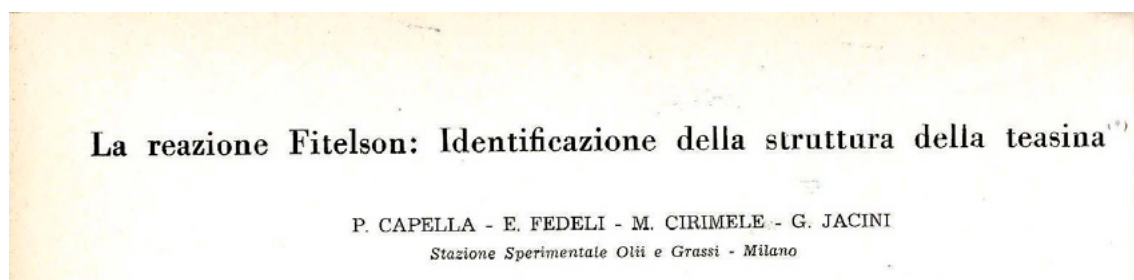
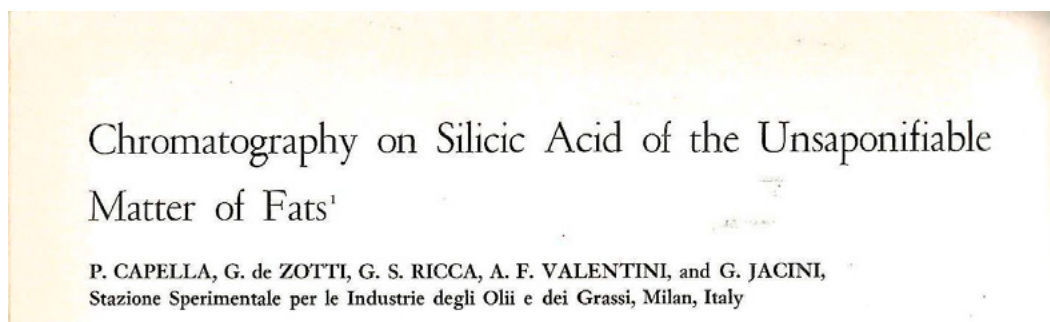


Pubblicazioni del passato commentate alla luce delle conoscenze odierne

Alcune storiche esperienze italiane sull'analisi dei componenti minori degli oli vegetali



La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, vol XL, 296 (1963)



The Journal of the American Oil Chemists' Society, vol 37, 564 (1960)

Una nota di

Lanfranco Conte e Paolo Bondioli

SISSG – Società Italiana per lo Studio delle Sostanze Grasse – Milano

✉ lanfrancoconte@gmail.com

L'analisi delle sostanze grasse, finalizzata alla verifica della purezza e della qualità ha vissuto una prima fase denominata "Chimica degli indici" in cui si effettuavano test ponendo la sostanza in esame in determinate condizioni e valutando se si comportasse come sostanze note, sia come aspetto fisico (es. formazione di precipitati), sia come aspetto cromatico, mediante lo sviluppo di determinate colorazioni, ma rimanendo in genere nel campo delle reazioni cromatiche e non colorimetriche. L'intensità della colorazione in genere non seguiva le leggi della spettrofotometria e il risultato era valutato in termini di POSITIVO/NEGATIVO, il primo talvolta preceduto dall'avverbio DEBOLMENTE.

La Tabella 1 riporta alcuni esempi di questi test; desideriamo qui porre l'attenzione sulla reazione, o test, di Fitelson per la ricerca dell'olio di the. Si tratta in questo caso di un interessante punto di congiunzione tra la "Chimica degli indici" e l'applicazione delle tecniche separative, cromatografiche ed in particolare gas cromatografiche, il cui sviluppo ebbe grande impulso nei primissimi anni '50, e che videro come campo applicativo di elezione, l'analisi dei lipidi. James e Martin [1] sono riconosciuti come inventori della gas cromatografia, nel 1952 descrissero la separazione degli acidi grassi da formico a dodecanoico. In seguito, Orr e Callen [2] svilupparono la separazione dei metil esteri di una serie molto più ampia di acidi grassi, con particolare attenzione ai C18 poliinsaturi.

