015). Şu ana kadar elde edilen toksikolojik veriler göz önünde bulundurulduğunda çalışmaların çoğu 3-MCPD'nin deney hayvanları üzerinde karsinojenik etkili olduğunu ve bazı organların fonksiyonlarını bozabildiğini göstermiş, ancak 3-MCPD esterlerinin toksikolojik özellikleri ile ilgili çok az araştırma yapılmıştır (Li ve ark., 2015; Bakhiya ve ark., 2011; Buhrke ve ark., 2011; Schilter ve ark., 2011). Dolayısı ile 3-MCPD esterlerinin sağlık üzerine uzun vadede etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda (Li ve ark., 2015) vücuda alınan 3-MCPD esterlerinin *in vivo* şartlarda %100 oranında 3-MCPD'ye dönüştüğü tespit edilmiştir. Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (The Federal Institute for Risk Assessment-BfR) tarafından yapılan bir araştırmada 10 farklı bebek maması ve devam maması örneklerinde 3-MCPD miktarı araştırılmış, sonuçlar ise, 3-MCPD esterleri vücutta 3-MCPD'ye dönüştüğünden, yalnızca ticari bebek maması formülasyonları ile beslenen bebeklerin önemli düzeyde glisidol ve 3-MCPD tükettiklerini ve tüketilen dozun Gıda Katkıları Ortak Uzmanlar Komitesi, JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) tarafından belirlenen

günlük dozu (2 µg/kg vücut ağırlığı) aşabileceğini göstermiştir. Gerçekleştirilen farklı toksikolojik çalışmalarda (Abraham ve ark., 2013; Buhrke ve ark., 2011) da 3-MCPD esterlerinin hidrolizinin hücrede gerçekleştirildiği görülmüş, ayrıca *in vivo* koşullarda deney farelerinde serbest MCPD'nin diesterlerinden %86 oranında ayrıldığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2015).

Yapılan araştırmalarda serbest formdaki (ester bağlı olmayan) 3-MCPD'nin nefrotoksik ve tümörjenik özellikler gösterdiği deney fareleri üzerinde kanıtlanmıştır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı 3-MCPD'yi "insanlar için potansiyel karsinojen" olarak 2B grubunda sınıflandırmıştır. Glisidölün ise mutajenik ve karsinojenik özellikler gösterdiği belirtilmiş ve "insanlar için büyük bir olasılıkla karsinojen" olduğu ifade edilerek 2A grubunda sınıflandırılmıştır (IARC, 2000).

Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR) tarafından 2007 yılında yayınlanan bildiriye serbest formdaki 3-MCPD'nin insan sindirim sisteminde esterlerinden tamamen ayrıldığı ortaya konulmuştur. Ayrıca Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü bu bilgiden yola çıkarak serbest formdaki bileşikler için geçerli olan tüm eşik düzeyi ve önerilerin ester formları için de geçerli olduğunu öne sürmüştür (Pudel ve ark., 2016). Bu varsayım farklı çalışmalarla da (Abraham ve ark., 2013; Appel ve ark., 2013) onaylanmış ve bu çalışmalarda 3-MCPD diesterlerinin oral biyoyararlılıklarının %86 düzeyinde olduğu, glisidil esterlerinin ise sindirim sisteminde tamamen hidroliz edildiği tespit edilmiştir (Pudel ve ark., 2016).

Günümüzde düşük miktarda 3-MCPD içeren ancak sıklıkla tüketilen ekmek, makarna, et ürünleri, kek ve bisküvilerin serbest formdaki 3-MCPD'nin temel kaynağı olduğu bilinmektedir (Weiβhaar, 2011). Yapılan araştırmalar sonucu hidroliz edilmiş proteinler ve soya sosunda 3-MCPD miktarı için üst limit 0,02 mg/kg olarak belirlenmiş, ayrıca Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) tarafından geçici olarak günlük alınmasına izin verilen limitin (León ve ark., 2008) vücut ağırlığı başına 2 µg/kg olduğu belirtilmiştir (Zelinková ve ark., 2008).

Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen kısa dönemli çalışmalarda, 3-MCPD'ye bağlı toksisite yönünden en duyarlı organın böbrekler olduğu belirlenmiştir. Ayrıca vücut ağırlığı başına 100 mg/kg 3-MCPD alan farelerde ağır proteinüri ve glikozürinin yanı sıra akut glomerulonefrit gözlenmiştir. 3-MCPD'nin nefrotoksitesinin oluşumunda muhtemel mekanizmanın β-klorolaktat metabolik yolu ile ilişkili metabolitlerin glikoliz reaksiyonlarını inhibe etmesi olduğu belirtilmektedir (Ermacora ve Hrnčirik, 2014a). Alkol dehidrogenaz aracılığı ile 3-MCPD'den üretilen β-klorolaktaldehitin, glikolizis reaksiyonlarında yer alan gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz ve triozfosfat izomeraz enzimlerini inhibe ettiği ispatlanmıştır. Ek olarak β-klorolaktik asitin degradasyon ürünü olan okzalik asitin, 3-MCPD'nin böbrekler üzerindeki toksisiteye katkı sağladığı bilinmektedir (Ermacora ve Hrnčirik, 2014a; Lynch ve ark., 1998).

