

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة 08 ماي 1945 قالمة

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université 08 Mai 1945 Guelma



Thèse de Doctorat

Présentée à l'Université de Guelma

Faculté des Mathématiques, Informatique et Sciences de la matière

Département de : Sciences de la matière

Spécialité : Sciences chimiques

Présentée par : Mme Belguidoum Karima

Analyse par HPLC-UV et HPLC-DAD-MS du café du marché algérien pour sa composition nutraceutique et mise en évidence de la présence de l'acrylamide, un cancérigène et génotoxique potentiel dans le café torréfié.

Devant la commission d'examen:

R. Oumeddour	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Président
H. Amira-Guebailia	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Rapporteur
S. Akkal	Prof. Université de Constantine	Examineur
N. Gherraf	Prof. Université de Oum Elbouaghi	Examineur
S. Ladjel	Prof. Université de Ouargla	Examineur
M. Abdaoui	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Invité

Soutenue publiquement : 2014 - 2015

REMERCIEMENTS

Une partie des travaux de recherche présentés dans cette thèse a été menée à l'université de Guelma au laboratoires de Chimie Appliquée, et d'Analyses industrielles et Génie des matériaux, respectivement , et une autre partie au laboratoire de Mycologie, Biotechnologie végétale et Phytochimie, à l'Université de Bordeaux 2, en France.

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse le Pr AMIRA-GUEBAILIA HABIBA, de qui j'ai beaucoup appris. Je la remercie du fond du cœur pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apportés du début jusqu'à la fin de ma thèse, pour la confiance et la liberté qu'elle m'a accordées en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées afin de diriger cette recherche de manière perfectionnée et minutieuse.

Je remercie le Pr. Jean-Michel MERILLON, responsable du groupe GESVAB, Université de Bordeaux et Dr Jean Claude DELONAY de m'avoir accueillie dans le laboratoire et de m'avoir guidée dans mon travail.

Je remercie le professeur Ismail OUMEDDOUR qui m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Je suis reconnaissante à Messieurs, Salah AKKAL, Segni LADJEL et Noureddine GHARRAF d'avoir bien voulu se déplacer pour participer au jury de soutenance. Je leur exprime ma gratitude pour le temps consacré à lire et à juger mon travail. Je tiens également à remercier le professeur Mohamed ABDAOUI pour l'effort consentit à juger mon travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à mes amies intimes et enseignantes à l'université de Guelma : Yamina Boulmogh et Mouna Nacef pour toutes les heures qu'elles ont consacrées à la relecture du manuscrit ainsi que pour leurs aides et leurs encouragements.

Je remercie le directeur du laboratoire LCA, un grand merci également à tous les thésards du laboratoire en leur souhaitant une bonne continuation.

Je remercie le directeur du laboratoire LAIGM, ainsi que Dr M. Nacef de m'avoir aidé pour effectuer des analyses sur le spectromètre d'absorption atomique.

Mes remerciements sont adressés à Renouf Elodie ; ingénieur du laboratoire GESVAB pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de mes analyses réalisées sur LC-MS.

Je remercie tout particulièrement Maha ; doctorante au laboratoire de GESVAB pour son aide et sa bonne humeur durant le stage.

Mes remerciements à Mr Amine d'avoir fourni le café vert et donné beaucoup d'informations sur ce produit.

Je tiens à remercier Mr Nemouchi Ammar, ingénieur de laboratoire et Mme Nemouchi Zohra, technicienne de laboratoire, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée à chaque fois que j'en avais besoin.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont assuré le soutien affectif durant ce travail doctoral : ma famille et plus particulièrement ma très chère sœur et mon époux pour leur soutien sans failles.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide et que j'aurais malencontreusement oubliées.

A ma très chère sœur Sihem

Résumé

Dans ce travail, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-UV-visible) ; a été utilisée pour l'analyse des composés nutraceutiques; (acides phénoliques, flavonoïdes et caféine), dans seize échantillons de café (torréfié, vert et instantané) achetés du marché algérien. Les paramètres suivants ont été pris en compte pour les analyses de café: conditionnement, degré de torréfaction, la taille des grains, l'instantanéité et la décaféination.

La concentration des composés phénoliques totaux analysés dans les différentes marques de café varie de $12,37 \pm 0,55$ mg/l à $200,08 \pm 6,47$ mg/l, alors que la teneur de la caféine, principal stimulant du café varie de $38,00 \pm 1,89$ mg/l à $136,00 \pm 6,45$ mg/l.

L'évaluation de la performance chromatographique a révélé une excellente reproductibilité. Les limites de détection (LOD) pour tous les composés analysés ont varié de 0,75 à 14,79 µg/l, tandis que les limites de quantification (LOQ) se situaient entre 2,26 et 44,44 µg / l. La séparation de tous les composés a été obtenue en 13 minutes.

L'identification de l'acide chlorogénique (5-CQA) et la caféine dans le café boisson, préparé par deux types de cafetière (turque et électrique) a été faite par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Les teneurs en ces deux principes actifs du café identifiés par LC-MS, ont été déterminées par la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD). La teneur de l'acide chlorogénique dans le café boisson varie de $21,60 \pm 0,10$ mg/l à $26,55 \pm 0,09$ mg/l dans les échantillons préparés par la cafetière turque et de $12,55 \pm 0,07$ mg/l à $20,68 \pm 1,33$ mg/l dans ceux préparés par la cafetière électrique. La caféine possède des concentrations moyennes allant de $51,00 \pm 0,20$ à $94,65 \pm 1,50$ mg/l, dans les échantillons obtenus par la cafetière turque et de $46,44 \pm 0,54$ à $89,30 \pm 0,25$ mg/l, dans les échantillons obtenus par la cafetière électrique. Ces différences en teneurs sont certainement dues à la différence de la surface ainsi que du temps de contact dans les deux types de cafetières.

En outre, la détermination de quelques éléments minéraux nutritifs, en l'occurrence ; Zn, Cu, Fe, Na, K ainsi qu'un élément nocif (Cr) dans quatorze échantillons de café a été faite par spectrométrie d'absorption atomique et photométrie à émission atomique. Les résultats obtenus montrent que ces valeurs sont dans les normes et sont acceptables pour la consommation humaine.

Il faut noter que le café soluble était particulièrement riche en éléments minéraux avec des teneurs en minéraux totaux variant de 649,69 à 1072,65 mg/100g.

Le potassium et le sodium, sont les principaux éléments nutritifs dans tous les échantillons de café étudiés, leur teneur moyenne varie de 422 mg/100g à 1050 mg/100g, et entre 2,65 et 39 mg/100g respectivement.

Par ailleurs, l'acrylamide a été identifié et dosé par HPLC- UV-DAD dans les échantillons de café torréfié et emballé. Nous avons démontré que le degré de torréfaction est un facteur clé dans la formation de l'acrylamide. Les quantités substantielles d'acrylamide dans le café emballé, allant de $38,61 \pm 0,16 \mu\text{g/l}$ à $44,80 \pm 2,50 \mu\text{g/l}$ pourrait être un sérieux problème de santé publique, en particulier les gros consommateurs de cette boisson.

Mots-clés: caféine, café, acides phénoliques, la catéchine, la torréfaction, HPLC, nutraceutique, minéraux, acrylamide.

Abstract

In this work, HPLC coupled to UV–vis detection was used for the analysis of nutraceutical compounds (phenolic acids, flavonoids and caffeine), in sixteen samples of coffee (roasted, green and instant) purchased from local market. The following parameters were taken into account for coffee analyses: packaging, roasting degree, grain size, instantaneity, and decaffeination. The total polyphenols and caffeine levels in coffee extracts were found to vary from 12.37 ± 0.55 to 200.08 ± 6.47 mg/l, and 38.00 ± 1.89 to 136.00 ± 6.45 mg/l, respectively. Evaluation of chromatographic performance showed excellent reproducibility, resolution, selectivity, and reasonable peak symmetry. The limit of detection (LOD) ranged from 0.75 to 14.79 mg/l, while the limit of quantification (LOQ) ranged from 2.26 to 44.44 mg/l. The separation of all compounds was achieved within 13 min.

The identification of chlorogenic acid (5-CQA) and caffeine in the coffee beverage prepared by two types of coffee (traditional and electric), was achieved by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The levels of these two metabolites of coffee identified by LC-MS were quantified by liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). The content of chlorogenic acid in coffee drinks varies from 21.60 ± 0.10 mg /l to 26.55 ± 0.09 mg /l in the samples prepared by the traditional coffee maker and from, $12.55 \pm 0, 07$ mg/l to 20.68 ± 1.33 mg/l in those prepared by electric coffee maker. Caffeine concentration ranged from 51.00 ± 0.20 to 94.65 ± 1.50 mg/l, in the samples obtained by the traditional coffee maker and from 46.44 ± 0.54 to 89.30 ± 0.25 mg/l, in samples obtained by the electric coffee maker. The differences in level were due to the contact time and surface between the coffee powder and water, afforded by each kind of coffee maker.

Furthermore, the determination of some mineral elements, such as Zn, Cu, Fe, Na, K and Cr, in fourteen coffee samples was carried out by both atomic absorption spectroscopy and atomic emission photometry. The results obtained showed that the amounts of these elements in coffee are reasonable for human consumption.

It should be noted that instant coffee contained high amounts of minerals with total minerals contents varying from 649.69 to 1072.65 mg/100g. Potassium and sodium are the main nutrients in all studied samples, their average content ranged from 422 mg/100g to 1050 mg/100g, and from 2.65 to 39 mg/100g, respectively.

Moreover, acrylamide was detected and quantified in roasted and packaged coffee extracts by HPLC-UV-DAD. The degree of roasting was found to be a key factor in the content of acrylamide. The amounts of acrylamide in packaged coffee ranging from, $38.61 \pm 0.16 \mu\text{g/l}$ to $44.80 \pm 2.50 \mu\text{g/l}$ could be a serious health concern for consumers, especially large consumers of coffee drink.

Keywords: caffeine, coffee, phenolic acids, catechin, roasting, HPLC, nutraceutical, minerals, acrylamide.

ملخص

في هذا العمل ، تم استخدام التحليل المائع ذي الضغط العال HPLC ، لتحليل المركبات ذات القيمة الغذائية العلاجية (حمضيات فينولية، فلافونيدات و الكافيين (في ستة عشر عينة من القهوة المحمص والخضراء والفورية) التي تم شراؤها من السوق المحلية، وقد اخذنا بعين الاعتبار المعايير التالية لتحليل القهوة :التغليف ، التحميص، حجم الحبوب ،الفورية وعدم وجود الكافيين) .

يتراوح التركيز الإجمالي للمركبات الفينولية التي تم تحليلها في مختلف انواع القهوة بين $0,55 \pm 12,37$ مغ/ ل إلى $6,47 \pm 200,08$ مغ/ل، في حين أن محتوى الكافيين، المحفز الرئيسي في القهوة يتراوح بين $1,89 \pm 38,00$ مغ / ل إلى $6,45 \pm 136,00$ مغ /ل.

كما أظهر تقييم الأداء الكروماتوغرافي نتائج ممتازة .وتراوحت حدود الكشف (LOD) لجميع المركبات بين 0,75 و 14,79 ميكروغرام/ لتر، في حين تراوحت حدود الكشف الكمي (LOQ) بين 26 و 44,44 ميكروغرام/لتر . في حين تم فصل جميع المركبات في 13 دقيقة.

لقد أجري كذلك تحديد حمض الكلوروجينيك (CQA -5) والكافيين في مشروب القهوة المحضر بطريقتين (التقليدية والكهربائية) في مختلف أنواع القهوة المحمص باستخدام التحليل المائع ذي الضغط العالي مقرونا بمطياف الكتلة .

تم الكشف عن هذين العنصرين النشطين بواسطة MS-DAD-HPLC كما تم تحديد كميتهما في مشروب القهوة بواسطة DAD-HPLC.

يتراوح محتوى حمض الكلوروجينيك في مشروب القهوة من $0,10 \pm 21,60$ مغ/ ل إلى $0,09 \pm 26,55$ مغ /ل في عينات القهوة المحضرة بالطريقة التقليدية ومن $0,07 \pm 12,55$ مغ / ل إلى $1,33 \pm 20,68$ مغ / ل في تلك التي أعدت بماكينة تحضير القهوة الكهربائية يتراوح تركيز الكافيين من $51,00 \pm 020$ إلى $94,65 \pm 1,50$ مغ / ل، في العينات التي حصل عليها بطريقة التحضير التقليدية و من $46,44 \pm 0,54$ الى $89,30 \pm 0,25$ مغ / ل، في العينات التي تم الحصول عليها بألة القهوة الكهربائية. وكانت هذه الفروق في التراكيز بسبب اختلاف سطح وسرعة الاتصال في هذين الطريقتين.

وبالإضافة إلى ذلك، فإن تحديد بعض العناصر المعدنية، وهي؛ الزنك، النحاس، الحديد، الصوديوم، البوتاسيوم و الكروم في أربعة عشرة عينة من القهوة قد حققت بواسطة مطياف الامتصاص الذري والانبعاث الذري .النتائج التي تم الحصول عليها مقبولة للاستهلاك البشري.

من بين العينات المدروسة، فإن القهوة السريعة الذوبان غنية بالمعادن حيث يتراوح إجمالي محتواها المعدني بين 649,69 و 1072,65 ملغ/ 100 غ.

البوتاسيوم والصوديوم هما العنصران الرئيسيان في جميع العينات، و متوسط محتواهما يتراوح بين 422ملغ/ 100 غ إلى 1050 ملغ/ 100 غ ، وبين 2,65 إلى 39 ملغ/ 100 غ ، على التوالي.

وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم استنباط الأكريلاميد الذي يمثل جزيء ضار جدا بصحة الإنسان في العينات المدروسة للقهوة و تم تحديد تركيز هذا الجزيء بواسطة HPLC-UV-DAD ، كما تم أيضا دراسة تأثير التحميص على محتوى الأكريلاميد ,وتبين أن درجة التحميص هي عامل رئيسي في محتوى الأكريلاميد.

كميات مادة الأكريلاميد في القهوة المعبأة والتي تتراوح من $0,16 \pm 38,61$ ميكروغرام/ لتر إلى $44,80 \pm 2,50$ ميكروغرام / لتر يمكن أن يمثل مشكلة صحية خطيرة للمستهلكين، خاصة المفرطين منهم.

الكلمات الرئيسية: الكافيين ، القهوة، الأحماض الفينولية، الكاتشين، التحميص، HPLC، مواد مغذية علاجية، المعادن ، الأكريلاميد.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VI
INTRODUCTION GENERALE.....	1

CHAPITRE I: GENERALITES SUR LE CAFE

I.1. Introduction.....	5
I.2. Le café.....	5
I.3. Botanique.....	5
1. 4. La torréfaction.....	7
I.5. Préparation du café boisson	9
I.6.1. Les apports en acidité et en antioxydants.....	11
I.6.2. Les apports en Lipides.....	12
I.6.3. Les apports en glucides.....	13
I.6.4. Les apports en protéines et en acides aminés libres.....	13
I.6.5. Les apports en minéraux.....	14
I.6.6. Les apports en vitamines.....	14
I.6.7. La caféine.....	14
I.7. Emploi de café et de la caféine en médecine.....	15
I.8. Les effets physiologiques du café.....	15
I.9. Les effets néfastes du café.....	17
I.10. Quelques méthodes analytiques utilisées pour le dosage de la caféine et des polyphénols dans le café.....	18
I.13. Conclusion.....	23
I.12. Statistiques des travaux publiés sur le café.....	19

CHAPITRE II : L'ACRYLAMIDE: UNE MOLECULE POTENTIELLEMENT NOCIVE

II.1. Introduction.....	25
II.2. Définition et structure de l'acrylamide.....	25
II.3. L'acrylamide dans les aliments.....	26
II.4. Voies de formation de l'acrylamide.....	26
II.4.1. La réaction de Maillard.....	26
II.4.2. La dégradation des lipides.....	29
II.4.3. La décarboxylation et la désamination de l'asparagine.....	31
II.4.4. D'autres précurseurs pour la formation d'acrylamide.....	33
II.5. Toxicité de l'acrylamide.....	33
II.6. Dosage de l'acrylamide dans les aliments.....	35
II.7. Conclusion.....	36

CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES

III.1. Introduction.....	38
III.2. Matériels.....	38
III.2.1. La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible (HPLC-UV-visible).....	39
III.2.2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	41
III.2.3. La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur HPLC-DAD.....	42
III.3. Solvants utilisés.....	46
III.4. Méthodes.....	46

III.4.1. Analyse quantitative par HPLC de la caféine et des polyphénols dans le café.....	46
III.4.1.1. Échantillons de cafés.....	49
III.4.1.2. Méthode de préparation et injection des standards.....	49
III.4.1.3. Méthode de préparation des échantillons de café.....	50
III.4.1.4. Dosage par HPLC/UV-Visible des polyphénols et de la caféine.....	51
III.4.1.4.1. Solvants utilisés.....	51
III.4.1.4.2. Gradient.....	51
III.4.1.5. Validation de la méthode analytique.....	52
III.4.1.5.1. Détermination des limites de détection pour la caféine et les polyphénols recherché.....	52
III.4.1.5.2. Détermination des taux de récupération.....	53
III.4.2. Identification de l'acide chlorogénique, (5-CQA) et de la caféine par HPLC-DAD-MS dans la boisson du café.....	54
III.4.2.1. Méthode de préparation des standards.....	54
III.4.2.2. Méthode de préparation des cafés boissons.....	54
III.4.3. Dosage de l'acrylamide dans le café vert et torréfié par HPLC-UV-DAD.....	55
III.4.3.1. Méthode de préparation des échantillons.....	57
III.4.3.2. Détermination du pH des extraits obtenus.....	59
III.4.3.3. Solvants utilisés.....	59
III.4.3.4. Injection.....	60
III.4.4. Intégration.....	60
III.4.5. Analyse par spectrométrie d'absorption atomique des éléments Zn, Fe, Cu et Cr.....	60
III.4.5.1. Solutions.....	60
III.4.5.2. Méthode de préparation des solutions étalons (standards).....	61
III.4.5.3. Méthode de préparation des échantillons de café.....	61
III.4.6. Analyse de Na et K par photométrie à flamme.....	62
III.4.6.1. produits chimiques.....	62
III.4.6.2. Modes opératoires.....	62
III.4.6.3. Méthode de préparation des solutions étalons.....	62
III.5. Conclusion.....	62

CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Introduction.....	64
IV.2. Analyse par HPLC-UV-visible.....	64
IV.2.1. Données chromatographiques des standards.....	64
IV.2.2. Concentrations des polyphénols et de la caféine dans les différents échantillons de café étudiés.....	73
IV.2.2.1. Validation de la méthode.....	73
IV.2.2.1.1. Limite de détection et de quantification.....	74
IV.2.2.1.2. Taux de récupérations.....	74
IV.2.3. La teneur en caféine dans les échantillons de café.....	82
IV.2.4. Les teneurs en polyphénols dans les différents échantillons de café.....	83
IV.2.5. Effet de la taille des particules de café sur la concentration des composés analysés.....	85
IV.2.6. Effet du degré de torréfaction sur la concentration des composés étudiés.....	87
IV.3. Analyse de caféine et de l'acide chlorogénique (5-QCA) par HPLC-DAD-MS.....	88
IV.3.1. Identification de 5-QCA et de la caféine par HPLC-DAD-MS.....	88

IV.3.2. Quantification des deux principes actifs du café (5-QCA et caféine) par HPLC-DAD.....	91
IV.3.3. Concentrations en caféine et en acide chlorogénique (5-QCA) dans les échantillons de café étudiés.....	94
IV.4. Dosage de quelques éléments minéraux du café.....	97
IV.4.1. Analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) du Zn, Cu, Fe, Cr.....	97
IV.4.2. Analyse par photométrie à émission atomique (PEA) de K et Na.....	97
IV.4.3. Concentrations des éléments métalliques dans les échantillons de café.....	98
IV.5. Mise en évidence de la présence de l'acrylamide dans le café.....	103
IV.5.1. Analyse qualitative de l'acrylamide par HPLC-DAD.....	103
IV.5.1.1. Les données HPLC de l'acrylamide.....	103
IV.5.2. Analyse quantitative de l'acrylamide.....	106
IV.5.2.1. Chromatogrammes des échantillons de café étudiés pour le dosage de l'acrylamide.....	106
IV.5.3. Concentration de l'acrylamide dans les échantillons étudiés.....	109
IV.5.3.1. La détection et la quantification de l'acrylamide dans des échantillons de café.....	110
IV.5.3.2. Influence du degré de torréfaction.....	111
IV.5.4. Impact du pH sur la formation de l'acrylamide.....	112
IV.6. Conclusion.....	112
CONCLUSION GENERALE.....	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	120
ANNEXES.....	131

Liste des figures

Figure I. 1 : Voies d'obtention des grains de café vert.....	6
Figure I. 2: Structures chimiques des deux diterpènes caractéristiques du café.	13
Figure I. 3 : Nombre de références dans quelques pays trouvées dans la base de données Web Of Knowledge' et en utilisant une combinaison des mots 'coffee'	21
Figure I. 4 : Nombre de références dans les dix premiers pays producteurs de café trouvées dans la base de données'Web Of Knowledge' et en utilisant une combinaison.....	22
Figure I. 5 Evolution du nombre de travaux en rapport avec le café en Algérie. Issue de la base de données 'Web Of Knowledge'. Le 27 Juillet 2014.....	23
Figure II. 1 : Formule chimique de l'acrylamide en 2D et 3D.....	25
Figure II. 2 : Formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine et le dicarbone.....	28
Figure II. 3 : Voies de formation de l'acrylamide à partir de l'acroléine.....	30
Figure II. 4 : Formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine par une simple réaction de décarboxylation et désamination (Granvogl & Schieberle, (2006)).....	31
Figure II. 5 : Le Maleimide (2,5-pyrolidone).....	32
Figure II. 6: L'acide fumaramique.....	32
Figure II. 7: Formation du glycidamide à partir de l'acrylamide.....	33
Figure II. 8: N-acétyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)cystéine.....	34
Figure II. 9: Glyceramide.....	35
Figure II. 10: N-acetyl-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl)cyteine.....	35
Figure III. 1: HPLC de type Shimadzu utilisé pour le dosage des polyphénols et de la caféine dans le café.....	39
Figure III. 2: Organigramme de principe de fonctionnement d'un HPLC.....	40
Figure III. 3: Schéma descriptif de fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	41
Figure III. 4 : HPLC Agilent 1260 utilisé pour le dosage des principes actifs du café boisson, identification et dosage de l'acrylamide.....	42
Figure III. 5 : Spectromètre d'absorption atomique Perkin Elmer AAnalyst 400, utilisé pour le dosage des minéraux dans le café.....	44
Figure III. 6: Schéma de principe d'un photomètre à flamme.....	45
Figure III. 7: Photomètre à flamme type JENWAY.....	45
Figure III. 8 : Structures des molécules étudiées: (a) caféine; acides phénoliques: (b) acide chlorogénique, (c)acide caféique, (d) acide cinnamique, (e) acide gallique, (f) acide méthoxy-cinnamique, (g) acide férulique, (h) acide sinapique, (i)acide para-coumarique; flavonoïdes: (j) rutine, (k) catéchine et (l) quercétine.....	48

Figure III. 9 : Protocole expérimental de l'extraction des constituants du café.....	50
Figure III. 10 : Gradient HPLC utilisé.....	52
Figure III. 11 : Organigramme de l'expérience.....	56
Figure III.12a : Échantillons de café vert (Robusta) grillés à différentes températures.....	57
Figure III.12b : Échantillons de café (Arabica, Robusta, Robusta à petits grains (PG), Robusta à gros grains(GG)).....	58
Figure III. 13 : Organigramme de préparation des échantillons.....	60
Figure IV. 1 : Courbe d'étalonnage de la caféine	65
Figure IV. 2 : Chromatogramme de la caféine ; $T_R=5,73\text{min}$, $\lambda=280\text{nm}$	65
Figure IV. 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique.....	66
Figure IV. 4 : Chromatogramme de l'acide chlorogénique ; $T_R=4,77\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	66
Figure IV. 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique.....	67
Figure IV. 6 : Chromatogramme de l'acide caféique; $T_R=6,38\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	67
Figure IV. 7 : Courbe étalon de l'acide cinnamique.....	68
Figure IV. 8 : Chromatogramme de l'acide cinnamique; $T_R=6,67\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	68
Figure IV. 9 : Chromatogramme de l'acide férulique.....	69
Figure IV. 10 : Chromatogramme de l'acide férulique; $T_R=8,54\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	69
Figure IV. 11 : Chromatogramme de l'acide coumarique.....	70
Figure IV. 12 : Chromatogramme de l'acide coumarique; $T_R=7,90\text{min}$, $\lambda=280\text{nm}$	70
Figure IV. 13 : Chromatogramme de l'acide méthoxycinnamique.....	71
Figure IV. 14 : Chromatogramme de l'acide méthoxycinnamique; $T_R=9,76\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	71
Figure IV. 15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	72
Figure IV. 16 : Chromatogramme de la catéchine; $T_R=3,95\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	72
Figure IV. 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	73
Figure IV. 18 : Chromatogramme de l'acide gallique; $T_R=1,80\text{min}$, $\lambda=310\text{nm}$	73
Figure IV. 19 : Taux de récupérations pour chaque composé à partir du café moulu dopé, obtenus à partir d'un extrait du café torréfié.....	76
Figure IV. 20 : Taux de récupérations pour chaque composé à partir du café moulu dopé, obtenus à partir d'un extrait du café vert.....	76
Figure IV. 21 : Chromatogramme par HPLC de: A) café vert, B) café moulu non emballé, C) café moulu emballé. ①acide gallique, ②Inconnu, ③Catéchine, ④acide chlorogénique, ⑤Caféine, ⑥acide caféique, ⑦acide cinnamique, ⑧acide férulique, ⑨acide méthoxy-cinnamique.....	78
Figure IV. 22 : Teneurs de la caféine dans les échantillons de café.....	82
Figure IV. 23 : Teneurs en ACG dans les échantillons de café.....	83
Figure IV. 24 : Les polyphénols totaux dans les échantillons de café.....	85

Figure IV. 25: La teneur en caféine et en acides phénoliques (mg/l) dans les échantillons de café moulu (CVF) et (CVG).....	86
Figure IV.26 : Mécanisme de fragmentation de l'acide chlorogénique en mode positif (Fang et al. (2002)).....	89
Figure IV. 27: Chromatogramme d'un échantillon de café et spectres de masse en mode positif obtenus par HPLC- MS:(a) pic de la caféine et (b) pic de l'acide chlorogénique (5-QCA).....	90
Figure IV. 28: Chromatogramme de la caféine ; TR=7,9min, λ =280nm.....	92
Figure IV. 29: Chromatogramme de l'acide chlorogénique ; TR=6,5min, λ =310nm.....	92
Figure IV. 30: Chromatogramme HPLC du café moulu Robusta (cafetière électrique); 1: 5ACQ, 2: caféine.....	93
Figure IV. 31: Chromatogramme HPLC du café moulu Robusta (cafetière turque); 1: 5ACQ, 2: caféine.....	93
Figure IV. 32: Teneurs en caféine dans le café préparé par la cafetière turque et électrique.....	95
Figure IV. 33: Teneurs en acide chlorogénique dans le café préparé par la cafetière turque et électrique.....	96
Figure IV. 34: Teneurs moyennes en Zn, Fe, Cr, Cu, K, Na dans les différents échantillons de café.....	100
Figure IV. 35: Minéraux totaux dans les échantillons de café.....	100
Figure IV. 36: Courbe étalon de l'acrylamide.....	104
Figure IV. 37: Chromatogramme de l'acrylamide, T_R : 0,30min, λ : 210nm.....	104
Figure IV. 38: Chromatogramme du café emballé (3) ; Pic (2), T_R : 0,30min, λ : 210nm.....	105
Figure IV. 39: Chromatogramme du café emballé (3) dopé par 1 μ l de l'acrylamide ; Pic (2) T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.....	105
Figure IV. 40: Chromatogramme du café torréfié à 200°C (couleur claire); Pic (2),.....	106
Figure IV. 41: Chromatogramme du café torréfié à 245°C (couleur moyenne); Pic (2), T_R : 0,30min, λ : 210nm.....	106
Figure IV. 42: Chromatogramme du café torréfié à 320°C (couleur foncée); Pic (3),.....	107
Figure IV. 43: Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (PG)) ; Pic (2), T_R : 0,30min, λ : 210 nm.....	107
Figure IV. 44: Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (GG)) ; Pic (2), T_R : 0,30 min, λ : 210nm.....	108
Figure IV. 45: Chromatogramme du café torréfié moulu non emballé (Robusta (PG + GG)) ; Pic (2), T_R : 0,30min, λ : 210nm.....	108
Figure IV. 46: Teneurs en acrylamide dans les différents échantillons du café.....	110

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Composition des grains de café verts et torréfiés selon la variété (en pourcentage massique par rapport à la matière sèche) (Houssou, (2007)).....	11
Tableau III.1 : quelques caractéristiques de la caféine et des polyphénols étudiés	47
Tableau III.2 : Gradient HPLC.....	51
Tableau III.3 : Solutions étalons utilisées pour le Zn,Fe, Cu et le Cr.....	60
Tableau IV. 1 : Données HPLC pour la caféine.....	64
Tableau IV. 2 : Données HPLC pour l'acide chlorogénique.....	65
Tableau IV. 3 : Données HPLC pour l'acide caféique.....	66
Tableau IV. 4 : Données HPLC pour l'acide cinnamique.....	67
Tableau IV. 5 : Données HPLC pour l'acide férulique.....	68
Tableau IV. 6 : Données HPLC pour l'acide coumarique.....	69
Tableau IV. 7 : Données HPLC pour l'acide méthoxycinnamique.....	70
Tableau IV. 8 : Données HPLC pour la catéchine.....	71
Tableau IV. 9 : Données HPLC pour l'acide gallique.....	72
Tableau IV. 10 :Paramètres graphiques de la méthode analytique proposée, RT: temps de rétention (mn), LOD: Limite de détection; LOQ: Limite de quantification.....	74
Tableau IV. 11 : Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement des différents composés standards dans le café moulu. Les extraits de café ont été préparés à partir du café vert et torréfié (Robusta). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne± RSD.....	75
Tableau IV. 12 : Concentrations des acides phénoliques en mg L ⁻¹ (a) et en mg/100 g (MS) (b), dans les échantillons du café vert et torréfié, en utilisant la méthode analytique proposée.....	80
Tableau IV. 13 : Concentrations de caféine, catéchine, polyphénols totaux (PT) en mg L ⁻¹ (a) et en mg /100g MS (b) dans le café vert et torréfié, en utilisant la méthode proposée..	81
Tableau IV. 14 : La teneur en caféine et en acides phénoliques (mg/l) dans les échantillons de café moulu fins (CVF) et gros (CVG).....	86
Tableau IV. 15 : Substances, temps de rétention(TR), masses molaires et pics recherchés en MS à polarité positive.....	89
Tableau IV. 16 : Equations de linéarité et coefficients de corrélation des deux composés analysés.....	91

Tableau IV. 17 : Teneur en mg/l en caféine et en acide chlorogénique (5-CQA) pour les différents échantillons de café boisson.....	94
Tableau IV. 18 : Equations de linéarité et coefficients de corrélation caractérisant le dosage par SAA.....	97
Tableau IV. 19 : Equations de linéarité et coefficients de corrélation caractérisant le dosage par PEA.....	98
Tableau IV. 20 : Teneur de Zn, Fe, K, Na, Cu et le Cr en (mg/100 g) dans les échantillons du café vert et torréfié, en utilisant le spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) et le photomètre d'émission atomique (PEA).....	99
Tableau IV. 21 : Données HPLC de l'acrylamide.....	103
Tableau IV. 22 : Concentrations ($\mu\text{g/l}$) de l'acrylamide dans les échantillons étudiés....	109

Liste des abréviations

SAA	Spectromètre d'absorption atomique
PEA	Photomètre d'absorption atomique
HCL	Lampes à cathode creuse
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
GC	Chromatographie gazeuse
MS	Spectromètre de masse
UV	Ultra-violet
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
ESI	Ionisation Electrospray
5-CQA	Acide 5-caféyl-quinique
CGA	Acide chlorogénique
AC	Acide caféique
AF	Acide férulique
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
T _R	Temps de retention
M	Masse molaire
Min	Minute
mm	Millimètre
ml	Millilitre
nd	Non détecté
NE	non empaqueté
MeOH	Méthanol
ACN	Acétonitrile
TFA	Acide Trifluoroacétique
H ₃ PO ₄	Acide phosphorique
CH ₂ O ₂	Acide formique
R ²	Coefficient de corrélation
PG	Petit grain
GG	Gros grain
CVF	Café vert à fines particules

CVG	Café vert à grosses particules
PT	Polyphénols totaux
PS	Poids sec
S/N	Rapport signal sur bruit (de l'anglais, signal/noise)

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, le café est l'un des principaux produits du commerce mondial, c'est la deuxième marchandise échangée entre les pays, après le pétrole. Il constitue l'une des denrées alimentaires les plus consommées au monde et l'un des aliments nutraceutiques qui présentent des bienfaits pour la santé humaine.