Tabella 1 - Esempi di "Chimica degli indici" [3,4]

Anni	Test	Significato
1860-1870	Titolo degli acidi grassi	
	Numero di Henner	Acidi grassi "fissi" insolubili in acqua
1870-1890	Numero di acidità	Acidi grassi liberi
	Numero di Saponificazione	Quantità di acidi grassi
	Indice di Reichert-Meissl- Polenske	Acidi grassi fissi e volatili
1890-1920	Numero di Iodio	Numero di doppi legami
	Numero di Acetile	Numero di gruppi -OH
	Reazione di Heydenreich	Ricerca di olio di Colza, Mais, Mandorle
	Hauchecorne Reazione di Brullé	
	Numero di Kirchner	Quantità di acidi grassi volatili
	Indice di Bömer	Ricerca di grasso suino
	Metodo di Fahrion	Acidi grassi ossidati
1920-1940	Indice di Bellier	Differenziazione oli di oliva vs oli di semi o grassi animali
	Indici A e B	Sansa vs oliva vergini
	Indice di perossidi	Rancidità
	Numero di tiocianogeno (solfocianogeno)	Grado di insaturazione
	Test di Kreiss	Rancidità
	Stamm Test	Rancidità
	Test di Fitelson	Ricerca di Olio di the
	Reazione di Halphen	Ricerca di Olio di cotone
	Reazione di Villavecchia	Ricerca di Olio di sesamo
	Grado termo solforico	Ricerca di oli "siccativi"
	Indice di Maumenè	Analisi mediante acido solforico [5] Citato per olio di papavero [6]
Reazione di Tortelli & Ruggeri	Ricerca di olio di arachide (Acido Lignoceric)	

Capella et al nel 1963 [7] intrapresero una ricerca per identificare il o i composto/i responsabili della positività alla reazione di Fitelson, in considerazione, come si legge sotto, dei dubbi sollevati sulla sua attendibilità.

Sono note le polemiche suscitate dalla applicazione della reazione di Fitelson alla ricerca di adulterazione di olio di oliva mediante olio di thè. Alla base di queste polemiche sta senza dubbio l'assoluta empiricità della reazione. Infatti fino ad ora, pur essendo state studiate a fondo le condizioni migliori per condurre la reazione, nulla si sapeva circa la (o le) sostanze responsabili della reazione stessa. Né si sapeva se le sostanze Fitelson-positivo dell'olio di thè e dell'olio di oliva fossero o meno la stessa sostanza.

Dato il notevole interesse merceologico assunto da questa reazione, da alcuni anni presso la Stazione Sperimentale Olii e Grassi abbiamo iniziato una ricerca allo scopo di identificare la sostanza responsabile della reazione di Fitelson dell'olio di thè e di chiarire se tra la sostanza presente in alcuni olii di oliva — Fitelson-positivi — e la sostanza presente nell'olio di thè ci fosse identità o meno.

Tutta questa attenzione nei confronti dell'olio di semi di the (*Camelia sinensis*) può apparire strano al lettore dei nostri giorni, tuttavia al tempo, in considerazione dell'elevatissimo contenuto in acido oleico di questo olio e delle limitate potenzialità diagnostiche dei sistemi di controllo la commistione era tutt'altro che impossibile. Il saggio di Fitelson era realizzato aggiungendo cloroformio, anidride acetica e acido solforico al campione in esame. L'aggiunta provoca la formazione di una intensa colorazione fluorescente verde alla luce riflessa e bruna alla luce trasmessa, che diviene intensamente rossa per aggiunta di etere etilico anidro, quindi leggermente bruna. L'olio di oliva e gli altri oli commestibili mostrano un colore verde, mentre l'olio di semi di the, se presente, genera un colore rosso per aggiunta dell'etere etilico. L'olio di the si può ottenere per estrazione dei semi con una resa in olio che può raggiungere il 42%. Le poche notizie sulle sue caratteristiche sono riportate nel classico volume di Martinenghi (8): numero di iodio 77-81 (g I₂/100 g), numero di saponificazione 188-196 (mg KOH/g), insaponificabile 0,2-0,3%, principali acidi grassi saturi (11%), oleico (87%), linoleico (2%), massa volumica (15°C) 0,916-0,917, indice di rifrazione (20°C) 1,4691-1,4779.