Maymunlar üzerinde gerçekleştirilen kısa dönemli çalışmalar ise 3-MCPD'nin kemik iliği üzerine toksik etkili olabileceğini göstermiştir. Çalışmada, altı erkek

maymundan üç tanesine altı hafta boyunca vücut ağırlığı başına 30 mg/kg 3-MCPD verilmiş ve sürenin sonunda anemi, kanda lökosit azlığı (lökopeni) ve ağır trombositopeni gibi hematolojik anormallikler gözlenmiştir (Kirton ve ark., 1970). Ek olarak maymunlardan iki tanesi kemik iliği bozunması nedeniyle ölmüştür (Lampen, 2014).

Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen iki farklı uzun vadeli çalışmada ise (Cho ve ark., 2008; Sunahara ve ark., 1993). 3-MCPD'nin karsinojenik olma potansiyeli bulunduğu ve hem erkek hem de dişi hayvanlarda iyi huylu böbrek tümörü oluşumuna neden olduğu, ayrıca erkek hayvanlarda Leydig hücre tümörü oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Ermacora ve Hrnčirik, 2014a).

3-MCPD Miktarını Azaltmaya Yönelik Çalışmalar

Rafine yağlarda 3-MCPD esterlerinin miktarını azaltmaya yönelik yapılan çalışmalar genel olarak 3 temel başlık altında toplanmaktadır: a) ham maddede bulunan prekürsörlerin minimize edilmesi, b) rafinasyon prosesinin modifikasyonu c) esterlerin rafinasyondan sonra ortamdaki uzaklaştırılması (Matthäus ve Pudol, 2014).

Prekürsör Maddelerin Elimine/Minimize Edilmesi

Yağlarda 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunun klor verici iyonlar ile birlikte; triaçilgliseroller, mono- ve diaçilgliseroller; fosfolipitler veya gliserol gibi uygun prekürsörlerin ve uygun proses şartlarının (ör: sıcaklık, süre, pH) varlığında gerçekleşen karmaşık bir problem olduğu belirtilmektedir. 3-MCPD ve esterlerinin yapısına bakıldığında, klor ve klor içeren bileşiklerin kaynağının tespit edilmesi azaltma stratejilerinin geliştirilmesinde anahtar rolü oynamaktadır. Matthäus ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, palm yağı su veya su-alkol karışımı gibi polar solventlerle yıkandıktan sonra deodorize edilmiş ve son üründe 3-MCPD esterlerinin miktarı azalmış, bunun nedeninin ise yıkama işlemi ile birlikte polar klor-içeren bileşiklerin yağdan uzaklaştırılması olduğu belirtilmiştir (Matthäus ve Pudol, 2014).

Özellikle palm yağında çok fazla farklı 3-MCPD ve glisidil esterleri olduğu bilinmekte ve bunun nedeni olarak iklim, toprak ve yetiştirme şartlarının yanı sıra genotip, hasat tekniği ve işleme koşullarının da etkisi olduğu belirtilmektedir (Rahn ve Yaylayan, 2011). Bu farklı etkenler sonuç olarak klor içeren bileşiklerin ve prekürsör olarak etki eden açilgliserollerin miktarını etkilemektedir. Ayrıca farklı tür klor verici bileşiklerle yapılan çalışmalar, klor içeren bileşiklerin organik formda olması gerektiğini, yoksa açilgliserollerle reaksiyonun gerçekleşmesinin zor olduğunu göstermiştir.

Nagy ve ark. (2011), palm yağının farklı organik klor içeren bileşikler ile demir [II] ve [III] klorür gibi inorganik klor içeren bileşikler içerdiğini tespit etmişlerdir. Buna bağlı olarak, 3-MCPD esterlerinin oluşumunu engellemek için yağlı hammaddelerin klor içeren bileşiklerle zenginleştirilmesinden kaçınılmalı veya bu bileşenler ham yağdan proses aşamasının hemen başlangıcında uzaklaştırılmalıdır (Matthäus ve Pudol, 2013). Ham yağdaki klor içeren bileşiklerin çeşitli

solventlerle yıkanarak uzaklaştırılmasına alternatif olarak yağ ekstraksiyonu sırasında pulpun yıkanması ile reaktif klor türlerinin uzaklaştırılması önerilmektedir (Matthäus ve Pudél, 2013; Craft ve ark., 2012). Esterlerin oluşumunu etkileyen bir diğer prekürsör açilgliserollerdir. Bitkisel yağların pek çoğunda triaçilgliserol miktarı %88-96 arasında olup, diaçilgliserol miktarı ise %1-2 arasındadır. Ancak diaçilgliserol miktarı yalnızca palm yağında %4-12 arasında değişmektedir. Bu da rafinasyon işlemi sırasında palm yağının 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumuna diğer bitkisel yağlardan neden daha fazla duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunu engellemek için diaçilgliserol miktarı, prostenen önce mümkün olduğu kadar minimize edilmelidir. Bu amaçla en basit şekilde, hammadde özellikle de palm meyvesi doğru şekilde seçilmeli ve işlenmelidir (Matthäus ve Pudél, 2014).