Le café contient des composés biologiquement actifs; la caféine, qui est un alcaloïde, agit comme stimulant du système nerveux central et du système cardio-vasculaire, en diminuant la somnolence et en augmentant temporairement l'attention. Les acides chlorogéniques (ACG) qui sont des esters des acides trans-cinnamiques (acide caféique, férulique et para-coumarique), jouent un rôle important dans la qualité gustative des cafés. De plus, ces acides confèrent au café une activité antioxydante avérée. Le café contient également, le saccharose qui est un produit essentiel pour notre organisme en lui apportant de l'énergie dont il a besoin pour son fonctionnement. Les minéraux font, aussi, partie des composants du café, on y trouve notamment le potassium et le sodium.

La valeur nutritionnelle et la saveur du café d'une part, et ses propriétés toxicologiques de l'autre part, sont fortement influencées par la torréfaction qui est à l'origine de nombreuses réactions chimiques de dégradation entraînant la disparition de composés initiaux thermosensibles et la formation de nouveaux composés. Les traitements thermiques peuvent ainsi induire des effets bénéfiques tels que la disparition des toxines et l'augmentation de la digestibilité. Parmi les effets indésirables, on peut citer: la dégradation des vitamines, des protéines et des acides gras essentiels et l'apparition de composés toxiques. Certains des produits néoformés peuvent jouer un rôle prépondérant dans les propriétés organoleptiques du café. Des chercheurs ont récemment, découvert que le café contient de l'acrylamide résultant du processus de torréfaction. Cette molécule a été reconnue comme potentiellement cancérigène et sa teneur dans le café doit être connue avec une grande précision.

Dans le marché Algérien, différentes marques de café emballé sont disponibles, ayant chacune un goût distinct. Ces cafés sont composés principalement de deux variétés de cafés ; Robusta et Arabica purs ou un mélange des deux variétés dans des proportions allant de 20 à 80 % de chacune.

D'après nos connaissances, aucun travail portant sur l'investigation et/ou la quantification des composants organiques ou minéraux des cafés vendus sur le marché algérien n'a été rapporté. A partir de cette constatation, il nous a paru évident de doser par des méthodes d'analyse physicochimiques qualitatives et quantitatives, les constituants les plus

importants de trois types de cafés: vert, torréfié, et soluble dans seize variétés de café du marché algérien.

Parmi les méthodes de dosage des composés organiques présents dans les denrées alimentaires, l'HPLC est la plus appropriée, vu qu'elle est d'une grande précision, fiable et facile à mettre en œuvre. Ainsi, les teneurs en constituants du café ont été mesurées par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec trois différents appareillages, chacun présentant un intérêt spécifique. Le dosage des minéraux a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique et photométrie à flamme.

En plus, il a été constaté que l'aspect physique du café emballé diffère de celui du café pur, en vrac, broyé. Il est particulièrement caractérisé par la présence d'une brillance due à l'enrobage et la caramélisation au cours du procédé de torréfaction du café conditionné provoquant par la suite, une augmentation des concentrations de l'acrylamide; une molécule très nocive pour la santé humaine. Cette molécule a été identifiée et déterminée dans les échantillons du café étudiés, par HPLC- UV-DAD. Dans cette étude, l'effet de la torréfaction sur la teneur en acrylamide a été aussi investigué.

L'objectif de ce travail est donc, d'effectuer des analyses qualitatives et quantitatives des principaux composants de seize échantillons disponibles sur le marché de la ville de Guelma. Les constituants du café concernés par cette recherche sont : la caféine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide para-coumarique, l'acide gallique, l'acide sinapique, l'acide cinnamique et méthoxycinnamique, la catéchine, la rutine, la quercétine, l'acrylamide, le zinc, le chrome, le cuivre, le fer, le sodium et le potassium.

Cette thèse s'articule autour de quatre chapitres :

- Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur le café.
- Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à la molécule d'acrylamide.
- Dans le troisième chapitre, seront présentées les méthodes d'analyse utilisées dans ce travail ainsi que les modes opératoires mis en œuvre.
- L'interprétation des différents résultats obtenus sera détaillée dans le quatrième chapitre.

- Enfin, une conclusion générale terminera ce travail et portera sur une lecture attentive et succincte des résultats obtenus et une présentation des perspectives envisagées.

CHAPITRE I
GENERALITES SUR LE CAFE

I.1. Introduction

Ce chapitre consistera en une revue de la littérature concernant le café, ses constituants, ses méthodes de traitement et de préparation, ainsi que ses effets sur un certain nombre de pathologies. En plus d'une rétrospective statistique de l'ensemble des travaux effectués sur le café à travers le monde.

I.2. Le café

Le café est une boisson largement consommée dans le monde entier et le deuxième produit le plus échangé, après le pétrole (**Fujioka & Shibamoto, (2008)**). Le Brésil est le plus grand producteur et exportateur de café, ce qui représente 30% du marché international pour ce produit. La consommation mondiale de café a connu une croissance constante depuis plus de 40 ans, cette consommation élevée du café est liée à ses caractéristiques organoleptiques et stimulantes et aux effets bénéfiques pour la santé en raison de la présence de composés bioactifs.

Il existe deux types principaux de café; Arabica et Canephora généralement connu sous le nom de Robusta. Arabica ou Robusta ou des mélanges des deux sont les cafés du commerce. L'Arabica est considéré comme la meilleure variété de café (**Farah et al. (2006)**).

La boisson du café est donc riche en substances biologiquement actives ayant des répercussions sur la santé humaine. Il s'agit notamment de la caféine, les micronutriments et les composés phénoliques (**Haler, (1988)**) et en particulier les acides chlorogéniques (CGA) qui sont formés par l'estérification de certains acides trans-cinnamiques tels que l'acide caféique, l'acide férulique, et l'acide p-coumarique, avec de l'acide quinique.

I.3. Botanique

L'Arabica pousse encore à l'état sauvage en Ethiopie où il fut découvert et utilisé pour ses vertus stimulantes et médicinales (**Costa et al. (1999)**). Il fut cultivé en premier lieu au Yémen. Il est cultivé entre 600 et 2000 mètres d'altitude dans la zone intertropicale, surtout en Amérique du Sud, en Amérique Centrale et dans quelques pays d'Afrique et d'Asie. Il est très apprécié pour ses qualités aromatiques et la finesse de son goût. Ses principales variétés sont le Moka, le Bourbon et le Maragogype aux fèves géantes.

Le Robusta tient son nom de sa caractéristique: la robustesse. On le trouve à l'état sauvage dans les forêts denses de l'Afrique de l'ouest et centrale (bassin du Congo) et se cultive aujourd'hui dans les régions de faible altitude, en Afrique, mais aussi en Inde, en

Indonésie, à Madagascar, au Brésil, aux Philippines et au Vietnam. Cette variété est plus vigoureuse que l'Arabica, son goût est puissant et corsé. En moyenne, elle est deux fois plus chargée en caféine que l'Arabica ce qui donne un café très tonique.

Le traitement des fruits murs du caféier s'effectue sur leurs lieux de production. Ils subissent quelques opérations qui ont pour objet de dégager les grains de leurs enveloppes (pulpe, mucilage, pellicule) et d'améliorer leur présentation (Costa *et al.* (1999)).

Pour obtenir le grain marchand, deux méthodes de préparation du café sont pratiquées; comme illustré par l'organigramme de la figure (I.1) ; la voie sèche et la voie humide, cette dernière comportant une étape de fermentation contrôlée.

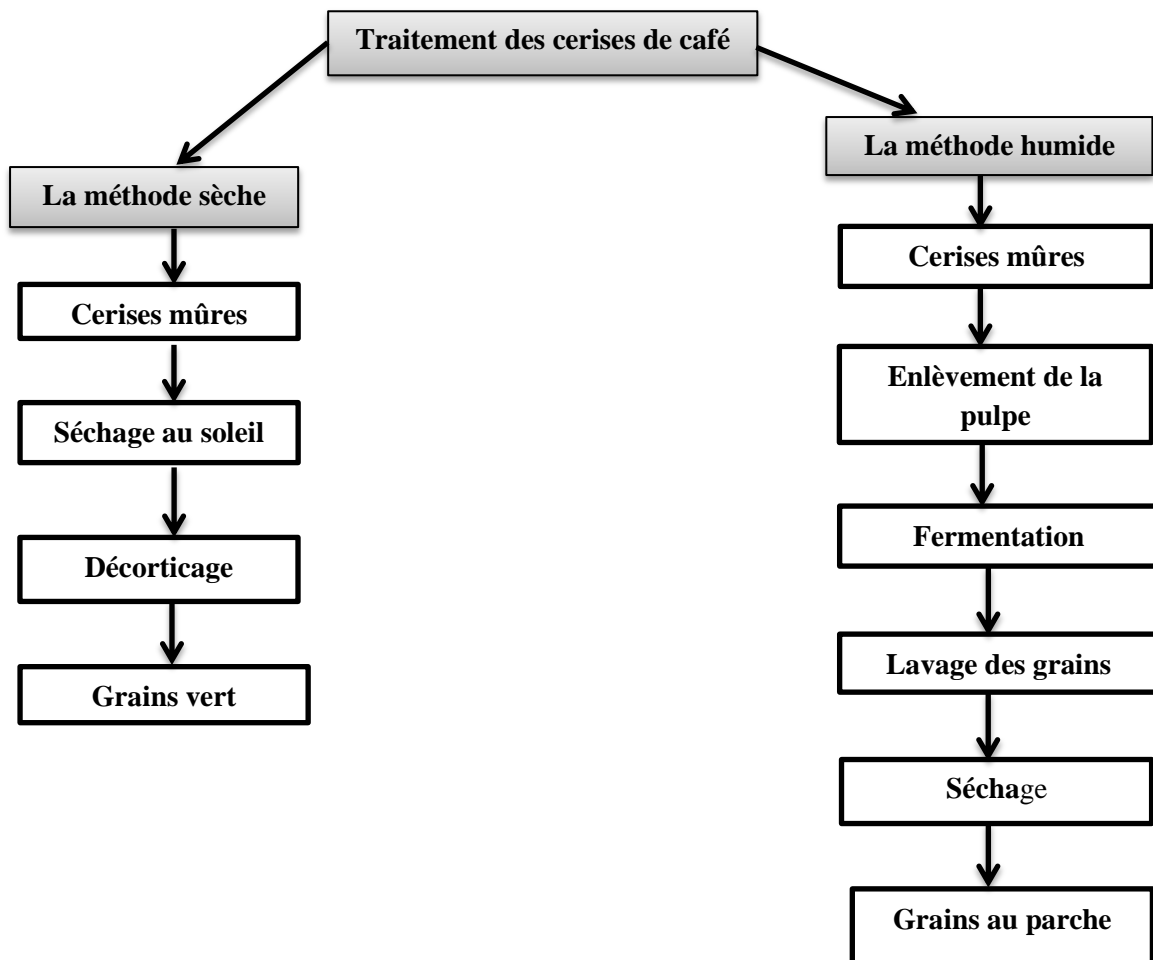


Figure I.1 : Voies d'obtention des grains de café vert.

Dans la voie humide, l'usinage des fruits frais s'effectue en trois étapes:

- Élimination de la pulpe (dépulpage) et du mucilage (couche riche en pectine adhérent à la parche et empêchant un séchage rapide des grains) et lavage.
- Séchage du café-parche.
- Élimination des enveloppes internes, parche et pellicule (déparchage) (**Costa et al. (1999)**).

La voie sèche se résume en deux étapes:

- Séchage des fruits (café en cerise ou café coque).
- Élimination des enveloppes desséchées en une seule opération mécanique (décorticage).

Les grains de café que l'on obtient avec ces deux méthodes d'extraction constituent le « café vert ». Les grains sont ensuite torréfiés et prêts pour la consommation. (**Casal & Oliveira, (2000)**).

I.4. La torréfaction

La torréfaction est un procédé qui consiste à traiter les grains de café vert par la chaleur sèche et forte, tout en permettant au café d'acquérir l'essentiel de ses propriétés organoleptiques (couleur, arôme, goût), par le biais de la réaction de Maillard (**Fujioka & Shibamoto, (2008)**) (cf. chapitre II.4.1).

Sous l'effet de la température élevée ; Les composés phénoliques sont fortement dégradés, tandis que les alcaloïdes sont modifiés différemment selon leurs natures. La caféine est volatilisée sans décomposition, mais la trigonelline, partiellement détruite, elle participe probablement à la formation de la pyridine et de l'acide nicotinique (**Hečimović et al. (2011)**). L'influence de la température de grillage sur les constituants du café a été confirmée par plusieurs recherches scientifiques. Les résultats de **Hečimović et al. (2011)** ont révélé que la teneur en composés bioactifs ainsi que les propriétés antioxydantes du café sont affectées par les conditions de torréfaction.

Sato et al. (2011) ont montré que les acides chlorogéniques (CGA) qui contribuent également aux propriétés antioxydantes du café torréfié, ont été réduits pendant la torréfaction du café. **Moon et al. (2009)** ont indiqué que les conditions de torréfaction jouent un rôle important dans la teneur en acide chlorogénique des fèves de café.

Bien que les antioxydants naturels soient perdus pendant le chauffage, les propriétés antioxydantes du café peuvent être maintenues par la formation de nouveaux antioxydants, tels que les produits de la réaction de Maillard (**Naira & Neura, (2013)**).

Daglia et al. (2008) ont constaté que la réduction progressive de l'activité antioxydante du café boisson est associée au degré de torréfaction des grains, en montrant que le café moyennement torréfié possède la plus forte activité, en raison de l'équilibre entre la dégradation des composés phénoliques et la génération des produits de la réaction de Maillard au cours de ce processus.

Les composés générés pendant la torréfaction sont alors responsables de nombreuses activités biologiques bénéfiques du café boisson (**Daglia et al. (2008)**). Cependant, des composés cancérigènes, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques peuvent également être formés par la combustion incomplète de la matière organique au cours de la torréfaction, heureusement, ils ont été détectés dans le café boisson en quantités insignifiantes (**Orecchio et al. (2009)**). La formation de l'acrylamide pendant la torréfaction du café a été confirmée, en particulier pendant les premières minutes du processus de torréfaction. Il a également été observé que, lors de la torréfaction du café ; le robusta contenait plus d'acrylamide que le café arabica et, que sa concentration diminue avec le temps au cours du traitement thermique (**Bagdonaitė et al. (2008)**). De plus, il s'est avéré que le stockage dans des conditions ambiantes réduit les teneurs en acrylamide du café torréfié (**Lantz et al. (2006)**).

L'action de l'élévation progressive de la température sur le café, donne lieu aux constatations suivantes: vers 100 °C, la couleur verte des grains commence à virer au jaune; la dessiccation se traduit par un dégagement de vapeur d'eau et d'une odeur de pain grillé. L'arôme commence à se développer aux environs de 180 °C. A cette température, les gaz de combustion apparaissent sous forme de volutes blanches bleutées, avec dégagement de CO₂ et de CO. L'arôme atteint, alors, son plein développement. Vers 300 °C, les grains de café sont noirs, charbonneux, friables à une légère pression; l'arôme a totalement disparu. A ce stade excessif de la torréfaction, le café est carbonisé (**Bastian, (2006)**).

Lors de la torréfaction, l'acidité du café diminue alors que l'amertume augmente. Ceci est surtout dû au fait que le saccharose du grain de café commence à caraméliser entre 170 et 200°C et donne aussi la couleur brune aux grains de café. Dans certains cas, du sucre peut être

rajouté au café avant de le torréfier, afin d'obtenir un café torréfié plus amer et plus foncé. La durée de la torréfaction est habituellement de 12 à 15 minutes (**Bastian, (2006)**).

I.5. Préparation du café boisson (Houessou, (2007))

On compte six modes de préparation du café conférant à la boisson obtenue des propriétés organoleptiques et compositions bien distinctes.

- La dissolution

Dans le cas particulier du café instantané, la boisson est préparée en mélangeant simplement du café soluble avec de l'eau bouillante.

- La filtration

C'est la méthode que l'on utilise couramment avec les cafetières électriques modernes. Cette cafetière présente la particularité d'être constituée de deux parties : la moitié supérieure contenant le filtre recouvert d'un tamis ou d'un disque percé de petits trous sur lequel le café moulu grossièrement est déposé, et la partie inférieure dans laquelle le café boisson est recueilli. Les filtres utilisés sont en acier inoxydable, en papier spécial, en nylon, ou encore en plastique.

- L'infusion

Cette méthode requiert l'usage d'une cafetière à piston. Dans un récipient en verre, un filtre sous la forme d'un piston permet la séparation du marc de la boisson en l'isolant au fond du récipient.

- L'ébullition

Elle consiste à verser le café moulu directement dans de l'eau en ébullition, avant de maintenir le mélange à ébullition pendant 1 à 2 min. Avant consommation, le café bouilli est généralement filtré.

- La décoction

Il s'agit de la méthode la plus ancienne. On utilise cette méthode dans la préparation du café turc. Une mouture fine de café mélangée à de l'eau (environ 3 cuillerées de café pour 300 ml d'eau) est portée à ébullition dans une cafetière arabe ou tout autre pot allant sur le feu.

- La percolation

C'est le procédé utilisé par les cafetières italiennes. La cafetière est constituée de deux compartiments séparés par un porte-filtre métallique dans lequel se trouve la dose de café (mouture fine). L'eau, placée dans le récipient inférieur, bout puis s'évapore lors du chauffage. La vapeur sous pression ainsi formée fait remonter l'eau, qui traverse la mouture

avant de monter dans la cheminée, pour retomber finalement dans la verseuse. Le café obtenu est dit à l'italienne (ou café *moka* ou café *napolitain*).

- ***La percolation sous haute pression ou expresso***

Un expresso (de l'italien *espresso*, extrait par pression ou très vite), ou café express, est un café très corsé avec un fort arôme, obtenu en faisant passer rapidement de l'eau chaude sous une pression de 9 bars à travers du café finement moulu et torréfié. Cette opération se fait à l'aide d'une cafetière à expresso.

Dans la partie expérimentale de ce travail, le café boisson a été préparé à partir de café moulu, avec une cafetière turque, qui est encore employée en Algérie et une cafetière à filtre, parce que c'est le mode de préparation le plus utilisé actuellement.

I.6. Composition et propriétés nutritionnelles du café

La composition du café est très complexe, plus d'une centaine de substances chimiques ont été identifiées (**Houessou, (2007)**). La composition du café a été déterminée par plusieurs auteurs, cependant, elle diffère suivant la variété du caféier, la maturité du fruit, le type de traitement appliqué et le lieu de production ainsi que d'autres facteurs environnementaux (**Guyot et al. (1996)**).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés dans leurs travaux aux deux espèces de café ; l'Arabica et le Robusta (**Cliford, (2004)**; **Farah & Donangelo, (2006)**), cependant, d'autres auteurs ont focalisé leurs travaux, sur quelques composés chimiques de ce fruit, notamment: **Fujioka & Shibamoto, (2008)**, sur l'acide chlorogénique et la caféine ; **Trugo, (1984)** sur les acides chlorogéniques ; **Casal et al. (1999)** sur les acides hydroxycinnamiques; **Naira & Neura, (2013)** sur la caféine et les acides phénoliques ; **Farah & Donangelo, (2006)** sur les composés phénoliques; **Huck et al. (2005)** sur la caféine et la théobromine; **Rakotomalala & Charrier, (1993)** sur les acides phénols et **Peronne et al. (2008)** sur les teneurs en caféine, trigonelline et acide nicotinique.

Tableau I.1 : Composition des grains de café vert et torréfié selon la variété (en pourcentage massique par rapport à la matière sèche) (Houessou, (2007)).

Composants	Café Arabica		Café Robusta	
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié
Caféine	0,8-1,4	0,9-1,6	1,7-4,0	1,2-2,6
Trigonelline	0,6-1,2	0,1-1,2	0,3-1,0	0,1-1,2
Acides aliphatiques	1,0-3,0	1,0-4,6	1,0-2,0	1,0-4,6
Acide quinique	0,4	0,8	0,4	1,0
Acides chlorogéniques totaux	5,5-9,0	0,2-3,5	7,0-12,0	0,2-4,6
Oligosaccharides	6,0-8,0	0,0-3,5	5,0-7,0	0,0-3,5
Saccharose	8,0	0,0	4,0	0,0
Polysaccharides totaux	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	/
Protéines	11,0-14,0	13,0-15,0	11,0-14,0	13,0-15,0
Acides aminés libres	2,0	0,0	2,0	0,0
Lipides totaux	10,0-18,0	14,5-20,0	8,0-13,0	8,3-16,0
Minéraux	3,0-4,2	3,5-4,5	3,5-4,5	4,6-5,0
Eau	5,0-12,0	0,0-5,0	5,0-12,0	0,0-5,0

I.6.1. Les apports en acidité et en antioxydants

- **Les acides-phénols**

Les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés des produits secondaires chez les végétaux. Le terme acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques (acides-phénols en C6-C1) et cinnamiques (acides-phénols en C6-C3). La plupart de ces derniers (acide caféique (AC), acide férulique (AF)) sont souvent estérifiés: esters d'alcools aliphatiques et esters de l'acide quinique (l'acide chlorogénique est le plus fréquent).

Les dérivés des acides hydroxycinnamiques possèdent un grand pouvoir antioxydant, c'est-à-dire qu'ils neutralisent les radicaux libres qui endommagent les cellules, ce qui a pour effet de renforcer les défenses immunitaires (**Kim, (2001)**).

Les acides chlorogéniques (ACG) qui sont également retrouvés dans l'artichaut, les graines de tournesol, et le thé, sont des esters composés d'un acide hydroxycinnamique (comme l'acide caféique, férulique et para-coumarique), et de l'acide quinique. Ils contribuent à l'augmentation de l'amertume et l'acidité du café. Ce sont des précurseurs de phénols et de catéchols qui se forment pendant la torréfaction et peuvent donner un goût désagréable au café. Plus la torréfaction est poussée, plus les ACG seront dégradés donnant un café moins acide, mais leur effet bénéfique diminue également.

Les principales sous classes de l'ACG dans le café sont:

- Les acides caféylquiniques.
- Les acides dicaféylquiniques.
- Les acides férulylquiniques.
- Les acides para-coumarylquiniques et les acides caféylférulylquiniques, avec une moindre concentration.

Quand on parle de l'acide chlorogénique, on parle d'un ester spécifique qui compte pour près de 60% des ACG dans le café, il s'agit de l'acide 5- caféylquinique (5-CQA).

• **Les autres acides**

A côté des ACG et de l'acide quinique, d'autres acides non volatils comme les acides (citrique, malique et oxalique) et des acides volatils, (principalement l'acétique) sont retrouvés dans le café. Leur teneur totale est presque la même pour l'Arabica et le Robusta.

Le café contient de nombreux composants qui sont essentiels au goût et certains de ces constituants sont un réel potentiel médical. Selon la variété de café, le degré de torréfaction et le mode de préparation, ces principes bioactifs sont plus ou moins présents. Pour avoir un café fonctionnel et nutraceutique, il faut veiller à avoir des grains de bonne qualité, dont la torréfaction est moyennement poussée et s'effectue à basses températures.

I.6.2. Les apports en Lipides

Comme indiqué dans le tableau (**I.1**), plusieurs constituants lipidiques (plus de 10 % du poids de la matière sèche) sont présents : à côté des stérols, des hydrocarbures, de tocophérols, on note la présence d'alcools diterpéniques.

Les deux diterpènes caractéristiques du café sont le cafestol et le kahweol (**Figure I.2**), ce dernier est présent uniquement à l'état de traces dans le Robusta. On peut considérer que les Arabicas sont des cafés riches en lipides (10 à 18 %); les Robustas en contiennent relativement moins (8 à 13 %) (**Houessou, (2007)**).

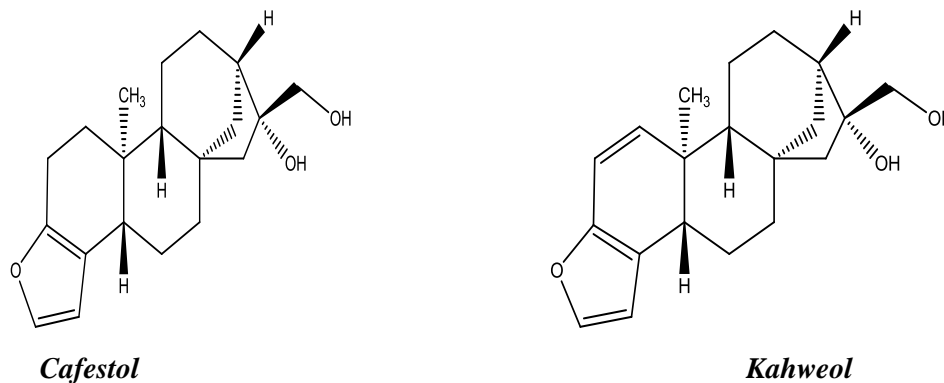


Figure I. 2 : Structures chimiques des deux diterpènes caractéristiques du café.

1.6.3. Les apports en glucides

Les glucides sont la classe majoritaire dans le café vert (parfois plus de 50 % de la matière sèche), Il y a des mono, oligo et polysaccharides. Lors de la torréfaction, les glucides participent à la réaction de Maillard (**Oosterveld et al. (2003)**). Ils contribuent également à l'acidité du café. Après la torréfaction, le saccharose qui se trouve en teneurs importantes dans l'Arabica, confère à cette variété la qualité, la saveur et l'arôme supérieurs.

1.6.4. Les apports en protéines et en acides aminés libres

Les protéines et les acides aminés contribuent également au goût et à l'odeur du café et participent aussi à la réaction de Maillard.

Les acides aminés présents dans le café vert sont principalement liés aux protéines, la fraction libre ne représente qu'environ 5 % du total, avec une teneur sensiblement plus élevée pour le Robusta que pour l'Arabica. Parmi les principaux acides aminés qui composent cette fraction libre, on trouve les acides glutamiques, asparagine et l'acide aminobutyrique.

Les teneurs en protéines du grain vert du café Arabica et du café Robusta sont comparables, et varient entre 8,7 et 13,6 % de la matière sèche. Ces protéines se composent de deux fractions en quantités comparables, l'une soluble dans l'eau, l'autre insoluble.

Plusieurs enzymes ont, également, été mises en évidence dans le café vert, notamment la polyphénoloxydase, responsable de la décoloration des grains défectueux en catalysant l'oxydation des acides chlorogéniques. Cependant, ces enzymes ne représentent qu'une

faible part des protéines, et de plus, elles sont détruites au cours de la torréfaction.