Non deve essere infine confuso con il Tea Tree Oil (Malaleuca oil), olio essenziale non edibile estratto dalle foglie di *Malaleuca alternifolia*.

Già nel 1960, sempre Capella et al [9] avevano ottenuto il frazionamento dell'insaponificabile di diversi oli vegetali utilizzando una colonna cromatografica impaccata con silica gel ed avevano evidenziato la presenza di un composto tipico dell'olio di the, denominato "teasina", che risultò positivo al test di Fitelson e che era presente nella frazione degli alcoli terpenici.

This paper describes the isolation of unsaponifiables from fats and oils and the separation of this material into various components by elution chromatography on silicic acid columns. The elution is performed by a series of solvents or mixtures of solvents of increasing polarity and permits the quantitative isolation of the following series of components: The saturated hydrocarbons; the polyene hydrocarbons (squalene); the waxes; the esters of sterols; the aliphatic alcohols; a group of materials the nature of which will make up a separate paper, containing triterpene alcohols; the free sterols; and a group of substances still unidentified which may be alteration products.

Although the method was developed to study the unsaponifiables of extracted olive oil, it may also be applied to other fats and oils. The resolution of unsaponifiables containing compounds of a different chemical type from those listed will, of course, depend upon the functional group of the compounds, and application of the elution scheme will, in general, permit their separation. As an example of this, in the separation of teaseed oil unsaponifiables (Figure 7), we have isolated by our method a group of substances giving the so-called Fitelson reaction (11).

La cromatografia su carta evidenziò che in realtà nella frazione positiva al test di Fitelson erano presenti almeno 2 sostanze, come confermato dall'analisi gas cromatografica (Fig 1 del presente articolo, fig. 3 dell'articolo del 1963)

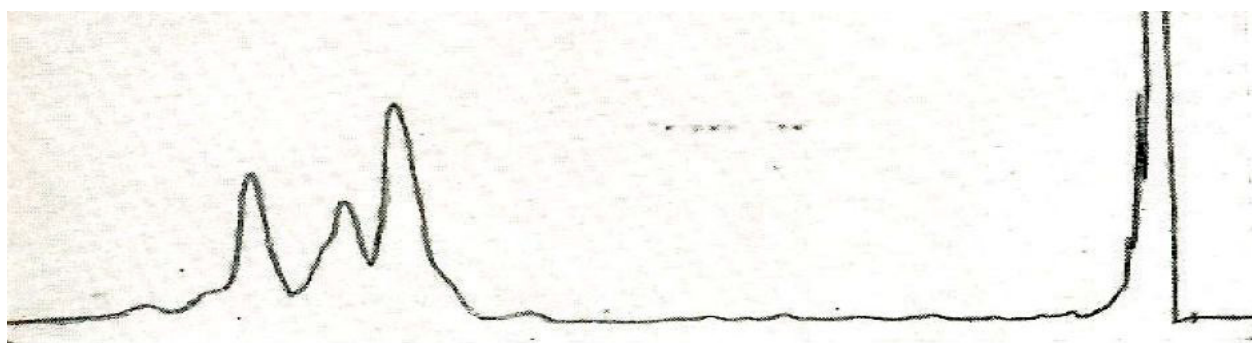


Fig. 1 (Fig 3/1963): Analisi gas cromatografica della frazione positiva al test di Fitelson

A questo punto, per un ulteriore approfondimento della natura di questi composti, venne intrapresa una classica strada della chimica preparativa applicata alle sostanze naturali, come riportato nel seguente paragrafo:

Cromatografando su colonna di allumina la miscela dopo acetilazione è stato possibile separare dalle frazioni di coda un acetato fondente a 235-237° che è stato successivamente identificato come acetil- β -amirina (I) in base all'analisi elementare, al potere rotatorio specifico e allo spettro I.R. Inoltre un campione autentico

