

43. Angela VERCILLO e Anna M. MANZONE. — **Determinazione rapida della caffeina nel caffè.** (*)

Riassunto. — Dal caffè, dopo opportuno trattamento idrolizzante, la caffeina viene estratta a caldo con cloroformio, separata dalle sostanze che l'accompagnano mediante cromatografia di partizione su colonna e dosata spettrofotometricamente.

Summary. — After suitable treatment by hydrolysis, the caffeine is extracted from the coffee under heat with chloroform, is separated from its accompanying substances by partition chromatography on column and spectrophotometrically assayed.

I metodi di determinazione della caffeina nel caffè sono, come è noto, assai numerosi; ma essi richiedono generalmente, e specie nel caso di caffè decaffeinati, complesse manipolazioni e notevole impiego di tempo (¹⁻¹⁶).

Ci siamo perciò proposti la messa a punto di un metodo che unisse alla precisione dei risultati la rapidità di esecuzione; e con le prove che veniamo a descrivere, abbiamo realizzato un procedimento che richiede solo un'ora di tempo ed è applicabile al caffè sia normale che decaffeinato, crudo o torrefatto.

PARTE SPERIMENTALE

In genere, la determinazione della caffeina nel caffè consta di tre fasi: 1) estrazione, 2) separazione dalle sostanze che l'accompagnano negli estratti ottenuti con i vari solventi, 3) dosaggio.

Per ciascuna di esse, abbiamo cercato modalità di esecuzione le più semplici possibili e ne abbiamo controllato l'esattezza dei risultati, confrontandoli con quelli ottenuti operando su caffeina pura o, per il caffè, applicando metodi riconosciuti esatti.

Riferiamo in particolare sulle prove fatte e sulle relative conclusioni.

(*) Comunicazione al IX Congresso Nazionale di Chimica tenuto congiuntamente con la Société Suisse de Chimie (Napoli 27 maggio-2 giugno 1962).

1) *Estrazione della caffeina.* — Viene eseguita con cloroformio all'ebollizione, sul caffè previamente trattato al fine di ottenere la liberazione della caffeina legata. Tra i diversi mezzi in uso per questo trattamento preliminare, abbiamo preso in considerazione quello all'ossido di magnesio umido e quello indicato nel metodo proposto dalla Casa Hag (¹⁷), all'acetato basico di alluminio. Abbiamo constatato che quest'ultimo è più efficace.

2) *Purificazione.* — Abbiamo applicato, convenientemente modificata, la cromatografia di partizione su colonna già utilizzata da Gordon

