

F. MOGLIE, D. PACETTI,
N.G. FREGA

Determinazione del profilo compositivo della frazione insaponificabile del caffè mediante GC/MS

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 11, N. 3, 162-169, 2009

TITLE
Characterization of the unsaponifiable matter of coffee by means of GC/MS

KEY WORDS
Unsaponifiable coffee fraction, GC/MS

PAROLE CHIAVE
Frazione insaponificabile del caffè, GC/MS.

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Indirizzo per corrispondenza:
Dr. ssa Deborah Pacetti
Dipartimento di Scienze degli Alimenti,
Università Politecnica delle Marche,
Via Breccie Bianche
60131 Ancona, Italia
E-mail: d.pacetti@univpm.it

Summary

The lipid fraction of green and roasted coffee beans can be considered as a fingerprint in order to characterize coffee varieties. In particular, the analysis of the unsaponifiable fraction plays a key role to characterize different varieties of green coffee and different commercial blends. Moreover, during the roasting process several components disappear while others are generated; the roasting temperature and time, as well as the blend characteristics can affect the unsaponifiable profile. The aim of this work was the study of the unsaponifiable fraction of green and roasted coffee obtained using two different roasting temperatures. Eight samples of green coffee, four arabica and four robusta coffee beans and their roasted derivatives obtained at different roasting temperatures, and four different coffee blends were studied. The analysis of the unsaponifiable fraction was performed with GC/FID (Gas chromatography/Flame ionization detection) and GC/MS (Gas chromatography/Mass spectrometry). The unsaponifiable lipid fractions of green, arabica and robusta coffee was characterised by the presence of several diterpenes such as kahweol, cafestol, 16-*O*-methylkahweol, and 16-*O*-methylcafestol. γ -Tocopherol, cholesterol, campesterol, 24-methylencholesterol, stigmaterol, β -sitosterol and cicloartenol were also identified. The roasting process generated the dehydrated kahweol, and cafestol derived products. In arabica coffee a neoformation diterpene called diterpene E was identified.

Riassunto

Lo studio della frazione lipidica del caffè verde e di quello torrefatto rappresenta un valido mezzo per caratterizzare le varietà di caffè (1, 2). In particolare, il profilo dei componenti insaponificabili delle polveri di caffè gioca un ruolo chiave nell'ambito della caratterizzazione delle varietà di caffè verde e quindi delle diverse miscele di polveri reperibili in commercio. Considerando che il profilo lipidico delle polveri di caffè può essere profondamente influenzato dalla temperatura e dal tempo di tostatura, il presente lavoro si pone come obiettivo lo studio della frazione insaponificabile del caffè verde e del corrispettivo tostato a temperature differenti, e di alcune miscele di polvere di caffè al fine di individuare eventuali modificazioni provocate dai processi di torrefazione e i componenti chimici ca-

ratteristici delle diverse varietà da utilizzare come marker nella caratterizzazione delle miscele commerciali. A tale scopo sono stati presi in esame otto campioni di caffè verde, quattro di varietà arabica e quattro di robusta, i corrispondenti campioni di caffè tostato a diverse temperature, e quattro miscele di polvere di caffè. La determinazione della composizione della frazione insaponificabile è stata effettuata mediante analisi GC/FID (Gaschromatography/Flame ionization detector) e GC/MS (Gaschromatography/Mass spectrometry). I risultati mostrano che la frazione insaponificabile dei campioni di caffè verde, sia di arabica che di robusta, è costituita da diterpeni (caveolo, cafestolo, 16-*O*-metilcaveolo, 16-*O*-metilcafestolo), γ -tocoferolo, steroli (colesterolo, campesterolo, sigmasterolo), alcoli triterpenici (cicloartenolo, 24-metilencicloartanolo) e da 4-metilsteroli (citrostadienolo). Dal confronto di tali tracciati con quelli dei corrispondenti campioni di caffè tostato, emerge che il profilo compositivo della frazione insaponificabile varia passando dal caffè verde a quello tostato, sia nel caso della varietà arabica che nel caso della robusta. Infatti, la tostatura, comporta la formazione di nuovi composti derivanti dalla disidratazione del caveolo e del cafestolo in entrambi i casi e, solo nell'Arabica la formazione di un nuovo diterpene (diterpene E).

