

## Spôsoby metylácie vyšších mastných kyselín

ŠTEFAN SCHMIDT – MILAN KOVÁČ

**Súhrn.** Predložená práca poskytuje prehľad metód alkylácie mastných kyselín a iných lipidov pre GLC analýzu. Súčasťou práce je naznačenie problémov pri aplikácii jednotlivých metód, ktoré sú rozdelené do skupiny protonicky a bázičky katalyzovaných esterifikačných a preesterifikačných reakcií, reakcií s diazometánom a metylácie aplikáciou kvartérnych amóniových solí. V závere sa naznačujú najoptimálnejšie možnosti preesterifikácie v československých podmienkach.

Pri analýze mastných kyselín plynovou chromatografiou sa dáva prednosť analýze ich metylesterov pred analýzou voľných mastných kyselín. Teplota varu mastných kyselín (MK) rastie so stúpajúcim počtom uhlíkových atómov v reťazci. Pri atmosferickom tlaku a zvýšených teplotách sú stále iba MK s počtom uhlíkov do C<sub>8</sub> (kyselina kaprylová), vyššie mastné a nenasýtené kyseliny sa už rozkladajú. Metylestery mastných kyselín majú nižšiu teplotu varu, nerozkladajú sa a umožňujú prácu pri nižších teplotách kalónového priestoru plynového chromatografu. Tým sa vylučujú zároveň nepriaznivé korozívne vlastnosti voľných mastných kyselín. Pri príprave metylesterov mastných kyselín možno použiť tieto základné reakčné postupy:

- a) protonicky katalyzovaná esterifikácia, resp. preesterifikácia,
- b) bázičky katalyzovaná preesterifikácia,
- c) reakcia s diazometánom,
- d) metylácia použitím kvartérnych amóniových solí.

Esterifikačné reakcie všetkých typov musia byť katalyzované, pričom druh katalyzátora podmieňuje rýchlosť a reakčnú teplotu reakcie. V špeciálnych prípadoch sa používa kombinácia prvých dvoch reakčných postupov [1], derivatizuje sa v mikroautokláve [2], prípadne sa pripravujú estery s vyššími

---

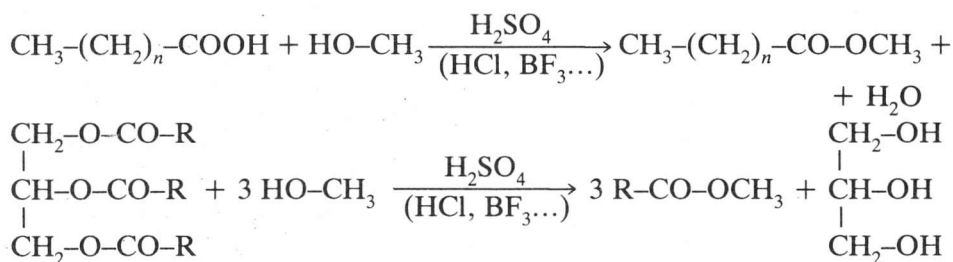
Ing. Štefan Schmidt, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Milan Kováč, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

nízkomolekulovými jednosýtymi alkoholmi, najmä butylestery mastných kyselín [3]. Pokiaľ je to nevyhnutné, metylestery MK sa analyzujú v deň prípravy a skladujú za nízkych teplôt pod inertným plynom, najlepšie v zatavenej sklenej ampulke. Modernejšie prístupy využívajú pyrolytickú derivatizáciu triacylglycerolov a mastných kyselín priamo v nástrekovom priestore plynového chromatografu účinkom alkylačných činidiel, predovšetkým na báze kvartérnych amóniových hydroxidov [4, 5].