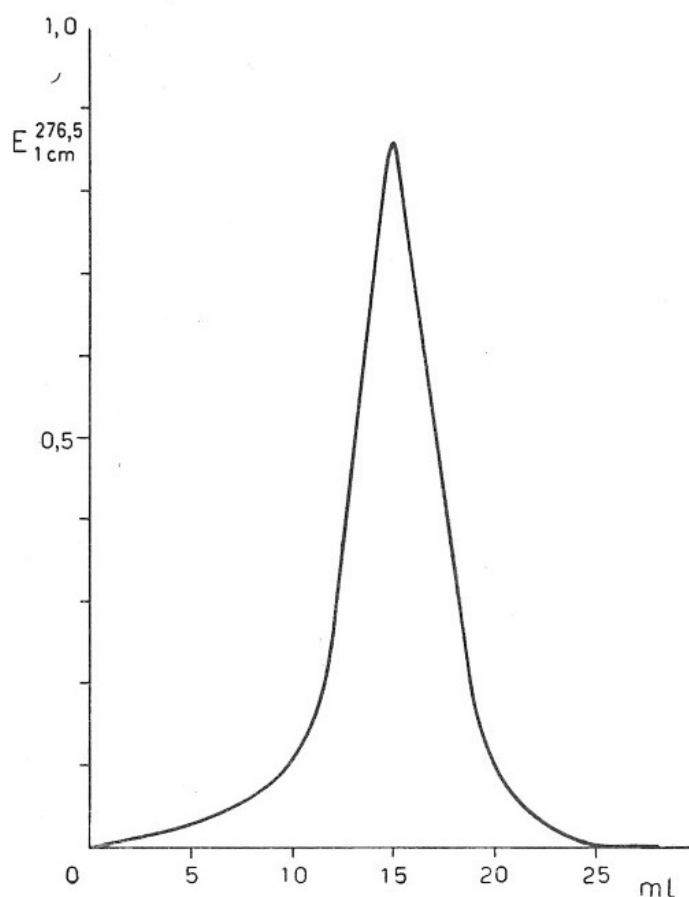


Fig. 1. - Curva di eluizione cloroformica della caffeina.

Smith per la separazione della caffeina dalla acetofenetidina (¹⁸). Essa, in base alle diverse solubilità, in etere, cloroformio ed acqua della caffeina da una parte e degli altri componenti l'estratto cloroformico del caffè dall'altra, e quindi ai diversi coefficienti di ripartizione di queste sostanze tra detti solventi, ci ha consentito di realizzare l'isolamento della caffeina utilizzando come fase stazionaria l'acqua (su supporto di celite) e come fasi mobili l'etere e il cloroformio. Infatti il coefficiente di ripartizione della caffeina tra etere e acqua è 0,089 e tra cloroformio e acqua è 8,35, mentre quello tra etere e acqua delle altre sostanze presenti nell'estratto cloroformico del caffè è certamente molto più elevato di

quello della caffeina: quindi la separazione cromatografica è agevole e si ottiene con l'uso di colonnine di dimensioni modeste e con piccole quantità di solventi.

Per la colonnina di cui indicheremo le misure, abbiamo constatato che 20 ml. di etere sono sufficienti ad asportare tutte le sostanze estranee alla caffeina e che questa è poi completamente recuperata da 25 ml. di cloroformio, come risulta dalla figura 1 nella quale è rappresentata la

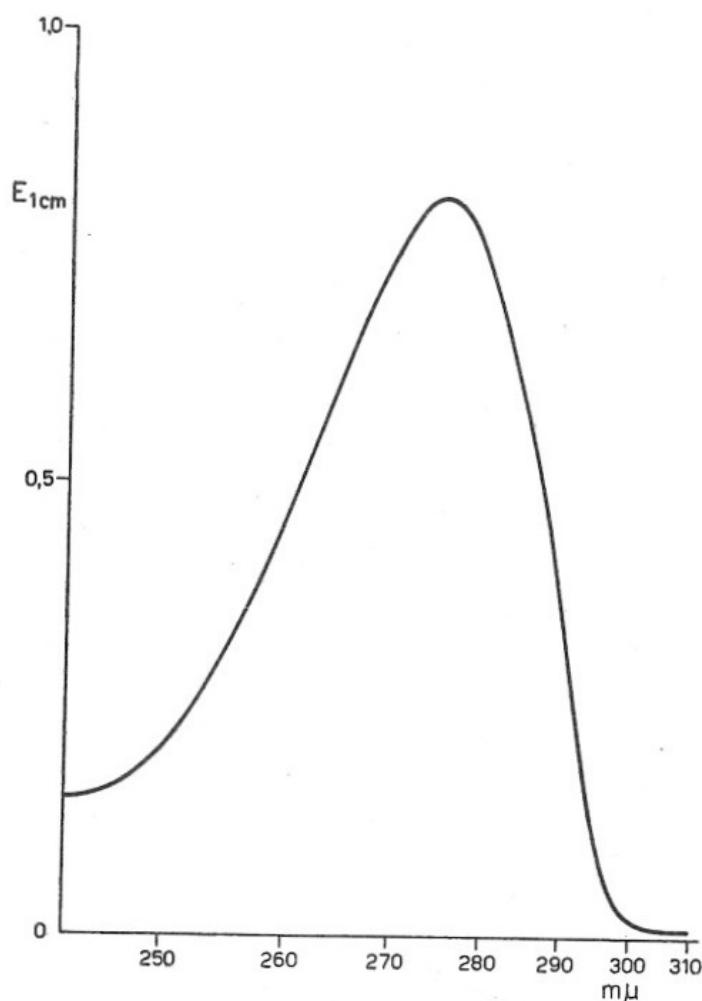


Fig. 2. - Curva di assorbimento della soluzione cloroformica di caffeina pura cromatografata

