

29. Scipione ANSELMi e Riccardo MONACELLI. — L'insaponificabile delle sostanze grasse e la determinazione del contenuto in squalene. - Nota I.

Riassunto. — Dopo aver ampiamente escusso la letteratura riguardante l'assorbimento di iodio da parte dell'insaponificabile delle sostanze grasse e le varie deduzioni che da esso si possono trarre, gli Autori passano a studiare il metodo della determinazione del contenuto in squalene riportato dai « Methods of analysis A.O.A.C. 1945 ». In base ai loro dati sperimentali, ottenuti operando sullo stesso campione di olio di oliva, essi pervengono alla conclusione che il metodo, pur essendo rispondente allo scopo, debba essere ancora oggetto di studio per realizzare una tecnica che assicuri una stretta riproducibilità dei risultati.

Résumé. — L'importance des constituants de la matière insaponifiable dans les substances grasses a été mise en évidence par plusieurs auteurs qui se sont particulièrement occupés de cet argument. Bolton et Williams ont extrait la matière insaponifiable de plusieurs huiles et graisses animales et végétales, et y ont déterminé la quantité d'iode absorbée. Selon la quantité d'iode absorbée, ils ont divisé les substances grasses examinées en quatre catégories, et de leurs expériences il a résulté que l'huile d'olive était celle qui en absorbait une plus grande quantité, tellement, qu'elle a constitué une catégorie à elle seule. Plus tard, Thorbjarnarson et Drummond ont démontré que cette absorption d'iode aussi élevée était due à la présence de notables quantités de squalène. Cet hydrocarbure ($C_{30}H_{50}$), ayant six doubles liaisons, avait déjà été identifié par Tsujimoto dans l'huile obtenue de quelques espèces de squales.

Il surgit de là l'intérêt à établir des méthodes appropriées d'extraction et de dosage pour pouvoir obtenir avec toute la précision désirable la quantité de squalène contenue dans les diverses substances grasses, de façon à pouvoir en déduire un indice caractéristique donnant la possibilité de déceler toute addition éventuelle d'huiles végétales comestibles à l'huile d'olive et vice versa.

C'est ainsi que les AA. après avoir passé largement en revue la littérature ayant trait à cet argument, ont voulu étudier la méthode de dosage proposée par Fitelson et décrite dans les « Methods of Analysis A.O.A.C. 1945 ». Comme leur programme de travail comprenait des recherches étendues, les AA. ont eu le souci de contrôler si la méthode proposée donnait ou non des résultats toujours reproductibles, et dans ce mémoire préliminaire ils rapportent les résultats de leurs expériences effectuées, pour un but de comparaison, sur un échantillon d'huile d'olive produit dans la région italienne de la Pouille.

Les AA., sur la base des données expérimentales ainsi obtenues, arrivent à la conclusion que la dite méthode, tout en répondant d'une façon générale au but qu'elle se propose, doit encore former l'objet d'une étude approfondie afin de pouvoir réaliser une technique dont les résultats soient strictement reproductibles.

Summary. — The importance of the constituents of the unsaponifiable matter in fatty substances has been pointed out by several authors, who have particularly studied this subject. Bolton and Williams extracted the unsaponifiable matter from several animal and vegetable oils and fats, and determined therein the absorption of iodine. According to the quantity of iodine absorbed, they divided the fatty substances examined into four classes, and it resulted from their experiments that the unsaponifiable matter in olive oil was that which absorbed the largest amount of iodine, to such extent as to form a class by itself. Later on, Thorbjarnarson and Drummond ascertained that this high iodine absorption was due to the presence of a considerable amount of squalene. This hydrocarbon ($C_{30}H_{50}$), containing six double bonds, had already been identified by Tsujimoto in the oil obtained from some species of sharks.

Hence the interest was aroused to devise suitable extraction and determination methods whereby it might be possible to obtain with the utmost precision the quantity of squalene in the unsaponifiable matter of the various fatty substances, so as to be able to deduce a particular characteristic value, and therefore, to have the possibility of detecting any eventual addition of edible vegetable oils to the olive oil, and viceversa.

Consequently the AA., after carefully surveying the literature concerned, proceed to consider the determination method proposed by Fitelson and reported in «Methods of Analysis A.O.A.C. 1945». As the plan of their work included extensive investigations, the AA. were chiefly careful to ascertain whether the method proposed could give or not results that were always reproducible, and in this preliminary paper they report the results obtained from the various tests carried out by them, for comparison purposes, on a sample of oil produced in the Italian region of Puglia.

The AA., on the basis of the data thus experimentally obtained, come to the conclusion that the above method, though generally answering its purpose, should be subjected to further investigation, with a view to working out a technique whereby results may be surely considered as strictly reproducible.