1.6.5. Les apports en minéraux

Le minéral principal du café est le potassium (40%), suivi du phosphore. Il existe d'autres minéraux comme le sodium, le magnésium, le calcium et le soufre, mais aussi des traces de zinc, de strontium, de silicium, de manganèse, de fer, de cuivre, de baryum, de bore et d'aluminium.

La composition moyenne en minéraux des grains verts, exprimée en pourcentage de matière sèche, est la suivante : potassium 1,63-2%, magnésium 0,16-0,31%, sulfates 0,13%, calcium 0,07-0,035%, phosphates 0,13-0,22%. La grande majorité (90%) des minéraux sont hydrosolubles, et donc présents dans la boisson (**Bastian, 2006**).

Les concentrations en minéraux des grains dépendent de la variété de café. Ainsi, le café Robusta contient davantage d'éléments minéraux que l'Arabica. En outre, le mode de production des grains de café vert a également une influence. Ainsi on observe que, lorsque le dépulpage est réalisé par voie humide, la teneur en minéraux des grains de café vert obtenue est sensiblement plus faible que celle obtenue pour les grains préparés par voie sèche (**Houssou, (2007)**).

1.6.6. Les apports en vitamines

Le café contient aussi des vitamines, telles que :

- L'acide nicotinique ou vitamine B3.
- La vitamine PP (ou niacine) indispensable à notre système nerveux et à la régénération de notre peau.
- D'autres vitamines du groupe B : B2, B5 et B6.

Toutes ces vitamines proviennent de la dégradation de la trigonelline lors de la torréfaction. Les vitamines B1 et C contenues dans le grain de café vert sont détruites suite à la torréfaction.

1.6.7. La caféine

L'un des composés majeurs du café est la caféine, elle constitue le principal alcaloïde et assurément l'un des principes actifs le plus connu du café. On la retrouve également dans d'autres aliments comme le thé, le chocolat, le cacao, le coca et dans d'autres boissons énergisantes. Sa présence dans les grains de café, et ensuite dans le café boisson, est d'une grande importance en raison de son activité physiologique importante et multiple. Le goût de la caféine est plutôt amer, mais elle ne compte que pour 10% de l'amertume totale du café.

La caféine est une base purique de la famille des méthylxanthines, c'est la 1,3,7 triméthylxanthine. Sa formule brute est $C_8H_{10}N_4O_2$ avec une masse moléculaire de 194 g/mol.

La teneur en caféine d'une tasse de café peut varier de façon considérable selon l'origine et la composition du mélange, la méthode de préparation et la dose de la mouture (**Mccusker et al. (2006)**).

I.7. Emploi du café et de la caféine en médecine

Le café est une substance médicinale. Il est utilisé dans le domaine pharmaceutique à l'état torréfié ou naturel. Parmi les indications thérapeutiques : le café sert à préparer un sirop contre la coqueluche (**Jane & Balz, (2006)**).

La caféine est le composé principal du café, elle a des effets sur la santé et c'est en fait le seul composé qui a trouvé une application sous forme purifiée dans des médicaments.

La caféine, jusque-là contre-indiquée chez l'enfant, peut cependant être utilisée sous forme de citrate de caféine dans le traitement des apnées du prématuré (**Comer et al. (2001)**).

Cet alcaloïde est ajouté aux antalgiques (paracétamol et acide salicylique) afin de combattre la fatigue. Elle intervient aussi dans le système d'inhibition de la douleur et elle peut augmenter de 5 à 10 fois l'effet antalgique (**Haler, (1988)**).

La caféine possède également un effet potentiel sur la migraine ; la combinaison de l'acétaminophène, l'aspirine et la caféine est très efficace pour le traitement de la migraine et des maux de tête ainsi que pour atténuer les nausées et l'incapacité fonctionnelle associée à des crises de migraine (**Richard et al. (1998)**). La structure xanthique est actuellement considérée pour le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de la maladie de Parkinson (**Trockle, (2000)**).

I.8. Les effets physiologiques du café

Le café est considéré comme une plante (médicinale) utilisée en médecine comme stimulant et accélérateur de l'absorption d'autres molécules (**Haler, (1988)**).

La consommation habituelle du café a été associée à une réduction du risque de mortalité et de maladies chroniques, y compris le cancer. La capacité antioxydante du café est associée à la présence à la fois des composés naturels et de substances développées pendant la torréfaction (**Vignoli et al. (2011)**).

L'effet bénéfique du café s'appuie sur divers mécanismes plausibles, en raison de la présence d'une variété de composés biologiques (**Farah et al. (2006)**). Le café contient plusieurs ingrédients fonctionnels connus, comme les flavonoïdes (catéchines et anthocyanes), les acides ; caféique férulique, chlorogénique, p-coumarique, férulique et sinapique, (**Meletis, (2006) ; Manach et al. (2004)**). En outre, d'autres composés biologiquement actifs sont présents dans le café notamment : l'acide nicotinique, trigonelline, quinoléique, l'acide tannique, l'acide pyrogallique et la caféine (**Minamisawa et al. (2004)**).

Des études récentes ont montré que la consommation des extraits de café vert a causé des effets hypotenseurs chez le rat et chez l'homme, un effet inhibiteur sur l'accumulation de graisse et le poids corporel chez les souris et les humains, en plus d'une modulation de glycémie. Ces effets biologiques ont été attribués à l'acide chlorogénique (CGA) présent dans le café vert (**Farah et al. (2008)**).

La consommation de CGA a été associée à un certain nombre d'avantages pour la santé tels que la réduction du risque relatif aux maladies cardiovasculaires, ou diabète de type 2, et à la maladie d'Alzheimer (**Arendash & Cao, (2010)**).

Différentes études ont révélé qu'un risque beaucoup plus faible de diabète de type 2 est associé à une consommation fréquente de café. Cette constatation a été faite dans le cas de café normal ainsi que celui du café décaféiné, ce qui indique que la caféine n'est pas la seule molécule responsable de l'activité antidiabétique (**Pimentel, (2009)**). Des études récentes ont démontré l'existence d'un lien entre la consommation du café, et un risque moins élevé d'atteinte de la maladie de Parkinson (**Dorea & da Costa, (2005)**).

Des études épidémiologiques et méta-analyses ont également révélé qu'il y a une corrélation inverse entre certains types de cancer et la consommation de café (**dorea & da Costa, (2005)**).

Les dérivés des acides hydroxycinnamiques ont une action anticancérogène. Ils ont le potentiel de prévenir la génotoxicité en réduisant l'exposition aux facteurs oxydatifs et cancérogènes (**Abraham et al. (2004)**). Les données actuelles suggèrent que la consommation de café est associée à un risque réduit du cancer de foie, de rein, du sein et du colon. En l'occurrence, de nombreuses études ont été menées sur l'effet protecteur du café boisson contre le cancer colorectal (**Tavani et al. (2004)**). La consommation de café peut encore aider à réduire les décès dus au cancer de la prostate (**Wilson et al. (2011)**).

De plus, certains composés polyphénoliques sont des agents antibiotiques, antiulcéreux et anti-inflammatoires. Ils peuvent ainsi être utilisés dans le traitement des maladies comme l'hypertension, la faiblesse vasculaire, les allergies et l'hypercholestérolémie (**Olthof et al. (2001)**).

Une série d'expériences rapportées par **Scalbert et al. (2005)** a montré que, les acides caféique et férulique dans le café, réduisent le taux de cholestérol en aidant son transport à partir des cellules spumeuses des macrophages vers le foie, où il est traité pour être enfin éliminé. **Murase et al. (2012)** ont montré qu'une consommation à long terme de café réduira la graisse corporelle chez l'homme.

En outre, le café peut être considéré comme une substance anticariogène potentielle ; une étude récente de **Meckelburg et al. (2014)** a révélé une action inhibitrice de *Coffea canephora* contre le biofilm dentaire.

I.9. Les effets néfastes du café

Nous avons passé en revue les effets bénéfiques du café et de ses composants. Mais le café possède aussi des effets néfastes ; par exemple, un excès de caféine qu'on appelle ; **caféisme** (600 mg à plus de 1000 mg de caféine par jour), élimine une partie du calcium et du magnésium du corps, avec pour conséquences :

- Une grande nervosité.
- Une situation d'anxiété.
- Des insomnies.
- Une réduction de l'activité motrice, voire des crampes.

Le café mélangé à du lait est très indigeste. En effet, les tanins du café précipitent la caséine du lait au contact des sucs gastriques. Il se forme alors de gros « grumeaux » difficiles à digérer et mettant à contribution le foie (**Haler, (1988)**).

La caféine et les acides présents dans le café peuvent affecter la voie gastro-intestinale et le système biliaire (**Czok, (1977)**).

Il semble aussi que la consommation de café et les fractures ostéoporotiques sont corrélées et particulièrement pour une consommation de plus de quatre tasses, avec un apport peu important en calcium (**Haler, (1988)**).

Des études récentes ont indiqué la présence de substances potentiellement cancérigènes comme les hydrocarbures aromatique polycycliques (HAP) et l'acrylamide formés lors de la torréfaction (**Houessou, (2007)**).

I.10. Quelques méthodes analytiques utilisées pour le dosage de la caféine et des polyphénols dans le café

La caféine et les polyphénols absorbent dans l'ultra-violet, ainsi leur identification dans les échantillons se fait principalement par comparaison de leurs chromatogrammes HPLC à ceux de témoins purs. L'HPLC UV/visible a été utilisée par plusieurs chercheurs pour identifier et quantifier les composés bioactifs dans le café.

Farah et al. (2005) ; **Belguidoum et al. (2014)** ainsi que **Hečimović et al. (2011)** ont déterminé la concentration des polyphénols et de la caféine dans le café par HPLC-UV/visible. **Belay et al. (2008)** ont utilisé le spectrophotomètre UV/visible pour la détermination de la caféine dans le café. **Belay & Gholap, (2009)** ont aussi effectué un dosage des acides chlorogéniques dans le café par spectrophotométrie UV/visible.

L' HPLC-DAD est l'une des méthodes analytiques les plus utilisées pour l'analyse des composés bioactifs dans le café. (**Minawisawa et al. (2004)**).

Le couplage de l' HPLC à un spectromètre de masse permet de donner une meilleure identification des composés élués mais il présente tout de même de nombreuses contraintes de mise en œuvre. Parmi les travaux réalisés dans ce sens, **Naira & Neura, (2013)** ont déterminé les composés bioactifs du café par HPLC–DAD–MS. **Sapozhnikova, (2014)** a également utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des composés polyphénoliques dans des échantillons liquides des jus de raisin, thé vert et café.

I.11. Solvants utilisés pour l'extraction de la caféine et de polyphénols

Les composés bioactifs issus des végétaux sont utilisés en phytochimie dans le but de préparer des compléments alimentaires ou nutraceutiques, d'ingrédients alimentaires, de produits cosmétiques ou pharmaceutiques. Ces substances peuvent être extraites à partir de produits végétaux frais ou de plantes séchées.

Les techniques d'extraction par solvant sont souvent employées à cause de leur simplicité d'utilisation et leur efficacité. Le rendement d'extraction obtenu dépend du type de solvant employé, de la température, de la durée d'extraction et de quelques caractéristiques de l'échantillon.

Bastian, (2006) a utilisé des teneurs en éthanol de 20%, 30%, 40%, 60% et 80% pour l'extraction accélérée par solvant, des composés polyphénoliques.

Dans une autre étude publiée par **Naira & Neura (2013)** ; l'eau ultra pure à 92,3 °C a été utilisée pour la préparation des échantillons de café dans le but d'analyser leurs teneurs en composés bioactifs, y compris la caféine et les polyphénols.

D'autre part, une simple extraction par l'eau distillée a été utilisée par **Wanika et al. (2010)** et **Ayelnig & Sabally, (2013)** pour l'extraction et le dosage de l'acide chlorogénique (CGA) dans le café.

Hec̃imovic et al. (2011) ont employé l'extraction par l'eau désionisée à 100°C afin d'analyser la caféine et les polyphénols dans le café.

D'après **Belay et al. (2008)** ; pour le dosage de la caféine dans le café, le solvant adéquat était le dichlorométhane. Cependant, **Farah, (2005)** a utilisé le méthanol comme solvant pour extraire et analyser la caféine.

I.12. Statistiques des travaux publiés sur le café

Cette section retrace brièvement les travaux les plus pertinents sur le café. Plusieurs groupes de chercheurs à travers le monde, se sont penchés sur l'étude de la composition du café.

En Brésil, Farah Adriana, et ses coauteurs (**Farah et al. (2005, 2006, 2008)**) ont été les pionniers dans ce domaine. A travers leurs articles, ils ont, principalement, investigué la composition du café en se focalisant sur l'acide chlorogénique ; ses effets bénéfiques sur la santé, les méthodes d'extraction de cet acide du café vert et sa dégradation par le traitement thermique.

Au Mexique, les travaux publiés sur le café se sont spécialement intéressés au côté botanique de la plante; (**Perez et al. (2005)** ; **Toledo et al. (2013)**).

Aux états unis, beaucoup de chercheurs ont travaillé sur le café, récemment ; **Dranoff, et al. (2014)**; **Bambha et al. (2014)** ont étudié l'effet de la consommation du café sur la fibrose hépatique. L'analyse du café par HPLC pour la détermination des composantes naturelles et des contaminants dangereux a été faite par **Naegele, (2014)**.

L'équipe de Ranic (**Ranic et al. 2014**) en Serbie quant à elle a publié une étude sur les polyphénols totaux contenus dans des extraits de café (noir, espresso et café à filtre).

Au Japon, Fukushima (**Fukushima et al. (2009_a, 2009_b)**) et ses coauteurs ont également publié quelques articles sur le café, et ils ont montré qu'il représente une large

source de polyphénols et antioxydants dans le régime alimentaire des japonais, ce qui constitue un facteur potentiel de réduction des risques de maladies liées au mode de vie.

En Inde et dès 1988, Abraham a publié plusieurs articles qui ont traité essentiellement le rôle de la capacité bioactive du café, vis-à-vis de la protection contre la génotoxicité *in vivo* (Abraham *et al.* (1988, 1996, 2004)).

En France, des travaux sur les polysaccharides du café; leurs teneurs et leurs transformations durant le traitement du café ont été publiés par le groupe d'Avallone (Avallone, (2000, 2001)).

En Grèce, la plus part des travaux ont été focalisés sur les effets physiologiques du café. D'après Chrysohoou, (2010, 2012) la consommation modérée du café semble avoir un effet bénéfique sur la santé.

En chine plusieurs études ont traité l'activité physiologique du café. Les données intégrées à partir des études de Cao (Cao *et al.* (2014)) et ses coauteurs ainsi que par l'équipe de Zhong (Zhong *et al.* (2014)) soutiennent l'hypothèse qui affirme que la consommation de café peut réduire le risque de cancer de la prostate. En revanche, Jiang *et al.* (2014) ont montré que la prise quotidienne de café freine l'évolution du diabète du type 2.

En Italie, Daglia et son équipe (Daglia *et al.* (1998, 2000, 2008)) se sont pour la plus part de leurs travaux focalisés sur l'activité antioxydante du café.

En Allemagne, Speer, (Speer *et al.* (1993, 1999)) et ses coauteurs ont beaucoup travaillé sur les diterpènes, leurs teneurs, leur dégradation, leurs effets biologiques et leur rôle dans la qualité du café.

En Russie, et au mieux qu'on le sache, peu d'articles en rapport avec le café ont été publiés; l'équipe de Urakova, (Urakova *et al.* (2008)) a publié un article sur la quantification de l'acide chlorogénique dans le café par différentes méthodes. Tandis que Ziyatdinova *et al.* (2013) ont concentré leurs recherches sur les polyphénols totaux et l'activité antioxydante du café.

Toutefois ; la production scientifique du Honduras, du Pérou et du Vietnam (Figure I.4) est très faible dans ce domaine, et elle ne représente que 1,51% de la production scientifique des dix premiers pays producteurs de café.

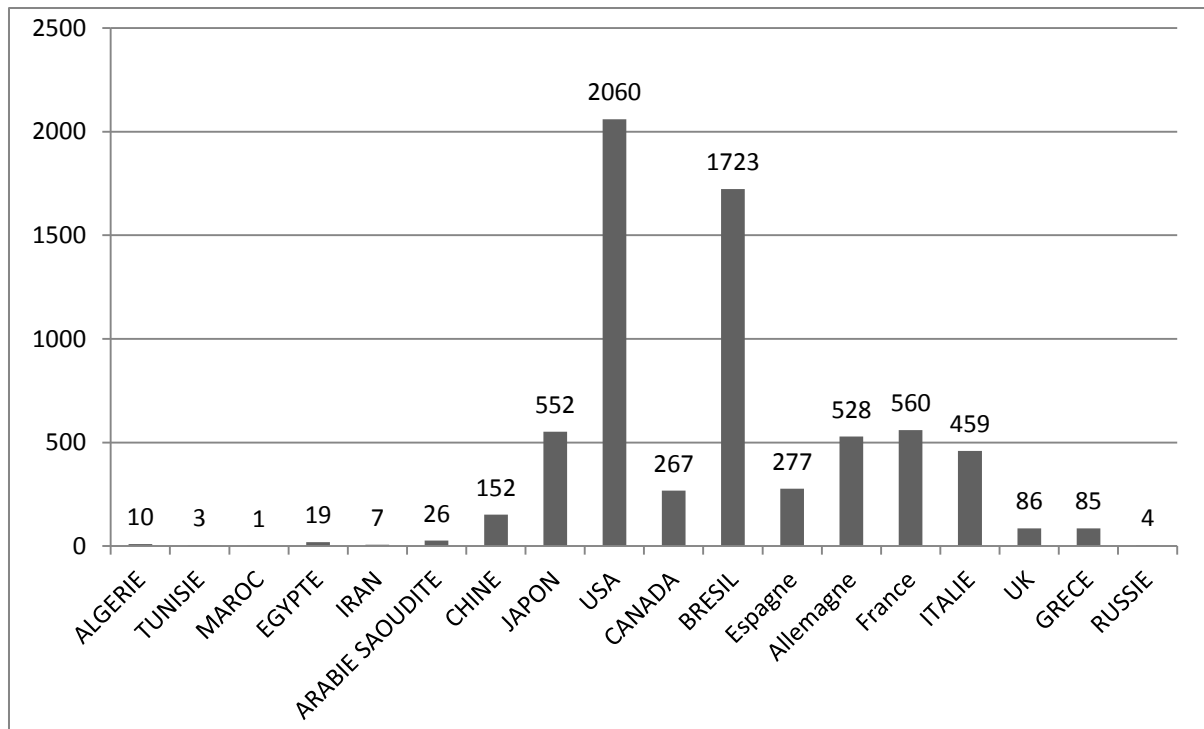


Figure I. 3 : Nombre de références dans quelques pays trouvées dans la base de données 'Web Of Knowledge' et en utilisant une combinaison des mots 'coffee' et le nom du pays. Le 27 juillet 2014.

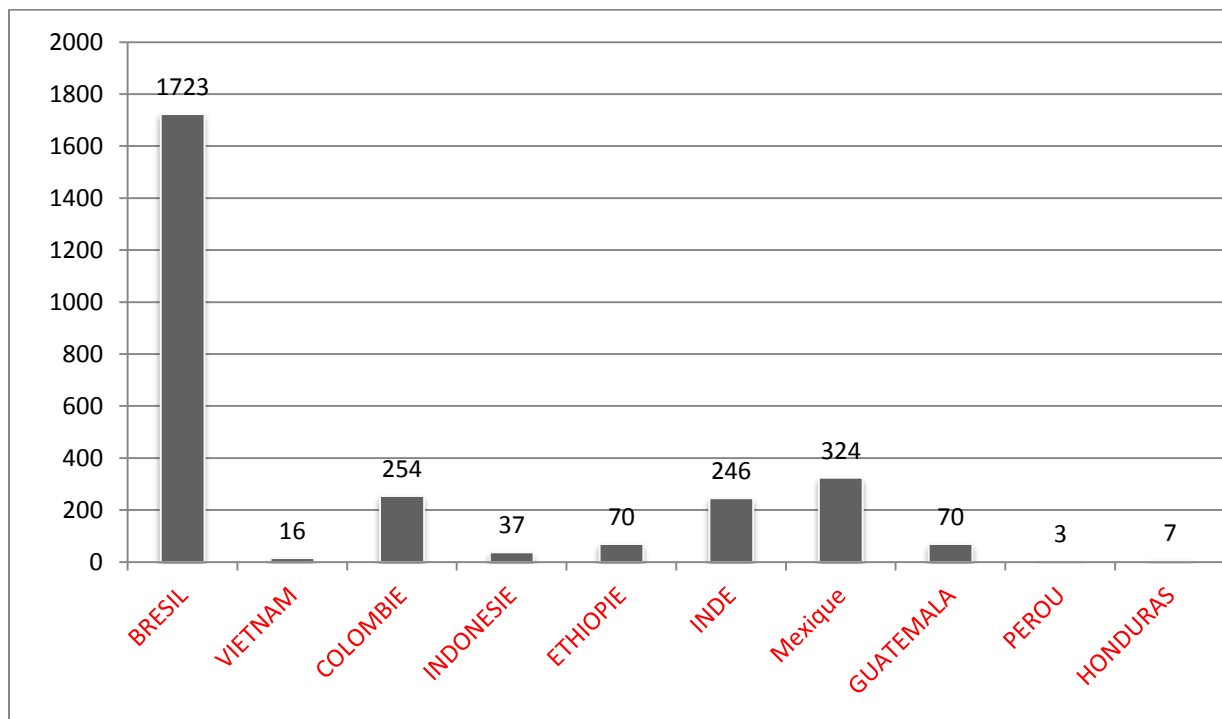


Figure I. 4 : Nombre de références dans les dix premiers pays producteurs de café trouvées dans la base de données 'Web Of Knowledge' et en utilisant une combinaison des mots 'coffee' et le nom du pays. Le 27 juillet 2014.

Le nombre de recherche dévoués au café est très limité dans les pays arabes, par comparaison avec le reste du monde (**Figure I.3**). En l'occurrence, la production scientifique des pays nord africains dans ce domaine, ne représente que 1,4% et celle de l'Arabie saoudite est de 1,26% du nombre total de travaux réalisés au cours du temps.

En Algérie, le nombre de chercheurs impliqués dans le domaine du café est insuffisant. Nous n'avons noté aucune publication antérieure à 2005. Il serait intéressant de remarquer que les travaux publiés ne traitent que de l'adsorption de quelques substances chimiques par le résidu (le marc) de café, notre étude qui est apparue en 2014 (**Figure I.5**) et la seule qui s'est intéressée, plutôt, à la quantification des polyphénols et de la caféine dans plusieurs marques de café.

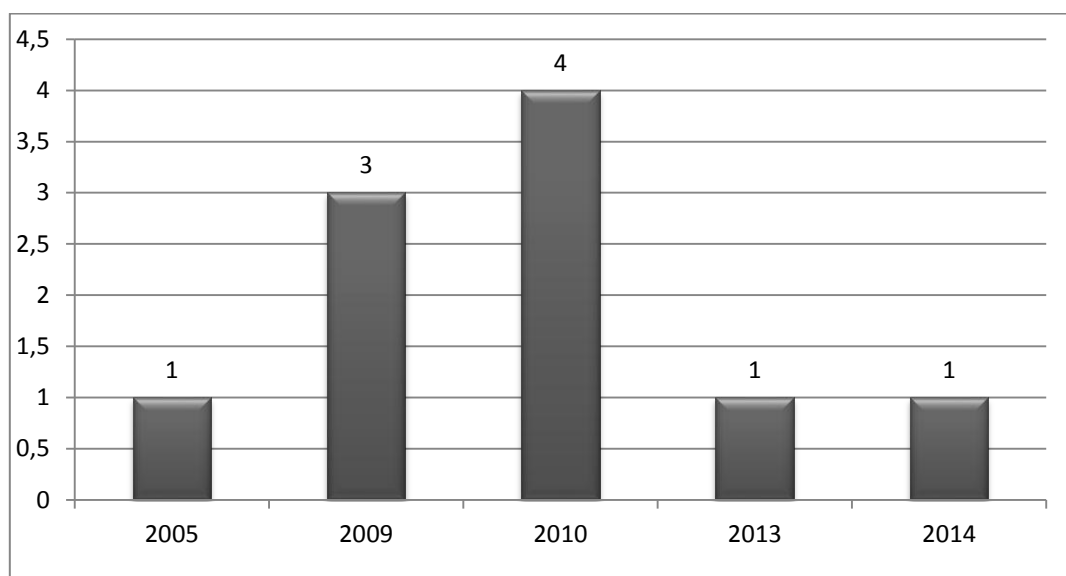


Figure I. 5: Evolution du nombre de travaux en rapport avec le café en Algérie. Issue de la base de données 'Web Of Knowledge'. Le 27 Juillet 2014.

I.13. Conclusion

A la fin de ce chapitre, il apparait que les effets bénéfiques du café ne sont pas seulement attribués à la caféine, mais il est maintenant connu qu'il y a d'autres composés qui contribuent également aux propriétés biologiques intéressantes de cette boisson. Ces propriétés directement attribuées aux composés présents naturellement dans les grains verts et aussi à ceux issus de la torréfaction.

L'apport nutritionnel et le rôle de la consommation de café dans la prévention de certaines maladies graves et les plus répandues justifient sa classification comme une boisson nutraceutique ou comme aliment fonctionnel.

Malgré les techniques développées pour l'analyse biochimique, peu de recherches ont été menées sur ce sujet à travers le monde.

CHAPITRE II
L'ACRYLAMIDE :
UNE MOLECULE POTENTIELLEMENT
NOCIVE

II.1. Introduction

Dans le présent chapitre, nous nous intéresserons à une molécule potentiellement toxique: l'acrylamide.

Nous allons évoquer les points suivants : définition et structure de la molécule, son existence dans les aliments, les différentes voies de sa formation et sa toxicité.

II.2. Définition et structure de l'acrylamide

L'acrylamide (**Figure II.1**) est une molécule produite lors de la cuisson à haute température des aliments. Il est également connu sous les noms de 2-propénamide, amide acrylique, amide de vinyle et acrylamide monomère. C'est une molécule très polaire avec un poids moléculaire de 71 g/mol, un point de fusion de $84,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ et un point d'ébullition élevé de 136°C à 3,3 kPa (**Weisshaar, (2004)**).

L'acrylamide est très soluble dans l'eau (215,5 g/100 ml à 30°C) et dans de nombreux solvants organiques comme les alcools, l'acétone, l'acétonitrile, légèrement soluble dans l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, l'éther diéthylique. Il est insoluble dans l'hexane et d'autres alcanes et alcènes ; sa volatilité est faible. Il n'a pas d'absorption UV significative au-dessus de 220 nm.

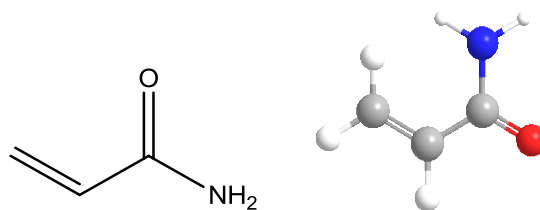


Figure II. 1 : Formule chimique de l'acrylamide en 2D et 3D.

L'acrylamide contient une double liaison électrophile réactive et un groupe amide réactif. Il présente de faibles propriétés acides et à la fois basiques (**Friedman, (2003)**). L'acrylamide peut être produit industriellement pour la synthèse du polyacrylamide.

Le polyacrylamide peut être utilisé dans le traitement des eaux usées en tant que flocculant, la stabilisation des sols, dans les cosmétiques, le papier et le textile (**Friedman, (2003)**). L'acrylamide est décrit comme une neurotoxine, génotoxine et est probablement cancérigène pour l'homme (**Friedman, (2003)**).

II.3. L'acrylamide dans les aliments

L'acrylamide a été détecté dans tous les types d'aliments, notamment la viande, le pain et les produits de pommes de terre préparés à des températures élevées (**Tareke et al. (2002)**). Des quantités relativement faibles peuvent être trouvées dans les aliments soumis à des températures allant jusqu'à 260°C (**Murkovic, (2004)**).

Il est présent aussi dans les aliments cuits ou chauffés aux micro-ondes. Les feuilles de thé et les grains d'orge grillés contiennent aussi de l'acrylamide. Il se forme dans les aliments riches en glucides pendant la friture, la cuisson et la torréfaction.

Dans le café moulu il peut y avoir des teneurs relativement élevées d'acrylamide jusqu'à 400 ng/g de poudre. L'acrylamide est une substance très polaire, il n'est pas surprenant qu'il est également détecté en grandes quantités dans les cafés brassés. Aucune trace d'acrylamide n'a été détectée dans un résidu analysé après une préparation de café, il semble que tout l'acrylamide dans la poudre de café est transféré à l'eau où il est très stable. Aucune diminution significative de la concentration d'acrylamide n'a été observée même après cinq heures de chauffage (**Andrzejewski et al. (2004)**).

II.4. Voies de formation de l'acrylamide

La voie principale de formation de l'acrylamide dans les aliments est la réaction de Maillard. Selon certains auteurs (**Becalski et al. (2003)** ; **Stadler et al. (2003)**), il existe d'autres voies de formation, mais elles sont mineures.

II.4.1. La réaction de Maillard

La réaction de Maillard porte le nom de Louis-Camille Maillard, premier chercheur ayant exploité la réaction de l'acide aminé avec des glucides. Il a ensuite été signalé que les acides aminés en combinaison avec différents hydrates de carbone réagissent à des températures supérieures à 100° C, formant la couleur typique brune foncée et la saveur des aliments cuits (**Stadler et al. (2003)**). Grâce à cette réaction extrêmement complexe, non seulement des propriétés souhaitables comme la couleur, l'arôme et le goût sont acquises, mais aussi des composés antioxydants sont formés (**Andrzejewski et al. (2004)**).