### Protonicky katalyzovaná esterifikácia, resp. preesterifikácia

Voľné mastné kyseliny sa esterifikujú a glycerolipidy preesterifikujú zahrevom s veľkým prebytkom bezvodného metanolu v prítomnosti kyslého katalyzátora. Karbonylové skupiny sú relatívne málo reaktívne v určitých podmienkach, a preto napríklad karboxylové kyseliny reagujú s alkoholmi pomaly. Pridaním silnej kyseliny (kyselina sírová, bezvodý chlorovodík, sulfónové kyseliny, Lewisove kyseliny) sa esterifikácia výrazne urýchľuje.



Veľmi často sa tuk alebo olej najprv zhydrolyzuje (zmydelní) a po uvoľnení voľných mastných kyselín vzniknutých zo solí (mydiel) minerálnou kyselinou sa uskutočňuje priama esterifikácia metanolom.

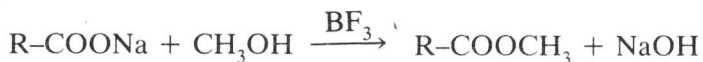
*Hydrolyza tuku a esterifikácia za katalýzy minerálnou kyselinou.* Opísané postupy sú výhodné predovšetkým v tých prípadoch, keď frakcie lipidov obsahujú veľké množstvo „nezmydeľniteľných“ látok, ktoré by pri príprave metylesterov priamou konverziou (preesterifikáciou metanolom) prechádzali do vzorky a rušili analýzu. Pokiaľ sa analyzuje vzorka s obsahom krátkoreťazových mastných kyselín, môže sa nízkomolekulová frakcia oddeliť destiláciou vodnou parou. Vysokomolekulová frakcia sa potom analyzuje po prevedení na metylestery a nízkomolekulová frakcia sa buď analyzuje v podobe voľných mastných kyselín na polárnych stacionárnych fázach s prídavkom  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , buď sa derivatizuje na butylestery mastných kyselín. Bežná esterifikácia a izolácia

nízkomolekulových MK (do C<sub>8</sub>) vedie k stratám vzorky spôsobených ich rozpustnosťou vo vode a značnou prchavosťou.

Postupy využívajúce kyselinu sírovú sú zakotvené v ČSN 56 0059 a 46 1011 [6, 7]. Metanolová kyselina chlorovodíková (zvyčajne 5 % koncentrácie) sa jednoducho pripravuje prebublávaním plynného HCl cez bezvodný metanol. Plynný chlorovodík sa generuje postupným prikvapkávaním konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na príslušný chlorid (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) alebo konc. HCl. Typický príklad na esterifikáciu a preesterifikáciu metanolovou HCl je semimikropostup podľa Christieho [8].

*Príprava metylesterov katalyzovaná s Lewisovou kyselinou.*

Fluorid boritý, prípadne chlorid boritý sú najrozšírenejšie kyslé preesterifikačné katalyzátory, pretože okrem inertnosti k prostrediu najviac urýchľujú reakciu alkoholov s organickými kyselinami. Za veľmi miernych podmienok a v krátkom čase tvoria estery alifatických a aromatických kyselín. V prvej fáze reakcie vznikajú mydlá, ktoré sa v ďalšej etape esterifikujú metanolom za katalýzy fluoridom boritým. Takto vznikajú metylestery mastných kyselín v priebehu 10 minút. Straty nižších mastných kyselín, ktoré sú rozpustné vo vode, znížia sa pridaním roztoku chloridu sodného. Metylestery vznikajú podľa reakcie



Prípravu činidla a všetky ďalšie operácie treba vykonávať opatrne a v digestórii vzhľadom na vysokú toxicitu BF<sub>3</sub>! Dnes sa činidlo dodáva už komerčne vo forme 14 % roztoku BF<sub>3</sub> v metanole. Chlorid boritý je o niečo stabilnejší pri laboratórnej teplote ako BF<sub>3</sub>. Postupuje sa podľa ČSN 56 0059, v medzinárodnom meradle sa používa záväzný postup podľa IUPAC II.D.19 [9].