Zusammenfassung. — Die Wichtigkeit der Bestandteile des Unverseifbaren der Fettstoffe ist von mehreren Verfassern hervorgehoben und als Studiengegenstand gewählt worden. Bolton und Williams haben das Unverseifbare aus vielen Tier- und Pflanzenfetten und Ölen abgeschieden

und die Iodabsorption bestimmt. Je nach der absorbierten Jodmenge haben sie die geprüften Fettstoffe in 4 Kategorien eingeteilt; aus ihren praktischen Versuchen ging hervor, dass das Unverseifbare des Olivenöles jenes war, welches die grösste Menge absorbierte, so dass dieses eine eigene Gruppe bildet. Später haben Thorbjarnarson und Drummond festgestellt, dass diese hohe Iodabsorption auf Anwesenheit einer bemerkenswerten Squalenmenge zurückzuführen ist. Dieser Kohlenwasserstoff ($C_{30}H_{50}$) der 6 Doppelbindungen aufweist, ist schon von Tsujimoto im Öl einiger Haifischarten identifiziert worden.

Daraus ersieht man die Bedeutung angemessene Extraktions- und Bestimmungsmethoden festzustellen, die es ermöglichen, die Squalenmengen im Unverseifbaren der verschiedenen Fettstoffe mit grösster Genauigkeit zu ermitteln, um eine charakteristische Anzeige entnehmen zu können, die es erlaubt eine eventuelle Zugabe von geniessbaren Pflanzenölen zum Olivenöl oder umgekehrt, zu suchen.

Nach einer weitläufigen Durchsicht der betreffenden Literatur, erwägen die V.V. die von Fitelson in «Methods of Analysis A.O.A.C. 1945» wiedergegebenen Bestimmungsmethode. Da ihr Arbeitsprogramm ausgedehnte Untersuchungen betraf, haben sie sich vor allem damit befasst die vorgeschlagene Methode auf stets reproduzierbare Ergebnisse zu kontrollieren. In dieser vorangehenden Mitteilung werden die, bei den verschiedenen Vergleichsuntersuchungen auf Ölproben aus Puglien erhaltenen Ergebnisse erläutert.

Auf Grund erhaltener experimenteller Ergebnisse schliessen die V.V., dass die Methode, obwohl sie dem Zweck entspricht, noch weiteren Beobachtungen unterworfen werden muss, um eine Technik zu erreichen, die eine strenge Wiedergabe der Ergebnisse erlaubt.

L'insaponificabile delle sostanze grasse è stato oggetto di studio da parte di molti autori, i quali hanno indirizzato le loro ricerche sia per trovare metodi pratici ed esatti per la sua separazione e determinazione, sia per identificare la sua composizione. Per quanto riguarda la sua separazione accenneremo solamente che ha molta importanza il solvente usato per l'estrazione. Infatti l'uso dell'etere solforico conduce a risultati maggiori di quelli che si ottengono usando invece etere di petrolio poichè alcuni componenti, i quali non sono solubili in questo ultimo solvente, rimangono conglobati nella massa saponosa. Questa diversità di risultati ha condotto la Commissione internazionale per lo studio dei grassi a descrivere la manualità sia del metodo all'etere di petrolio sia di quello all'etere solforico.

Ambedue questi metodi sono riportati nei « *Methodes unifiées pour l'analyse des matières grasses* » dell'« *Union Internationale de Chimie* » e vengono correntemente usati ⁽¹⁾.

Per quanto riguarda la identificazione della sua composizione uno dei mezzi d'indagine fu quello di verificare se esso assorbisse iodio o meno. In questo modo si poteva stabilire se vi era presenza di sostanze non sature e dalla quantità di iodio assorbita calcolare se le sostanze non sature fossero in prevalenza rispetto a quelle sature o viceversa. Fu potuto così stabilire che esso conteneva delle sostanze non sature del tipo steroli ed il quantitativo di essi variava secondo il grasso da cui proveniva. In base all'assorbimento di iodio da parte dell'insaponificabile estratto con etere di petrolio da vari olii e grassi sia animali che vegetali, E. R. Bolton e K. A. Williams ⁽²⁾ trovarono che, esprimendo tale valore, in analogia a quanto viene comunemente praticato nell'analisi delle sostanze grasse, in milligrammi di iodio assorbito da g 100 di insaponificabile, si poteva stabilire un carattere distintivo tale da poter dividere in più gruppi le varie sostanze grasse.

Essi pervennero alla seguente classificazione:

- 1) valore di iodio 60-80: olii e grassi animali e pochi grassi vegetali simili all'olio di cocco;
- 2) valore di iodio 90-96: olio di pesci e di animali marini e burro di cacao;
- 3) valore di iodio 117-124: olii e grassi vegetali
- 4) valore di iodio 197-206: olio di oliva.