curva di eluizione cloroformica della caffeina, ottenuta misurando l'assorbimento presentato da frazioni successive di 5 ml di eluato: sulle ascisse vengono riportati i limiti dei volumi tra cui sono comprese le varie frazioni e sulle ordinate i valori dei relativi assorbimenti a 276,5 $m\mu$.

3) *Dosaggio.* — Spettrofotometrico, dalla misura dell'assorbimento a 276,5 $m\mu$; a tale lunghezza d'onda l'assorbimento specifico della caffeina in soluzione cloroformica è $E_{1cm}^{1\%} = 483$.

Onde accertare che l'eluato cloroformico contiene sola caffeina, ne è stato controllato lo spettro nell'intervallo compreso tra 240-310 $m\mu$.

A riguardo si deve notare che l'etere, sempre presente in piccola quantità nell'eluato cloroformico, non influenza l'assorbimento in corrispondenza della lunghezza d'onda utilizzata per la determinazione (276,5 m μ) ma interferisce al disotto dei 260 m μ (con un aumento di trasparenza) per cui la curva di assorbimento della caffeina eluita risulta no-

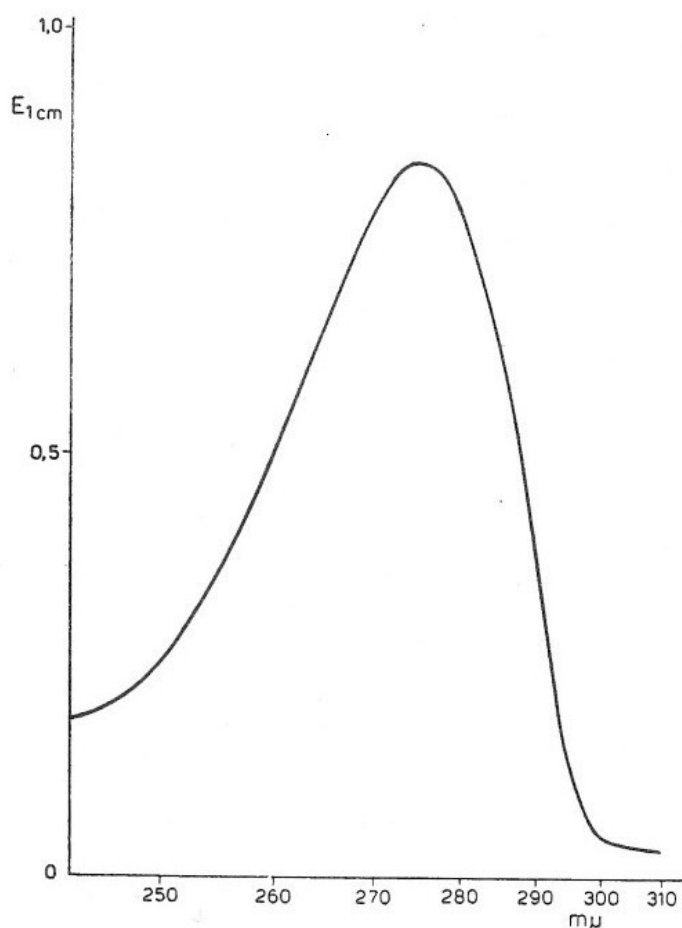


Fig. 3. - Curva di assorbimento della soluzione cloroformica di caffeina ottenuta dal caffè.

tevolmente deformata rispetto a quella della soluzione in cloroformio puro.