Olgun palm meyvesinde eğer lipaz aktivitesi yüksekse bu durum triaçilgliserollerin hızlı bir şekilde degrade olmasına, bu da lipazların aktif olduğu süreye bağlı olarak yüksek miktarda diaçilgliserol oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle hasattan sonra enzimlerin inaktivasyonu amacıyla meyve kümelerinin hızlıca toplanması ve sterilize edilmesi ve sorun teşkil edecek meyvelerin diğer kümelerle birlikte işlenmemesi, ester oluşumunun ileri işlemeye geçilmeden önce engellenmesi açısından gereklidir (Matthäus ve Pudél, 2014). Malezya'daki bazı firmalar, sterilizasyon uygulaması ile birlikte hasat ve ham yağın işlenmeye başlanması arasında geçen sürenin optimize edilmesi durumunda palm yağında 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunun ciddi düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir (Matthäus ve Pudél, 2013).

Rafinasyon Prosesinin Modifikasyonu

Her ne kadar ham yağın işlenmesi öncesinde alınabilecek tedbirler olsa da, ester oluşumunun minimize edilebileceği temel aşama rafinasyon prosesidir. Degumming işlemi sırasında genel olarak 3-MCPD ve glisidil esterlerinin miktarının azaldığının bilinmesine rağmen, degumming sırasında asit kullanımının 3-MCPD ester prekürsörlerinin oluşumunu aktive ettiği tespit edilmiştir (Matthäus ve Pudél, 2013). Ek olarak uygulanan bir nötralizasyon işlemi de asitliği deodorizasyon işleminden önce azaltarak ham palm yağında ester oluşum ihtimalini düşürmektedir. Ayrıca bu işlem nötrale edilmiş yağın sabun fazının ayrılması için uygulanan yıkama işlemi esnasında potansiyel prekürsörlerin ayrılmasına da yardımcı olmaktadır.

3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunun ısı varlığında gerçekleştiği bilinmekte ve ısı artışı bu kontaminantların miktarını arttırmaktadır. Bu nedenle rafinasyonun en kritik aşaması deodorizasyon basamağıdır. Deodorizasyon sırasında 3-MCPD ve glisidil esterlerinin miktarını azaltmanın bir yolu olarak ısıya hassas bileşiklerin distilasyonunda kullanılan kısa yollu distilasyon uygulaması önerilmektedir (Pudél ve ark., 2016). Bu yöntemin geleneksel damıtma işlemine göre palm yağında 3-MCPD ve glisidil esterlerinin oluşumunu %90'dan daha fazla azalttığı tespit edilmiştir (Matthäus ve Pudél, 2013). Ancak bu uygulamanın bilinen tek dezavantajı son ürünün renginin ham palm yağında görülen kırmızı renk olmasıdır ve bu renk bazı

uygulamalarda arzu edilmemektedir. Fakat aynı zamanda, uygulanan hafif işlemde dolayı son ürün özellikle karoten, tokoferol, tokotrienol ve fitosteroller yönünden oldukça zengin olmaktadır (Pudél ve ark., 2016; Unnithan, 1999; Ooi ve ark., 1996).

Ayrıca farklı çalışmalarda ağartılmış palm yağına etanol veya gliserol eklenmesinin 3-MCPD esterlerinin oluşum oranını azalttığı (Matthäus ve Pudél, 2013; Craft ve ark., 2012), deodorizasyon işleminden önce potasyum hidrojen karbonat veya sodyum bikarbonat ilavesinin 3-MCPD ve glisidil oluşumunu engellediği, deodorizasyon sırasında Köstrolith eklenmesinin 3-MCPD miktarını azalttığı ve deodorizasyon esnasında evaporasyon işleminden önce klor-verici ajana rakip molekül olarak diasetin kullanımının bu kontaminantların oluşumunu azaltabildiği tespit edilmiştir (Matthäus ve Pudél, 2013).