Da questa classificazione si deduce che gli olii vegetali possiedono un insaponificabile che, dato il suo alto indice di iodio, denota un forte contenuto in composti non saturi. L'olio di oliva è quello che ne possiede più di tutti gli altri olii e poichè la quantità è così elevata gli autori hanno ritenuto di classificarlo in un gruppo a parte. Però questa classificazione non sembra in armonia con quanto essi asseriscono cioè che nelle sostanze grasse a più alto numero di iodio si trovi una quantità maggiore di insaponificabile a grande contenuto di steroli. Infatti se ciò fosse, un olio di sesamo che ha un numero di iodio medio di 108 oppure un olio di fegato di merluzzo che ha un numero di iodio medio di 150-170 dovrebbero avere un insaponificabile a forte contenuto di steroli; di conseguenza l'assorbimento di iodio dei rispettivi insaponificabili dovrebbe essere maggiore di quello di un olio di arachide, il cui numero di iodio è di 92-95. Invece, nella classificazione, troviamo che gli olii di pesce prendono posto nel secondo gruppo mentre l'olio di sesamo è compreso nella stessa cate-

(1) N.G.D. Stazione Sperim. Olii e Grassi, Milano, giugno 1942, p. 83.

(2) Analyst, 55, 5 (1930).

goria di quello di arachide. Questo fatto potrebbe essere spiegato ammettendo che l'insaponificabile di questi olii ad alto numero di iodio fosse superiore a quello degli altri olii a più basso numero di iodio e che gli steroli presenti si trovassero diluiti con altre sostanze sature, presenti anche esse nell'insaponificabile.

L'aver classificato l'olio di oliva in una categoria a parte ed avergli attribuito un numero di iodio dell'insaponificabile così elevato, tanto che per mezzo di esso si potesse svelare una sofisticazione con altri olii vegetali, richiamò l'attenzione di parecchi studiosi sull'argomento i quali, in seguito a loro esperienze, non poterono confermare in pieno quanto Bolton e Williams avevano asserito.

Così Loew ⁽³⁾, prendendo a base delle sue considerazioni le cifre riportate da Bolton, rileva che il numero di iodio dell'insaponificabile dell'olio di oliva non può essere preso come indice per svelare l'aggiunta di olio di semi all'olio di oliva, in quanto occorrerebbe che la sofisticazione fosse di non lieve entità per giungere a risultati positivi, entità che può essere svelata con metodi di indagine meno laboriosi. Occorrerebbe inoltre, essere sicuri che i dati trovati da Bolton e Williams non fossero soggetti a variazioni e che l'olio di oliva di qualsiasi provenienza ed in qualsiasi stato di raffinazione avesse sempre lo stesso numero di iodio dell'insaponificabile, la qual cosa non potè essere confermata dall'autore. Infatti, in sue esperienze su olio di oliva di varie provenienze, ebbe valori molto inferiori a quelli degli autori suddetti e che oscillavano fra 107-168. Anche per alcuni olii di semi trovò dati inferiori a quelli di Bolton e Williams. Così, pur non traendo conclusioni, Loew è del parere che simile argomento richieda ancora di essere studiato. La non costanza del numero di iodio dell'insaponificabile dell'olio di oliva, a secondo della provenienza, è messa in evidenza dai risultati ottenuti da Thorbjarnarson e Drummond ⁽⁴⁾ che ottennero le seguenti quantità: Palestina 255, Tunisia 194, Spagna 203, Turchia 263 e Italia 235. Alla stessa conclusione pervennero Ricca e Lamonica ⁽⁵⁾ i quali trovarono per l'olio prodotto in Calabria un numero di iodio dell'insaponificabile molto variabile (68-134) e posero in evidenza la non riproducibilità dei risultati nella determinazione dell'insaponificabile e di conseguenza del valore di assorbimento di iodio da parte di questo.

Cattaneo, Karman e Rosovski ⁽⁶⁾ in un accurato studio, confermano che il numero di iodio dell'insaponificabile estratto dall'olio di oliva è

⁽³⁾ Olii min., olii grassi e vernici, 3, 10 (1931).

⁽⁴⁾ Analyst, 60, 23 (1935).

⁽⁵⁾ Olii min., olii grassi e vernici, 12, 73 (1932).

⁽⁶⁾ Ann. Ass. Quim. Argentina, 33, 85 (1945).

superiore a quello dell'insaponificabile degli altri olii e grassi commestibili ma giungono alla conclusione che i risultati non sono costanti. Su otto campioni di olio di oliva di produzione argentina le cifre trovate variano da 132 a 240. In loro esperienze trovano che sottoponendo il grasso saponificato a successive estrazioni con etere di petrolio, la parte dell'insaponificabile che passa nella prima estrazione ha un numero di iodio maggiore delle successive, denotando così di essere più ricca di sostanze a maggior numero di doppi legami.

Per quanto tra i dati trovati da Bolton e Williams, da Loew, da Ricca e Lamonica, da Cattaneo, Karman e Rosovskj esistano sensibili differenze, pur tuttavia essi sono concordi nel mettere in rilievo che l'olio di oliva contiene un insaponificabile il cui numero di iodio è superiore a quello dell'insaponificabile degli olii di semi. Di qui l'interesse degli studiosi i quali indirizzarono le loro ricerche allo scopo di conoscere la composizione di questo insaponificabile che, per avere un così alto valore di assorbimento di iodio, doveva contenere una o più sostanze complesse a più doppi legami.