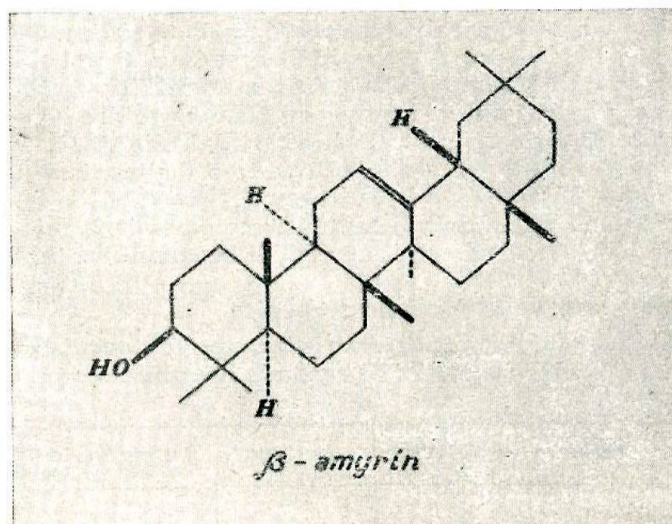


Figura 4

di β -amirina (Fig. 4) mostrò avere un tempo di ritenzione in gascromatografia uguale a quello del picco maggiore della miscela di triterpeni dell'olio di thè.

La β -amirina così purificata fu sottoposta al test di Fitelson che inaspettatamente risultò negativo! Gli Autori quindi proseguirono le indagini sulle altre frazioni:

Controllando la reazione di Fitelson sulle diverse frazioni della cromatografia degli acetati avevamo potuto constatare che le frazioni di testa davano una reazione più intensa delle frazioni di coda.

Abbiamo allora ripetuto più volte la cromatografia degli acetati raccogliendo ogni volta le teste e ricromatografandole separatamente.

Infine per cristallizzazione frazionata delle frazioni prive di β -amirina, dopo aver allontanato tracce di un alcool alifatico superiore, si è isolato un altro acetato con punto di fusione 140-141°C, che in gascromatografia dava un solo picco, con tempo di ritenzione uguale a quello del secondo picco della miscela grezza.

Va messo in evidenza il laborioso metodo seguito, tipico della operatività delle ricerche di allora che portò alla identificazione del butirrospermolo come "responsabile" della positività al test di Fitelson

Questo composto mostrava nettissima la reazione di Fitelson. L'identificazione di questa sostanza ci è stata facilitata da alcune considerazioni.

Innanzitutto un campione di cicloartenolo in nostro possesso e proveniente da lattice di una euforbicea dava una Fitelson nettamente positiva, mentre il cicloartenolo puro che abbiamo identificato tra gli alcoli triterpenici dell'olio di lino (3) non dà assolutamente la Fitelson.

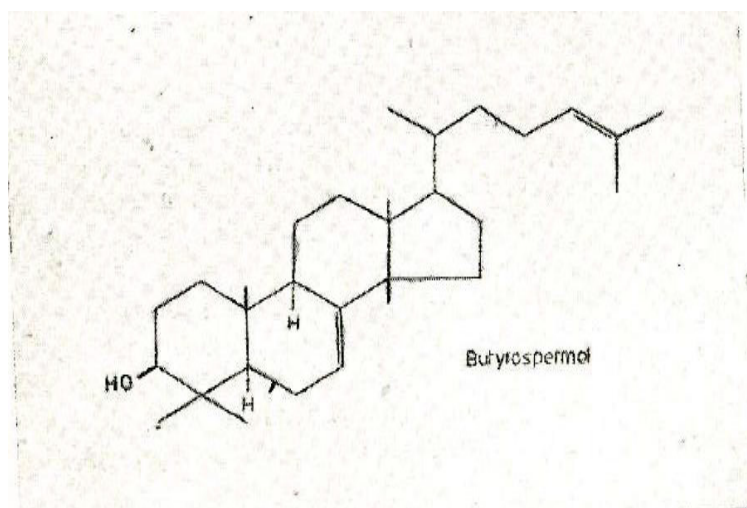
Avevamo constatato che l'insaponificabile del burro di karité dà una Fitelson molto intensa. E' anche noto che nelle euforbiacee sono contenuti alcuni alcoli triterpenici della serie dell'eufano quali l'eufolo e l'eufobolo e che, d'altra parte, dal burro di karité è stato isolato da Halsall un altro alcool triterpenico di questa serie, il butirrospermolo.