Rafinasyondan Sonra Esterlerin Uzaklaştırılması

3-MCPD ve glisidil esterlerini azaltmanın bir diğer yolu da rafinasyon işlemi tamamlandıktan sonra satışa hazır ürünün çeşitli şekillerde işlenmesidir. Strijowski ve ark. (2011), kalsine edilmiş zeolit ve sentetik magnezyum silikat uygulaması ile glisidil esterlerinin miktarını rafine palm yağında azaltmışlardır. Shimizu ve ark. (2012), tarafından, aktive edilmiş ağartma toprağı kullanımının glisidil palmitatı ortamdaki uzaklaştırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitli kaynaklardan elde edilen farklı enzimlerin (lipaz, halohidrin dehalojenaz, epoksit hidrolaz) kullanımı ile de rafine yağlarda bulunan 3-MCPD esterleri enzimatik olarak farklı bileşiklere dönüştürülebilmekte ve degrade edilebilmektedir (Matthäus ve Pudél, 2013).

Bunların haricinde yakın tarihte Li ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, prekürsör içeren kimyasal model reaksiyon ortamında (tripalmitoil gliserol, 1,2-dipalmitoil-sn-gliserol, monopalmitoil gliserol ve sodyum klorür) ve yağ içeren model ortamda (kolza yağı ve sodyum klorür) 3-MCPD esterlerinin oluşumu üzerine 6 farklı antioksidanın (bütilendirilmiş hidroksi toluen, bütilendirilmiş hidroksi anisol, tersiyer bütilhidrokinon, propil gallat, L-askorbil palmitat ve α -tokoferol) etkisi test edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm antioksidanların test edilen her iki ortamda da 3-MCPD oluşumu üzerine inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Tersiyer bütilhidrokinon ise hem kimyasal reaksiyon ortamında, hem de yağ içeren model ortamda en yüksek inhibitör etkiye sahip antioksidan olarak bildirilmiştir. Ayrıca farklı bir çalışmada (Hamlet ve Sadd, 2005) model hamur sisteminde, ortamda yüksek miktarda maya bulunmasının 3-MCPD oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir.

Sonuç

3-MCPD ve glisidil esterleri gıdaların işlenmesi sırasında açığa çıkan gıda kontaminantları olup, ürün kalitesini etkilemenin yanısıra sağlık üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu bileşiklerin oluşumu için klor iyonlarının varlığı ile birlikte yüksek sıcaklık uygulaması (>200°C) gerekmekte, bu da ekmek, bisküvi, kraker gibi tahıl ürünleri, salam, jambon gibi sıklıkla tüketilen et ürünlerinin üretimi esnasında bu bileşiklerin oluşumuna zemin hazırlamaktadır. 3-MCPD ve glisidil esterleri kantitatif olarak günümüzde direkt analiz metotları