Così, Thorbjarnarson e Drummond riuscirono ad isolare 4 gruppi di sostanze trattando con alcool metilico l'insaponificabile estratto dall'olio di oliva. Da un insaponificabile grezzo, con un valore di iodio 255, fu separata una frazione insolubile in alcool metilico caldo avente un numero di iodio di 130 e per cristallizzazione frazionata dal solvente altre 3 frazioni che, rispettivamente, avevano un valore di iodio di 108, 181 e 342. Poichè la loro attenzione fu subito attratta dall'ultima frazione, essa fu separata dalle altre sciogliendo l'insaponificabile grezzo in una miscela formata da 90 parti di etere di petrolio (40-60° C) e 10 parti di benzolo e facendo passare il miscuglio lentamente attraverso una adatta colonna di ossido di alluminio. Il liquido raccolto, dopo avere attraversato la colonna, lasciò per evaporazione una sostanza con un numero di iodio di 345, corrispondente alla quarta frazione ottenuta nella cristallizzazione frazionata. Mentre nella colonna di ossido di alluminio si formarono quattro strati colorati corrispondenti alle altre frazioni isolate che furono esaminati spettrograficamente, la sostanza residuata dal solvente passato attraverso la colonna si presentava come un olio incolore ed inodore, che, lasciato in riposo, separò una sostanza solido-cerosa, che dopo una ricristallizzazione dall'alcool metilico non assorbiva iodio e che dall'analisi elementare si poté concludere trattarsi di idrocarburi saturi del tipo di quelli isolati da Sakai e Chibnal da sostanze vegetali e cioè una miscela di $C_{29}H_{60}$ e $C_{31}H_{62}$ con p. f. 63-64° C (7).

(7) Biochem. J., 26, 403 (1932).

La parte liquida così purificata, fu dagli AA. sottoposta a distillazione frazionata a pressione ridotta (0,08 mm), ottenendo un prodotto che distillò tra 170 e 190°, in prevalenza tra 187 e 190° C e che, sia in base all'analisi elementare sia in base ad analisi spettrografica, fu riconosciuto come squalene, quasi puro e dal quale ottennero il cloridrato ed il bromuro.

Questo idrocarburo fu descritto per la prima volta da Tsujimoto ⁽⁸⁾ il quale, studiando l'insaponificabile ottenuto da olio di pesci, riuscì ad isolare una sostanza alla quale per le sue caratteristiche chimiche e fisiche attribuì la formula $C_{30}H_{50}$ ed il nome di squalene in quanto esso era contenuto nell'olio estratto dal fegato degli squali. Successivamente lo stesso autore lo identificò nell'insaponificabile degli olii ottenuti da altre varietà di pesci.

Un idrocarburo, a cui fu attribuita la stessa formula, fu anche isolato nel corso di ricerche sull'insaponificabile estratto dall'olio di alcune varietà di squali, da Chapman ⁽⁹⁾ che, non conoscendo i risultati delle esperienze di Tsujimoto lo chiamò « Spinacene ».

Più tardi la denominazione fu unificata ed il composto ebbe il nome « squalene », e la sua struttura chimica fu chiaramente stabilita da Karrer e Helfenstein ⁽¹⁰⁾ i quali lo ottennero per sintesi partendo da due molecole di bromuro di farnesile. Così a questo idrocarburo fu definitivamente attribuita la formula $C_{30}H_{50}$ con 6 doppi legami.

Questo idrocarburo fu quindi identificato nell'olio estratto dal fegato di altri animali marini dallo stesso Tsujimoto ⁽¹¹⁾ e da Thorbjarnarson, Ruiz e Drumond ⁽¹²⁾ che lo isolarono con lo stesso metodo seguito per la separazione dall'insaponificabile dell'olio di oliva e da molti altri sperimentatori che si occuparono di olii di tale genere. La presenza di questo idrocarburo nell'insaponificabile contenuto nell'olio di oliva, dove in precedenza Sani ⁽¹³⁾ aveva identificato un idrocarburo non saturo a 3 doppi legami che chiamò « oleostene » e al quale attribuì la formula $C_{21}H_{36}$, richiamò l'attenzione degli studiosi i quali intravedero la possibilità di arrivare ad identificare con questo mezzo la presenza dell'olio di oliva negli olii di semi.

Però, vari furono i problemi che si presentarono e cioè studiare un metodo di separazione dello squalene dall'insaponificabile tale che desse risultati sempre riproducibili, stabilire se questo idrocarburo fosse presente negli olii di semi ed in quale quantità in modo da essere sicuri che

⁽⁸⁾ J. Soc. Chem. Ind., 9, 935 (1906).

⁽⁹⁾ Chem. Zentr., II, 153 (1917) e III, 56 (1917).

⁽¹⁰⁾ Helvetica Chim. Acta, 14, 78 (1931).

⁽¹¹⁾ J. Soc. Chem. Ind., 37, 312A, (1918).