LC. Maillard a trouvé que le groupe aldéhyde d'un aldose réagit de façon plus efficace avec des acides aminés que les groupes hydroxyles (**Stadler et al. (2003)**). Les mélanoides (produits de réaction ayant une couleur brune foncée) sont solubles dans la première phase de la réaction et par la suite, ils deviennent insolubles.

Il a été constaté, que les acides aminés les plus réactifs sont l'alanine, suivie de la valine, la glycine, l'acide glutamique, la leucine, la sarcosine et la tyrosine. Les monosaccharides réagissent facilement avec les acides aminés. Le saccharose, un sucre non réducteur, doit être d'abord hydrolysé pour former des intermédiaires réactifs. Les pentoses réagissent plus vite que les hexoses.

La réaction de Maillard est effectuée en trois étapes. Dans un premier temps, la réaction de condensation du groupe carbonyle d'un sucre réducteur avec un composé aminé a lieu et la base de Schiff est produite.

Les réarrangements de l'acide catalysé donnent des produits de réarrangement d'Amadori, qui ne sont pas stables au-dessus de la température ambiante. Dans la réaction d'un acide aminé avec un cétose, la déoxyaldosylamine est formée par le réarrangement de Heyns (**Stadler et al. (2003)**).

Dans la deuxième étape de la réaction, au cours de l'énolisation, la désamination, la déshydratation et les étapes de fragmentation, différents produits, y compris les furfurals, les furanones, les pyranones, et d'autres produits de déshydratation et de fragmentation du sucre sont formés (**Friedman, (2003)**). La phase suivante est la dégradation de Strecker qui consiste en une décarboxylation oxydative et une désamination, qui forme un aldéhyde et qui va

aboutir à la formation de l'acrylamide après différentes étapes de réductions et de déshydratations (**Mottram et al. (2002)**).

Dans la troisième étape de la réaction de Maillard, des substances de masses moléculaires élevées (mélanoidines) sont formées au cours d'une réaction de condensation entre des carbonyles (en particulier les aldéhydes) et les amines (**Stadler et al. (2003)**).

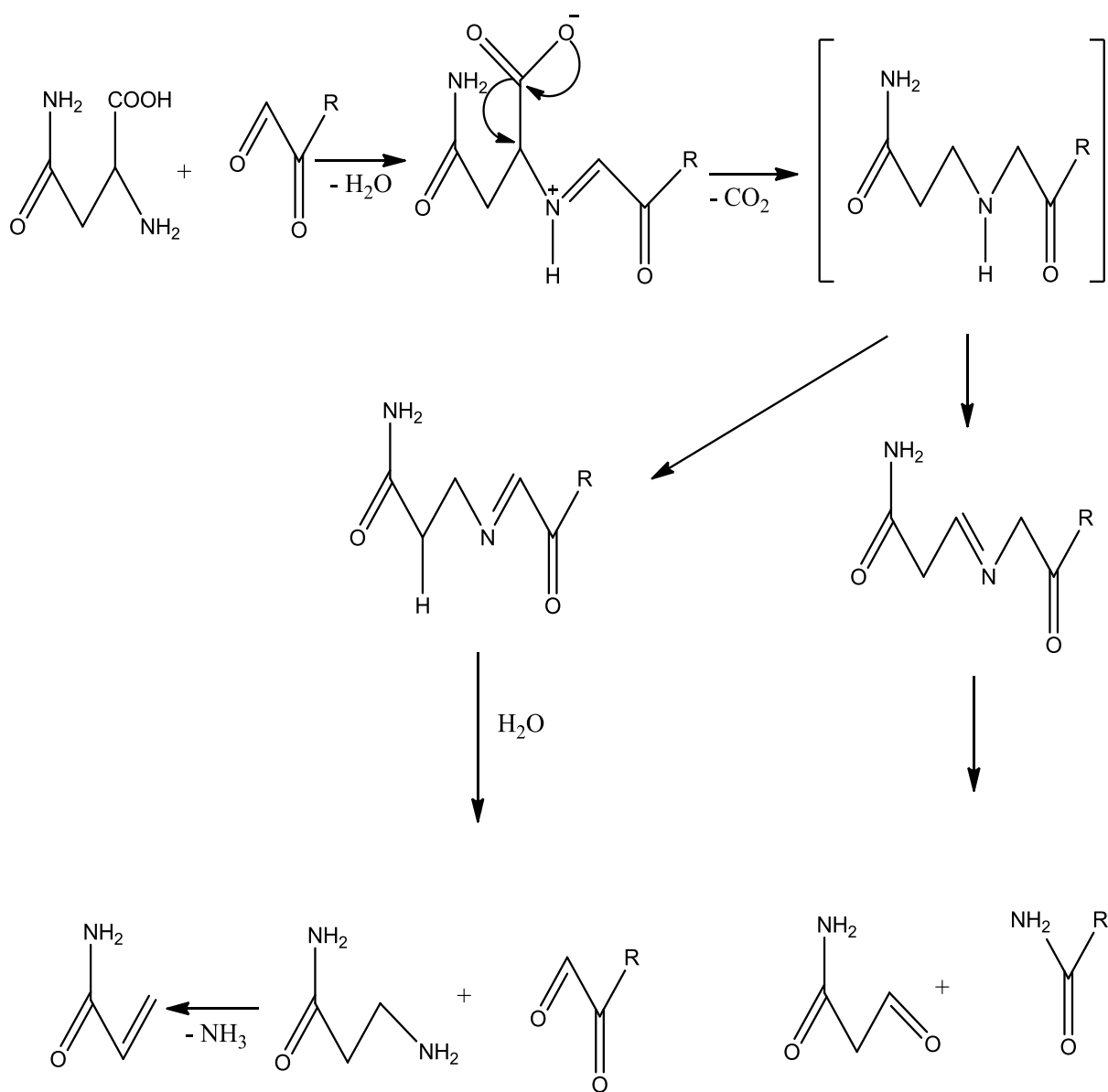


Figure II. 2 : Formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine et d'un composé dicarbonylé (Stadler et al. (2004)).

Il a été montré que la réaction de Maillard est l'une des principales voies de formation de l'acrylamide, en présence d'hydrates de carbone et de l'asparagine (**Figure II.2**) (**Zyzak et al. (2003)**).

Pour cette voie, les composés dicarbonylés (à partir du glucose par exemple) et des acides aminés libres (de l'asparagine par exemple) forment la base de Schiff. D'autres réactions conduisent à la formation du 3-aminopropionamide et enfin à l'acrylamide (**Zyzak et al. (2003)**).

Il a été montré dans quelques expériences que parmi vingt acides aminés chauffés avec du glucose, seul l'asparagine a donné d'importantes quantités d'acrylamide (**Becalski et al. (2003)**).

Au cours de la réaction de Maillard, un très grand nombre de composés volatils sont formés. Déjà plus de 550 composés ont été identifiés.

Dans le café torréfié, les mélanoidines sont responsables de la couleur foncée et d'un degré moindre de l'arôme. Il a été remarqué, que les mélanoidines de café peuvent réagir avec les composés volatils et de cette façon, elles modifient la perception d'arôme à la boisson de café. En outre, le spectre de la mélanoidine est fortement influencé par le degré de torréfaction (**Andriot et al. (2004)**).

Certains produits de la réaction de Maillard peuvent être mutagènes, mais pas cancérigènes (**Stadler et al. (2003)**). Les boissons de café préparées d'une manière habituelle, le thé noir et vert ont été reporté comme source de composés mutagènes résultant de la réaction de Maillard. En outre, la mutagénicité n'apparaît qu'au-dessus d'une température de pyrolyse de 400° C et elle est plus accentuée à 500° C (**Stadler et al. (2003)**).

Certains composés présentant une activité anti-oxydante ont également été détectés chez les produits de la réaction de Maillard. Ces composés, empêchant l'oxydation des lipides se trouvent dans la fraction de la mélanoidine (**Stadler et al. (2003)**).

II.4.2. La dégradation des lipides

Une autre voie pour la formation d'acrylamide dans les aliments chauffés, en particulier dans les produits alimentaires frits existe. Lors de la dégradation des lipides, l'acroléine et l'acide acrylique (les précurseurs d'acrylamide) sont formés (**Gertz &**

Klostermann, (2002)) et ils peuvent réagir avec de l'ammoniaque formée à partir d'acides aminés (**Figure II.3**) comme l'acide aspartique pour former l'acrylamide (**Stadler et al. (2004)**).

D'après **Friedman, (2003)**, les acides aminés libres tels que l'asparagine, la glutamine, la cystéine et l'acide aspartique, présents dans les aliments, peuvent aussi être une des principales sources produisant de l'ammoniaque dans le traitement thermique des aliments.

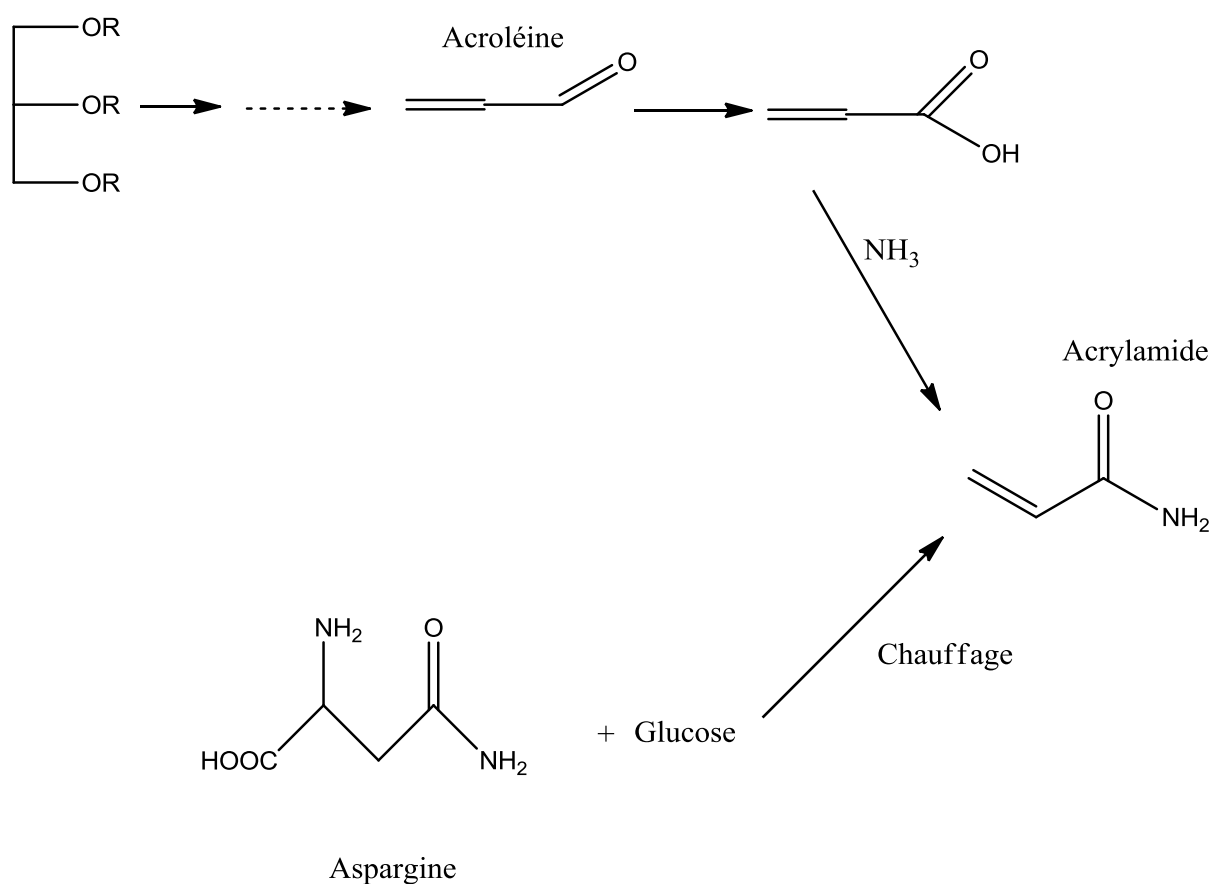


Figure II. 3 : Voies de formation de l'acrylamide à partir de l'acroléine et l'asparagine (Becalski et al. (2003)).

Une forte concentration d'acrylamide a été trouvée dans les produits de pommes de terre frites. Les expériences ont montré une légère différence entre les produits de pommes de terre frites dans différentes huiles. Il a été observé que les échantillons frites dans l'huile d'olive avaient la plus forte teneur en acrylamide. En outre, l'addition de certains antioxydants, par

exemple, l'herbe de romarin, réduit la formation d'acrylamide jusqu'à 25% (Becalski *et al.* (2003)).

Lorsque l'asparagine a été chauffée dans différentes huiles et graisses, il a été observé que la graisse de bovin, contenant des taux bas de lipides non saturés, produit des quantités plus faibles d'acrylamide (Becalski *et al.* (2003)).

En outre, en augmentant le temps de cuisson, la teneur en acrylamide dans les échantillons également augmente.

La teneur en acrylamide formé dans les produits alimentaires frits et cuits dépend des précurseurs (les acides aminés, les sucres) contenus dans la matière première. Il a été constaté qu'avec l'utilisation d'une procédure standard de l'industrie et une température de friture de 180°C, la teneur en acrylamide dans les produits de pommes de terre peut être considérablement réduite quand les pommes de terre à faible teneur en sucre sont sélectionnées (Becalski *et al.* (2003)).

II.4.3. La décarboxylation et la désamination de l'asparagine

Il a été signalé, récemment que l'acrylamide peut être formé en quantités plus faibles à partir de l'asparagine en absence de glucose (Granvogl & Schieberle, (2006)). Pour cette réaction, des températures élevées (> 170° C) sont nécessaires.

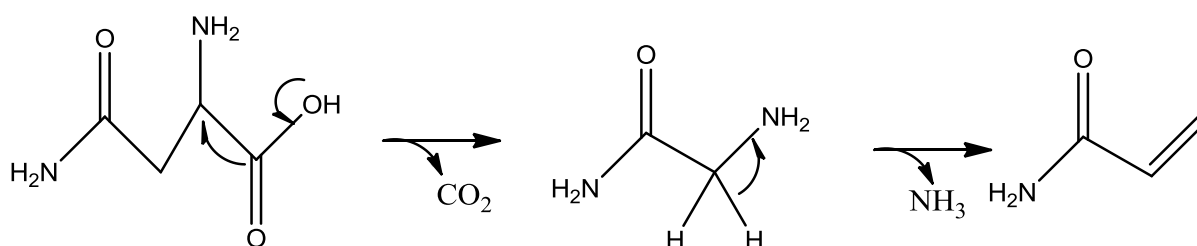


Figure II. 4 : Formation de l'acrylamide à partir de l'asparagine par une simple réaction de décarboxylation et désamination (Granvogl & Schieberle, (2006)).

Il a été remarqué, que la décarboxylation directe suivie de la désamination de l'asparagine peut se produire. Dans ce cas, les sucres réducteurs ne peuvent pas se produire (Figure II.4). Ce fait permet de comprendre pourquoi la plupart des aliments chauffés à des

températures élevées contiennent de l'acrylamide: de faibles quantités d'asparagine libre peuvent être détectées dans presque tous les types des produits alimentaires (**Granvogl & Schieberle, (2006)**).

Selon **Yaylayan et al. (2003)**, lorsque l'asparagine pure est chauffée, le produit principal obtenu est le maléimide (**Figure II.5**) et non pas l'acrylamide ; ceci peut-être dû aux températures relativement élevées de la réaction (250 et 350°C), la cyclisation intramoléculaire rapide de l'asparagine s'effectue et empêche ainsi la formation d'acrylamide.

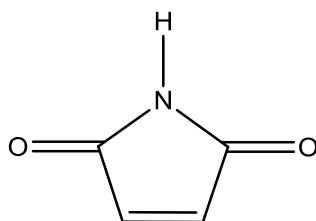


Figure II. 5 : Le Maléimide (2,5-pyrroldione).

L'acide fumaramique (**Figure II.6**) peut être l'un des produits de dégradation de l'asparagine. Sa décarboxylation peut également conduire à la formation de l'acrylamide (**Granvogl & Schieberle, (2006)**).

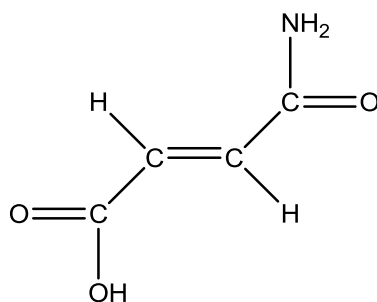


Figure II. 6: L'acide fumaramique.

Il semble que le chauffage des aliments à des températures extrêmement élevées (> 250°C) dans un temps court peut diminuer la quantité d'acrylamide, car à ces températures, la cyclisation de l'asparagine est préférable, ce qui empêche la formation d'acrylamide (**Yaylayan et al. (2003)**).

II.4.4. D'autres précurseurs pour la formation d'acrylamide

Le 3-aminopropionamide a été démontré comme le précurseur direct de l'acrylamide. Il peut être facilement formé à partir de 3-aminopropionamide par un procédé de déshydratation en une seule étape (**Stadler et al. (2004)**).

Stadler et al. (2004) ont mentionné que des grandes quantités d'acrylamide dans des mélanges fructose/asparagine sont formées à des températures supérieures à 180°C, alors que d'importantes quantités d'acrylamide de 3-aminopropionamide peuvent être déjà formées à 140°C et la concentration maximale peut être atteinte à 180°C. Il a également été observé que la dégradation thermique du 3-aminopropionamide en acrylamide peut produire à des températures comprises entre 100 et 180° C (**Granvogl et al. (2004)**).

II.5. Toxicité de l'acrylamide

Le polymère de l'acrylamide est non toxique, mais le monomère est neurotoxique pour l'être humain et les animaux de laboratoire (**Gamboa et al. (2003)**).

L'acrylamide est cancérigène pour les rongeurs de laboratoire et est décrit par le centre international de recherche sur le cancer, comme un cancérigène probable pour l'homme. La neurotoxicité de l'acrylamide est caractérisée par l'ataxie, distale faiblesse musculaire et l'engourdissement des mains et des pieds. Dans le corps humain, l'acrylamide est oxydé en glycidamide époxyde (2,3-époxypropionamide) par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique (**Figure II.7**), impliquant éventuellement le cytochrome P450 2E1.

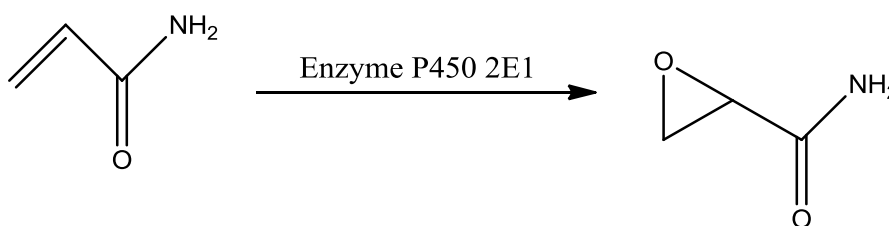


Figure II. 7: Formation du glycidamide à partir de l'acrylamide. (P450 2E1 : Monoxygénase cytochrome) (Gamboa et al. (2003)).

L'acrylamide et le glycidamide peuvent former des adduits d'hémoglobine mais seul le glycidamide peut former des produits d'addition avec des groupes amino de l'ADN (acide désoxyribonucléique) (**Gamboa et al. (2003)**). Cette fonction du glycidamide implique la

génotoxicité. En outre, les niveaux élevés d'acrylamide peuvent causer des mutations génétiques et la transformation cellulaire (**Park et al. (2002)**).

L'acrylamide et le glycidamide peuvent être décontaminés dans les cellules par combinaison avec le glutathion, ou par hydrolyse (**Gamboa et al. (2003)**). En outre, une teneur élevée d'acrylamide dans les produits d'addition d'hémoglobine est détectée chez les fumeurs, car l'acrylamide se trouve également dans la fumée de tabac à la suite d'une combustion incomplète ou de chauffage de la matière organique (**Tareke et al. (2002)**).

L'acrylamide peut être absorbé par la peau, mais l'absorption cutanée n'est qu'environ 7% de l'absorption par voie orale (**Fennell et al. (2005)**).

L'acrylamide se lie directement à l'ADN (acide désoxyribonucléique) (**Park et al. (2002)**). Il peut être excrété par le corps humain avec de l'urine, principalement sous forme métabolisée.

La N-acétyle-S-(3-amino-3-oxopropyl) cystéine (**Figure II.8**) apparaît comme un métabolite majeur (72%). Les autres métabolites possibles ; le glycéramide (glycidamide hydrolysée, 11%) dans la figure (**II.9**), le glycidamide (2,6%), la N-acétyle-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl) cystéine (**figure II.10**) et de la N- acétyle S-(carbamoyléthyl) cystéine-S - oxyde (14%) (**Friedman, (2003)**). Le métabolisme du glycidamide chez l'homme est la plupart du temps achevé par hydrolyse (**Gamboa et al. (2003)**).

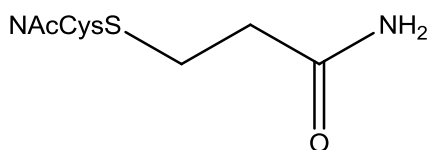


Figure II. 8: N-acétyle-S-(3-amino-3-oxopropyl) cystéine.

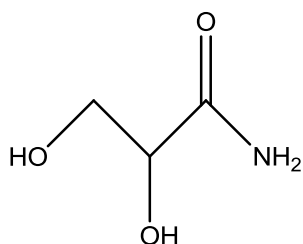


Figure II. 9: Glycéramide.

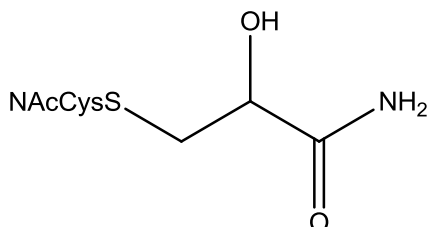


Figure II. 10: N-acétyl-S-(3-amino-2-hydroxy-3-oxopropyl) cystéine.

II.6. Dosage de l'acrylamide dans les aliments

Aucune méthode n'a pour l'instant été validée par les autorités réglementaires et il n'existe donc pas de méthode officielle de dosage de l'acrylamide dans les aliments (**Granby, (2004)**).

Les méthodes classiques de dosage de l'acrylamide sont basées sur l'utilisation de l'HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) ou de la chromatographie en phase gazeuse (**Taeymans *et al.* (2004)**).

L'acrylamide est un faible chromophore UV. La LC-UV est idéale pour l'analyse des aliments contenant un taux élevé d'acrylamide.

Au cours de ce travail, la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes HPLC-UV-DAD a été choisie pour l'identification et la détermination de l'acrylamide dans le café, car le détecteur DAD permet de procurer une sensibilité très élevée, ce qui mène à une méthode d'analyse très sélective et une performance accrue par rapport au détecteur UV.

II.7. Conclusion

A partir des informations exposées dans ce chapitre, on peut conclure que l'acrylamide pourrait comporter des risques pour notre santé. Il est nécessaire donc d'apporter des solutions pratiques à la préparation des aliments et particulièrement le café, afin d'éviter ou de diminuer la formation de produits supposés mutagènes ou cancérigènes comme l'acrylamide. Il n'est pas moins intéressant de faire une analyse de contrôle pour savoir les teneurs des aliments du marché algérien en acrylamide. C'est le cas dans cette étude dont une partie s'intéresse à la détection et la quantification de l'acrylamide dans le café du marché algérien.

CHAPITRE III
MATERIELS ET METHODES

III.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons le matériel, les réactifs, les modes opératoires, les conditions de torréfaction du café et les méthodes analytiques mises en œuvre pour l'analyse de différents types de cafés, en l'occurrence; le café vert, le café moulu conditionné ou pas et le café soluble.

Les constituants du café auxquels nous nous sommes intéressés sont: la caféine, Les acides phénoliques, en l'occurrence l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide paracoumarique, l'acide férulique, l'acide cinnamique, l'acide méthoxy-cinnamique, l'acide sinapique, l'acide gallique; les flavonoïdes en l'occurrence la quercétine, la rutine, la catéchine. L'acrylamide qui apparaît lors de la torréfaction a également, été dosé. Afin de compléter ces analyses, les taux des minéraux tels que le fer, le sodium, le potassium, le cuivre, le zinc et le chrome ont été mesurés dans le café boisson.

Les méthodes analytiques utilisées sont :

- La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible (HPLC-UV-vis) pour le dosage des polyphénols et de la caféine.
- La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-DAD-MS) pour identifier l'acide chlorogénique et la caféine.
- La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) pour le dosage de l'acide chlorogénique et la caféine ainsi que pour l'identification et le dosage de l'acrylamide dans le café.
- Spectrométrie d'absorption atomique pour le dosage du fer, du cuivre, du zinc et du chrome.
- Photométrie à flamme pour le dosage du sodium et du potassium.

III.2. Matériels

La conduite de ce travail de recherche a nécessité l'utilisation de différents matériels d'importance variée tels que :

- Le matériel usuel de laboratoire de type analytique et organique.
- Des tamis annulaires de 0,75; 0,25 mesh.
- PH-mètre (Hanna) HI, Série 110.

- Lyophilisateur (Unitrap modèle 10-100).
- Milli-Q (Millipore, MA, USA).
- Évaporateur sous pression réduite (Laborota – 4000)
- Centrifugeuse (Bioblock scientific, model 3K18).
- Bac à ultrasons à multifréquence (25 et 45 kHz) ; fonctionnant à 25 kHz à 100% d'intensité de sortie.
- HPLC- UV-Visible ; Shimadzu (TOKYO, Japan).
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260.
- HPLC-DAD-MS ; Agilent avec un détecteur série 1200.
- Spectromètre à absorption atomique à flamme AAnalyst 400 de Perkin Elmer.
- Photomètre à flamme (JENWAY, modèle PFP7).

III.2.1. La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible (HPLC-UV-visible)

Pour le dosage des polyphénols et de la caféine dans le café, nous avons utilisé un appareil HPLC analytique (Shimadzu; Japon) couplé à un détecteur UV-VIS SPD-10Avp, équipé d'une colonne garnie de silice greffée au C8 (nucleosil 100, diamètre des billes de silice : 5 μm), deux pompes de type LC-10ATvp, un dégazeur de type DGU-14A et un système de contrôle de type SCL-10Avp. L'ensemble est piloté par un logiciel appelé CLASS-VP 5.0 (**Figure III.1**).

Au cours de l'analyse, la colonne a été maintenue à la température ambiante.



Figure III.1: HPLC analytique (Shimadzu, Japon, Université de Guelma) utilisé pour le dosage des polyphénols et de la caféine dans le café.

La figure ci-dessous illustre le principe de fonctionnement d'une HPLC.

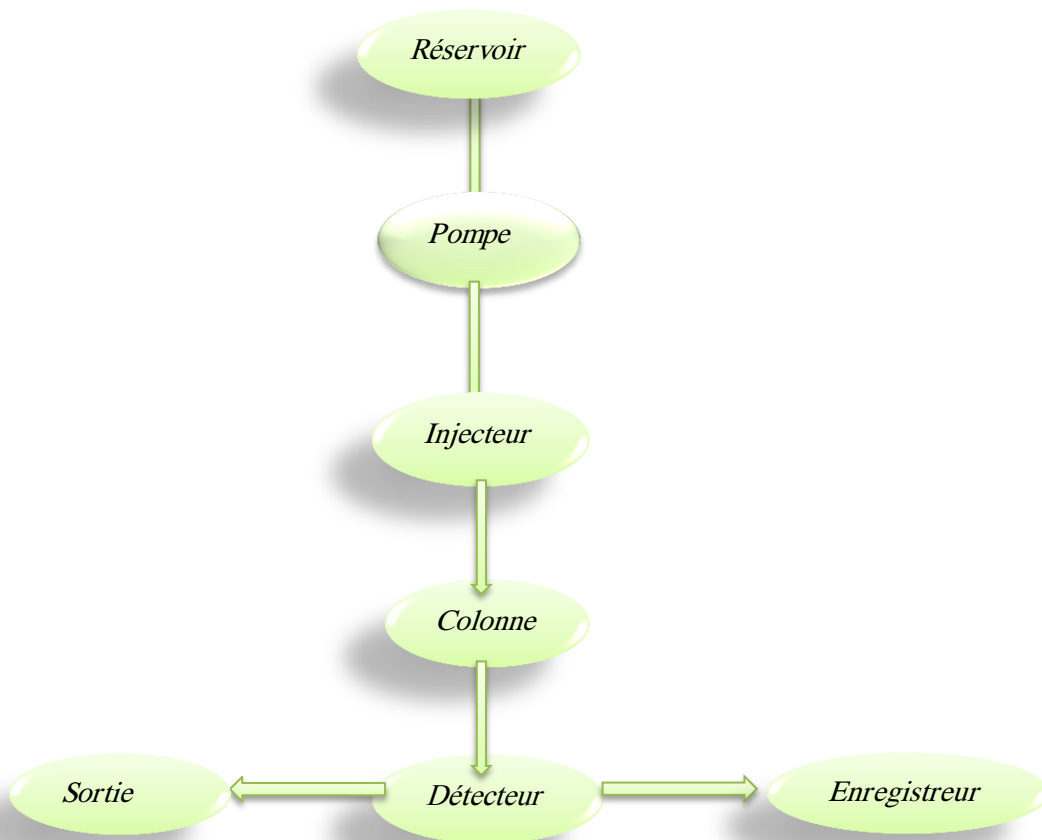


Figure III. 2: Organigramme de principe de fonctionnement d'une HPLC.

La chromatographie est une technique d'analyse pour séparer les constituants d'un mélange; les molécules à séparer sont entraînées par un solvant qu'on appelle la phase mobile qui se trouve dans le réservoir (**Figure III.2**).