### Alkalicky katalyzovaná preesterifikácia

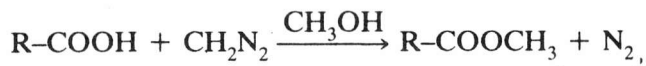
Pôsobením alkálie v metanole na estery mastných kyselín (glycerolipidy) sa tieto priamo preesterifikujú na metylestery. Ako bázičný katalyzátor sa najčastejšie používa metanolát sodný alebo draselný, prípadne hydroxid draselný. Roztok CH<sub>3</sub>ONa je stály pri laboratórnej teplote, reakcia je rýchla a úplná. Napríklad glycerofosfolipidy sa pri laboratórnej teplote kompletne preesterifikujú už za niekoľko minút. Katalytická účinnosť metoxidov alkalických kovov prevyšuje kyslé katalyzátory asi o tri poriadky. Preesterifikácia prebieha asi 1000-krát rýchlejšie ako zmydlenie, ktoré je na rozdiel od preesterifikácie nevratná reakcia. Výhodou preesterifikácie katalyzovanej metoxidom sodným je skutočnosť, že prítomnosť vody v reakčnej zmesi význam-

ne ovplyvňuje výťažnosť ani priebeh reakcie [10, 11]. Voľné masťné kyseliny s činidlom nereagujú, a preto pre vzorky s ich vyšším obsahom (napr. surové oleje) treba použiť kyslú katalýzu. Príslušný pracovný postup opäť uvádza ČSN 56 0059 a IUPAC II.D.19.

Pri menej rozpustných lipidoch (napr. estery cholesterolu a trinasýtené triacylglyceroly) treba zvýšiť ich rozpustnosť prídavkom ďalšieho rozpúšťadla, najlepšie toluénu alebo tetrahydrofuránu. Chlorofom je v tomto prípade nevhodný, pretože účinkom metoxidu sodného vzniká dichlórkarbén, ktorý môže reagovať s dvojíťmi väzbami nenasýtených masťných kyselín.

### Reakcia s diazometánom

Reakcia masťných kyselín s diazometánom je jedným z najrýchlejších spôsobov pre GLC analýzu masťných kyselín. Diazometán sa získava z komerčne dostupného *N*-metyl-*N*-nitrózo-*p*-toulénsulfoamidu (Diazald) alebo *N*-metyl-*N*-nitrózomočoviny



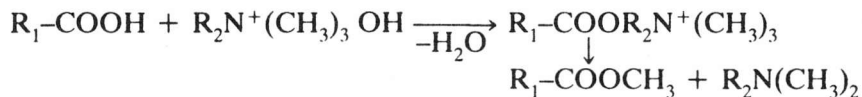
Činidlo sa obvykle pripravuje vo forme roztoku v dietyléteri reakciou alkálie s vhodným nitrózoamínom v prítomnosti alkoholu. Roztok je krátky čas v tme a chlade stály nad kryštalickým KOH, avšak dlhším skladovaním sa tvoria vedľajšie polymérne produkty, ktoré môžu interferovať pri GLC analýze masťných kyselín. Najviac sa používa postup podľa Schlenka a Gellermana [12].

Príprava metylesterov masťných kyselín s diazometánom je vhodná predovšetkým pri štúdiu vzniku stereoisomérov nenasýtených masťných kyselín, avšak práca s ním je veľmi nepríjemná aj nebezpečná. Diazometán je vysoko toxický a za určitých podmienok explozívny. Derivatizácia musí prebiehať v digestóriu za vylúčenia priamo dopadajúceho svetla v aparátúre bez sklenených zábrusov. Treba pripomenúť aj to, že nitrózoamíny patria medzi primárne karcinogény, čo podtrhuje nevyhnutnosť dodržiavania všetkých bezpečnostných predpisov.