Introduzione

Il caffè insieme al tè, è la bevanda più consumata al mondo dopo l'acqua (1-3). Il caffè, sia come pianta che come bevanda, ha le sue origini nei paesi dell'Africa Nord Orientale. Il suo consumo, all'origine circoscritto in quelle terre, si estese in tutto il mondo già dal XV secolo. Oggi il commercio del caffè è di tali proporzioni da essere, per importanza, secondo solo al grano.

In Italia il consumo procapite è di poco superiore ai 4 kg ed è in continuo aumento grazie ai suoi effetti

fisiologici e al suo piacevole gusto e aroma. Secondo recenti ricerche l'assunzione di moderate quantità di caffè (due-quattro tazze al giorno) genera effetti benefici all'organismo (4).

Le due principali specie di caffè in commercio sono la *Coffea arabica* L., denominata semplicemente arabica, e la *Coffea canephora*, denominata robusta. Le due specie presentano differenze nella loro composizione, sia qualitative che quantitative: la robusta contiene più caffeina ed acidi clorogenici, mentre l'arabica, considerata una delle varietà più pregiate, contiene

più lipidi e una quantità dimezzata di caffeina (1).

Le caratteristiche organolettiche e commerciali del caffè sono per lo più legate al tipo di caffè, alla qualità dei semi verdi, alla tecnologia di torrefazione ed al contenuto di caffeina (2). Lo studio della composizione del caffè è un mezzo utile per caratterizzare e differenziare le sue varietà. Durante la tostatura molti composti si trasformano, alcuni scompaiono e altri si formano. In fase di tostatura il chicco di caffè perde alcune sostanze organiche con formazione di CO₂, aumenta il suo volume di

1/3 e perde dal 18 al 22% del suo peso.

Il presente lavoro si pone come obiettivo lo studio della frazione insaponificabile del caffè verde e del corrispettivo tostato a temperature differenti e di alcune miscele di polvere di caffè. Lo scopo è quello di valutare le modificazioni provocate dai processi di torrefazione ed individuare i componenti chimici caratteristici delle diverse varietà, da utilizzare come marker chimico nella caratterizzazione delle miscele reperibili in commercio.

Materiale e metodi

Frazionamento dei componenti insaponificabili

Sono stati presi in esame otto campioni di caffè verde, quattro di varietà arabica e quattro di robusta; ogni campione è stato sottoposto a 2 diversi processi di tostatura T1 e T2 (Tab. 1). Sono state inoltre analizzate quattro miscele di caffè, la cui composizione è indicata in tabella. La frazione lipidica è stata ottenuta mediante estrazione a caldo con esano per 6 h (sistema Soxhlet). 1 g dell'estratto lipidico è stato addizionato di 1 mg di squalano e sottoposto a saponificazione secondo la procedura prevista nelle Norme Grassi e Derivati NGD C-12 (5). Il frazio-

Tabella 1 - Campioni di caffè verdi utilizzati nella sperimentazione

Campioni	Tostatura 1		Tostatura 2	
	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura (°C)	Tempo
Arabica				
Guatemala	180	14 min 30 sec	202	8 min
Repubblica Dominicana	177	13 min 30 sec	195	8 min
Santos del Brasile	176	14 min 30 sec	202	8 min
Colombia	176	18 min 30 sec	196	8 min
Robusta				
Cherry India	179	15 min 15 sec	201	8 min
Vietnam	186	14 min 30 sec	193	8 min
Costa D'Avorio	171	14 min 00 sec	195	8 min
Parchment India	162	13 min 00 sec	192	8 min