⁽¹²⁾ Analyst, 60, 382 (1935).

⁽¹³⁾ Atti Accad. Lincei, 12, 238, (1930).

anche una minima aggiunta di olio di oliva ne aumentasse il contenuto in modo sensibile, ed infine controllare se l'olio di oliva di qualsiasi provenienza ed in qualsiasi stato di raffinazione contenesse o meno le stesse quantità di squalene. Grossfeld ⁽¹⁴⁾ studiò un sistema speciale per la separazione dell'insaponificabile consistente nell'estrarlo da 40 g di grasso per 6 ore in soxhlet con 250 cm³ di etere di petrolio. L'estrazione degli idrocarburi è praticamente completa e sono estratti circa il 90% di steroli. Dalle sue esperienze giunse alla conclusione che l'olio di oliva di recente estrazione contiene una quantità di squalene compresa fra 0,41 e 0,54% mentre quella ottenuta nell'olio di fegato oscilla fra 0,05 e 0,10%.

Täufel e Heinisch ⁽¹⁵⁾ estraggono l'insaponificabile esaurendo direttamente con etere di petrolio la soluzione idro-alcoolica saponosa, filtrano il liquido etero attraverso farina fossile calcinata per eliminare le impurezze. Sul residuo dell'estratto etero, essiccato a 105° C per un'ora, determinano l'assorbimento di iodio.

In base a questo dato e alla formazione di cristalli di esacloridrato, ottenuti sottoponendo, in determinate condizioni, a corrente di acido cloridrico secco la soluzione acetonica di altra parte del residuo, riconobbero la presenza di squalene solamente nell'olio di oliva, di soia, di germi di grano, di lievito, di lino, di noce e di fegato di merluzzo, benchè le loro ricerche fossero state condotte su 23 varietà di olii e di grasso.

Fitelson ⁽¹⁶⁾ mette in rilievo nei suoi studi che i metodi per l'isolamento e per la determinazione dello squalene riportati dalla letteratura sono laboriosi e poco soddisfacenti. Infatti essi debbono essere eseguiti su grande quantità di sostanza insaponificabile, la quale deve essere sottoposta a distillazione sotto vuoto ed a cristallizzazione frazionata, e pertanto non adatti allo scopo quando questo idrocarburo è presente in quantità molto piccola nel grasso. Così egli, applicando un suo metodo più semplice, ha potuto constatare la presenza di squalene in 6 sostanze grasse, la cui ricerca eseguita da altri autori risultò negativa. Ammette inoltre di non essere stato capace, come Khun e Gerhard ⁽¹⁷⁾ di ottenere la riproducibilità dei dati analitici seguendo il metodo di Grossfeld e Timm ⁽¹⁸⁾, i quali proposero di introdurre nell'analisi dei grassi il numero di squalene cioè la quantità di questo idrocarburo, dedotto dall'assorbimento di iodio, contenuto nell'insaponificabile di 100 g di sostanza grassa.

⁽¹⁴⁾ Z. Untersuch. Lebensm., 80, 434 (1940).

⁽¹⁵⁾ Biochem. Z., 303, 324 (1940) e 306, 123 (1940).

⁽¹⁶⁾ J. Assoc. of Offic. Agr. Chemists, 4, 405 (1943).

⁽¹⁷⁾ Chimie et Industrie, 48, 157 (1942).

⁽¹⁸⁾ Z. Untersch. Lebensm., 77, 249 (1939).

Il metodo proposto da Fitelson consiste essenzialmente nel saponificare la sostanza grassa in determinate condizioni, di estrarre l'insaponificabile con etere di petrolio e di filtrare, attraverso una colonna di ossido di alluminio per cromatografia di determinata lunghezza e preparazione, il liquido eterico. Sulla parte non assorbita, liberata dal solvente determina l'assorbimento di iodio con il metodo al solfato di piridina. La quantità di sostanza grassa da impiegare è di g 100 quando si vuole procedere alla identificazione dello squalene per formazione del suo esacloridrato e di g 5 quando se ne vuol determinare la quantità. Con questo metodo l'autore ha determinato lo squalene in parecchie varietà di sostanze grasse, sia animali che vegetali dimostrando così che esistono tra una sostanza grassa e l'altra forti differenze in contenuto di questo idrocarburo. Riteniamo opportuno riportare i dati analitici riguardanti quelle sostanze il cui contenuto in squalene fu determinato in parecchi campioni, tralasciando quelli la cui determinazione fu eseguita su di un solo campione poichè esso non può rappresentare una vera media analitica.

O l i o	Oliva	Cotone	Arachi- de	Grano	Soia	Girasole	The	Sesamo	Colza
N° dei campioni di Olio esaminati . . .	44	12	11	9	9	3	3	1	1
S q u a l e n e { mg/100 g di o l i o	massimo 708	12	49	36	17	19	16		
	minimo 136	4	13	19	7	8	8		
	medio 330	8	29	28	11	13	12	3	28

L'autore non constatò sensibili differenze nei risultati seguendo il metodo di estrazione S.P.A. ⁽¹⁹⁾ oppure quello di estrazione con etere di petrolio.