Les pompes sont utilisées pour la circulation de la phase mobile, c'est-à-dire le liquide circulant dans le système chromatographique. Des tubes en acier inoxydable permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique. Après l'injecteur, est placée une colonne chromatographique (cylindre rempli par la phase stationnaire) qui permet la séparation. La colonne est reliée au détecteur chromatographique (spectroscopie UV-visible, barrette de diode, fluorimètre, réfractomètre, etc). Un ordinateur complète ce dispositif, pour la commande du système chromatographique, ainsi que l'acquisition et le traitement des données.

III.2.2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

L'identification des principes actifs étudiés dans le café a été réalisée en utilisant un appareil HPLC du type Agilent avec un détecteur série 1200 (université Bordeaux 2, France), couplé à un spectromètre de masse à piège ionique Esquire 3000+ équipé d'une source ESI (Electrospray Ionisation) de Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) où a lieu l'ionisation des molécules et la fragmentation des ions, un système dispersif qui assure la séparation des ions suivant leur rapport masse/charge et un détecteur qui mesure l'abondance relative de chaque ion (**Figure III.3**).

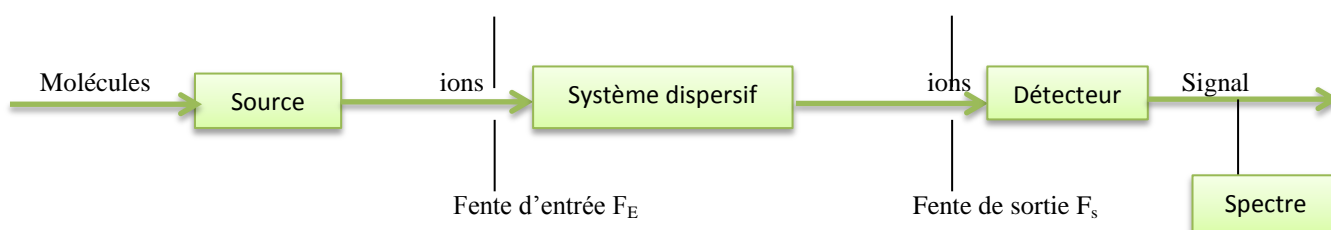


Figure III. 3: Schéma descriptif de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

L'instrument HPLC comprend un auto-échantillonneur, un dégazeur, une pompe binaire, un appareil de chauffage/sélecteur de colonne et un détecteur à barrette de photodiodes du même fournisseur. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Esquire. Les spectres ont été enregistrés dans le mode positif.

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Bischoff ProntoSil 120-5-C18-AQ (250 x 4,0 mm, taille des particules 5 µm) thermostatée à 25 °C.

III.2.3. La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur HPLC-DAD

Pour le dosage des principes actifs étudiés dans la boisson du café et de l'acrylamide ainsi que l'identification de ce dernier, nous avons utilisé un HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 (**Figure III.4**) avec un détecteur muni d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un auto-échantillonneur (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostatée (G1316A) et d'un détecteur à barrette de photodiodes (G1315B).

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation. La colonne était du même type que celle utilisée pour l'identification de ces deux substances.

Les appareils à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions.

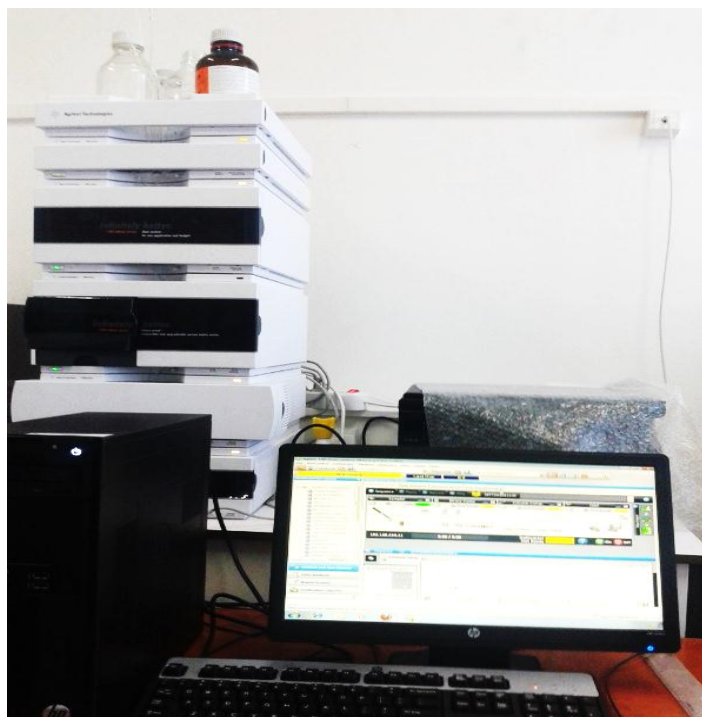


Figure III.4 : HPLC (Agilent 1260) utilisé pour le dosage des principes actifs de café boisson, identification et dosage de l'acrylamide (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

III.2.4. La spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Parmi les méthodes spectrométriques, la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est particulièrement utile pour la détermination de la teneur des métaux dans le café (Malgorzata *et al.* (2007) ; Oliveira *et al.* (2012) ; Gillies & Birkbeck, (1983) ; Suseela *et al.* (2001)). Son principe de fonctionnement repose sur l'absorption d'une source de lumière à la longueur d'onde caractéristique de l'élément mis à l'état d'atomes neutres en phase vapeur.

L'appareil utilise des lampes spécifiques à chaque élément métallique. Les lampes sont appelées à cathode creuse ou en anglais 'Lumina Hollow Cathode' ou "HCL" dont la longueur d'onde de l'émission correspond à l'élément à doser. Le rapport des intensités incidente et transmise, est proportionnel à la quantité d'atomes de l'élément à doser et permet de déterminer sa concentration dans la solution par rapport à la gamme de calibration.

Avant de commencer les analyses, des courbes d'étalonnage ont été tracées à l'aide de différentes concentrations connues des éléments à doser. Les solutions mères correspondent à une concentration de 1000 mg/l du métal à doser dans le café. Les concentrations des solutions étalons ont été choisies dans le domaine de linéarité (qui diffère d'un élément à un autre). Pour rappel, la loi de Beer-Lambert qui relie l'absorbance mesurée et la concentration d'un élément n'est applicable qu'à des solutions très diluées (Esenaliev *et al.* (1994) ; Brown, (2005)).

Le logiciel qui donne directement la concentration de chaque échantillon est Winlab 32, il sert également à piloter l'appareil.

Le spectromètre d'absorption atomique (**Figure III. 5**) utilisé est de type AAnalyst 400 et est constitué des composants suivants :

- Des lampes à cathode creuse (HCL).
- Une flamme (produite de la combustion de l'acétylène par l'air).
- Un monochromateur.
- Un détecteur.
- Un ordinateur muni d'un logiciel pour l'enregistrement et la manipulation de l'appareil.



Figure III. 5 : Spectromètre d'absorption atomique Perkin Elmer Analyst 400, utilisé pour le dosage des minéraux dans le café (LAIGM, Université de Guelma).

III.2.5. Photomètre à flamme ou photomètre à émission atomique (PEA)

Etant une méthode simple et efficace, la photométrie à flamme permet le dosage des cations Li^+ , Na^+ et K^+ (Oliveira et al. (2012)).

La photométrie à flamme repose sur la proportionnalité entre l'intensité de la lumière émise et le nombre d'atomes retournés à l'état initial. La lumière émise est donc proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

Une partie des ions soumis à la chaleur de la flamme passe dans un état excité. Le retour à l'état fondamental des électrons de la couche externe s'effectue avec émission caractéristique de l'ion en présence (Conesa et al. (2004) ; Brown, (2005) ; Rosado, (2013)).

Comme montré sur la figure (III.6); un photomètre à flamme est composé :

1. D'un nébuliseur qui permet de créer un « brouillard » avec la solution à analyser.
2. D'un brûleur : les gaz employés peuvent être de l'acétylène, du butane ou du propane en fonction de la température de la flamme souhaitée.
3. D'un filtre ou un monochromateur.

4. D'un détecteur : cellule photoélectrique.
5. D'un afficheur ou indicateur.

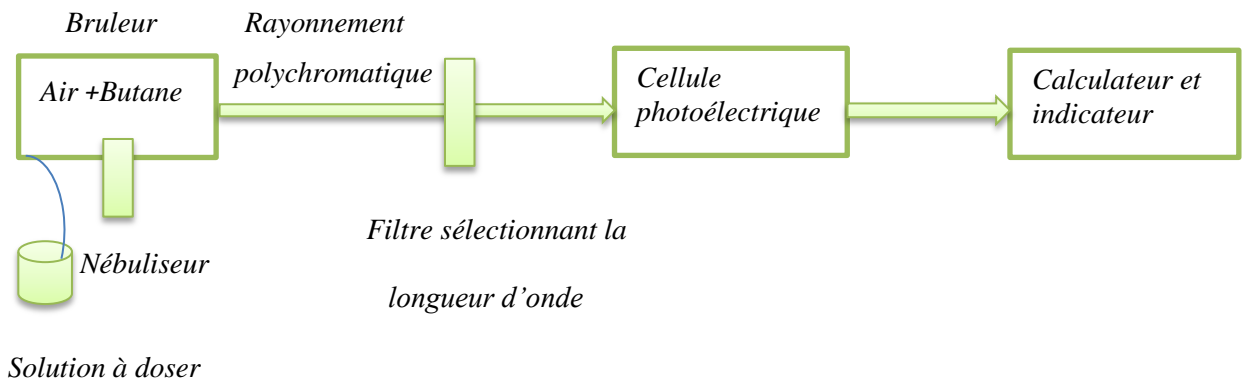


Figure III.6: Schéma de principe d'un photomètre à flamme.

Le photomètre à flamme utilisé (JENWAY, modèle PFP7) (**Figure III.7**). La flamme est obtenue par combustion du butane par l'air.



Figure III.7: Photomètre à flamme (JENWAY, modèle PFP7).

La technique d'analyse par photométrie à flamme procède par comparaison avec une série de quelques solutions étalons dont les propriétés sont analogues aux solutions inconnues.

III.3. Solvants et réactifs

Tous les solvants que nous avons utilisés en chromatographie sont de grade HPLC. Le méthanol, l'acétonitrile, l'acide phosphorique, l'acide formique, le chlorure de potassium, le chlorure de sodium, la caféine ainsi que l'acrylamide ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Sigma, Allemagne). Les acides phénoliques: gallique, chlorogénique, caféique, para-coumarique, férulique, sinapique, cinnamique et méthoxy-cinnamique; les flavonoïdes: quercétine, rutine et catéchine ont été fournies par le groupe GESVAB (Université de Bordeaux 2, France, achetés chez Sigma Aldrich). Les solutions mères de fer, cuivre, zinc et chrome ont été fournies par Perkin Elmer, elles correspondent à une concentration de 1000 mg/l du métal à doser dans le café. Les solutions standards de sodium et de potassium ont été obtenues à partir de KCl et de NaCl respectivement.

Les molécules standards sont d'une pureté supérieure à 97%.

A ces différents solvants s'ajoute l'eau déminéralisée produite par un système milli-Q de Millipore. Un système de purification d'eau Milli-Q a été utilisé pour obtenir de l'eau ultra-pure (de résistance de 18,2 $\Omega \text{ cm}^{-1}$) pour l'analyse quantitative.

III.4. Méthodes

III.4.1. Analyse quantitative par HPLC de la caféine et des polyphénols dans le café

Le but de cette analyse est de déterminer la dose de chacun des composés organiques présents dans les différents cafés concernés par cette étude en l'occurrence; caféine, acides phénoliques: gallique, chlorogénique, caféique, para-coumarique, férulique, sinapique, cinnamique et méthoxy-cinnamique; flavonoïdes: quercétine, rutine et catéchine, dont les structures moléculaires ainsi que quelques caractéristiques sont, respectivement, représentées dans la figure (III.8) et le tableau (III.1).

Tableau III.1 : Quelques caractéristiques de la caféine et des polyphénols étudiés
(ChemIDplus, Base de données, consulté le 7 juillet 2014).

Composés	Formule brute	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité
Caféine	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,1906	Eau, alcool, acétone, éther, chloroforme, benzène.
Acide chlorogénique	$C_{16}H_{18}O_9$	354,3087	Soluble dans l'eau.
Acide caféique	$C_9H_8O_4$	180,1574	Peu soluble dans l'eau.
Para-coumarique	$C_9H_8O_3$	164,158	Peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol et l'éther diéthylique.
Acide férulique	$C_{10}H_{10}O_4$	194,184	Soluble dans l'eau.
Acide cinnamique	$C_9H_8O_2$	148,1586	Soluble dans l'eau.
Acide méthoxy-cinnamique	$C_{10}H_{10}O_3$	178,186	Soluble dans l'eau à 20°C.
Acide sinapique	$C_{11}H_{12}O_5$	224,210	THF, méthanol et éthanol.
Acide gallique	$C_7H_6O_5$	170,119	Soluble dans l'eau.
Quercétine	$C_{15}H_{10}O_7$	302,236	Soluble dans des solutions aqueuses alcalines.
Rutine	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,52	Légèrement soluble dans l'eau et dans le méthanol et l'éthanol.
Catéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	290,27	Soluble dans le méthanol.

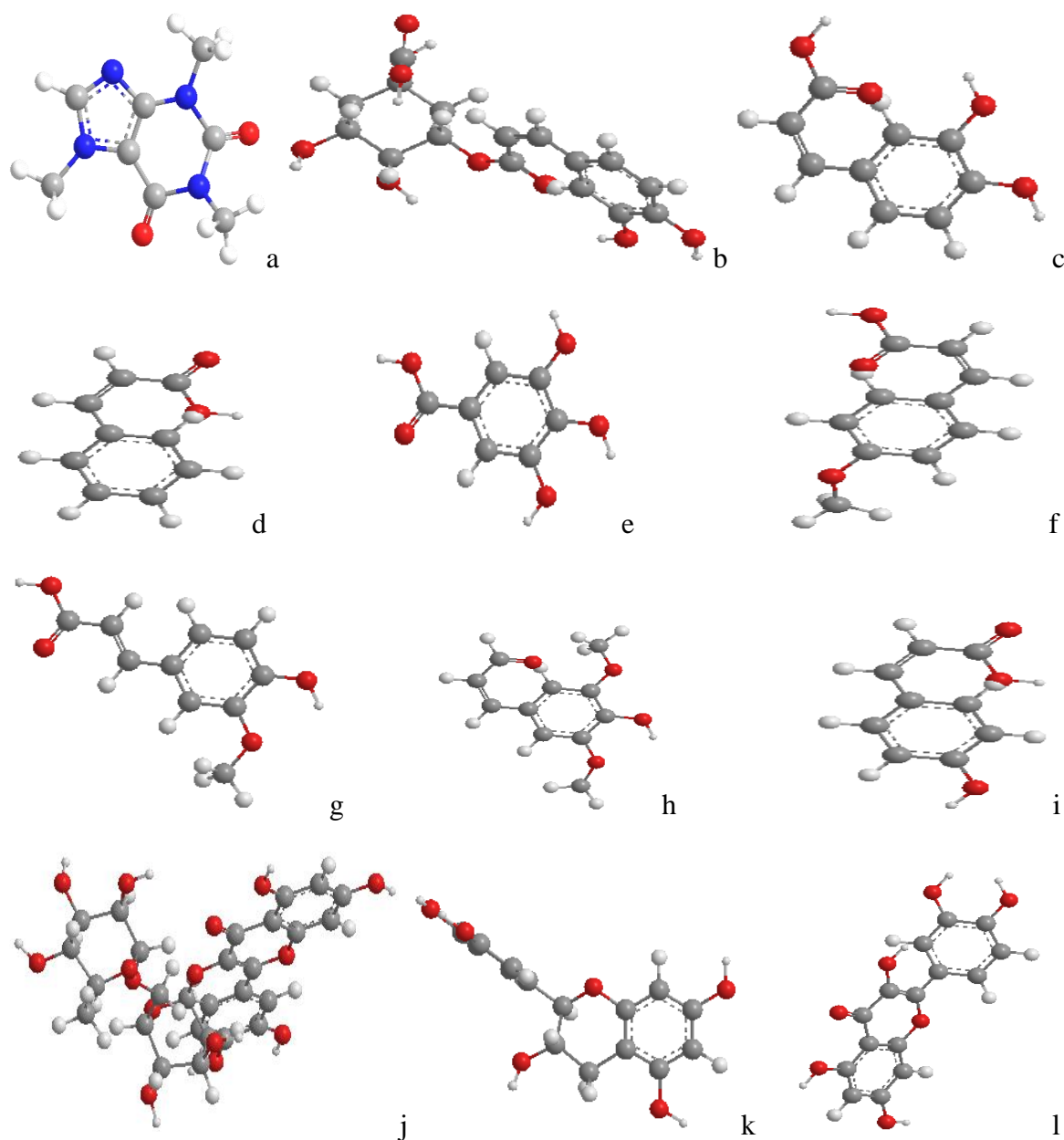


Figure III. 8: Structures des molécules étudiées: (a) caféine; acides phénoliques: (b) chlorogénique, (c) caféique, (d) cinnamique, (e) gallique, (f) méthoxy-cinnamique, (g) férulique, (h) sinapique, (i) para-coumarique; flavonoïdes: (j) rutine, (k) catéchine et (l) quercétine.

III.4.1.1. Échantillons de cafés

Des marques différentes de cafés (emballés, non emballés et solubles) ont été achetées au marché local dans la ville de Guelma et utilisées dans cette étude. Sept marques de cafés emballés, trois cafés instantanés, un café instantané décaféiné, trois échantillons de cafés torréfiés non emballés et deux échantillons de grains de café vert ont été analysés. Les cafés emballés et les cafés instantanés ont été utilisés tel qu'ils étaient et aucune modification ne leur a été apportée.

Les grains de café torréfiés non emballés ont été séparés, avant le broyage, en deux échantillons, en fonction de la taille des grains. En fait, les petits grains étaient de couleur plus foncée que les gros, ce qui signifie que les premiers ont subi une profonde torréfaction. Les deux échantillons ont été broyés et analysés séparément.

Les grains de café vert ont été broyés à l'aide d'un moulin électrique à café et utilisés pour l'analyse. Ces échantillons de café sont principalement composés de Robusta et d'Arabica purs ou de mélanges des deux. Après le broyage, les particules de café vert ont été séparées selon leurs tailles, en deux échantillons.

III.4.1.2. Méthode de préparation et injection des standards

Le but de cette étape est de construire la courbe d'étalonnage des composés purs (standards) qu'on veut doser, ultérieurement, dans les échantillons de cafés.

La solution mère est préparée à partir de 1 mg de chacun des standards purs dans 1 ml de solvant (50 % MeOH, 50 % eau). Par la suite, des dilutions successives ont été effectuées, selon la nécessité. Les courbes étalons ont, ensuite, été tracées pour chacun des standards.

Des volumes de: 5 μ l ; 10 μ l ; 15 μ l ; 20 μ l de chaque solution standard préparée ont été injectés dans l'appareil HPLC, en triplicata.

La courbe étalon est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2010) qui donne la variation de l'aire du pic en fonction du volume injecté.

La teneur de chaque constituant dosé dans différents échantillons a été calculée en utilisant l'équation de régression de la meilleure ligne d'ajustement.

III.4.1.3. Méthode de préparation des échantillons de café

Le protocole expérimental, (Figure III.9) utilisé pour l'extraction des composés étudiés à partir des échantillons solides est basé sur les conditions préalablement optimisées par Rostagno *et al.* (2011).

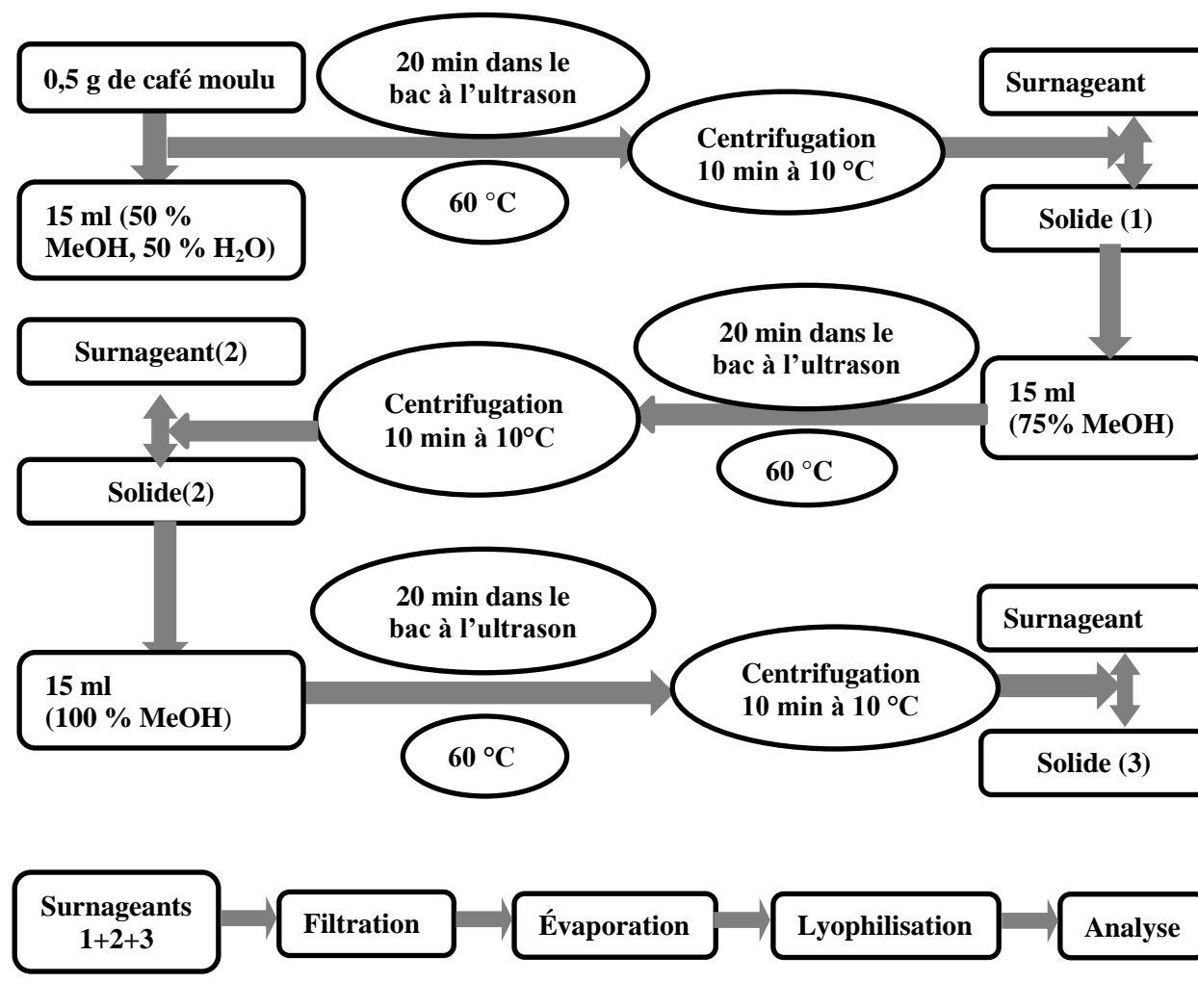


Figure III. 9 : Protocole expérimental de l'extraction des constituants du café.

En bref, la méthode d'extraction a consisté en l'extraction séquentielle avec un volume de 15 ml d'eau ultra pure et de méthanol de 0,5 g de café, d'abord le méthanol à 50%, ensuite à 75%, et enfin à 100% en utilisant à chaque fois un bac à ultrasons pendant 20 min à 60 °C. Après chaque étape d'extraction, l'échantillon est centrifugé pendant 10 min, à une température de 10°C et à raison de 4000 tours par minute à l'aide d'une centrifugeuse. Le

surnageant est recueilli, et le solide est soumis à l'étape suivante d'extraction. Après la dernière extraction, les surnageants ont été combinés, et mis en place dans une fiole en complétant avec de l'eau ultra pure jusqu'au volume de 100 ml, l'extrait ainsi obtenu a été filtré, vaporisé à l'aide d'un évaporateur rotatif et lyophilisé pendant deux jours, le rendement de l'extraction est alors déterminé.

Une quantité de 1mg du produit obtenu a été prélevée et incorporée dans une solution de 10 ml (50% méthanol, 50% eau). Un volume de 20 µl de chaque échantillon a été, ensuite, injecté dans l'appareil HPLC (en triplicata).

III.4.1.4. Dosage par HPLC/UV-visible des polyphénols et de la caféine

Pour ce dosage, le débit a été fixé à 1ml /min. La détection des composés a été réalisée à 280 et 310 nm (Rostagno *et al.* (2011)).

III.4.1.4.1. Solvants utilisés

Les phases mobiles utilisées dans le dosage des polyphénols et de la caféine sont :

Solvant A: Eau/ acide phosphorique (1%).

Solvant B: Acétonitrile / acide phosphorique (1%).

III.4.1.4.2. Gradient

Après plusieurs essais de séparation pour les différents échantillons de café, nous avons constaté qu'une bonne séparation est obtenue pour un gradient établi sur 13 min avec un pourcentage initial de 85% du solvant A (Tableau III.2):

Tableau III.2 : Gradient HPLC pour l'analyse des polyphénols et de la caféine.

Temps (min)	Composition volumique du solvant A	Composition volumique du solvant B
0	85	15
5	63	37
10	20	80
11	0	100
12	0	100
13	85	15

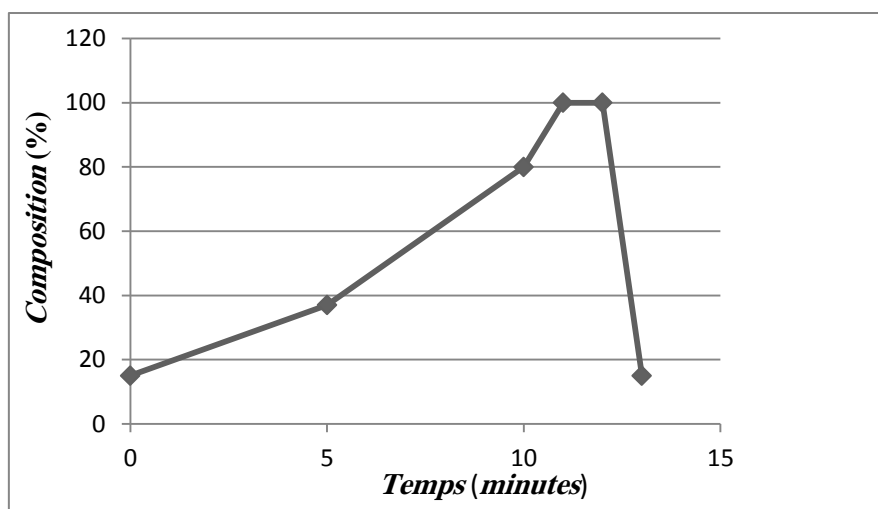


Figure III.10: Gradient HPLC utilisé.

III.4.1.5. Validation de la méthode analytique

Les différentes molécules ont été dosées par la méthode du standard externe. La gamme de volumes injectés était de 5 à 20 μl pour tous les composés analysés. Les courbes d'étalonnage ont été tracées en représentant les aires des pics (Y) par rapport au volume injecté (X, μl injectés) pour quatre volumes différents, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures de surface indépendantes.

III.4.1.5.1. Détermination des limites de détection pour la caféine et les polyphénols recherchés

La limite de détection (LOD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée. Alors que, la limite de quantification (LOQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, bien entendu, dans les conditions expérimentales de la colonne (**Ducauze, (2011)**). La limite de détection (LOD) a été calculée en considérant une valeur égale à trois fois l'écart type du bruit de fond obtenu à partir d'un échantillon blanc (solvant; méthanol), divisé par la pente de la courbe d'étalonnage. La limite de quantification (LOQ) a été déterminée en tenant compte d'une valeur égale à 10 fois l'écart type du bruit de fond, obtenue à partir d'un blanc, divisé par la pente de la courbe d'étalonnage. (**Naira & Neura, (2013)**). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (**IV.10**).

III.4.1.5.2. Détermination des taux de récupération

Le pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donnée et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon enrichi et la concentration mesurée du même échantillon non enrichi, divisée par la concentration de la substance ajoutée (**Vial & Jardy, (1998)**).

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{C_e - C}{C_a} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

Où:

C_e : Concentration mesurée d'un échantillon enrichi.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non enrichi.

C_a : Concentration de la substance ajoutée.

Afin de déterminer les taux de récupération des différents acides phénoliques, caféine et catéchine, des solutions de café préparées à partir de café moulu vert et torréfié non emballé ont été enrichies par des quantités connues en chacun des standards, puis analysées dans les mêmes conditions. Les quantités détectées ont alors été soustraites aux quantités déterminées dans la même solution de café non enrichi ensuite divisées par chacune des concentrations ajoutées.

Les capacités de récupération ont été évaluées par dopage des extraits de café avec trois concentrations différentes des standards (composés phénoliques et caféine) (0,5; 0,7 et 1,0 mg /l). La récupération moyenne est supérieure à 98% pour toutes les molécules.

Les taux de récupération obtenus avec cette méthode d'extraction sont récapitulés dans le tableau (**IV.11**).

III.4.1.6. Analyses statistiques

L'élution de chaque molécule de référence et de chaque extrait a été réalisée en triplicata. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne plus ou moins la déviation standard de trois expériences séparées.

III.4.2. Identification et quantification de l'acide chlorogénique, (5-CQA) et de la caféine par HPLC-DAD-MS dans la boisson du café

L'identification des deux principes actifs étudiés du café a été faite par la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

Les solvants utilisés dans le dosage de l'acide chlorogénique et la caféine dans la boisson du café sont :

- **Solvant A:** Eau/ (acide trifluoroacétique (0,025%)).
- **Solvant B:** Acétonitrile / acide trifluoroacétique (0,025%).