nemento delle principali classi lipidiche è stato eseguito mediante cromatografia su strato sottile (TLC-Thin Layer Chromatography) utilizzando come fase mobile esano:etere etilico (60:40 v/v) e come fase stazionaria gel di silice (60G DC-Fertigplatten DURASIL-25 20x20x0,25 silice gel 60, Macherey-Nagel GmbH & Co, Duren-Germania). Le bande sono state visualizzate per mezzo di una soluzione etanolica al 96% di 2,7'-diclorofluorescina e osservate sotto luce UV a 254 nm e 366 nm. Il corrispondente estratto di ogni banda, ottenuto con etere di etilico, e la frazione insaponificabile totale, sono stati silanizzati seguendo il metodo di Sweeley et al. (6) e utilizzati per l'analisi gascromatografica.

Analisi GC-FID

L'analisi GC-FID è stata eseguita utilizzando un gascromatografo Carlo Erba 5300 HRGC equipaggiato con colonna capillare di silice (TAP, 25 m x 0,25 mm di diametro interno Chrompack, Inc., Raritan, N.J., USA). Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio con flusso in colonna di 0,8 ml/min, rapporto di splittaggio 1:80 (v/v) e una pressione in entrata di 100 kPa. La temperatura dell'iniettore e del FID è stata impostata a 330°C; il programma di temperatura del forno partiva da 200 e raggiungeva 300°C con una velocità di 3°C/min. L'identificazione dei singoli componenti è avvenuta per comparazione dei tempi di ritenzione con quelli di standard reperiti in commercio.

Tabella 2 - Composizione della frazione insaponificabile (mg/100 g di grasso) del caffè verde (V) e del caffè tostato (T1-T2) varietà arabica e robusta

	Arabica						Robusta																	
	Guatemala		Colombia		S. Brasile		S. Domingo		Cherry India		Parchment India		Costa d'Avorio		Vietnam									
	V	T2	V	T2	V	T2	V	T2	V	T2	V	T2	V	T2	V	T2								
Polidissiratazione caweolo	793	342	10570	260	314	592	279	401	0	4	0	2	4	4	5	2								
Polidissiratazione cafestolo	9333	354	13410	319	320	589	180	247	124	193	124	188	256	266	139	204								
Caweolo	3957	1843	3393	2006	148673	2666	2295	1159	2576	2893	2395	3357	34	18	95	913	18	38	37	27	41	123	37	24
Cafestolo	3379	983167	2615	1519	149139	2382	2539	1865	1118	2533	1049	1603	1580	706	1132	1372	636	1037	2589	1117	1344	1443	509	860
16-O-metilcaweolo	52	1569	57	461	2532	31	398	196	149	640	181	69	72	10	26	19	14	14	47	16	20	31	39	16
Diterpene E	1689	175	596	41	90	631	40	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-O-metilcafestolo	65	2380	222	402	1030	46	311	166	488	300	50	25	1338	178	664	874	426	513	1110	535	804	486	690	504
γ-tocoferolo	26	0	0	37	4190	0	13	33	19	45	71	11	27	12	0	57	14	51	31	14	13	25	16	40
Colesisterolo	0	0	2	4	1183	0	27	143	0	20	0	0	57	5	13	5	10	2	42	4	2	18	14	4
Campesterolo	122	4263	163	59	8297	72	67	84	140	83	116	73	159	85	142	205	94	137	161	144	140	181	128	152
24metilcolesterolo	0	0	5	0	5	0	0	0	3	0	0	0	27	10	28	15	10	9	6	21	11	24	8	12
Stigmasterolo	1567	5101	192	79	8803	101	115	124	189	110	164	124	298	119	207	323	149	221	195	181	168	263	193	230
β-sitosterolo	348	11636	403	210	20039	243	285	273	453	259	350	287	612	219	377	586	261	368	480	419	406	508	341	469
Δ ⁵ -avenasterolo	58	381	15	16	1296	15	17	15	29	35	24	21	130	68	111	88	79	101	124	123	109	152	90	135
Cicloartenolo	80	2210	119	30	3749	34	42	49	64	43	63	54	100	42	62	108	29	48	85	64	57	70	40	58
24-metilcicloartenolo	62	2608	106	19	48165	35	53	49	65	31	18	47	27	50	75	163	39	64	102	82	66	28	52	75
Citrostadienolo	16	384	21	2	1676	11	6	14	12	18	16	13	20	10	18	18	14	12	26	19	16	28	11	18