Per eliminare questo inconveniente, si è utilizzato, come solvente di riferimento, cloroformio fatto passare attraverso la colonna di celite nelle identiche condizioni che indicheremo per la preparazione cromatografica dal caffè. Operando in tal modo, la curva della caffeina pura Merch, sottoposta al trattamento cromatografico e quella ottenuta dall'eluato cloroformico del caffè sono risultate praticamente identiche (figg. 2 e 3).

I valori ottenuti col procedimento messo a punto sono stati confrontati con quelli del metodo proposto dalla Casa Hag.

Si sono avuti i risultati seguenti:

Contenuto di caffeina in caffè del commercio.

Numero del cam- pione	TIPO DI CAFFÈ	CAFFEINA ‰	
		Metodo proposto dalla Casa Hag	Metodo che si propone
	<i>Caffè crudi:</i>		
1	caffè normale	1,203	1,220
2	caffè semidecaffeinato	0,325	0,330
3	caffè decaffeinato	0,113	0,110
	<i>Caffè torrefatti:</i>		
4	caffè normale	2,215	2,218
5	caffè normale	1,378	1,380
6	caffè semidecaffeinato	0,481	0,484
7	» »	0,440	0,433
8	» »	0,302	0,307
9	» »	0,188	0,190
10	» decaffeinato	0,114	0,115
11	» »	0,073	0,075

PROCEDIMENTO.

Reattivi:

- Acetato basico di alluminio preparato secondo la F.U.
- Cloroformio.
- Etere etilico.
- Cloroformio per spettrofotometria.
- Celite n. 545 Jons-Manville Corp.

Apparecchi:

- Spettrofotometro capace di indicare bande spettrali dell'ordine di 2 mμ o meno nella regione compresa tra 230-300 mμ.

b) Colonna cromatografica. E' costituita da celite imbibita di acqua contenuta in un tubo di vetro lungo cm 20, dal diametro interno di mm 15; la parte superiore termina con tappo smerigliato, e la inferiore con rubinetto.

Preparazione della colonnina. Sul fondo si mette un fiocchetto di lana di vetro. Quindi si pongono in una capsula di porcellana g 5 di celite e 5 ml di acqua e con un pestello si mescola in modo che l'acqua risulti omogeneamente distribuita; si aggiungono ml 50 di una miscela in parti uguali di etere e cloroformio, si mescola bene il tutto e, servendosi di un imbuto a collo corto e più largo possibile, si portano nella colonna i fiocchi di celite curando di tenerli durante l'operazione coperti dal liquido, e regolando opportunamente il deflusso di questo dal rubinetto; via via che si introduce la celite, la si comprime leggermente con una bacchetta di vetro che termina con un dischetto di circa 10 mm di diametro in modo da ottenere infine uno strato continuo, uniformemente compatto, che occupa un'altezza di cm 8. La colonnina di celite si conclude con un dischetto di carta da filtro e si lascia sotto uno strato di 2-3 ml della miscela adoperata (*).

Determinazione:

g 2 di caffè macinato vengono trattati, in un palloncino a fondo piano da 150 ml, con 8 ml di acetato basico di alluminio, per 10 minuti su bagno maria bollente, agitando frequentemente: si ottiene così l'evaporazione della maggior parte dell'acqua restando uno strato di sostanza ancora umida aderente al recipiente.

Si raffredda, si aggiungono alcuni granuli di quarzo e ml 50 di cloroformio, si pesa e si fa bollire a ricadere per 15 minuti, agitando frequentemente; si riporta a temperatura ambiente, si controlla il peso, integrandolo, se occorre, con qualche goccia di cloroformio e si filtra rapidamente.

ml 20 del filtrato nel caso di caffè normale, e ml 40 nel caso di caffè decaffeinato, si portano in palloncino tarato da 50 ml, contenente alcuni granuli di quarzo e si evaporano su bagno maria riducendoli a circa 10 ml. Si porta a volume con etere (soluzione A).