kullanılarak sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ile belirlenebilmekte, ayrıca indirekt analiz metotları ile gaz kromatografisi-kütle dedektöründe tayin edilebilmektedir. Genel olarak maliyetler göz önünde bulundurulduğunda, her bir esterinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gereken durumlarda direkt analiz yöntemleri tercih edilmekte, ancak toplam esterlerin miktarının analiz edildiği koşullarda indirekt analiz yöntemleri daha az referans madde gerektirdiğinden daha ekonomik olarak görülmektedir. İndirekt analiz yöntemlerinde esterlerin hidrolizi alkali veya asidik koşullarda, ya da enzimatik muamele ile gerçekleştirilmektedir. Alkali ve asidik hidroliz gerektiren yöntemlerde genel olarak esterlerin hidrolizi uzun bir sürede (>10 saat) tamamlanmaktadır. Enzimatik hidroliz ise çok daha kısa bir sürede (~30 dakika) gerçekleşmektedir. Gıda sistemlerinde çeşitli kloropropanoller ve bunların esterlerinin azaltılmasına yönelik yeni araştırmalar özellikle yakın tarihte hız kazanmıştır. Kloropropanollerin sağlık üzerindeki etkileri dikkate alındığında konuyla ilgili yeni çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Abraham K, Appel KE, Berger-Preiss E, Apel E, Gerling S, Mielke H, Creutzenberg O, Lampen A. 2013. Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Arch Toxicol.*, 87(4): 649-659. DOI:10.1007/s00204-012-0970-8.
- Appel KE, Abraham K, Berger-Preiss E, Hansen T, Apel E, Schuchardt S, Vogt K, Bakhiya N, Creutzenberg O, Lampen A. 2013. Relative oral bioavailability of glycidol from glycidyl fatty acid esters in rats. *Arch Toxicol.*, 87(9): 1649-1659. DOI: 10.1007/s00204-013-1061-1.
- Bakhiya N, Abraham K, Gürtler R, Appel KE, Lampen A. 2011. Toxicological assessment of 3-chloropropane-1, 2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol Nutr Food Res.*, 55(4): 509-521. DOI: 10.1002/mnfr.201000550.
- Becalski A, Feng S, Lau BP-Y, Zhao T. 2015. A pilot survey of 2- and 3-monochloropropanediol and glycidol fatty acid esters in foods on the Canadian market 2011-2013. *J Food Compos Anal.*, 37: 58-66. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.09.002.
- Breitling-Utzmann CM, Köbler H, Herbolzheimer D, Maier A. 2003. 3-MCPD: Occurrence in bread crust and various food groups as well as formation in toast. *Deut Lebensm-Rundsch.*, 9(7): 280-285.
- Buhrke T, Weißhaar R, Lampen A. 2011. Absorption and metabolism of the food contaminant 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) and its fatty acid esters by human intestinal Caco-2 cells. *Arch Toxicol.*, 85(10): 1201-1208. DOI: 10.1007/s00204-011-0657-6.
- Cerbulis J, Parks OW, Liu RH, Piotrowski EG, Farrell HM. 1984. Occurrence of diesters of 3-chloro-1, 2-propanediol in the neutral lipid fraction of goats' milk. *J Agr Food Chem.*, 32(3): 474-476. DOI: 10.1021/jf00123a013
- Chung SW, Chan BT. 2012. Simultaneous determination of 2- and 3-Monochloropropan-1, 3-diol esters in foods by enzymatic hydrolysis and GC-MS detection. *Chromatographia*, 75(17-18): 1049-1056. DOI: 10.1007/s10337-012-2282-9.
- Cho WS, Han BS, Nam KT, Park K, Choi M, Kim SH, Jeong J, Wang DD. 2008. Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1, 2-diol in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.*, 46(9): 3172-3177. DOI: 10.1016/j.fct.2008.07.003.