Tabella 3 - Composizione (% relativa) della frazione insaponificabile delle miscele

	Miscele			
	R (60% arabica 40% robusta)	8 (50% arabica 50% robusta)	D (20% arabica 80% robusta)	M (80% arabica 20% robusta)
Prod. Disidr. Caveolo	5.5±0.4	5.2±0.9	2.3±0.2	5.6±1.4
Prod. Disidr. Cafestolo	6.5±0.1	7.3±0.8	5.1±0.6	5.8±1.4
Caveolo	33.6±1.1	29.1±1.1	19.3±1.6	39.8±1.8
Cafestolo	32.1±0.2	29.7±1.4	31.9±1.3	31.3±1.2
16-O-metilcaveolo	0.2±0.3	0.6±0.1	0.5±0.2	1.0±0.8
Diterpene E	0.5±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1	0.5±0.1
16-O-metilcafestolo	6.0±0.9	8.4±0.8	16.9±1.1	3.5±0.6
Colesterolo	0.7±0.1	-	-	0.4±0.6
g-tocoferolo	-	0.7±0.2	1.1±0.4	0.7±0.9
Campesterolo	1.8±0.1	2.2±0.5	2.1±0.5	1.0±0.9
24-metilencolesterolo	1.5±0.4	2.6±0.9	2.0±0.5	1.3±1.6
Stigmasterolo	2.2±0.3	2.4±0.4	1.1±1.7	1.2±1.5
β-sitosterolo	6.2±1.0	2.4±0.4	4.7±1.2	4.3±1.6
Δ ⁵ -avenasterolo	0.6±0.0	4.9±0.5	7.4±0.5	0.6±0.2
Δ ⁷ -avenasterolo	0.1±0.1	1.2±0.3	1.8±0.6	0.4±0.4
Cicloartenolo	0.7±0.1	0.8±0.1	1.2±0.7	0.4±0.2
24metilencicloartanololo	1.0±0.2	0.9±0.1	1.5±0.6	0.9±0.3
Citrostadienolo	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.1±0.1

*Quantità calcolata in base alle relative aree GC

Per le sostanze di cui non si disponeva dello standard si è fatto riferimento ai tempi di ritenzione riportati in letteratura. La determinazione quantitativa dei singoli componenti, è stata effettuata per comparazione con l'area del picco dello squalano (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane), utilizzato come standard interno.

Analisi GC-MS

L'analisi GC-MS è stata eseguita

utilizzando un gas-cromatografo Varian 3900 (Walnut Creek, CA, USA) accoppiato on-line ad uno spettrometro di massa a trappola ionica (Varian Saturn 2100 T). La fase stazionaria era costituita da una colonna capillare apolare (DB-5MS, 30 m x 0,25 mm d.i., spessore del film 0,25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 300°C e il flusso del gas carrier (elio) a 0.7 ml/min. Il programma di temperatura del

forno partiva da 100°C e raggiungeva 325°C con una velocità di 5°C/min. L'isoterma a 325°C era mantenuta per 11 min. I parametri della trappola ionica (impatto elettronico) erano 170°C per la trappola, 80°C per il manifold e 300°C per la transfer-line. I dati sono stati elaborati tramite il software MS-Workstation 6-Varian. L'identificazione dei singoli componenti è avvenuta per comparazione degli spettri di massa dei picchi incogniti con quelli di

standard reperiti in commercio e con spettri riportati in letteratura.