III.4.2.1. Méthode de préparation des standards

Une quantité de 1 mg de chacun des standards purs a été incorporée dans 10 ml de solvant (50% MeOH, 50% eau). Des volumes de: 5 µl ; 10 µl ; 15 µl ; 20 µl de chaque solution standard préparée ont été injectés dans l'appareil HPLC en triplicata.

Les courbes étalons correspondantes sont, ensuite, tracées afin de déterminer les concentrations des deux principes actifs étudiés dans les différents échantillons de café.

III.4.2.2. Méthode de préparation des cafés boissons

Les cafés boissons ont été préparés par deux types de cafetière (turque et électrique). Et pour cela, une quantité de 7 g de chaque échantillon de café torréfié et moulu, empaqueté et non empaqueté a été pesée et incorporée dans 100 ml d'eau ultra-pure à une température de 85°C sous agitation modérée pendant 5 minutes pour préparer les extraits de café par la méthode traditionnelle, dite « turque ».

Les extraits de café préparés par la cafetière électrique ont été obtenus, en mettant la même quantité de café utilisée par la première procédure dans un papier filtre qui est placé au-dessus d'un récipient (réservoir à pression atmosphérique) contenant 100 ml d'eau ultra-pure, l'eau monte ensuite pour s'écouler sur le filtre.

Avant de les faire passer au lyophilisateur, les extraits ont été filtrés avec un papier filtre. Une quantité de 1 mg de la masse obtenue par lyophilisation a été dissoute dans 10 ml

d'eau ultra pure, une quantité de 20 µl de chaque échantillon a été prélevée pour l'analyse HPLC en triplicata.

Le gradient est identique à celui utilisé auparavant (**Tableau III.2**).

Pour ce dosage, le débit a été toujours fixé à 1 ml/min. La détection des composés a été réalisée à 280 nm pour la détection de la caféine et 310 nm pour la détection de l'acide 5-CQA.

III.4.3. Dosage de l'acrylamide dans le café vert et torréfié par HPLC-UV-DAD

Parmi les produits de Maillard, l'acrylamide est formé lors de la cuisson forte d'aliments riches en amidon et sucres complexes. Elle est particulièrement présente dans les céréales du petit déjeuner, les poudres de café, chicorée, et tous les aliments fortement grillés ou cuits à plus de 120°C.

Cette partie est consacrée à la détermination de la teneur de l'acrylamide dans le café du marché algérien. L'influence de la température de torréfaction sur le taux d'acrylamide a également été étudiée.

La colonne (50 x 4 mm) utilisée est garnie de silice greffée au C18 (Nucleosil 100, diamètre des billes de silice: 2 µm), c'est une colonne avec une phase stationnaire apolaire, les solvants étant polaires, on est donc en présence d'une RP-HPLC (HPLC à phase inverse).

La température de la colonne et le débit sont, respectivement, de 30 °C et de 1ml/min. Le gradient est isocratique avec 95% eau et 5% acétonitrile.

Le temps d'acquisition est de 5 min, le volume d'injection est de 7 µl. La détection a été effectuée à une longueur d'onde de 210 nm. La solution mère est préparée à la base de 1 mg du standard pur dans 100 ml d'eau ultra-pure. La concentration en acrylamide des échantillons a été calculée par étalonnage externe. A cet effet, des solutions aqueuses standards de l'acrylamide dans la gamme de 0,25 µl à 2 µl ont été préparées.

III.4.3.1.Méthode de préparation des échantillons

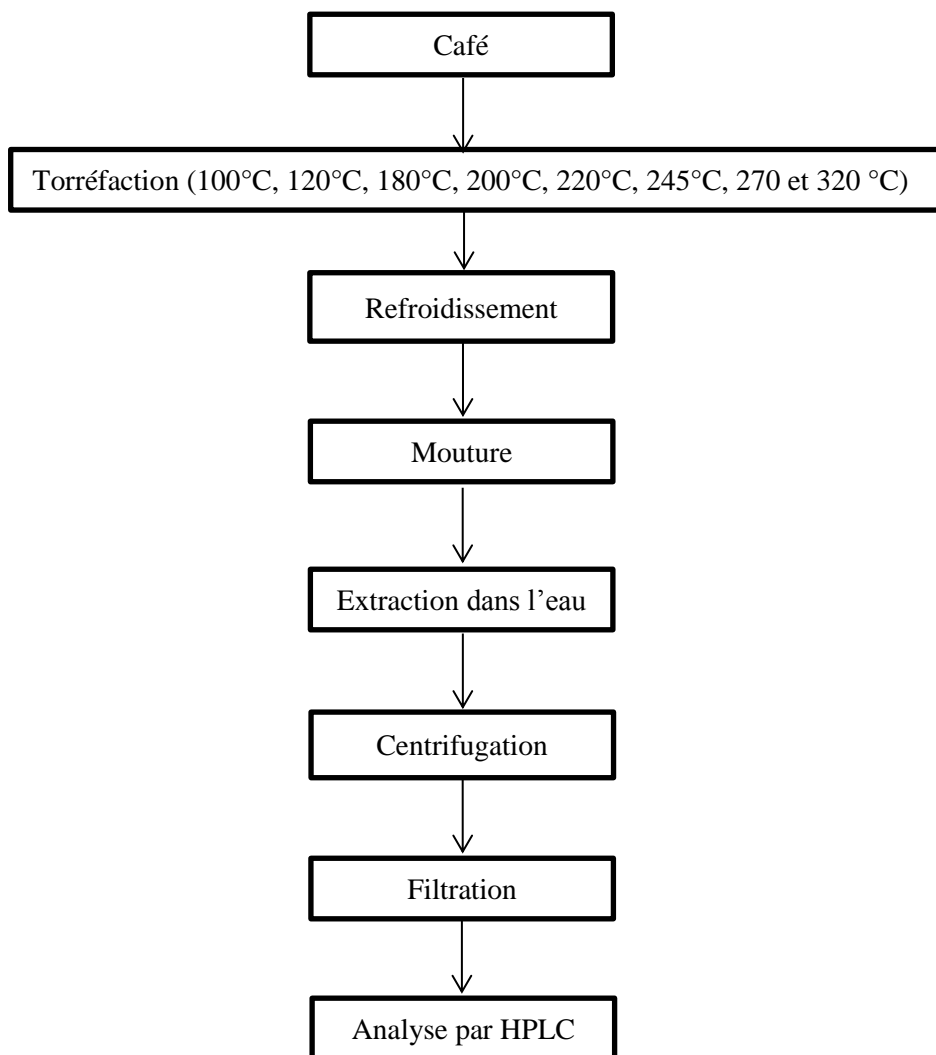


Figure III. 11: Protocole de préparation des échantillons.

Comme il est illustré par la figure (III.11), 12g de grains de café vert (Robusta) ont subi une torréfaction manuel au laboratoire pendant 15 minutes à 100°C,120°C,180°C, 200°C, 220°C, 245°C,270°C et 320°C, respectivement. Les grains de café ont été, ensuite, refroidis à température ambiante. Des photographies des échantillons torréfiés sont présentées par la figure (III.12a). On y voit clair que les couleurs virent du jaune au marron et finalement vers le noir à des torréfactions poussées.

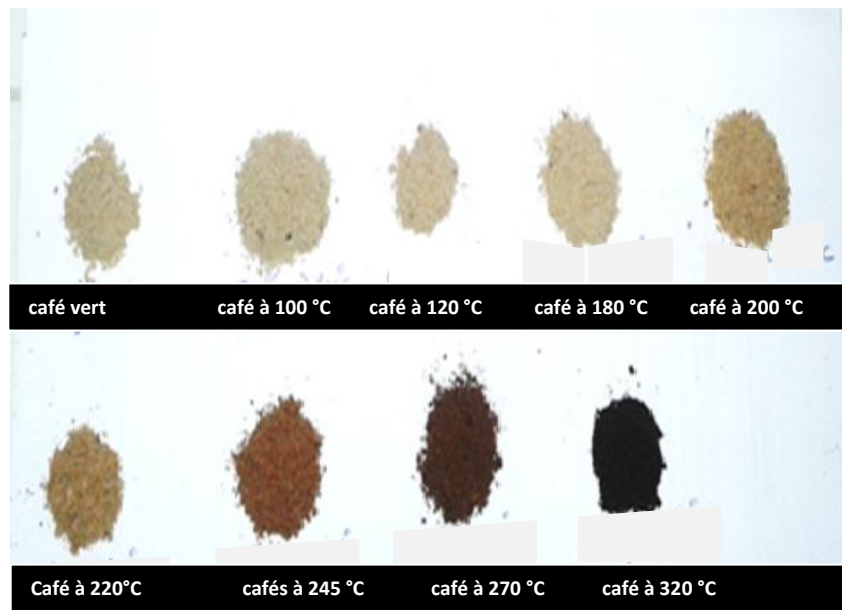


Figure III.12a : Échantillons de café vert (Robusta) grillés à différentes températures.

Le refroidissement des grains de café pendant 10 minutes est suivi par une mouture fine, et étant donné que l'acrylamide est très soluble dans l'eau (215,5g/100 ml), la poudre de café a subi une extraction en mettant en contact 7 g de poudre avec 80 ml d'eau contenue dans un bécher chauffée à 90°C.

L'extraction a été conduite sous agitation pendant 3 minutes. Après l'extraction dans l'eau, la solution a été centrifugée à 4000 tours par minute pendant 10 min. Après refroidissement, l'extrait a subi deux filtrations successives à l'aide du papier filtre, avant d'être analysé par HPLC- UV-DAD.

Pour le café torréfié non emballé (Arabica, Robusta, Robusta à petits grains (PG), Robusta à gros grains(GG) (**Figure III.12b**), nous avons procédé, directement, à la mouture en suivant le reste du protocole expérimental (**Figure III.11**).



Figure III.12b : Échantillons de café (Arabica, Robusta, Robusta à petits grains (PG), Robusta à gros grains(GG)).

Pour le café emballé qui est déjà moulu, la poudre a directement été soumise à l'extraction.

III.4.3.2. Détermination du pH des extraits obtenus

Le pH-mètre est calibré avec les deux solutions tampon à pH 4 et 7. Les pH des extraits obtenus de chaque échantillon sont mesurés et les résultats sont récapitulés sur le tableau (IV.22).

III.4.3.3. Solvants utilisés

Les solvants utilisés pour le dosage de l'acrylamide sont :

- **Solvant A:** Eau/ (acide formique (0,1%)).
- **Solvant B:** Acétonitrile / acide formique (0,1%).

III.4.3.4. Injection

Chacun des appareils HPLC-DAD analytique ou HPLC-DAD-MS est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 7 μ l. L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives.

III.4.4. Intégration

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de deux paramètres:

- La largeur attendue des pics.
- Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur du pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches.

Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. Les surfaces des pics correspondant aux composés auxquels nous nous intéressons sont données par le logiciel dans un fichier contenant les données chromatographiques sous forme de tableaux contenant le numéro du pic, son temps de rétention, et sa surface et ce à la fin de chaque analyse.

III.4.5. Analyse par spectrométrie d'absorption atomique des éléments Zn, Fe, Cu et Cr

Dans cette partie, on s'est focalisé sur la détermination de la teneur en quelques éléments métalliques d'intérêt nutritionnel dans les différents échantillons de café, à savoir le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le fer (Fe) et le zinc (Zn).

III.4.5.1. Solutions

- Solutions mères standards commerciales de chrome, de cuivre, de zinc et de fer de concentration 1000 mg/l.
- Eau ultra pure.

III.4.5. 2. Méthode de préparation des solutions étalons (standards)

Le dosage des minéraux par absorption atomique nécessite l'utilisation d'une courbe d'étalonnage. Celle-ci rapporte l'absorbance en fonction de la concentration de la solution en

cation métallique en question. Pour cela, les solutions étalons ont été choisies en respectant le domaine de linéarité de la courbe conformément à la loi de Beer-Lambert. Le tableau ci-dessous regroupe les solutions étalons utilisées pour chaque élément.

Tableau III.3 : Solutions étalons utilisées pour le dosage de Zn, Fe, Cu et le Cr.

Eléments	Gamme des Concentrations des solutions étalons (mg/l)
Zinc (Zn)	0,1 – 1
Fer(Fe)	0,3 - 2,5
Cuivre(Cu)	2 – 9
Chrome(Cr)	2 – 10

III.4.5.3. Méthode de préparation des échantillons de café

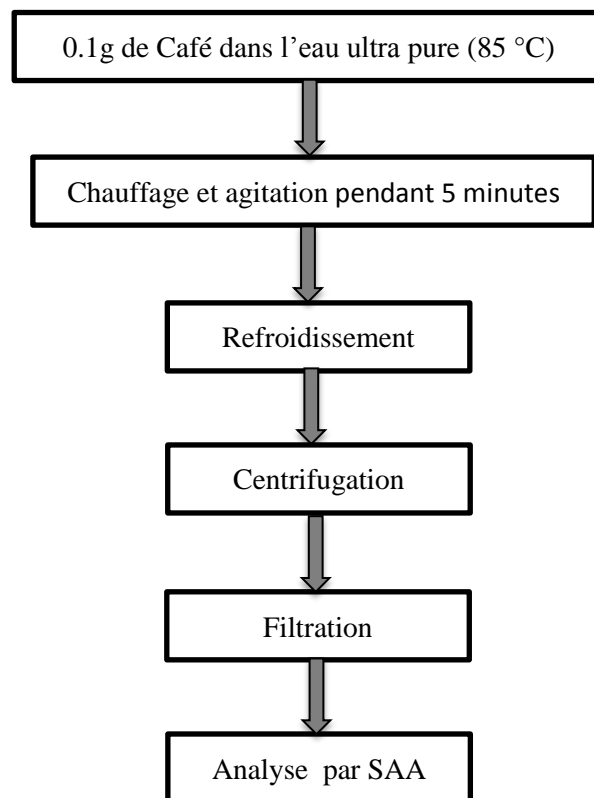


Figure III. 13: Organigramme de préparation des échantillons.

Comme illustré par l'organigramme représenté par la figure (III.13), le mode opératoire utilisé pour la préparation des échantillons de café est basé sur celui effectué par

Oliveira et al. (2012) ; une quantité de 0,1 g de chaque échantillon a été dissout dans une quantité d'eau chauffée à 85 °C avec agitation pendant 5 min. Après refroidissement, les solutions ont été centrifugées pendant 30 minutes puis filtrées.

Les extraits obtenus ont été dilués pour obtenir une solution de 100 ml.

Les analyses des métaux dans les différents échantillons de café par absorption atomique ont été effectuées au laboratoire d'analyses industrielles et génie des matériaux (LAIGM) à l'université de Guelma.

III.4.6. Analyse de Na et K par photométrie à flamme

Le but de cette analyse est le dosage de deux éléments alcalins (le potassium K et le sodium Na).

III.4.6.1. produits chimiques

- KCl (solide).
- NaCl (Solide).
- Eau ultra-pure.

III.4.6.2. Modes opératoires

III.4.6.3. Méthode de préparation des solutions étalons

Une quantité de 0,283 g de KCl pur a été dissoute dans un faible volume d'eau ultra pure. Le volume est ensuite complété à 100 ml.

Les échantillons ont été dilués pour obtenir les concentrations suivantes (en mg/l): 0,3; 0,7 ; 1 et 2.

De la même façon, une quantité de 0,127 g de NaCl pur a été dissoute dans un petit volume d'eau ultra pure. Le volume est ensuite complété à 100 ml. Des dilutions successives ont permis d'obtenir les concentrations suivantes (en mg/l) : 0,5; 2; 4,5 et 7.

En ce qui concerne les échantillons de café, ils sont les même que ceux utilisées auparavant, et le mode opératoire pour la préparation des extraits de café est identique à celui utilisé pour la caractérisation par spectroscopie d'absorption atomique.

Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de méthodes physicochimiques d'analyses à l'université de Guelma.

III.5. Conclusion

Après le détail du matériel et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que les méthodes d'analyse choisies pour notre étude sont des méthodes simples, efficaces et adéquates; en fait, elles ont permis d'identifier et de doser avec une grande précision, quelques composés nutritifs contenus dans le café ainsi qu'un composé redoutable, l'acrylamide. Ces méthodes ont été convenablement validées.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons, les courbes des standards, les chromatogrammes et les résultats de dosages des différents types de café étudiés (café vert, café torréfié, moulu, emballé et non emballé et café soluble).

Les constituants de café qui ont été dosés sont la caféine, les acides phénoliques (chlorogénique, caféique, p-coumarique, ferulique, cinnamique, méthoxy-cinnamique, sinapique et gallique), les flavonoïdes (la quercétine, la rutine et la catéchine), l'acrylamide et aussi quelques minéraux; le potassium, le sodium, le zinc, le fer, le cuivre et le chrome.

Les méthodes analytiques utilisées sont : HPLC-UV-visible, HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS, spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et photométrie à flamme (PEA).

IV.2. Analyse par HPLC-UV-visible

IV.2.1. Données chromatographiques des standards

Les figures de (IV.1) à (IV.18) représentent les chromatogrammes par HPLC et les courbes étalons des composés purs dosés, et les tableaux de (IV. 1) à (IV.9) montrent les données pour construire les courbes d'étalonnage.

- La caféine

Tableau IV. 1: Données HPLC pour la caféine.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	99540	99543	99537	99540	3
10	156034,8	156034,4	156034,4	156034,5	0,2
15	225176,2	225175	225177	225176,1	1
20	285071,1	285072,3	285070,3	285071,2	1

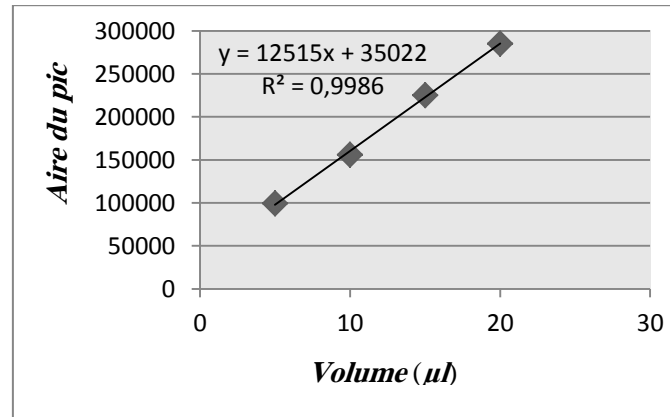


Figure IV. 1: Courbe d'étalonnage de la caféine.

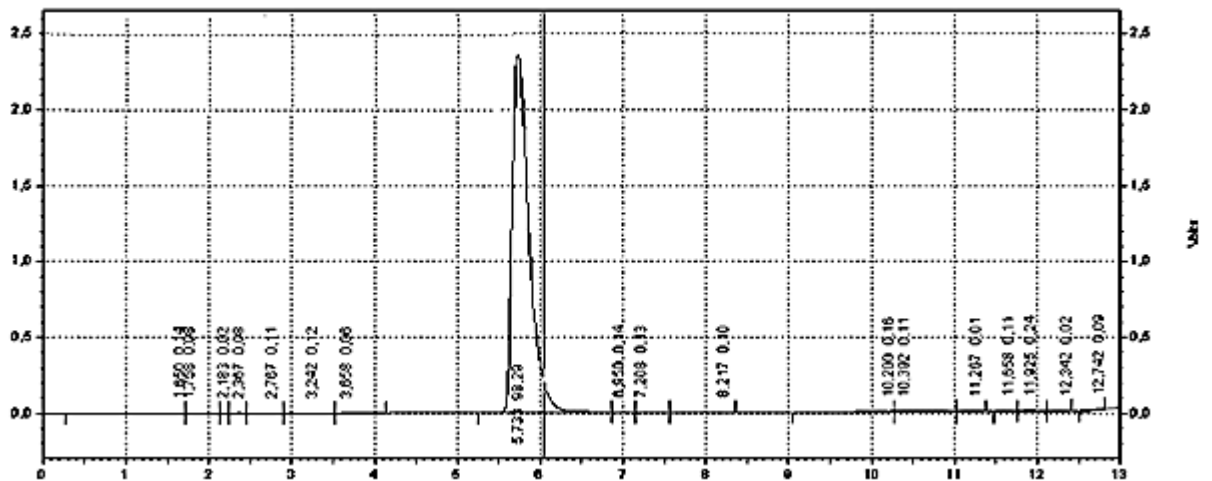


Figure IV. 2: Chromatogramme de la caféine ; $T_R=5,73$ min, $\lambda =280$ nm.

- Acide chlorogénique

Tableau IV. 2: Données HPLC pour l'acide chlorogénique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	47143,6	47142,0	47145	47143,5	1,5
10	79913,3	79917,0	79915,5	79915,3	1,9
15	102737	102734,7	102736,5	102736,1	1,2
20	135545,5	135545,0	135544,8	135545,1	0,4

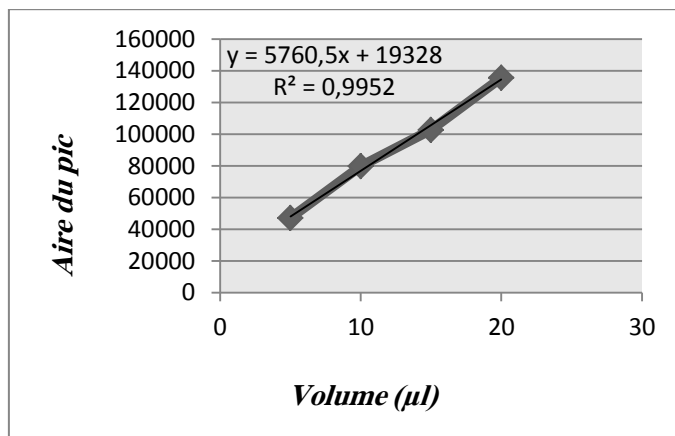


Figure IV. 3: Courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique.

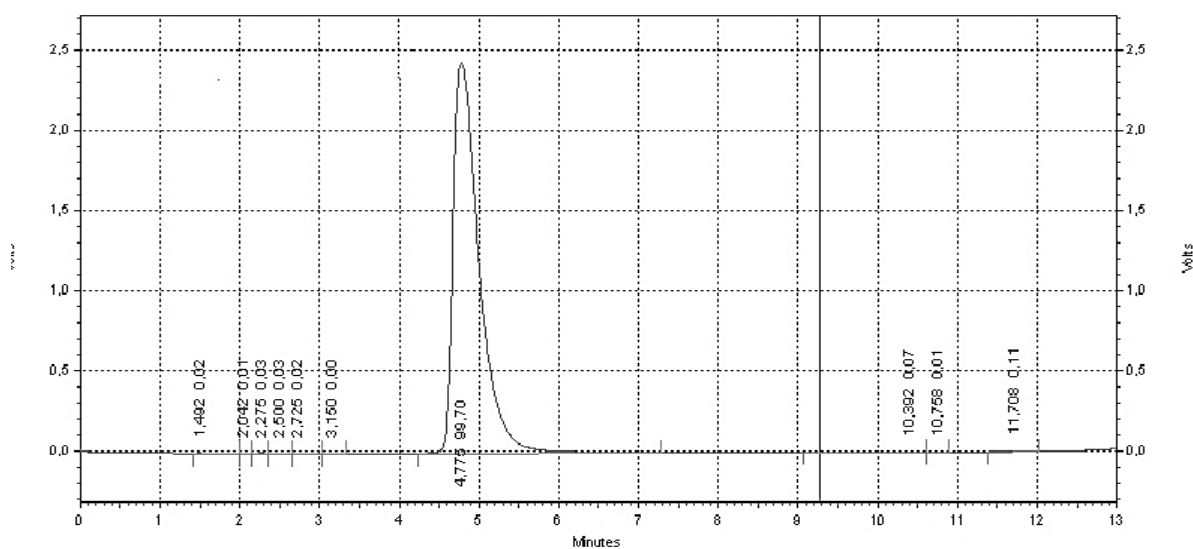


Figure IV. 4: Chromatogramme de l'acide chlorogénique ; $T_R=4,77$ min, $\lambda =310$ nm.

- L'acide caféique

Tableau IV. 3: Données HPLC pour l'acide caféique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	5460,5	5460,7	5463,5	5461,6	1,7
10	16456,3	16454,8	16454,5	16455,2	1
15	25024,7	25025,3	25025,5	25025,2	0,4
20	37809,3	37809,7	37800,7	37806,6	5,1

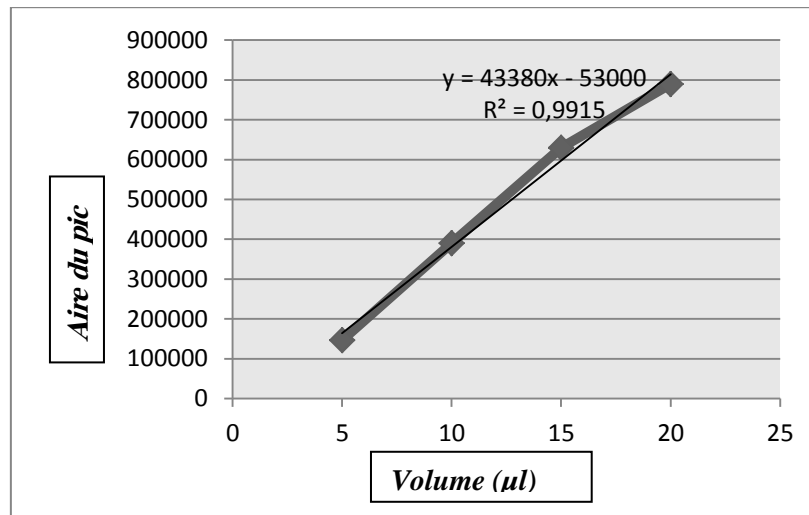


Figure IV. 5: Courbe d'étalonnage de l'acide caféique

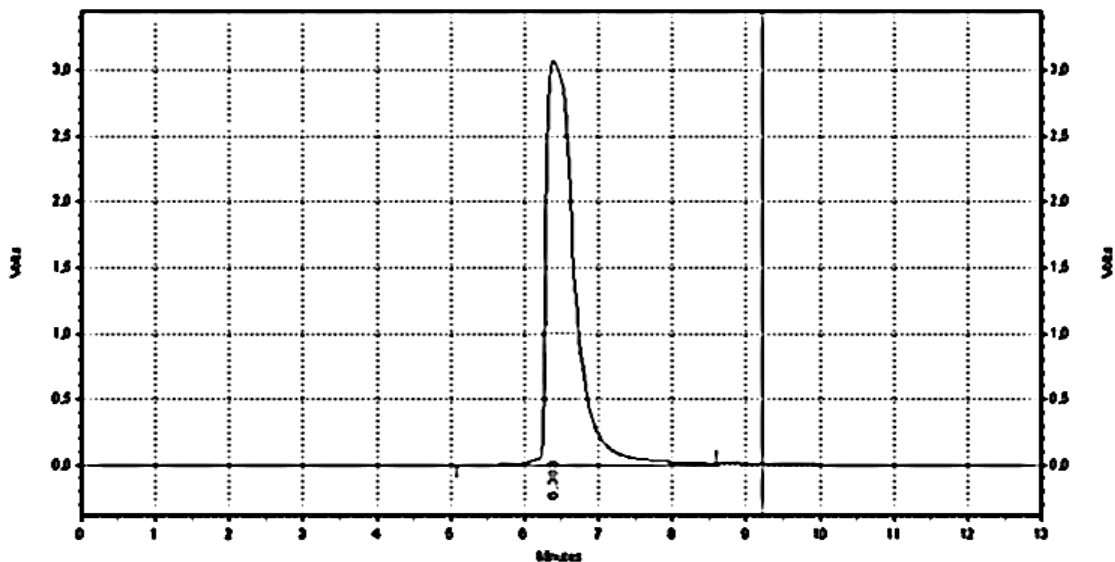


Figure IV. 6: Chromatogramme de l'acide caféique; $T_R=6,38\text{min}$, $\lambda = 310\text{nm}$.