- Craft BD, Nagy K, Sandoz L, Destaillets F. 2012. Factors impacting the formation of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters during palm (*Elaeis guineensis*) oil production. *Food Addit Contam A.*, 29(3): 354-361. DOI: 10.1080/19440049.2011.639034.
- Crews C, Brereton P, Davies A. 2001. The effects of domestic cooking on the levels of 3-monochloropropanediol in foods. *Food Addit Contam.*, 18(4): 271-280.
- Crews C, Hough P, Brereton P, Harvey D, Macarthur R, Matthews W. 2002. Survey of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in selected food groups, 1999-2000. *Food Addit Contam.*, 19(1): 22-27. DOI: 10.1080/02652030110085395.
- Crews C, Chiodini A, Granvogl M, Hamlet C, Hrnčířík K, Kuhlmann J, Lampen A, Scholz G, Weisshaar R, Wenzl T, Jasti PR. 2013. Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. *Food Addit Contam A.*, 30(1): 11-45. DOI: 10.1080/19440049.2012.720385.
- Davidek J, Velišek J, Kubelka V, Janiček G, Šimicová Z. 1980. Glycerol chlorohydrins and their esters as products of the hydrolysis of tripalmitin, tristearin and triolein with hydrochloric acid. *Z Lebensm Unters For., Z Lebensm Unters For.*, 171(1): 14-17. DOI: 10.1007/BF01044410.
- Divinová V, Svejková B, Dolezal M, Velisek J. 2004. 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 J Food Sci.*, 22(5): 182-189.
- Divinová V, Dolezal M, Velisek J. 2007. Free and bound 3-chloropropane-1, 2-diol in coffee surrogates and malts. *Czech J Food Sci.*, 25(1): 39.
- Doležal M, Chaloupská M, Divinová V, Svejková B, Velišek J. 2005. Occurrence of 3-chloropropane-1, 2-diol and its esters in coffee. *Eur Food Res Technol.*, 221(3-4): 221-225. DOI: 10.1007/s00217-004-1118-8.
- Dubois M, Tarres A, Goldmann T, Empl AM, Donaubaer A, Seefelder W. 2012. Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oil. *J Chromatogr A.*, 1236: 189-201. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.009.
- Ermacora A, Hrnčířík K. 2012. Evaluation of an improved indirect method for the analysis of 3-MCPD esters based on acid transesterification. *J Am Oil Chem Soc.*, 9(2): 211-217. DOI: 10.1007/s11746-011-1911-z.
- Ermacora A, Hrnčířík K. 2013. A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. *J Am Oil Chem Soc.*, 90(1): 1-8. DOI: 10.1007/s11746-012-2132-9.
- Ermacora A, Hrnčířík K. 2014a. Development of an analytical method for the simultaneous analysis of MCPD esters and glycidyl esters in oil-based foodstuffs. *Food Addit Contam A.*, 31(6): 985-994. DOI: 10.1080/19440049.2014.905712.
- Ermacora A, Hrnčířík K. 2014b. Processing Contaminants in Edible Oils: MCPD and Glycidyl Esters. Urbana, IL, 61802, U.S.A, AOCS Press. ISBN: 978-0-9888565-0-9.
- Gardner AM, Yurawecz MP, Cunningham WC, Diachenko GW, Mazzola EP, Brumley, WC. 1983. Isolation and identification of C16 and C18 fatty acid esters of chloropropanediol in adulterated Spanish cooking oils. *B Environ Contam Tox.*, 31(6): 625-630.
- Haines TD, Adlaf KJ, Pierceall RM, Lee I, Venkitasubramanian P, Collison MW. 2011. Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOFMS. *J Am Oil Chem Soc.*, 88(1): 1-14. DOI: 10.1007/s11746-010-1732-5.
- Hamlet CG. 1998. Analytical methods for the determination of 3-chloro-1, 2-propanediol and 2-chloro-1, 3-propanediol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam.*, 15(4): 451-465. DOI: 10.1080/02652039809374666.