Risultati e discussione

La composizione della frazione insaponificabile dei campioni presi in esame è riportata nelle tabelle 2 e 3. I risultati mostrano che la frazione insaponificabile dei campioni di caffè verde, sia di arabica che di robusta, è costituita da diterpeni (caveolo, cafestolo, 16-O-metilcaveolo e 16-O-metilcafestolo), γ -tocoferolo, steroli (colesterolo, campesterolo, 24-metilencolesterolo, stigmasterolo, β -sitosterolo, Δ^5 -avenasterolo), da alcoli triterpenici (cicloartenolo, 24-metilen-cicloartanolo) e da 4-metilsteroli (citraostadienolo). Tale composizione si modifica passando dal caffè verde a quello tostato, sia nel caso della varietà arabica che nel caso della robusta. Infatti, la tostatura comporta la formazione di nuovi composti derivanti dalla disidratazione del caveolo e del cafestolo in entrambi i casi e, solo nell'arabica, la formazione di un nuovo diterpene (diterpene E).

Allo scopo di valutare gli effetti della tostatura sulla composizione della frazione insaponificabile del caffè, e di individuare dei componenti chimici da utilizzare come marker per la caratterizzazione delle miscele di caffè, è stata effettuata l'Analisi delle Componenti Princi-

pali (PCA). L'X-loading e lo score plot sono riportati in figura 1. Le prime due componenti spiegano rispettivamente il 56% e il 18% della varianza totale del sistema. Le variabili riportate nell'X-loading sono costituite dai componenti insaponificabili ovvero: prodotto di disidratazione del caveolo (pdCV), prodotto di disidratazione del cafestolo (pdCF), caveolo (CV), cafestolo (CF), diterpene E (DE), 16-O-metilcaveolo (16OMCV), 16-O-metilcafestolo (16OMCF), campesterolo (C), stigmasterolo (S), β -sitosterolo (BS), Δ^5 -avenasteolo (D5A), cicloartenolo (CA), 24-metilencicloartanolo (24MCA), citrostadienolo (CS).

I grafici mostrano come i campioni, in funzione della varietà e della tostatura, siano differenziabili in 4 gruppi: **gruppo 1** costituito dai campioni di caffè verde di varietà robusta, **gruppo 2** costituito dai campioni di caffè verde di varietà arabica, **gruppo 3** dai campioni di caffè tostati di varietà robusta, **gruppo 4** dai campioni di caffè tostati di varietà arabica e il **gruppo 5** dalle miscele.

Dalla differenziazione emerge che: a) i campioni di caffè verde di arabica sono particolarmente ricchi di 16-O-metilcaveolo e del caveolo rispetto a quelli di caffè verde di varietà robusta. Questi ultimi, a loro volta, si caratterizzano dall'insieme dei componenti insaponificabili tipici dei

caffè non tostati;