- Acide cinnamique

Tableau IV. 4: Données HPLC pour l'acide cinnamique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	5460,5	5460,7	5463,5	5461,6	1,7
10	16456,3	16454,8	16454,5	16455,2	1
15	25024,7	25025,3	25025,5	25025,2	0,4
20	37809,3	37809,7	37800,7	37806,6	5,1

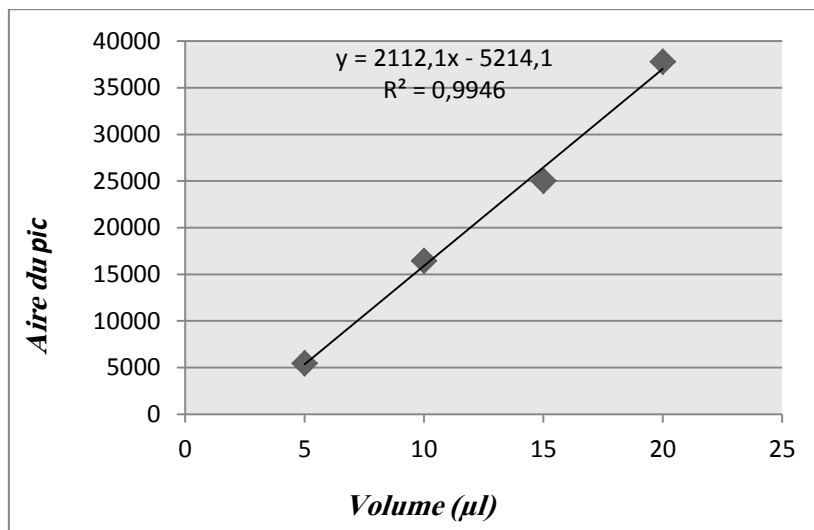


Figure IV. 7 : Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique

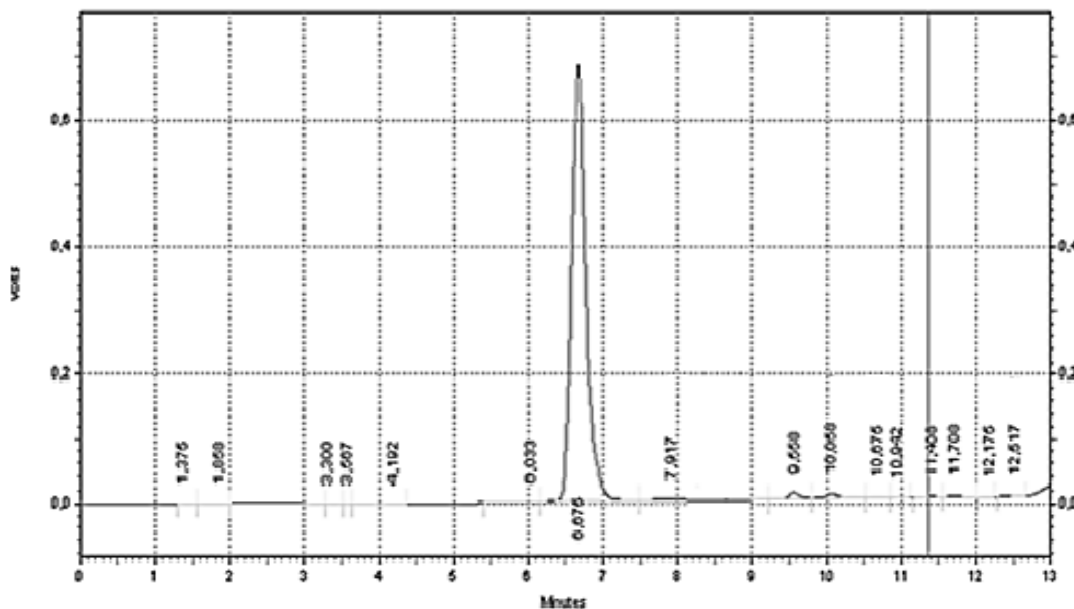


Figure IV. 8: Chromatogramme de l'acide cinnamique; $T_R=6,67\text{min}$, $\lambda =310\text{ nm}$.

- L'acide férulique

Tableau IV. 5: Données HPLC pour l'acide férulique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	9531	9533	9531	9531,7	1,2
10	27866	27865	27863	27864,7	1,5
15	49593	49597	49595	49595	2
20	75507	75507	75509	75507,7	1,2

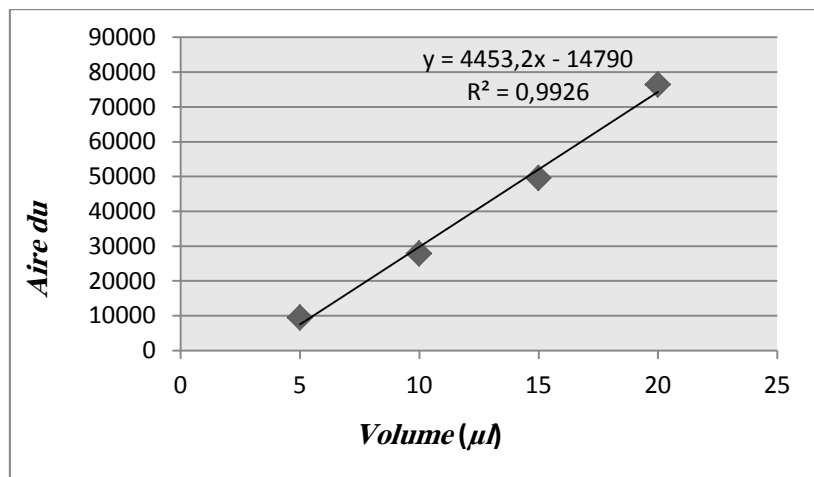


Figure IV. 9: Courbe d'étalonnage de l'acide férulique.

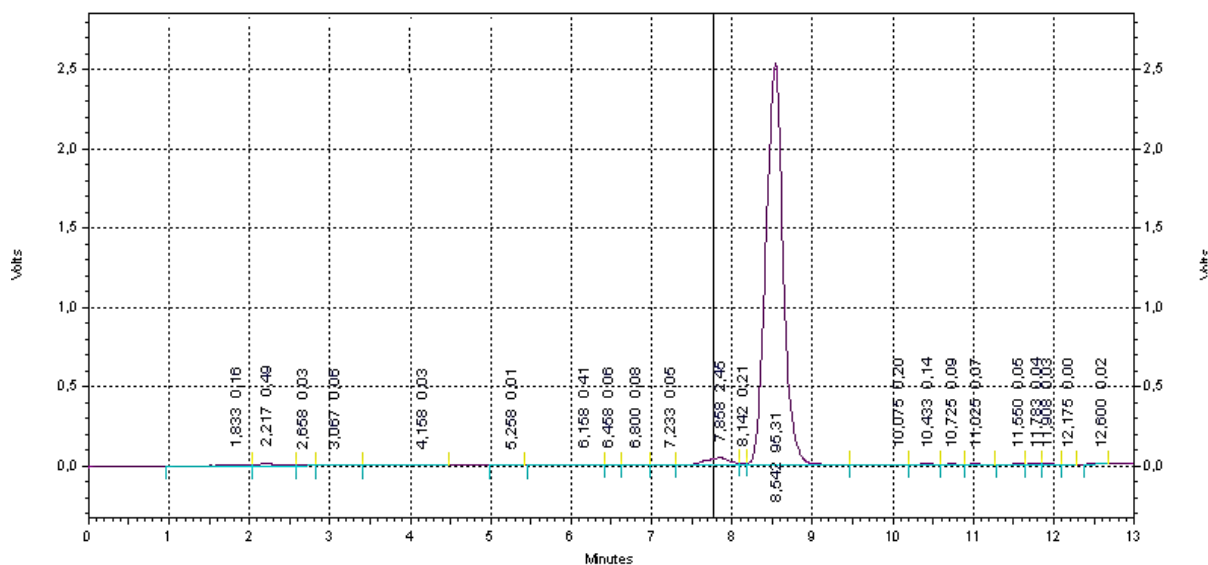


Figure IV. 10: Chromatogramme de l'acide férulique; $T_R=8,54\text{min}$, $\lambda=310\text{ nm}$.

- Acide p- coumarique

Tableau IV. 6: Données HPLC pour l'acide p-coumarique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	9811	9817	9820	9816	4,6
10	23967,3	23967,7	23967,5	23967	0,2
15	39903	39900	39905	39902,7	2,5
20	60410	60407	60407	60408	1,7

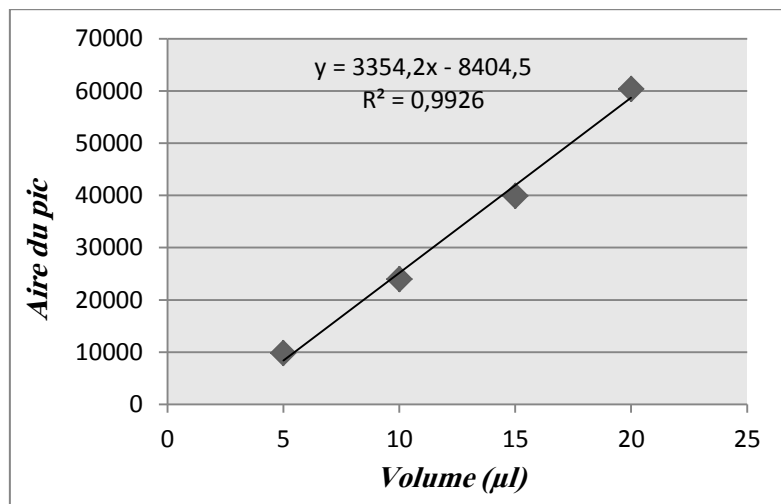


Figure IV. 11: Courbe d'étalonnage de l'acide p-coumarique.

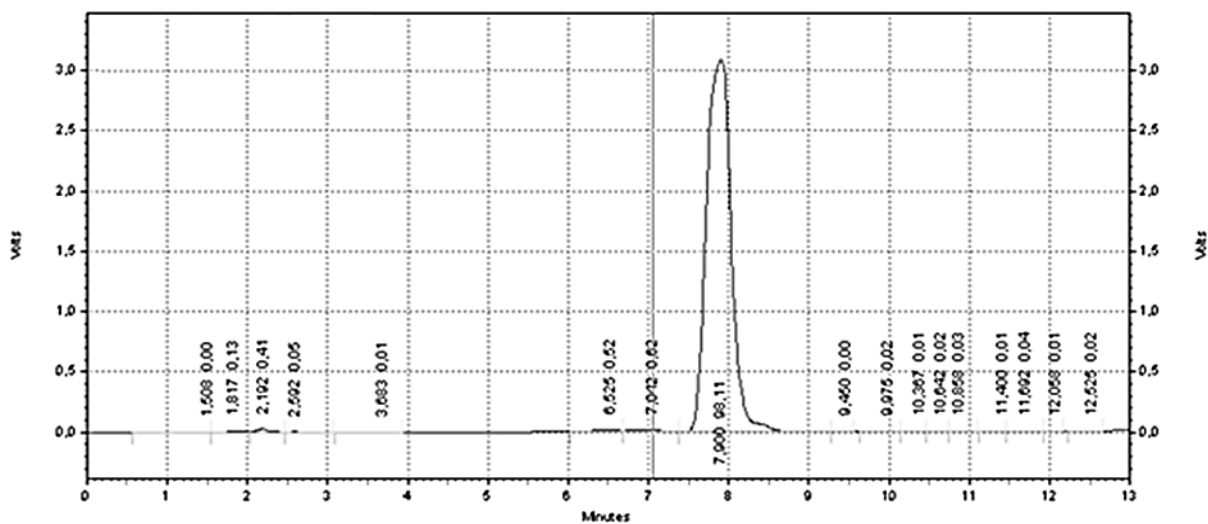


Figure IV.12: Chromatogramme de l'acide p-coumarique; $T_R=7,90$ min, $\lambda=280$ nm.

- Acide méthoxy-cinnamique

Tableau IV.7: Données HPLC pour l'acide méthoxy-cinnamique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	7462	7463	7465	7463,3	1,5
10	17917,3	17913,9	17915,5	17915,6	1,7
15	32463	32453	32457	32457,7	5
20	48453	48455	48452	48453,3	1,5

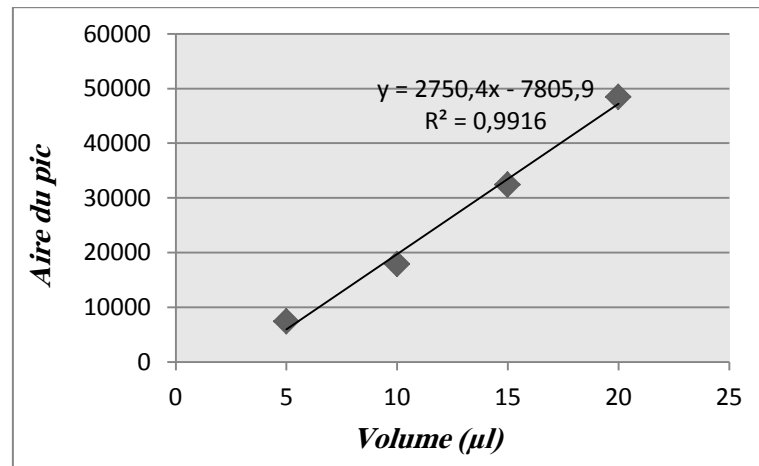


Figure IV. 13: Courbe d'étalonnage de l'acide méthoxy-cinnamique.

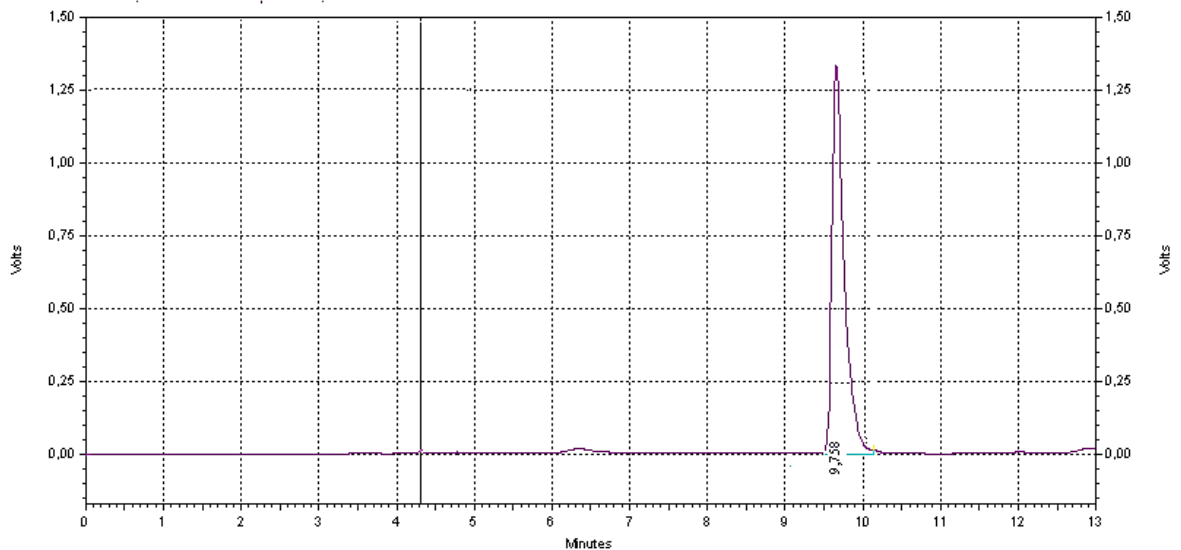


Figure IV. 14: Chromatogramme de l'acide méthoxy-cinnamique; $T_R=9,76\text{min}$, $\lambda=310\text{ nm}$.

- Catéchine

Tableau IV. 8: Données HPLC pour la catéchine.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	9752,5	9751,9	9752,7	9752,37	0,4
10	20056	20060	20057	20057,7	2,1
15	29534,3	29534,5	29532,9	29533,9	0,9
20	41507,5	41511,4	41509,6	41509,5	2

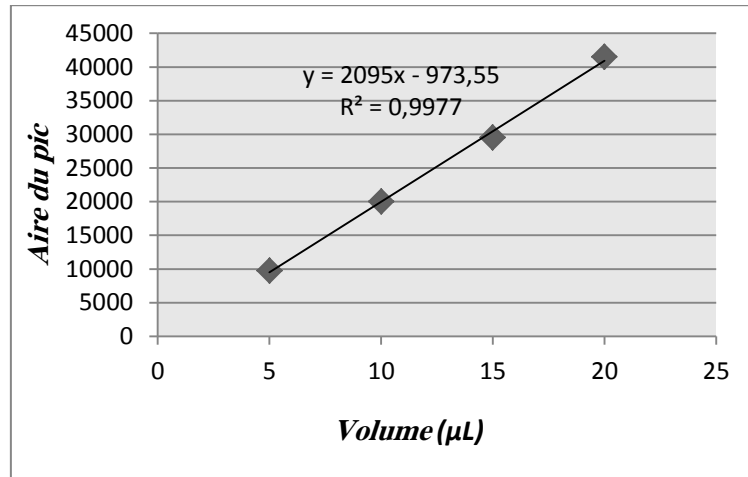


Figure IV. 15: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

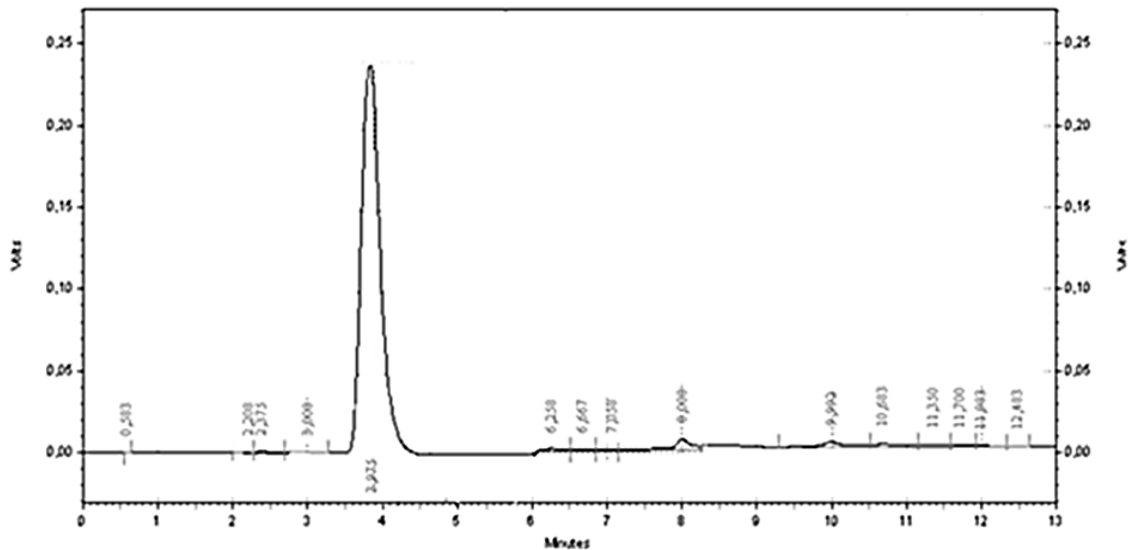


Figure IV. 16: Chromatogramme de la catéchine; $T_R=3,95\text{min}$, $\lambda=310\text{ nm}$.

- L'acide gallique

Tableau IV. 9: Données HPLC pour l'acide gallique.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	8901	8900	8903	8901,3	1,5
10	23556	23553	23549	23552,7	3,5
15	48654	48650	48653	48652,3	2,1
20	63493	63493	63495	63493,7	1,2

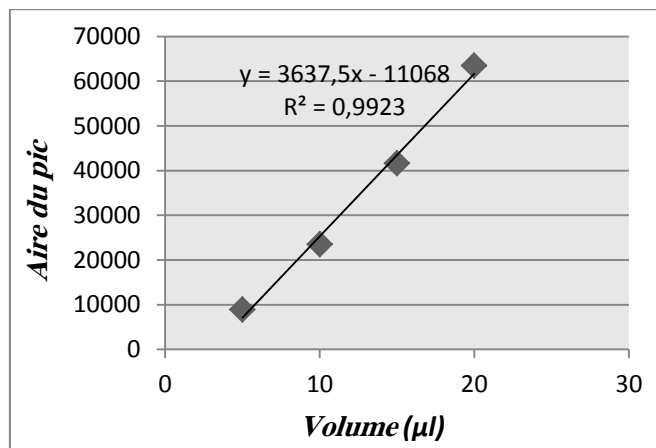


Figure IV. 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

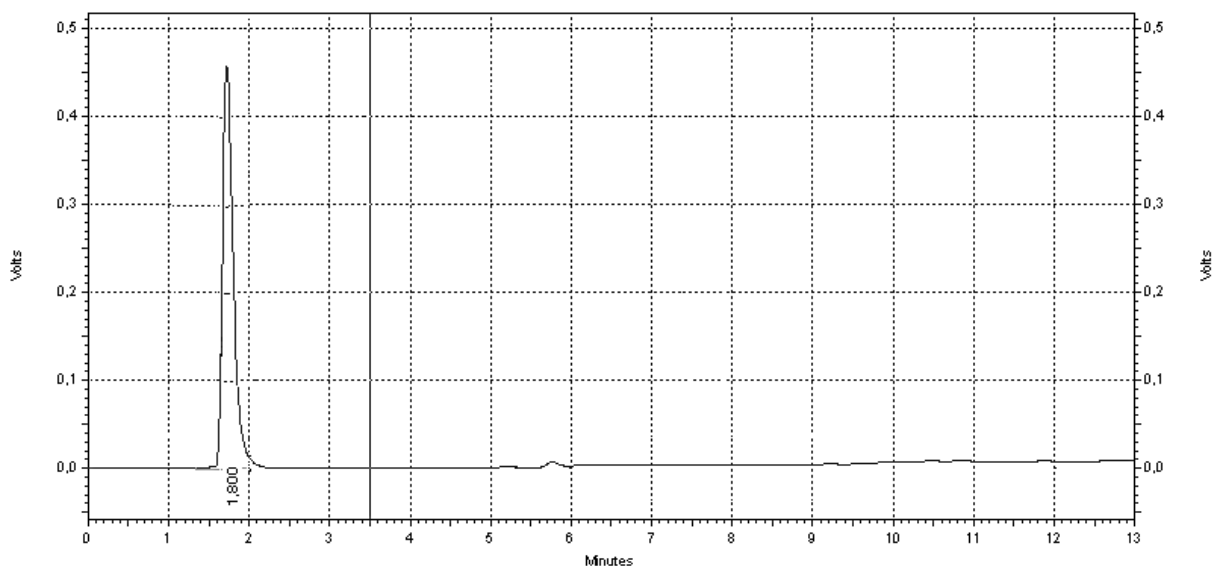


Figure IV. 18: Chromatogramme de l'acide gallique; $T_R=1,80\text{min}$, $\lambda =310\text{ nm}$.

IV.2.2. Concentrations des polyphénols et de la caféine dans les différents échantillons de café étudiés

IV.2.2.1. Validation de la méthode

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression, ($R^2 > 0,98$) a été obtenu pour toutes les solutions des composés standards. La ligne de base pour tous les échantillons était linéaire et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient acceptables.

IV.2.2.1.1. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Nous avons calculé les concentrations détectables et quantifiables dans les échantillons de café étudiés. C'est ce que nous appelons «limite de la détection, LOD et limite de quantification, LOQ». Les valeurs estimées sont indiquées dans le tableau (IV.10). Les limites de détection estimées pour la méthode vont de 0,75 à 14,79 µg/l et celles de quantification de 2,26 à 44,44 µg/l. Ces valeurs sont donc tout à fait acceptables.

Tableau IV. 10 : Paramètres graphiques de la méthode analytique proposée, T_R : temps de rétention (mn), LOD: Limite de détection; LOQ: Limite de quantification.

Composés	T_R	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)
Acide Gallique	1,80	14,79	44,44
Acide Para-Coumarique	7,91	1,67	5,00
Acide Ferulique	8,54	4,34	13,04
Acide Sinapique	8,78	2,74	8,22
Acide Cinnamique	6,38	0,75	2,26
Acide Methoxy-cinnamique	9,76	5,34	15,96
Acide Caffeique	6,75	5,72	17,32
Acide Chlorogénique	4,70	1,65	5,00
Caféine	5,95	1,90	5,70
Catéchine	3,99	2,36	7,14
Rutine	7,40	7,95	23,89
Quercétine	9,37	2,44	7,32

IV.2.2.1.2. Taux de récupérations

Les taux de récupération de la méthode ont été évalués par dopage des extraits de café avec trois concentrations différentes des standards (composés phénoliques et caféine) (0,5, 0,7 et 1,0 mg/100g). Les résultats sont rassemblés dans le tableau (IV.11) et représentés sur les figures (IV.19 et IV.20).

Tableau IV. 11 : Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement des différents composés standards dans le café moulu. Les extraits de café ont été préparés à partir du café vert et torréfié (Robusta). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD.

Composés	Concentrations ajoutées (mg/100g)	n	Taux de récupération (%)	
			Extrait de café torréfié	Extrait de café vert
Caféine	0.5	4	102.3 \pm 4.2	98.8 \pm 1.6
	0.7	4	100.6 \pm 3.7	105.2 \pm 2.4
	1.0	4	98.7 \pm 4.0	107.2 \pm 2.0
Catéchine	0.5	4	105.3 \pm 5.1	99.3 \pm 1.0
	0.7	4	99.0 \pm 1.4	102.0 \pm 2.7
	1.0	4	98.2 \pm 1.0	98.7 \pm 1.3
Acide galique	0.5	4	110.0 \pm 4.7	114.1 \pm 4.6
	0.7	4	117.9 \pm 4.5	119.0 \pm 4.4
	1.0	4	101.7 \pm 2.2	106.2 \pm 2.3
Acide chlorogénique	0.5	4	109.6 \pm 1.0	98.9 \pm 1.2
	0.7	4	107.0 \pm 4.0	99.6 \pm 1.9
	1.0	4	106.5 \pm 2.4	109.7 \pm 2.4
Acide caféique	0.5	4	98.1 \pm 1.0	99.1 \pm 1.2
	0.7	4	99.8 \pm 1.2	105.7 \pm 3.7
	1.0	4	104.5 \pm 2.0	106.3 \pm 4.6
Acide cinnamique	0.5	4	102.0 \pm 4.7	103.2 \pm 2.7
	0.7	4	110.0 \pm 3.2	105.0 \pm 3.2
	1.0	4	102.7 \pm 4.6	98.6 \pm 1.6
Acide ferulique	0.5	4	109.6 \pm 4.1	103.4 \pm 3.0
	0.7	4	104.4 \pm 1.7	108.0 \pm 5.0
	1.0	4	106.3 \pm 3.6	107.2 \pm 3.1
Acide méthoxy-cinnamique	0.5	4	98.5 \pm 0.4	99.5 \pm 2.9
	0.7	4	103.0 \pm 3.2	109.5 \pm 3.4
	1.0	4	99.3 \pm 1.6	102.7 \pm 2.6

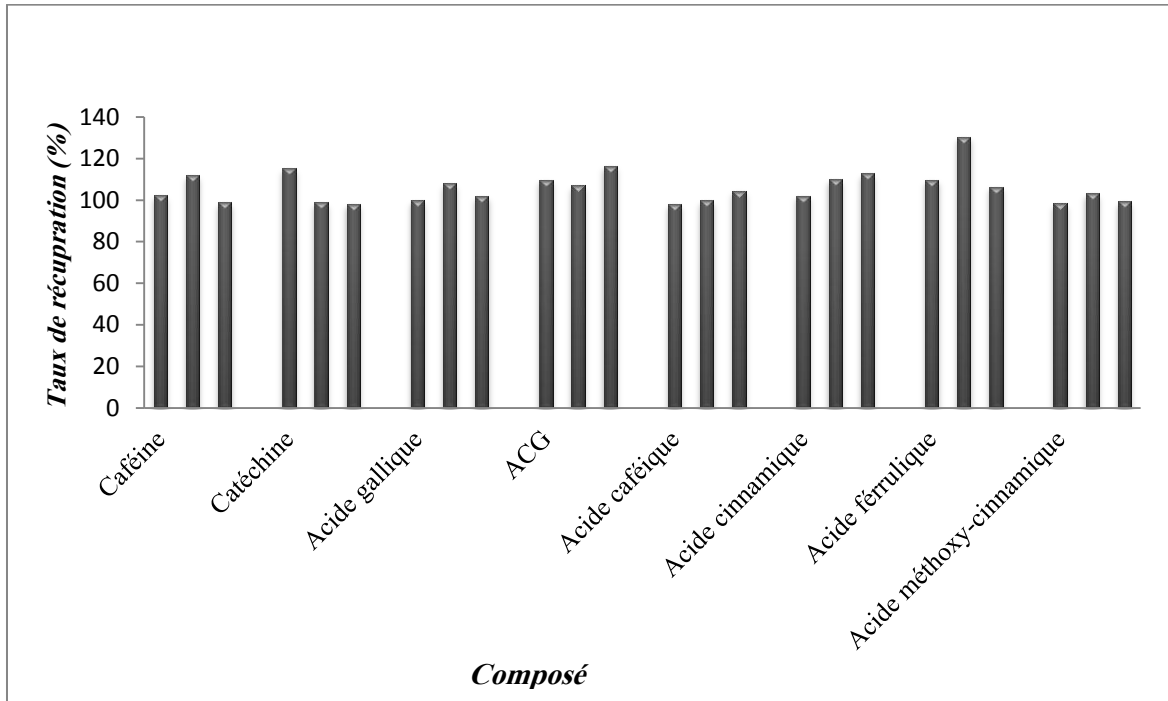


Figure IV. 19: Taux de récupération pour chaque composé à partir du café moulu dopé, obtenu à partir d'un extrait du café torréfié.