### Použitie kvartérnych amóniových solí

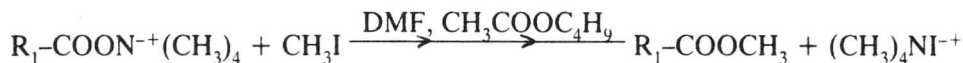
Okrem doteraz uvedených spôsobov metylácie vyšších masťných kyselín bolo v novej literatúre publikovaných niekoľko prác, v ktorých autori využili termické štiepenie metylamóniových solí masťných kyselín na prípravu ich

metylesterov podľa tejto schémy



kde  $\text{R}_1$  je ľubovoľný alkyl a  $\text{R}_2$  je  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Ph}$ , resp.  $-\text{CF}_3$   $-\text{Ph}$ .

Najbežnejšia reagentia, tetrametylamónium hydroxid je výrazne bázičné činidlo. Termickým rozkladom vznikajúcich tetrametylamóniových solí príslušných kyselín pri relatívne vysokej teplote dochádza k pyrolytickej metylácii kyselín. Nevýhodou tejto reakcie je možnosť izomerizácie a degradácie nenasýtených mastných kyselín [13]. Podobné správanie sa pozorovalo aj pri použití fenyiltrimetylamónium hydroxidu. Tento nedostatok odstraňuje metylácia vznikajúcej tetrametylamóniovej soli pomocou metyljodidu podľa reakčnej schémy:



pričom tetrametylamóniumjodid vypadáva z reakčnej zmesi [14]. Modifikáciou tetrametylamónium hydroxidu za (3-trifluórmetyl feny) trimetylamónium hydroxid, potláča sa, až zanedbáva izomerizácia a degradácia pri pyrolyze amóniových solí polynenasýtených mastných kyselín [4].

Použitím metanolového roztoku uvedeného činidla sa výrazne urýchľuje proces preesterifikácie acylglycerolov za priameho vzniku metylesterov mastných kyselín. Jednoduchosť uvedenej metódy metylácie mastných kyselín a glycerolipidov pomocou (3-trifluórmetylfenyl) trimetylamónium hydroxidu priviedla autorov Gerhardta a Gehrkeho [15] k úspešnému otestovaniu rýchleho stanovenia mastných kyselín v biologickom materiáli najrôznejšieho pôvodu.

### Artefakty pri príprave metylesterov mastných kyselín

Pri príprave a analýze metylesterov mastných kyselín plynovou chromatografiou môžu vzniknúť látky alebo javy (artefakty), ktoré čiastočne alebo úplne znehodnotia konečný výsledok analýzy.

Výťažnosť esterifikácie monokarboxylových kyselín alkoholom pri kyslej katalýze vzrastá od kyseliny metánovej (mravčej) po kyselinu butánovú (maslovej), od ktorej je vplyv dlhšieho C reťazca zanedbateľný. Zo všetkých alkoholov má metanol najväčší stupeň konverzie a najväčšiu počiatočnú rýchlosť.

Reakčná rovnováha v prospech vzniku esteru sa posunie odstraňovaním vody vzniknutej reakciou alebo veľkým prebytkom alkoholu alebo kyseliny. Protonicky katalyzovaná alkoholýza tukov a iných lipidov je teoreticky aj prakticky možná za rovnakých reakčných podmienok ako protonicky katalyzovaná esterifikácia mastných kyselín.

Fluorid boritý je napriek svojej toxicite veľmi rozšírený katalyzátor pre esterifikačných reakcií, najmä pre svoju účinnosť. Reagencia sa však aj v chlade zle skladuje a použitie staršej chemikálie spôsobuje tvorbu artefaktov a stratu obsahu predovšetkým polynenasýtených mastných kyselín. Straty stúpajú aj predlžovaním reakčného času a s vyššou koncentráciou katalyzátora (napríklad pri starších prácach sa odporúčala koncentrácia až 50 %  $\text{BF}_3$  v metanole. Pri alkoholýze triacylglycerolov a fosfolipidov sa získal pri GLS analýze metylesterov mastných kyselín neznámy pík s ekvivalentnou uhlíkovou dĺžkou 21,4 na polyesterovej fáze EGSS-X už po 30 min záhrevu na vriacom vodnom kúpeli. Táto frakcia, metoxymetylestery MK, predstavovala 25 až 30 % relatívnej hmotnosti z celkového množstva metylesterov MK a jej obsah vzrastal s dĺžkou a vekom činidla [16].