Data l'entità del contenuto in squalene dell'olio di oliva rispetto agli altri oli vegetali commestibili, l'A. ritiene che la determinazione di questo idrocarburo possa rappresentare un metodo di indagine per verificare se ad un olio di oliva è stato aggiunto un olio di semi e viceversa.

Alle stesse conclusioni giungono Philippe e Henrj ⁽²⁰⁾ i quali, in un dettagliato lavoro, espongono i risultati delle loro determinazioni eseguite su miscele di olio di oliva e di olio di semi. Essi usano un altro metodo per la determinazione dello squalene nelle sostanze grasse e, precisamente, saponificano g 5 di sostanza, estraggono l'insaponificabile con etere di petrolio e, dopo aver allontanato il solvente, sciolgono il residuo, preventivamente essiccato, in alcool assoluto.

⁽¹⁹⁾ Analyst, 58, 203 (1933).

⁽²⁰⁾ Lebensm. Hyg., 35, 94 (1944).

Titolano la soluzione iodometricamente secondo Margosche e la percentuale di squalene viene ottenuta moltiplicando per 0,06 il numero dei centimetri cubici di tiosolfato sodico N/10 risultanti dalla differenza tra quelli impiegati per la prova in bianco e quelli occorsi per la prova con la sostanza. Essi giungono, però, a risultati leggermente diversi da quelli ottenuti da Fitelson, in quanto ammettono, in linea generale, che la quantità di squalene presente nell'olio di oliva è di almeno il 0,3% mentre quello degli altri oli vegetali commestibili è meno del 0,1%.

Infatti su 7 campioni di olio di oliva ottengono cifre contenute fra 0,294 e 0,450%, in 5 campioni di olio di arachide fra 0,042 e 0,090%, nell'olio di cotone 0,066%, nell'olio di girasole su 3 campioni fra 0,072 e 0,090% e così per altre sostanze grasse il cui tenore in squalene si tiene al disotto del 0,1% ad eccezione dell'olio di balena e dell'olio di vinaccioli che risultano sorpassare tali cifre. Mentre Thorbjarnarson e Drumond riportano che il numero di iodio degli idrocarburi dell'insaponificabile dell'olio di oliva, i quali, dato il metodo di isolamento debbono identificarsi con la quantità di squalene in quanto recuperati dal solvente dopo il suo passaggio attraverso la colonna di ossido di alluminio, non subisce sensibili variazioni in dipendenza del luogo di origine poichè trovano le seguenti cifre: Turchia 364, Palestina 345, Tunisia 360, Spagna 374, Fitelson invece, riporta la seguente tabella

Regione di origine dell'olio	Spagna	Italia	Francia	Tunisia	Grecia	Marocco	Palestina	Turchia	U.S.A. California	Altre prove- nienze	
N° dei campioni di olio esa- minati	2	4	2	10	7	2	2	4	5	6	
Squalene mg/100g	{	404	518	388	258	431	370	708	278	448	435
di olio		402	225	381	136	316	352	475	230	159	305
		403	378	385	193	376	361	592	261	335	376

dedotta da sue esperienze, dalla quale appare evidente che il contenuto di questo idrocarburo varia in modo sensibile a secondo del luogo di origine e che, pur proveniendo dallo stesso Paese, si possono avere delle variazioni di non lieve entità. Anche gli oli vegetali commestibili contengono una quantità variabile di squalene.

In seguito alle esperienze di Fitelson il metodo da lui elaborato venne incluso nella VI ed. dei «Methods of Analysis A.O.A.C.» del 1945, pagina 506, come progetto per la ricerca dello squalene nell'olio di oliva. Successivamente esaurita la relativa inchiesta, nel 1948 veniva dichiarato ufficiale.

Poichè Philippe e Henrj hanno riportato delle esperienze con le quali vogliono dimostrare che dal contenuto di squalene si può arrivare

a stabilire se un olio di oliva è stato aggiunto di olio di semi o viceversa, abbiamo iniziato una serie di esperienze con lo scopo di giungere a confermare o meno tale possibilità, dato anche che Fitelson a tale riguardo concludeva che non si potevano ottenere risultati positivi. Inoltre dalla letteratura presa in esame, si può rilevare che il contenuto in squalene sia dell'olio di oliva sia dell'olio di semi non è un valore costante; infatti per l'olio di oliva Fitelson ammette dei valori compresi fra 0,1 e 0,7%; Grossfeld fra 0,41 e 0,54; il che ci porterebbe alle stesse conclusioni alle quali arrivarono Loew, Ricca ed altri per quanto riguardava questa ricerca basandola sul numero di iodio dell'insaponificabile. Prima, però, di iniziare lo studio sulle miscele, è nostro intendimento, onde avere dei dati sui quali basarsi, di procedere alla determinazione del contenuto in squalene dell'olio di oliva prodotto nelle varie regioni d'Italia per stabilire così i limiti entro i quali esso può eventualmente variare in dipendenza del luogo di origine e da tale indagine potrebbe anche essere ottenuto un dato analitico che potrebbe rappresentare un indice caratteristico dell'olio di oliva prodotto in una data zona.