- Hamlet CG, Sadd PA, Crews C, Velišek J, Baxter DE. 2002. Occurrence of 3-chloro-propane-1, 2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Addit Contam.*, 19(7): 619-631. DOI: 10.1080/02652030210132391.
- Hamlet CG, Sadd PA. 2004. Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech J Food Sci.*, 22: 259-262. DOI: 10.1016/j.jf035078o.
- Hamlet CG, Sadd PA, Gray DA. 2004. Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough systems. 2. unleavened doughs. *J Agr Food Chem.*, 52(7): 2067-2072. DOI: 10.1021/jf035078o.
- Hamlet CG, Sadd PA. 2005. Effects of yeast stress and pH on 3-monochloropropanediol (3-MCPD)-producing reactions in model dough systems. *Food Addit Contam.*, 22(7): 616-623. DOI: 10.1080/02652030500150093.
- Hori K, Matsubara A, Uchikata T, Tsumura K, Fukusaki E, Bamba T. 2012a. High-throughput and sensitive analysis of 3-monochloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in edible oils by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1250: 99-104. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.06.017.
- Hori K, Koriyama N, Omori H, Kuriyama M, Arishima T, Tsumura K. 2012b. Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *LWT-Food Sci Technol.*, 48(2): 204-208. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.03.014.
- Hrnčířik K, Zelinkova Z, Ermacora A. 2011. Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1, 2-diol esters. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 361-367. DOI: 10.1002/ejlt.201000316.
- IARC 2000. Some industrial chemicals, IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 77: 469-486.
- IARC 2013. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 101, 9.
- Jędrkiewicz R, Głowacz A, Gromadzka J, Namieśnik J. 2016a. Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control* 59: 487-492. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.05.039.
- Jędrkiewicz R, Głowacz-Różyńska A, Gromadzka J, Kloskowski A, Namieśnik J. 2016b. Indirect determination of MCPD fatty acid esters in lipid fractions of commercially available infant formulas for the assessment of infants' health risk. *Food Anal Method.*, 9(12): 3460-3469. DOI: 10.1007/s12161-016-0531-5
- Jira W. 2010. 3-Monochloropropan-1, 2-diol (3-MCPD) in geräucherten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung* 89-96.
- Karsulinova L, Folprechtová, B, Dolezal M, Dostálová J, Velisek, J. 2007. Analysis of the lipid fractions of coffee creamers, cream aerosols, and bouillon cubes for their health risk associated constituents. *Czech J Food Sci.*, 25(5): 257.
- Kirton KT, Ericsson RJ, Ray JA, Forbes AD. 1970. Male antifertility compounds: efficacy of U-5897 in primates (*Macacamulatta*). *J Reprod Fertil.*, 21(2): 275-278. DOI: 10.1530/jrf.0.0210275
- Karl H, Merkle S, Kuhlmann J, Fritsche J. 2016. Development of analytical methods for the determination of free and ester bound 2-, 3-MCPD, and esterified glycidol in fishery products. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 118(3): 406-417. DOI: 10.1002/ejlt.201400573.
- Koyama K, Miyazaki K, Abe K, Ikuta K, Egawa Y, Kitta T, Kido H, Sano T, Takahashi Y, Nezu T, Nohara H, Miyashita T, Yada H, Yamazaki K, Watanabe Y. 2015. Optimization of an indirect enzymatic method for the simultaneous analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidyl esters in edible oils. *J Oleo Sci.*, 64(10): 1057-1064. DOI: 10.5650/jos.ess15100.
- Koyama K, Miyazaki K, Abe K, Egawa Y, Kido H, Kitta T, Miyashita T, Nezu T, Nohara T, Sano T, Takahashi Y, Taniguchi T, Yada H, Yamazaki K, Watanabe Y. 2016. Collaborative study of an indirect enzymatic method for the simultaneous analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and glycidyl esters in edible oils. *J Oleo Sci.*, 65(7): 557-568. DOI: 10.5650/jos.ess16021.
- Kuhlmann J. 2011a. Indirect determination of bound glycidol and MCPD in refined oils. 102 nd AOCS Annual Meeting and Expo, Cincinnati, OH, May 1-4,
- Kuhlmann J. 2011b. Determination of bound 2, 3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 335-344. DOI: 10.1002/ejlt.201000313.
- Kuksis A, Marai L, Myher JJ, Cerbulis J, Farrell HM. 1986. Comparative study of the molecular species of chloropropanediol diesters and triacylglycerols in milk fat. *Lipids* 21(3): 183-190. DOI: 10.1007/BF02534819.
- Kuntzer J, Weißhaar R. 2006. The smoking process: A potent source of 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in meat products. *Deut Lebensm Rundsch.*, 102(9): 397-400.
- Lampen, A. 2015. Processing Contaminants in Edible Oils: MCPD and Glycidyl Esters. Urbana, IL, 61802, U.S.A, AOCS Press. ISBN: 978-0-9888565-0-9.
- Lee BQ, Khor SM. 2015. 3-Chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in soy sauce: A review on the formation, reduction, and detection of this potential carcinogen. *Compr Rev Food Sci F.*, 14(1): 48-66. DOI: 10.1111/1541-4337.12120.
- León N, Yusà V, Pardo O, Pastor A. 2008. Determination of 3-MCPD by GC-MS/MS with PTV-LV injector used for a survey of Spanish foodstuffs. *Talanta* 75(3): 824-831. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.12.028.
- Li C, Jia H, Shen M, Wang Y, Nie S, Chen Y, Zhou Y, Wang Y, Xie M. 2015a. Antioxidants inhibit formation of 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in model reactions. *J Agr Food Chem.*, 63(44): 9850-9854. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03503.
- Li H, Chen D, Miao H, Zhao Y, Shen J, Wu Y. 2015b. Direct determination of fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol in edible vegetable oils by isotope dilution-ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1410: 99-109. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.080.
- Lynch BS, Bryant DW, Hook GJ, Nestmann ER, Munro IC. 1998. Carcinogenicity of monochloro-1, 2-propanediol (α -chlorohydrin, 3-MCPD). *Int J Toxicol.*, 17(1): 47-76. DOI: 10.91-5818/98.
- MacMahon S, Mazzola E, Begley TH, Diachenko GW. 2013a. Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 1. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol monoesters and glycidyl esters. *J Agr Food Chem.*, 61(20): 4737-4747. DOI: 10.1021/jf4005803.
- MacMahon S, Begley TH, Diachenko GW. 2013b. Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 2. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol and 2-monochloropropanediol diesters. *J Agr Food Chem.*, 61(20): 4748-4757. DOI: 10.1021/jf400581g.
- Matthäus B, Pudel F, Fehling P, Vosmann K, Freudenstein A. 2011. Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 380-386. DOI: 10.1002/ejlt.201000300.
- Matthäus B, Pudel F. 2013. Mitigation of 3-MCPD and glycidyl esters within the production chain of vegetable oils especially palm oil. *Lipid Technology* 25(7): 151-155. DOI: 10.1002/lite.201300288.
- Matthäus B, Pudel F. 2014. Processing Contaminants in Edible Oils: MCPD and Glycidyl Esters. Urbana, IL, 61802, U.S.A, AOCS Press. ISBN: 978-0-9888565-0-9.