Chlorid boritý sa menej používa, napriek tomu, že v porovnaní s  $\text{BF}_3$  poskytuje určité výhody. Predovšetkým je takmer rovnako účinný ako fluorid boritý, dáva v menšej miere vedľajšie produkty a jeho metanolové roztoky (obvykle 12 %) sú stálejšie.

Esterifikácia a preesterifikácia lipidov katalyzovaná minerálnymi kyselinami vyžaduje dlhší záchrev, čo spôsobuje často straty najmä polyénových mastných kyselín. Konjugované nenasýtené mastné kyseliny môžu podliehať v prítomnosti metanolovej  $\text{HCl}$  *cis-trans* izomerizácii a migrácii dvojitej väzby a môže dôjsť aj k dehydrácii a ďalším nežiadúcim reakciám.

Postupy založené na zmydlení tuku vyžadujú dlhší záchrev pri teplote refluxu, čím vzniká nielen nebezpečenstvo strát polyénových mastných kyselín, ale aj kumulácie izolovaných dvojitých väzieb uhlíkového reťazca. Problematika sa vyjasnila zistením, že zmydlenie tuku spôsobuje najmä koncentrácia alkálií vo vode a preesterifikáciu tukov koncentrácia alkoxidu v alkohole. Zistilo sa, napríklad, že v roztoku hydroxidu sodného  $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  v etanole, obsahujúcom iba 1 % vody, je alkalita tvorená zo 4 % hydroxidom a z 96 % etoxidom sodným [17]. V bezvodom etanole klesá množstvo hydroxidu až na 0,8 % z celkového množstva alkálií.

Pri použití etanolom stabilizovaného chloroformu na extrakciu lipidov môžu pri metanolýze vzniknúť aj etylestery mastných kyselín. Elučné časy etylesterov kyseliny palmitovej a stearovej korešpondujú s elučnými časmi metylesterov kyseliny palmitolejovej a olejovej. Odporúča sa preto pred použitím zbaviť chloroform etanolu pretrepaním s vodou a po oddelení fáz chloroform predestilovať a vysušiť.

Pôsobením alkoxidov (alkálií) v metylalkohole pri vyššej teplote po dlhší čas na nenasýtené mastné kyseliny vzniká možnosť kumulácie dvojjitých väzieb. Izolované dvojité väzby kyseliny linolovej sa kumulujú pri zahrievaní na 80 až 100 °C s metanolovým KOH už za 45 minút [17]. Pri vyšších teplotách pôsobením metanolového KOH môžu vznikať aj polohové izoméry nenasýtených mastných kyselín.

Diazometán môže tvoriť z nenasýtených MK pyralozíny a pri metylácii hydroxymastných kyselín vznikajú metoxymetylestery mastných kyselín. Tieto deriváty môžu v hmotnostnej spektrometrii interferovať s trimetylsilylderivátmi metylesteroz týchto mastných kyselín. Adícii diazometánu na dvojlitú väzbu sa zabraňuje znížením jej polaritv. Vznik metoxymetylesteroz pri metylácii konjugovanvch izomeroz kyseliny linolovej sa zistil aj pri katalýze s  $\text{BF}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alebo  $\text{HClO}_4$ .

Nevýhodou priamej reakčnej preesterifikácie je potreba chemikálií z dovozu a vznik vody, ktorá pôsobí degradačne na polyesterové stacionárne fázy. Priama reakčná preesterifikácia kvartérnymi amóniovými solami je možná iba na zvlášť upravených silikónových elastoméroch [4].