Dalla colonnina precedentemente preparata, si fa defluire il liquido fino allo strato di celite e vi si fanno passare rapidamente 30 ml di etere;

(*) La colonnina cromatografica può essere utilizzata per diverse determinazioni: abbiamo constatato che dopo essere stata usata 6-7 volte era ancora efficiente: quindi può essere adoperata tranquillamente per 5 volte. Per conservarla si lascia sotto uno strato di cloroformio che andrà spostato con 30 ml di etere, al momento dell'uso.

poi si introducono 2 ml della soluzione A, che si fanno defluire lentamente (1 goccia per secondo). Si eluisce quindi con 20 ml di etere, prima lentamente usando tre porzioni successive da 2-3 ml ciascuna, e poi liberamente col resto. Indi si fa passare del cloroformio per spettrofotometria, raccogliendone 25 ml in un palloncino tarato. Si misura l'estinzione della soluzione a 276,5 mμ in cella da 1 cm per i caffè normali e da 2 cm per i caffè decaffeinati (*), servendosi naturalmente, quale liquido di confronto, dello stesso cloroformio usato per l'eluizione.

La concentrazione di caffeina nella soluzione esaminata risulta dalla formula:

$$\frac{E_{276,5}^{1 \text{ cm}}}{483} \cdot 100 = G. \text{ caffeina anidra in 100 ml, in cui } E_{276,5}^{1 \text{ cm}} \text{ è il valore dell'estinzione in cella da 1 cm. Si risale quindi alla quantità presente nel caffè.}$$

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BUOGO G. - Chimica applicata all'Igiene: II Tomo, pag. 1178. Ed. Macri, Firenze, Bari (1948).
- (2) PETER WADE e AMEN J. - J. Sci. Food Agr., 1: 177 (1950).
- (3) PAUL HAGHEDORN - Deut. Apoth. Ztg., 92: 430 (1952).
- (4) SCHWABE W. - Deut. Lebensm. Rundschau, 48: 85 (1952).
- (5) HARRIS F. J. T. - J. Sci. Food Agr., 4: 203 (1953).
- (6) JOSETTE ADDA - 10th Congr. Intern. Ind. Agr. Aliment. Madrid, 1954.
- (7) GAZZI V. - Boll. Lab. chim. prov., VI: 69 (1955).
- (8) BOEGER G. - Pharmazie, 10: 541 (1955).
- (9) WILSON J. B. - J. Assoc. offic. agr. Chemists, 39: 712 (1956).
- (10) EISENBRAND J. e PFALL D. - Z. anal. Chem., 151: 241 (1956).
- (11) CIRANI G., GIULIANO R. e ZIFFERERO M. - Ann. Chim., 47: 646 (1957).
- (12) BORKER EMANUEL e JAMES JERANSAN A. J. - Assoc. offic. agr. Chemists, 40: 346 (1957).
- (13) HASE K. - Z. Lebensm. Unters. Forsch., 110: 127 (1959).
- (14) HADORN H. e SUTER H. - Mitt. Gebiete Lebensm. u. Hyg., 48: 63 (1957).
- (15) POLZELLA LUIGI - Boll. Lab. Chim. Prov., 12: 23 (1961).
- (16) MAMELI e MANCINI - J. Assoc. offic. agr. Chemists, 44: 554 (1961).
- (17) Hag. riportato dal Caggiola M., Farmaco, 6: 893 (1951).
- (18) SMITH GORDON - J. Assoc. offic. agr. Chemists, 37: 677 (1954).

(*) Nel caso di caffè decaffeinati, non disponendo di celle di 2 cm, per la lettura spettrofotometrica si può adoperare quella di 1 cm portandovi una soluzione di doppia concentrazione, che si ottiene agevolmente sottoponendo alla cromatografia 4 ml invece di 2, della soluzione A.