Per l'applicazione di questo nostro programma di lavoro avevamo bisogno di accertare se il metodo impiegato conducesse sempre a risultati costanti e pertanto abbiamo iniziato le nostre ricerche eseguendo numerose determinazioni di contenuto in squalene sopra un campione di olio di oliva prodotto in Puglia. Riteniamo opportuno di riferire, in questa nota preliminare, i risultati raggiunti. Dato che le nostre esperienze non avevano altro scopo che quello di controllare la riproducibilità dei risultati, non ci siamo preoccupati dello stato di freschezza dell'olio, per quanto dalla letteratura risulti che la rancidità diminuisca il contenuto di questo idrocarburo⁽¹⁶⁻²¹⁾. Il nostro olio dava infatti positiva la reazione di Kreis per la rancidità. Nell'esecuzione della determinazione dello squalene, prima di sottoporre il residuo del solvente, passato attraverso la colonna di ossido di alluminio, all'azione dello iodio, abbiamo voluto determinarne il peso. Questo dato avrebbe potuto servirci per indicare se tutto il residuo fosse stato squalene o meno.

Nell'essiccazione sia dell'insaponificabile grezzo sia del residuo ottenuto dal solvente, abbiamo lasciato il prodotto in stufa a 105° C. fino a quando non si raggiungeva la costanza di peso. Così abbiamo potuto notare che il tempo di permanenza in stufa non era costante e abbiamo potuto rilevare che esso si aggirava intorno alle 10-12 ore. Un'ulteriore permanenza in stufa non ci indicò alterazioni di prodotto in quanto si ottenne lo stesso peso anche lasciando che l'essiccazione durasse oltre

(21) Ann. Ass. Quim. Argentina, 33, 110 (1945).

24 ore. Il metodo seguito fu quello riportato nei « Methods of analysis A.O.A.C. 1945 » usando per la determinazione dell'assorbimento di iodio la soluzione di Hanus invece di quella al solfato di piridina, perchè d'impiego più comune nei laboratori di analisi ed in quanto i risultati leggermente maggiori ai quali, secondo Fitelson, essa conduce non potevano recare alcun inconveniente allo scopo del nostro lavoro.

TABELLA I.

INSAPONIFICABILE ESTRATTO CON

E t e r e d i p e t r o l i o				E t e r e e t i l i c o		
	Grammi per g 100 di olio	Quantità di iodio assor- bita dall'ins. di g 100 olio	Quantità di iodio assor. da g 100 di ins.	Grammi per g 100 di olio	Quantità di iodio assorb. da l'ins. di g 100 olio	Quantità di iodio assorb. da g 100 d'ins.
1	0,62	1,20	193	1,28	0,66	51,56
2	0,60	1,17	195	0,98	0,68	67,61
3	0,62	1,20	193	0,90	0,74	82,2
4	0,74	1,39	187	1,52	0,84	55,26
5	0,56	1,10	196	1,20	0,70	58,33
6	0,78	1,57	201	1,14	0,70	61,40
7	0,64	1,26	196	1,20	0,70	58,33
8	0,70	1,33	190	1,40	0,84	60,—
9	0,64	1,28	200	1,44	0,84	58,3
10	0,75	1,46	194	—	—	—

Stimammo inoltre opportuno di determinare l'assorbimento di iodio sia sull'insaponificabile grezzo estratto con etere di petrolio sia su quello con etere etilico per stabilire le differenze che si avevano usando l'uno o l'altro solvente. I risultati ottenuti del contenuto in squalene sono dello stesso ordine di grandezza di quelli indicati dalla letteratura al riguardo per gli olii rancidi. La presenza di squalene nei residui fu identificata trasformando questo idrocarburo in esacloridrato, secondo il metodo riportato dai vari autori, ed eseguendo su questo prodotto sia il punto di fusione sia l'osservazione al microscopio.

L'influenza del solvente nei riguardi dell'estrazione dell'insaponificabile viene messa in evidenza dai dati ottenuti nelle due serie di esperienze riportate nella tabella I. Dal confronto di essi emerge che il peso del prodotto estratto con etere etilico non è proporzionale al rispettivo assorbimento di iodio mentre quello estratto con etere di petrolio, pur non essendo rigorosamente proporzionale, ha un andamento conforme al peso. Da ciò deriva la conferma che nell'etere etilico si sciolgono un numero maggiore di sostanze che nell'etere di petrolio.

Così mentre gli idrocarburi fortemente non saturi estratti con l'etere etilico si trovano diluiti con sostanze a minor numero di doppi legami o sature, l'estratto in etere di petrolio è invece costituito prevalentemente

mente da idrocarburi con un numero di doppi legami più o meno grande. Di conseguenza l'assorbimento di iodio è più forte nel secondo caso che nel primo.