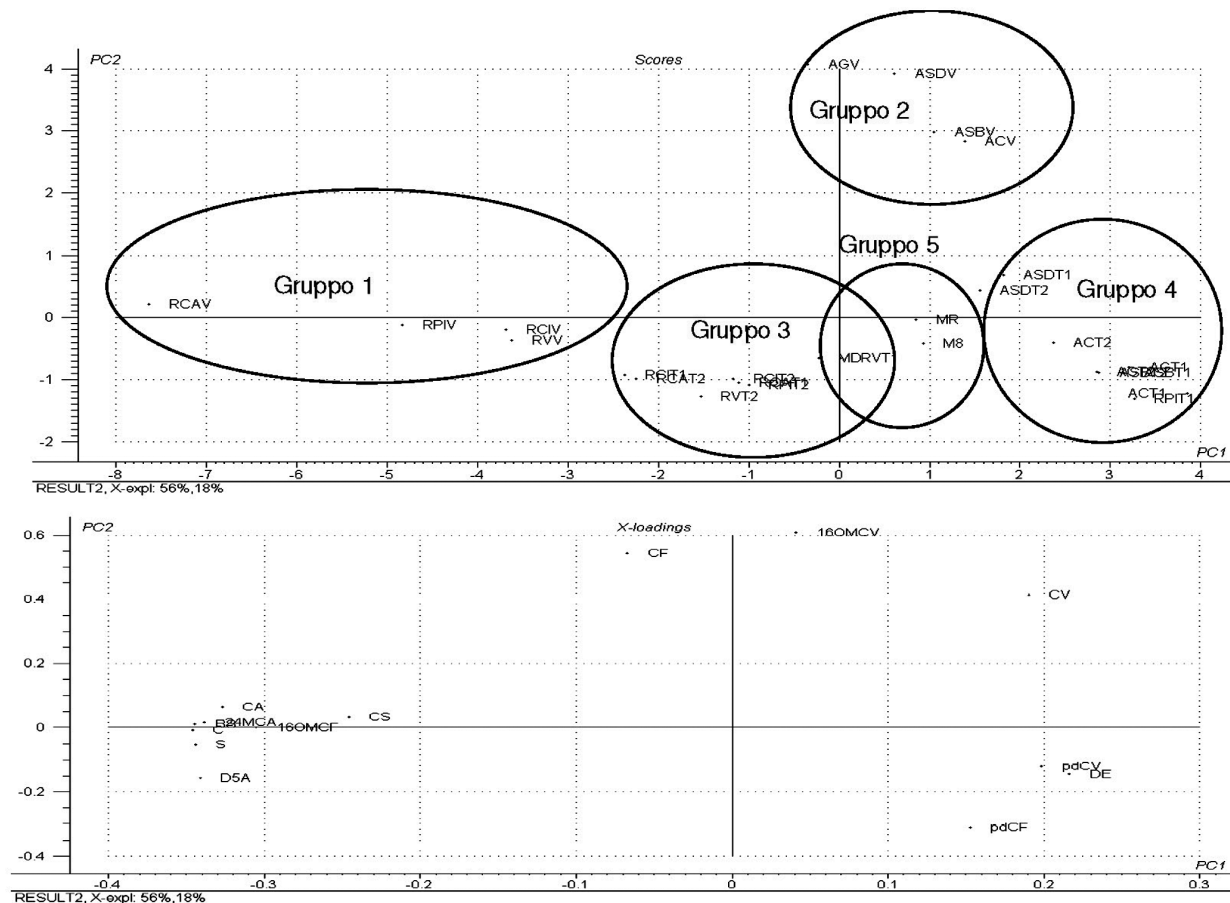
- b) i campioni di caffè arabica tostati sono più ricchi dei prodotti di disidratazione (pdCV, pdCF), del diterpene E, del 16-O-metilcaveolo e del caveolo rispetto a quelli di varietà robusta; quest'ultimi a loro volta presentano un maggior contenuto di 16-O-metilcafestolo rispetto ai campioni di arabica tostati;
- c) i campioni derivanti dalla T1 non sono differenziabili da quelli derivanti dalla T2, sia nel caso dell'arabica che della robusta;
- d) il gruppo comprendente le miscele è localizzato tra il gruppo 3 e il gruppo 4, ovvero tra i campioni tostati di varietà robusta e quello di arabica. All'interno di tale gruppo, la miscela costituita principalmente da robusta (miscela D=80% robusta/20% arabica) è più vicina al gruppo 3.

Conclusioni

Dall'esame del profilo compositivo delle frazioni dell'insaponificabile dei campioni di caffè verde arabica e robusta, del caffè tostato corrispondente e delle miscele si evidenzia che:

- i campioni di caffè verde appartenenti alle varietà arabica presentano contenuti in grasso superiori a quelli di varietà robusta.