Confrontando i dati chimico-fisici della teasina con quelli dei triterpeni della serie dell'eufano si può constatare che corrispondono perfettamente con quelli riportati per il butirrospermolo (tabella 1).

TABELLA 1

	Teasina	Eufolo	Butirospermolo	Tirucallolo	Eufobolo
p. f.	142	109	146,5-147,5	163,5	121-122 124-125
	+ 6,1	+ 41	+ 11	- 17	± 0
Analisi					
C	82,3	teor. 82,0	82,0	82,0	82,1
H	11,3	11,1	11,1	11,1	11,2

A questo punto, una volta identificato il composto suscettibile di reattività al test di Fitelson, gli Autori si interrogano sul perché essa sussista e ragionando sulla formula di questo componente, riportata da una loro figura:



Notarono che a differenza degli altri alcoli, esso presenta una catena laterale orientata in α , anziché in β , come avviene in tutti gli altri terpeni, tale caratteristica è comune all'eufenolo, anch'esso positivo al test.

Era quindi lecito ipotizzare che la "teasina", ritenuta responsabile della positività del test di Fitelson fosse il butirrospermolo, così come ogni altro terpene con catena laterale in 17 in configurazione α .

Un'ulteriore riflessione sulla osservata positività al test di Fitelson di alcuni oli d'oliva, indusse però i ricercatori a considerare la positività al test come concentrazione dipendente, ovvero, poiché piccole concentrazioni di alcoli terpenici e non di solo butirrospermolo sono presenti negli oli d'oliva, la osservata "leggera positività" sarebbe potuta dipendere dalla inferiore concentrazione di butirrospermolo in questi ultimi rispetto agli altri oli, ma anche dalla presenza di altri componenti non identificati nel corso di questo studio.

Il lettore avrà notato come in questo lavoro si sia posto l'accento su una classe di composti della frazione insaponificabile il cui studio fu in seguito piuttosto negletto, a parte alcuni articoli di Rutkowski et al (1966) [10], Itoh et Al (1974, 1981) [11,12] e di Lercker et Al (1981) [13], a favore della frazione degli steroli. Le esperienze "storiche" della ricerca italiana su questa classe di composti saranno oggetto di una seconda nota.

Bibliografia

- [1] Orr C., Callen J.F., Recent advances in the gas chromatographic separation of methyl esters of fatty acids *Annals of the New York Academy of Sciences*, 72, (13), 649-665, (1959)
- [2] Conte L., The evolution of analytical methods of fats and oils: the role of "La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse", *Riv Ital Sostanze Grasse*, 101, 254-258, (2024)
- [3] Villavecchia V., *Trattato di Chimica analitica applicata - Metodi e Norme per l'esame chimico ed il controllo dei principali prodotti industriali ed alimentari*, Vol II°, Ulrico Hoepli editore Milano, 1942, pp 626-632
- [4] Capella P., Fedeli E., Cirimele M., Jacini G., La reazione di Fitelson: identificazione della struttura della teasina *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, XL, 296-299, (1963)
- [5] G. B. Martinenghi: *Tecnologia chimica industriale degli oli, grassi e derivati*. Hoepli, Milano 1963
- [6] Capella P., De Zotti G., Ricca G.S., Valentini A.F., Jacini G., *Chromatography on Silicic acid of the unsaponifiable matter of fats*, (1960), *J. Amer. Oil Chem Soc*, 37, 564-567, (1960)
- [7] Rutkowski A., Jacini G., Capella P., Cirimele M., idrocarburi, alcoli triterpenici, e steroli dell'olio di colza, *Riv. Ital Sostanze Grasse*, XLII, 89-94, (1966)
- [8] Itoh T., Tamura T., Matsumoto T., Sterols, methylsterols and triterpene alcohols in three Theaceae and some other vegetable oils *Lipids*, 9, 173-184 (1974)
- [9] Itoh T., Yoshida K., Yatsu T., Tamura T., Spencer G.F., Triterpene alcohols and sterols of Spanish olive oil *JAOCs*, 58, 545-550, (1981)
- [10] Lercker G., Frega N., Capella P., Conte L., La gascromatografia su colonne capillari (HRGC) nello studio dell'insaponificabile degli oli vegetali *Riv.It. Sostanze Grasse*, 58, 324-330, (1981).