Infatti mentre per un peso di insaponificabile estratto con etere di petrolio variante fra 0,56 e 0,78 si è verificato un assorbimento di iodio di 187-201; per un peso di insaponificabile estratto con etere etilico di 0,90-1,44 l'assorbimento di iodio fu di 51,55-82,2. Inoltre, poichè tutte le

TABELLA II.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Peso insaponificabile di g 5 di olio	0,031	0,028	0,043	0,032	0,034	0,035	0,032	0,031	0,033
Peso insaponificabile dopo passaggio attraverso ossido di alluminio	0,013	0,012	0,018	0,013	0,014	0,014	0,013	0,011	0,011
Jodio assorbito dall'insaponificabile di g 5 di olio dopo passaggio attraverso ossido di alluminio	0,029	0,026	0,040	0,028	0,032	0,030	0,028	0,025	0,025
N° di squalene. - Quantità di squalene dall'insaponificabile di g 100 di olio calcol. dalla quantità di iodio ass. dopo pass. attr. ossido alluminio	0,142	0,134	0,194	0,142	0,158	0,154	0,143	0,134	0,132
Quantità di iodio assorbita da g 100 insap. dopo passaggio attraverso ossido di alluminio	223	216	222	215	213	214	215	227	225
Quantità di squalene per g 100 di insapon. dopo passaggio attraverso ossido di alluminio	60,10	57,9	59,8	57,9	57,4	57,6	57,9	61,1	60,6
Quantità di insaponificabile che rimane assorbita dalla colonna di ossido di alluminio	0,018	0,016	0,025	0,019	0,019	0,021	0,019	0,020	0,022

determinazioni furono eseguite sullo stesso campione di olio, si è potuto osservare che i risultati ottenuti, pur variando entro limiti abbastanza ristretti, non rappresentano una rigorosa riproducibilità di dati. Da questa considerazione si può dedurre che il peso dell'insaponificabile che viene determinato con questi metodi, non rappresenta un dato rigorosamente preciso sul quale possa basarsi un metodo analitico d'indagine per la ricerca di un'eventuale aggiunta di altri olii. Queste variazioni di risultati non possono essere attribuite al fatto che abbiamo sottoposto il prodotto saponificato a sole tre estrazioni con solvente e non a 6-8 come suggeriscono Cattaneo, Karman e Rosovsky, perchè avremmo potuto ottenere dati inferiori a quelli effettivi e non diversi, in quanto la quantità totale di solvente usato fu uguale per tutte le esperienze eseguite.

Nella tabella n. II abbiamo riportato tutti i dati che si potevano dedurre dalle varie determinazioni per avere un quadro, il più possibilmente chiaro, del valore che si può attribuire al cosiddetto « numero di squalene ».

Anche per questo argomento, poichè i dati riportati provengono da uno stesso campione di olio, le deduzioni che si possono fare sono di non lieve interesse.

Così, prescindendo dalle escursioni trovate nel peso di insaponificabile proveniente da g 5 di sostanza grassa, abbiamo riscontrato delle differenze, sebbene di lievissima entità, fra i vari pesi dell'insaponificabile raccolto dopo il passaggio attraverso la colonna di ossido di alluminio. Queste differenze influiscono sensibilmente nel calcolo del numero di squalene dai milligrammi di iodio assorbiti dall'insaponificabile di g 100 di olio. Infatti da un minimo di 120 si passa ad un massimo di 190. Questi dati pur essendo inferiori a quelli ammessi dai vari autori per l'olio di oliva fresco rientrano in quelli riportati per l'olio di oliva irrancidito.

Abbiamo voluto calcolare dalla quantità di iodio assorbito da g 100 di insaponificabile il contenuto in idrocarburi presenti esprimendoli come squalene per vedere in quale percentuale esso incidesse sulla quantità totale. Abbiamo potuto così osservare che essa rappresenta circa il 60% dell'insaponificabile. Da ciò ne deriva che l'esprimere questo dato in squalene è improprio, in quanto oltre a questo idrocarburo, ve ne possono essere altri a minore o maggiore numero di doppi legami. Una tale denominazione può solamente avere un valore convenzionale.

La quantità di idrocarburi trattiene dalla colonna di ossido di alluminio, ottenuta dalla differenza di peso fra l'insaponificabile grezzo e quello trovato dopo il passaggio, fu separata lavando la colonna con cloroformio e si è potuto constatare che presentava un elevato assorbimento di iodio. Inoltre la colonna di ossido di alluminio sottoposta a luce di Wood non presentava formazione di strati a diversa fluorescenza.

In conclusione riteniamo che la determinazione del « numero di squalene » sia un dato importante per la caratterizzazione di un olio, ma il metodo, pur essendo in generale rispondente allo scopo, deve, secondo il nostro parere, basato sui dati sperimentali riferiti, essere oggetto di studio per realizzare una tecnica tale da poter ottenere una perfetta riproducibilità di dati.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica. 1° febbraio 1949.