Figura 1 - PCA dei componenti insaponificabili dei campioni di arabica e robusta verdi e tostati e delle miscele



AGV = caffè verde di varietà Arabica Guatemala; ACV = caffè verde di varietà Arabica Colombia; ASDV = caffè verde di varietà Arabica Santo Domingo; ASBV = caffè verde di varietà Arabica Santos Brasile; RPIV = caffè verde di varietà Robusta Parchment India; RCAV = caffè verde di varietà Robusta Costa d'Avorio; RCIV = caffè verde di varietà Robusta Cherry India; RVV = caffè verde di varietà Robusta Vietnam; AGT1 = caffè tostato T1 di varietà Arabica Guatemala; ACT1 = caffè tostato T1 di varietà Arabica Colombia; ASDT1 = caffè tostato T1 di varietà Arabica Santo Domingo; ASBT1 = caffè tostato T1 di varietà Arabica Santos Brasile; RPIT1 = caffè tostato T1 di varietà Robusta Parchment India; RCAT1 = caffè tostato T1 di varietà Robusta Costa d'Avorio; RCIT1 = caffè tostato T1 di varietà Robusta Cherry India; RVT1 = caffè tostato T1 di varietà Robusta Vietnam; AGT2 = caffè tostato T2 di varietà Arabica Guatemala; ACT2 = caffè tostato T2 di varietà Arabica Colombia; ASDT2 = caffè tostato T2 di varietà Arabica Santo Domingo; ASBT2 = caffè tostato T2 di varietà Arabica Santos Brasile; RPIT2 = caffè tostato T2 di varietà Robusta Parchment India; RCAT2 = caffè tostato T2 di varietà Robusta Costa d'Avorio; RCIT2 = caffè tostato T2 di varietà Robusta Cherry India; RVT2 = caffè tostato T2 di varietà Robusta Vietnam; MR = miscela R; M8 = miscela 8; MD = miscela D.

Il contenuto lipidico non si modifica con la tostatura: tutti i campioni di caffè tostati nelle condizioni T1 presentano una quantità in grasso superiori ai corrispondenti tostati nelle condizioni T2 (dati non riportati);

- il 16-O-metilcaveolo e il caveolo possono essere considerati marker chimici della varietà arabica, mentre il 16-O metilcafestolo e il Δ^5 -avenasterolo marker della var. robusta;
- il cafestolo può essere considerato un marker per la tostatura ma non per la differenziazione delle varietà. Infatti, tutti i campioni di caffè verde sono più ricchi di cafestolo rispetto ai corrispondenti tostati;
- la tostatura comporta la formazione di nuovi composti derivanti dalla disidratazione del caveolo e del cafestolo in entrambi i casi

e, solo nell'arabica, la formazione del diterpene E. Comunque la temperatura e il tempo di tostatura non influenzano la composizione quali-quantitativa della frazione insaponificabile;

- il profilo compositivo della frazione insaponificabile delle miscele è influenzato dalla composizione delle stesse: la miscela D costituita per l'80% dalla robusta è più povera di caveolo rispetto alle miscele R (60% arabica/40% robusta), 8 (50% arabica/50% robusta) e M (80% arabica/20% robusta). Per contro, quest'ultima mostra quantità maggiori di Diterpene E.

Bibliografia

1. Martin MJ, Pablos F, Gonzales AG, Valdenebro MS, Camacho ML. Fatty acid profiles as discriminant parameters

for coffee varieties differentiation. *Talanta* 2001; 54: 291-7.

2. Frega N, Bocci F, Lercker G, et al. La frazione lipidica del caffè. Nota 1: influenza della torrefazione e della decaffeinizzazione. *Industrie Alimentari*; 1996; XXXV: 1057-62.
3. Clarke RJ, Mcrae R. *Coffee. Chemistry*. Elsevier Applied Sci Publ, London and New York, Vol 1, 1985.
4. Frega N, Bocci F, Lercker G, et al. La frazione lipidica del caffè. 2: su alcuni parametri di qualificazione. *Industrie Alimentari* 1996; XXXV: 1186-93.
5. NGD. *Norme Grassi e Derivati: Metodo C-12*. Edito da Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi (SSOG), Milano, Italia, 1976.
6. Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Welles WE. Gas-liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2497-507.