Záverom možno konštatovať, že alkalicky katalyzovaná preesterifikácia je v našich podmienkach najvhodnejšou metódou prípravy metylesteroz mastných kyselín z tukov a iných lipidov (okrem MK) pre GLC analýzu. Za posledné obdobie poskytuje výborné výsledky metóda podľa Christophersonovej a Glassa [1], pretože metylácia prebieha dostatočne rýchlo a za teploty miestnosti. Metódy sme nepatrne upravili zmenou rozpúšťadla petroléteri za menej prchavý heptán (t. v. 98 °C), ktorý počas analýzy lepšie zabezpečuje optimálne koncentračné relácie. Z pyrolytických alkylačných činidiel dáva výborné výsledky trimetylsulfónium hydroxid [18], ktorý je účinnejší ako už spomenuté kvartérne amóniové hydroxidy, resp. soli, ale dá sa získavať tiež iba z dovozu.

## Literatúra

1. CHRISTOPHERSON, S. W. – GLASS, R. L., J. Dairy Sci., 52, 1969, s. 229.
2. PEISKER, K. V., J. Amer. Oil Chem. Soc., 41, 1964, s. 87.
3. MOLNÁR, I. P. – SZAKÁCS, M. P., Chromatographia, 17, 1983, s. 493.
4. McCREARY, D. K. – KOSSA, W. C. – RAMACHANDRAN, S. – KURTZ, R. R., J. Chromatogr. Sci., 16, 1978, s. 329.
5. METCALF, L. D. – WANG, C. N., J. Chromatogr. Sci., 19, 1981, s. 530.
6. ČSN 56 00 59. Stanovení kyseliny linolové a linolénové. Praha, ÚNM 1971.
7. ČSN 46 10 11. Stanovenie obsahu kyseliny erukovej v oleji. 29. Praha, ÚNM 1988.

8. CHRISTIE, W. W.: *Lipid Analysis*. Oxford – New York – Toronto – Sydney – Paris – Frankfurt, Pergamon Press 1982.
9. Iupac II.D.19. Preparation of the fatty acid methyl esters. Oxford – New York – Toronto – Sydney – Paris – Frankfurt, Pergamon Pressw 1976.
10. GLASS, R. L., *Lipids*, 6, 1971, s. 919.
11. KOMAN, V. – SCHMIDT, Š.: *Štruktúry lipidov vo vzťahu k ich výživovej kontrole a technologickej kvalite*. [Výskumná správa.] Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1985.
12. SCHLENK, H. – GELLERMAN, J. L., *Anal. Chem.*, 32, 1960, s. 1412.
13. BITNER, E. D. – LANSER, A. C. – DUTTON, H. J., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 51, 1971, s. 633.
14. SHEN, J., *Anal. Chem.*, 53, 1981, s. 475.
15. GERHARDT, K. O. – GEHRKE, C. W., *J. Chromatogr.*, 143, 1974, s. 335.
16. Bulletin 721 E, Supelco Inc., Bellefonte 1979.
17. BAŠE, J., *Prům. Potr.*, 31, 1980, s. 353.
18. BUTTE, W., *J. Chromatogr.*, 261, s. 142.

Do redakcie došlo 13. 12. 1989

## **Методы метилирования высших жирных кислот**

### **Резюме**

Предлагаемая работа дает перечень методов алкилирования жирных кислот и других липидов для GLS анализа. Частью работы является определение возможностей применения отдельных методов, которые розпределены в группы протонически и щелочно катализированных этерификационных и переэтерификационных реакций, реакций с диазометаном и метилирование применением четвертичных аммониевых солей. В заключении выделены самые оптимальные возможности переэтерификации в чехословацких условиях.

## **Methylation of higher fatty acids**

### **Summary**

The paper reviews the alkylation methods for fatty acids and other lipids for the GLC analysis. Also discussed are the problems in application of the individual methods which are classified to the group of protone and base catalyzed esterification and re-esterification reactions, reactions with diazomethane, and methylations with the use of quaternary ammonium salts. The optimum ways of re-esterification under Czechoslovak conditions are given in the conclusion.