- Miyazaki K, Koyama K, Sasako H, Hirao T. 2012. Indirect method for simultaneous determinations of 3-chloro-1, 2-propanediol fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters. *J Am Oil Chem Soc.*, 89(8): 1403-1407. DOI: 10.1007/s11746-012-2047-5.
- Miyazaki K, Koyama K. 2016. Application of Indirect Enzymatic Method for Determinations of 2-/3-MCPD-Es and Gly-Es in Foods Containing fats and Oils. *J Am Oil Chem Soc.*, 93(7): 885-893. DOI: 10.1007/s11746-016-2833-6
- Myher JJ, Kuksis A, Marai L, Cerbulis J. 1986. Stereospecific analysis of fatty acid esters of chloropropanediol isolated from fresh goat milk. *Lipids* 21(5): 309-314. DOI: 10.1007/BF02535692.
- Nagy K, Sandoz L, Craft BD, Destailats F. 2011. Mass-defect filtering of isotope signatures to reveal the source of chlorinated palm oil contaminants. *Food Addit Contam A.*, 28(11): 1492-1500. DOI: 10.1080/19440049.2011.618467.
- Ooi CK, Choo YM, Yap CM, Ma AN. 1996. Refining of red palm oil. *Elaeis*, 8: 20–28.
- Pudel F, Benecke P, Fehling P, Freudenstein A, Matthäus B, Schwaf A. 2011. On the necessity of edible oil refining and possible sources of 3-MCPD and glycidyl esters. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 368-373. DOI: 10.1002/ejlt.201000460.
- Pudel F, Benecke P, Vosmann K, Matthäus B. 2016. 3-MCPD- and glycidyl esters can be mitigated in vegetable oils by use of short path distillation. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 118 (3):396-405. DOI: 10.1002/ejlt.201500095.
- Rahn AKK, Yaylayan VA. 2011. What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation?. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 323-329. DOI: 10.1002/ejlt.201000310.
- Sadowska-Rociek A, Cieřlik A. 2016. Changes of 3-monochloropropane-1,2-diol levels in crackers and biscuits during storage. *J Verbrauch Lebensm.*, 11:317–324. DOI: 10.1007/s00003-016-1040-6.
- Samaras VG, Giri A, Zelinkova Z, Karasek L, Buttinger G, Wenzl T. 2016. Analytical method for the trace determination of esterified 3- and 2-monochloropropanediol and glycidyl fatty acid esters in various food matrices. *J Chromatogr A.*, 1466: 136-147. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.08.071.
- Sato H, Kaze N, Yamamoto H, Watanabe Y. 2013. 2-Monochloro-1, 3-propanediol (2-MCPD) dynamics in DGF standard methods and quantification of 2-MCPD. *J Am Oil Chem Soc.*, 90 (8): 1121-1130. DOI: 10.1007/s11746-013-2264-6.
- Schilter B, Scholz G, Seefelder W. 2011. Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 309-313. DOI: 10.1002/ejlt.201000311.
- Seefelder W, Varga N, Studer A, Williamson G, Scanlan FP, Stadler RH. 2008. Esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. *Food Addit Contam.*, 25(4): 391-400. DOI: 10.1080/02652030701385241.
- Shimizu M, Moriwaki J, Shiiba D, Nohara H, Kudo N, Katsuragi Y. 2012. Elimination of glycidyl palmitate in diolein by treatment with activated bleaching earth. *J Oleo Sci.*, 61(1): 23-28. DOI: 10.5650/jos.61.23
- Stadler RH. 2015. Monochloropropane-1, 2-diol esters (MCPDEs) and glycidyl esters (GEs): an update. *Current Opinion in Food Science* 6: 12-18. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.11.008.
- Sunahara G, Perrin I, Marchesini M. 1993. Carcinogenicity study on 3-monochloropropane-1,2- diol (3-MCPD) administered in drinking water to Fischer 344 rats. *Research & Development, Switzerland, Report No. RE-SR93003.*
- Strijowski U, Heinz V, Franke K. 2011. Removal of 3-MCPD esters and related substances after refining by adsorbent material. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 387-392. DOI: 10.1002/ejlt.201000323.
- Svejkovska B, Novotny O, Divinova V, Reblova Z, Dolezal M, Velisek J. 2004. Esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in foodstuffs. *Czech J Food Sci.*, 22(5): 190-196.
- Unnithan UR. 1999. U.S. Patent No. 5,932,261. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Velisek J, Davidek J, Kubelka V, Bartosova J, Tuckova A, Hajšlova J, Janicek G. 1979. Formation of volatile chlorohydrins from glycerol (triacetin, tributyrin) and hydrochloric acid. *Food Sci Tehnol-Leb.*
- Weißhaar R. 2008. Determination of total 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 110(2): 183-186. DOI: 10.1002/ejlt.200700197.
- Weißhaar R, Perz R. 2010. Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 112(2): 158-165. DOI: 10.1002/ejlt.200900137.
- Weißhaar R. 2011. Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence and exposure estimates. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 113(3): 304-308. DOI: 10.1002/ejlt.201000312.
- Wenzl T, Samaras V, Giri A, Buttinger G, Karasek L, Zelinkova Z. 2015. Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food. *EFSA Supporting Publications*, 12 (3).
- Wöhrlin F, Fry H, Preiss-Weigert A. 2011. Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils. *Second Collaborative Study—Part I. Method Validation and Proficiency Test.*
- Yamazaki K, Ogiso M, Isagawa S, Urushiyama T, Ukena T, Kibune N. 2013. A new, direct analytical method using LC-MS/MS for fatty acid esters of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD esters) in edible oils. *Food Addit Contam A.*, 30(1): 52-68. DOI: 10.1080/19440049.2012.713031.
- Zelinková Z, Svejková B, Velíšek J, Doležal M. 2006. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1, 2-diol in edible oils. *Food Addit Contam.*, 23(12): 1290-1298. DOI: 10.1080/02652030600887628.
- Zelinková Z, Novotný O, Schůrek J, Velíšek J, Hajšlová J, Doležal M. 2008. Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. *Food Addit Contam.*, 25(6): 669-676. DOI: 10.1080/02652030701799375.
- Zelinková Z, Doležal M, Velíšek J. 2009. 3-Chloropropane-1, 2-diol fatty acid esters in potato products. *Czech J Food Sci.*, 27: 421-424.
- Zwagerman R, Overman P. 2015. A novel method for the automatic sample preparation and analysis of 3-MCPD-, 2-MCPD-, and glycidylesters in edible oils and fats. *Eur J Lipid Sci Tech.*, 118: 997–1006. DOI: 10.1002/ejlt.201500358.