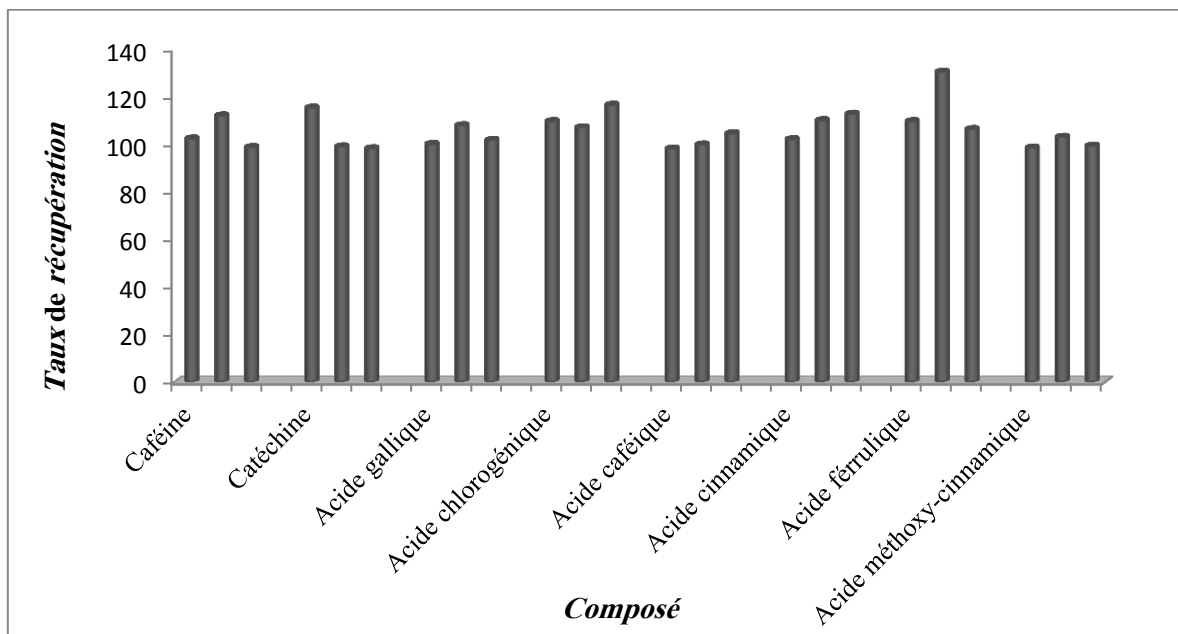
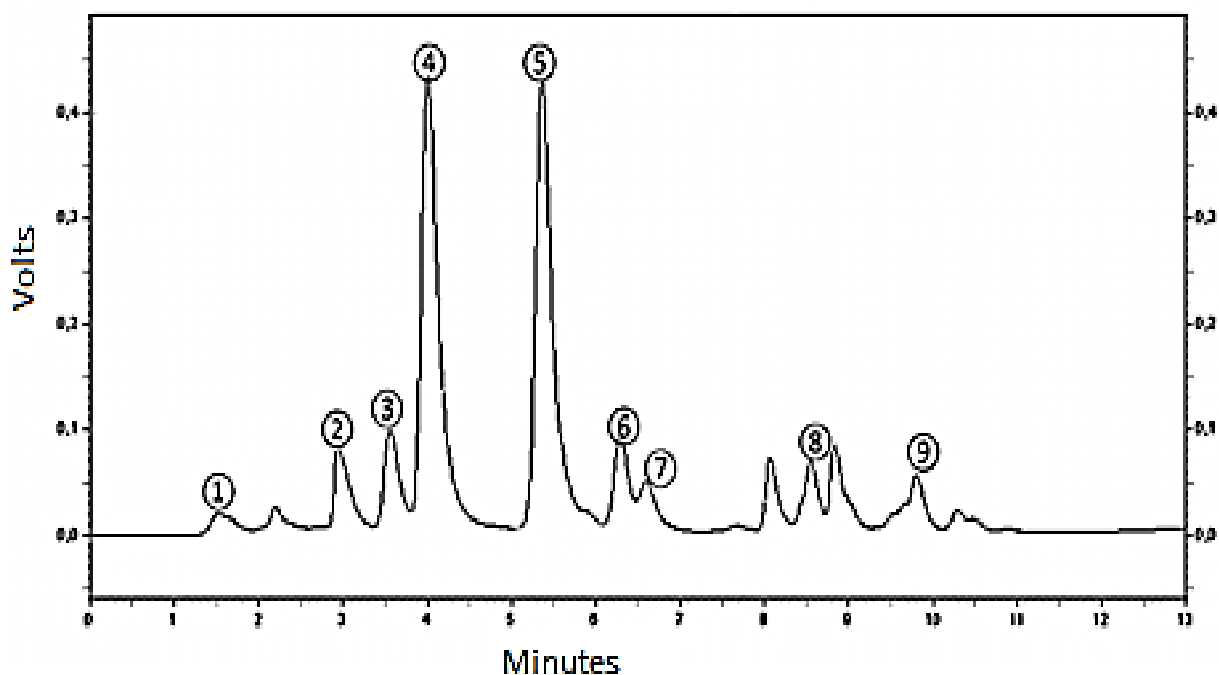


Figure IV. 20: Taux de récupération pour chaque composé à partir du café moulu dopé, obtenu à partir d'un extrait du café vert.

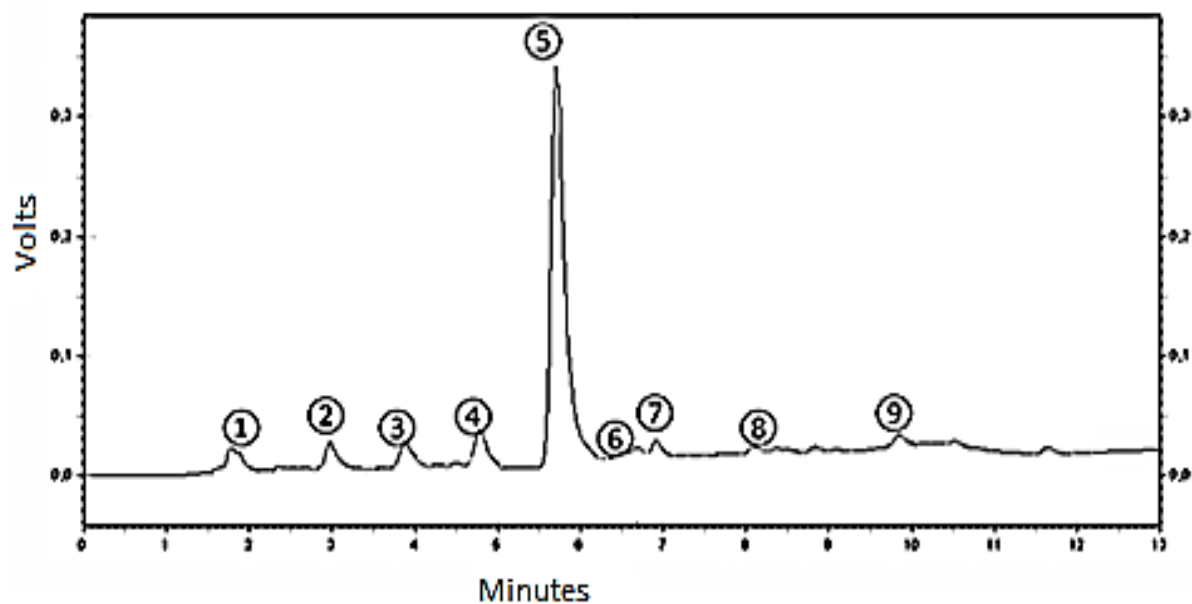
Les résultats du dopage réalisé sur les deux extraits de café vert et torréfié, présentent de très bons rendements. La récupération moyenne est supérieure à 98% pour toutes les molécules et elle varie de $98,1 \pm 1,0$ à $117,9 \pm 4,5\%$ pour le café torréfié et de $98,6 \pm 1,6$ à $119,0 \pm 4,4 \%$ pour le café vert ; ceci fait apparaître l'efficacité de l'extraction multiple par le méthanol en utilisant les ultrasons. En effet, les taux de récupération des standards ajoutés aux échantillons testés à des différentes concentrations sont reproductibles, et ont des valeurs très satisfaisantes.

Nous représentons dans la figure (IV. 21) les chromatogrammes HPLC des échantillons du café vert, torréfié non emballé (Arabica) et café torréfié emballé alors que les chromatogrammes des autres échantillons obtenus seront présentés en annexe A1.

A)



B)



C)

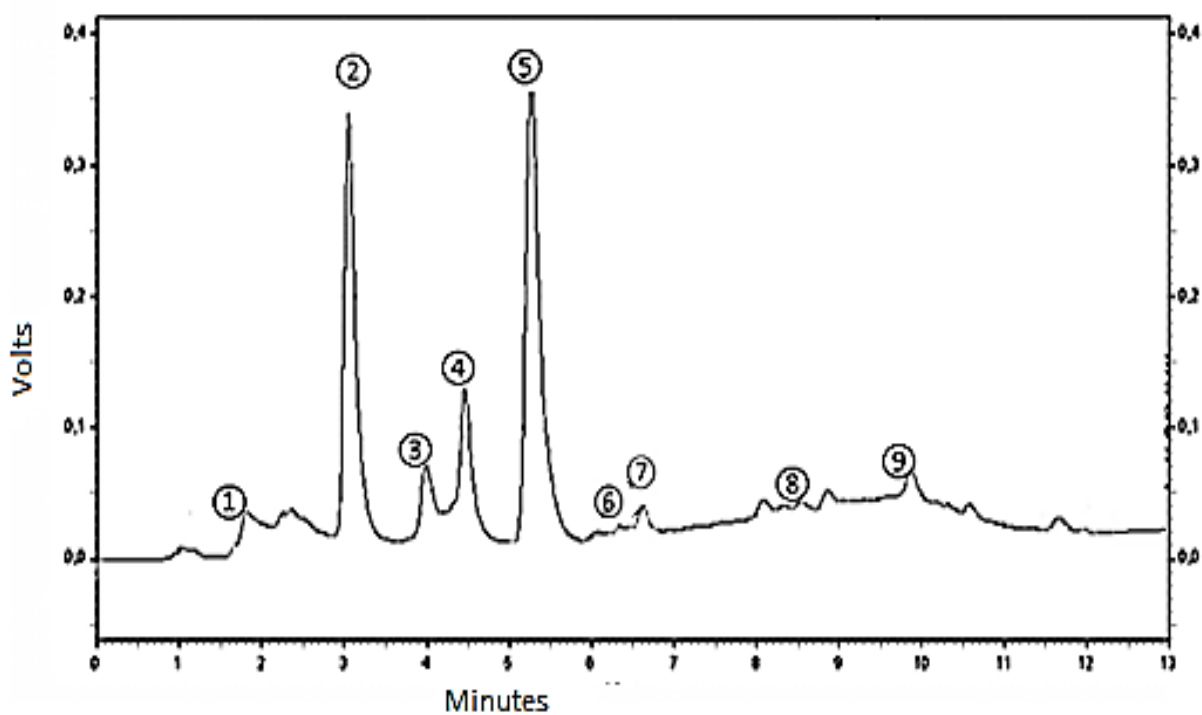


Figure IV. 21: Chromatogrammes HPLC de: A) café vert, B) café moulu non empaqueté, C) café moulu empaqueté. ①acide gallique, ②Inconnu, ③Catéchine, ④acide chlorogénique, ⑤Caféine, ⑥acide caféique, ⑦acide cinnamique, ⑧acide férulique, ⑨acide méthoxy-cinnamique.

Les concentrations des acides phénoliques; chlorogénique, caféique, p-coumarique, férulique, cinnamique, méthoxy-cinnamique, sinapique et gallique ainsi que la quercétine, la rutine, la catéchine, et la caféine ont été déterminées par HPLC/UV-visible pour les différentes variétés de café torréfié et non torréfié. La séparation des composés a été réalisée en 13 minutes.

Nous devons souligner que les acides p-coumarique et sinapique ainsi que la rutine et la quercétine n'ont pas été détectés dans les échantillons étudiés ; (café vert, torréfié moulu conditionné ou non). Les échantillons de café torréfié présentent un profil phytochimique similaire à celui du café vert, mais avec des concentrations relativement basses.

Les concentrations en mg/l et en mg/100 g (PS) des composés analysés sont résumés dans les tableaux **(IV.12a, IV.13a)** et **(IV.12b, IV.13b)** respectivement.

Tableau IV.12 : Concentrations des acides phénoliques en $mg L^{-1}$ (a) et en $mg/100 g$ (PS) (b), dans les échantillons de café vert et torréfié, en utilisant la méthode analytique proposée, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD.

Echantillons	variétés	Acide gallique	Acide chlorogénique	Acide Cafeique	Acide cinnamique	Acide férulique	methoxy-cinnamique
a)							
café vert							
A		9,50 \pm 0,02	140,75 \pm 2,70	17,97 \pm 1,32	3,01 \pm 0,01	10,60 \pm 1,15	16,75 \pm 1,20
B	Robusta	7,40 \pm 0,01	91,00 \pm 0,28	8,45 \pm 0,65	1,19 \pm 0,01	3,07 \pm 0,01	9,95 \pm 0,30
Café moulu torréfié non empaqueté							
C	Robusta	5,30 \pm 0,01	75,86 \pm 1,23	8,35 \pm 1,33	1,96 \pm 0,01	5,37 \pm 0,01	7,00 \pm 1,06
D	Arabica	3,80 \pm 0,06	59,45 \pm 2,03	4,07 \pm 0,94	1,36 \pm 0,05	2,95 \pm 0,01	5,50 \pm 1,32
E	Robusta	nd	05,05 \pm 0,45	nd	nd	nd	nd
Café moulu torréfié empaqueté							
F	Robusta	4,89 \pm 0,01	65,69 \pm 0,46	3,94 \pm 0,71	1,90 \pm 0,01	5,29 \pm 0,03	6,50 \pm 0,57
G	Mélange	4,07 \pm 0,03	63,64 \pm 1,07	4,81 \pm 0,13	1,76 \pm 0,02	3,87 \pm 0,01	5,46 \pm 1,15
H	Robusta	5,04 \pm 0,01	76,00 \pm 0,22	3,01 \pm 0,04	2,53 \pm 0,14	5,09 \pm 0,01	7,01 \pm 0,14
I	Robusta	4,91 \pm 0,08	70,76 \pm 1,19	3,55 \pm 0,98	2,01 \pm 0,10	5,20 \pm 0,07	6,87 \pm 0,21
J	Mélange	4,28 \pm 0,03	62,64 \pm 0,98	4,00 \pm 0,34	1,19 \pm 0,01	3,90 \pm 0,01	5,75 \pm 0,05
K	Robusta	4,55 \pm 0,06	68,20 \pm 1,76	3,60 \pm 0,85	1,99 \pm 0,05	5,25 \pm 0,01	6,38 \pm 0,10
L	Robusta	4,50 \pm 0,04	67,45 \pm 0,79	3,80 \pm 0,01	1,54 \pm 0,04	6,03 \pm 0,01	7,15 \pm 0,22
Café soluble							
M	Mélange	6,73 \pm 0,01	75,32 \pm 0,07	4,90 \pm 0,03	2,44 \pm 0,06	3,85 \pm 0,01	6,00 \pm 0,05
N	Mélange	3,89 \pm 0,04	60,00 \pm 1,54	4,20 \pm 0,06	1,50 \pm 0,01	3,90 \pm 0,05	5,45 \pm 0,35
O	Mélange	4,00 \pm 0,08	60,12 \pm 1,49	3,94 \pm 0,01	1,15 \pm 0,01	4,50 \pm 0,01	5,03 \pm 0,04
Café décaféiné							
P	Mélange	3,75 \pm 0,05	65,00 \pm 1,91	3,95 \pm 0,05	2,50 \pm 0,01	4,90 \pm 0,01	5,44 \pm 0,51
b)							
Café vert							
A	Robusta	190,0 \pm 0,4	2815,0 \pm 54,0	359,4 \pm 26,4	60,2 \pm 0,2	212,0 \pm 23,0	335,0 \pm 24,0
B		148,0 \pm 0,2	1820,0 \pm 5,6	169,0 \pm 13,0	23,8 \pm 0,2	61,4 \pm 0,2	199,0 \pm 6,0
Café moulu torréfié non empaqueté							
C	Robusta	106,0 \pm 0,2	1517,2 \pm 24,6	167,0 \pm 26,6	39,2 \pm 0,2	107,4 \pm 0,2	140,0 \pm 21,2
D	Arabica	76,0 \pm 1,2	1189,0 \pm 40,6	81,4 \pm 18,8	27,2 \pm 1,0	59,0 \pm 0,2	110,0 \pm 26,4
E	Robusta	nd	101,0 \pm 9,0	nd	nd	nd	nd
Café moulu torréfié empaqueté							
F	Robusta	97,8 \pm 0,2	1313,8 \pm 9,2	78,8 \pm 14,0	38,0 \pm 0,2	105,8 \pm 0,6	130,0 \pm 11,4
G	Blend	81,4 \pm 0,6	1272,8 \pm 21,4	96,2 \pm 2,6	35,2 \pm 0,4	77,4 \pm 0,2	109,2 \pm 23,0
H	Robusta	100,8 \pm 0,2	1520,0 \pm 4,4	60,2 \pm 0,8	50,6 \pm 2,8	101,8 \pm 0,2	140,2 \pm 2,8
I	Robusta	98,2 \pm 1,6	1415,2 \pm 23,8	71,0 \pm 19,6	40,2 \pm 2,0	104,0 \pm 1,4	137,4 \pm 4,2
J	Blend	85,6 \pm 0,6	1252,8 \pm 19,6	80,0 \pm 6,8	23,8 \pm 0,2	78,0 \pm 0,2	115,0 \pm 1,0
K	Robusta	91,0 \pm 1,2	1364,0 \pm 35,2	72,0 \pm 1,7	39,8 \pm 1,0	105,0 \pm 0,2	127,6 \pm 2,0
L	Robusta	90,0 \pm 0,8	1349,0 \pm 15,8	76,0 \pm 0,2	30,8 \pm 0,8	120,6 \pm 0,2	143,0 \pm 4,4
Café soluble							
M	Blend	134,6 \pm 0,2	1500,0 \pm 1,4	98,0 \pm 0,6	48,8 \pm 1,2	77,0 \pm 0,2	120,0 \pm 1,0
N	Blend	77,8 \pm 0,8	1200,0 \pm 30,8	84,0 \pm 1,2	30,0 \pm 0,2	78,0 \pm 1,0	109,0 \pm 7,0
O	Blend	80,0 \pm 1,6	1202,4 \pm 29,8	78,8 \pm 0,2	23,0 \pm 0,2	90,0 \pm 0,2	100,6 \pm 0,8
Café décaféiné							
P	Blend	75,0 \pm 1,0	1300,0 \pm 38,2	79,0 \pm 1,0	50,0 \pm 0,2	98,0 \pm 0,2	108,8 \pm 10,2

nd : non détecté.

Tableau IV. 13: Concentrations de caféine, catéchine, polyphénols totaux (PT) en mg L⁻¹(a) et en mg /100g (PS) (b) dans le café vert et torréfié, en utilisant la méthode proposée, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne± RSD.

Echantillons	variétés	Caféine	Catéchine	Polyphénols totaux	Rendement de l'extraction (%)
(a)					
Café vert					
A	Robusta	136,00±6,45	1,50±0,07	200,08±6,47	66
B		95,02±1,36	0,99±0,04	122,05±1,30	49
Café torréfié non emballé					
C	Robusta	85,00±1,05	5,20±0,13	109,04±3,78	67
D	Arabica	49,81±0,40	2,75±0,25	79,88±4,66	67
E	Robusta	38,00±1,89	7,32±0,10	12,37±0,55	55
Café torréfié emballé					
F	Robusta	76,00±4,01	4,55±0,02	92,76±1,81	55
G	mélange	69,53±2,29	3,05±0,08	86,66±2,49	50
H	Robusta	72,00±5,73	4,97±0,01	103,65±0,57	50
I	Robusta	74,50±5,08	5,66±0,01	98,96±2,64	50
J	mélange	81,20±4,52	3,34±0,06	85,10±1,48	59
K	Robusta	63,46±3,47	4,73±0,05	94,70±2,88	50
L	Robusta	60,00±1,87	5,10±0,05	95,57±1,16	49
Café soluble					
M	mélange	70,20±4,40	4,00±0,01	103,24±0,24	65
N	mélange	77,50±0,78	2,89±0,03	81,83±2,08	73
O	mélange	69,70±1,61	3,47±0,01	82,21±1,65	63
Café décaféiné					
P	Mélange	1,85± 0,20	3,35±0,02	88,89±2,56	71
(b)					
Café vert					
A	Robusta	2720,0±129,0	30,0±1,4	4001,6 ±129,4	
B		1900,4± 27,2	19,8±0,8	2441,0± 26,0	
Café torréfié non emballé					
C	Robusta	1700,0± 21,0	104,0±2,6	2180,8± 75,6	
D	Arabica	996,3± 8,0	55,0±5,0	1597,6± 93,2	
E	Robusta	760,0± 37,8	146,4±2,0	247,4± 11,0	
Café torréfié emballé					
F	Robusta	1520,0± 80,2	91,0±0,4	1855,2± 36,2	
G	Mélange	1390,6± 45,8	61,0±1,6	1733,2± 49,8	
H	Robusta	1440,0±114,6	99,4±0,2	2073,0± 11,4	
I	Robusta	1490,0±101,6	113,2±0,2	1979,2± 52,8	
J	Mélange	1624,0± 90,4	66,8±1,2	1702,0± 29,6	
K	Robusta	1269,2± 69,4	94,6±1,0	1894,0± 57,6	
L	Robusta	1200,0± 37,4	102,0±1,0	1911,4± 23,2	
Café soluble					
M	Mélange	1404,0± 88,0	80,0±0,2	2064,8± 4,8	
N	Mélange	1550,0± 15,6	59,6±0,6	1636,6± 41,6	
O	Mélange	1394,0± 32,2	69,4±0,2	1644,2± 33,0	
Café décaféiné					
P	Mélange	37,0± 4,0	67,0±0,4	1777,8± 51,2	

IV.2.3. Les teneurs en caféine dans les échantillons de café

La quantité de caféine varie considérablement dans les échantillons étudiés. C'est le composé prédominant dans tous les échantillons, à l'exception du café décaféiné où sa concentration est la plus faible (**Belay et al. (2008) ; Candeias et al. (2009)**).

Les résultats des différentes concentrations de la caféine sont présentés sur la figure (IV.22).

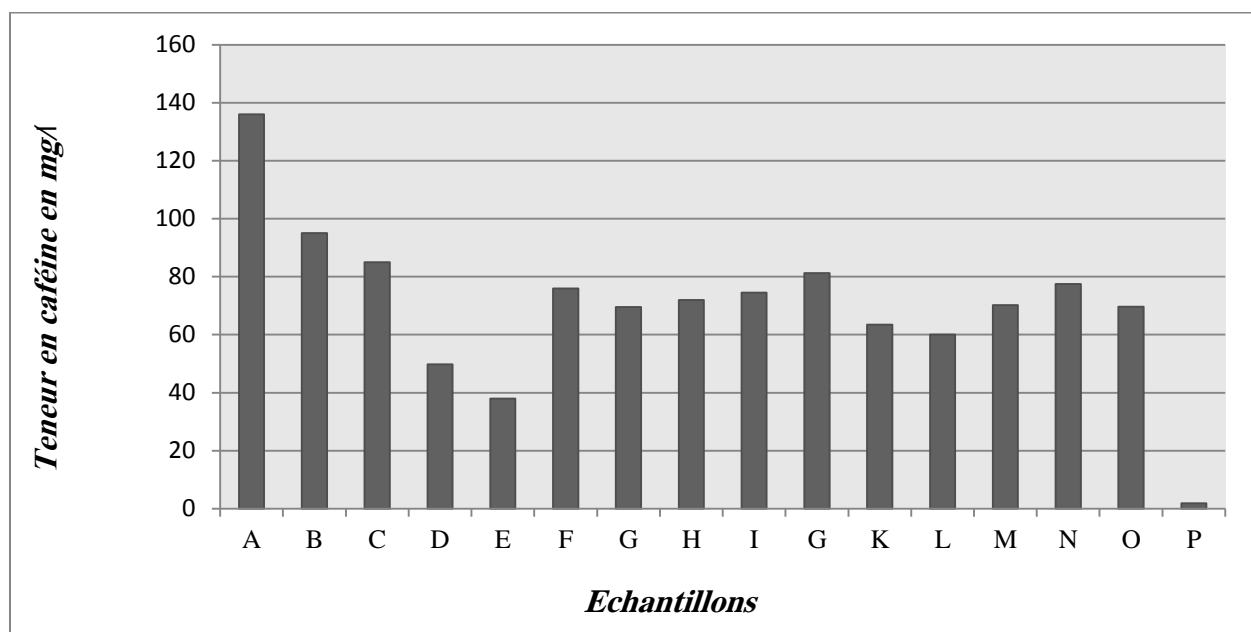


Figure IV. 22: Teneurs en caféine dans les échantillons de café.

Il a également été remarqué que la teneur en caféine dans les échantillons de la variété Arabica est inférieure à celle des échantillons de Robusta; ce résultat est en complète concordance avec la littérature (**Huck et al. (2005) ; Fujioka & Shibamoto (2008)**).

En outre, les taux de caféine dans les échantillons de café emballé étaient proches de ceux du café non emballé.

En revanche, les teneurs en caféine des échantillons de café soluble, allant de $69,70 \pm 1,61$ mg/l à $77,50 \pm 0,78$ mg/l, sont proches de ceux du café insolubles, parce que le café instantané est obtenu par un procédé de lyophilisation n'ayant pas d'influence sur la

composition du café (**Burmester & Eggers, (2010) ; Ratti, (2001)**) par contre la quantité de caféine dans l'échantillon de café décaféiné est de $1,85 \pm 0,20$ mg/l.

IV.2.4. Les teneurs en polyphénols dans les différents échantillons de café

Il est intéressant de noter que les phénols conjugués sont habituellement les espèces prédominantes de polyphénols dans le café (comme le 3-caféylquinique, l'acide 1-feruloylquinique, l'acide 3-p-coumaroylquinique). Toutefois l'irradiation par les ultrasons peut accélérer l'hydrolyse des composés conjugués sous certaines conditions. C'est la raison pour laquelle les acides phénoliques libres sont présents en quantités considérables dans le café.

Dans notre étude, la procédure d'extraction multiple (50%, 75% et enfin 100% de MeOH) en utilisant des ultrasons à 60°C a permis la récupération maximale de métabolites de café, ceux-ci est en accord avec les résultats rapportés par **Zuo et al. (2002); Jiao & Zue, (2009)** qui ont utilisé l'extraction multiple avec du méthanol et de l'éthanol respectivement, et ont réussi à extraire le maximum de métabolites.

Dans cette étude, les teneurs en acide chlorogénique varient de $5,00 \pm 0,45$ à $140,75 \pm 2,70$ mg/l avec les valeurs les plus élevées établies pour les échantillons de café vert (**Figure IV.23**).

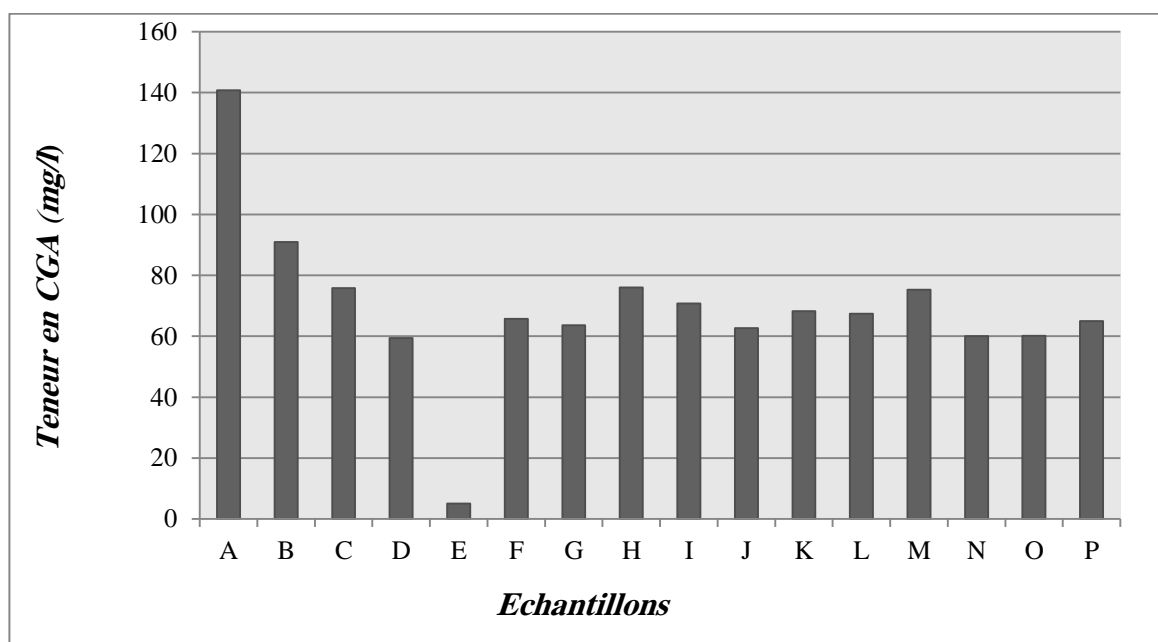


Figure IV. 23 : Teneurs en ACG dans les échantillons de café.

La concentration de l'acide chlorogénique dans le café torréfié non emballé Arabica est de $59,45 \pm 2,03$ mg/l, elle est inférieure à celle constatée pour la variété Robusta ($75,86 \pm 1,23$ mg /l). Ce résultat est en accord avec la littérature (**Duarte et al. (2010) ; Trugo et al. (1991)**). Dans les échantillons de café instantané, les teneurs en acide chlorogénique varient de $60,00 \pm 1,54$ à $75,32 \pm 0,07$ mg/l. En comparant ces valeurs à celles déclarées par **Rostagno et al. (2011)** pour le thé vert (7,0 mg/l), blanc (2,4 mg/l) et noir (1,2 mg/l), elles sont nettement supérieures.

Les teneurs en acide caféique varient de $3,01 \pm 0,04$ à $17,97 \pm 1,32$ mg/l, avec la plus grande valeur trouvée pour l'échantillon de café vert.

Pour le café non emballé Arabica, la concentration en acide caféique est de $4,07 \pm 0,94$ mg/l, elle est inférieure à celle trouvée pour le Robusta ($8,35 \pm 1,33$ mg/l).

Les concentrations des acides gallique et férulique varient de $3,75 \pm 0,05$ à $9,50 \pm 0,02$ mg/l et de $2,95 \pm 0,01$ mg / l à $10,60 \pm 1,15$ mg l, respectivement. En comparant ces résultats avec ceux trouvés dans les thés, les valeurs de l'acide gallique sont plus proches de celles trouvées par **Rostagno et al. (2011)**, pour les thés verts, blancs et noirs, mais demeurent très faibles par rapport à celles rapportées par **Zuo et al. (2002)**, pour le thé du marché chinois.

Les acides cinnamique et méthoxy-cinnamique sont parmi les principaux polyphénols du café (**Fukushima et al. (2009) ; Wang & Ho, (2009) ; Yusaku & Kuniyo (2011)**), leurs concentrations varient de $1,15 \pm 0,01$ à $3,01 \pm 0,01$ mg/l et de $5,03 \pm 0,04$ à $16,75 \pm 1,20$ mg/l, respectivement, avec la plus grande valeur trouvée dans l'échantillon de café vert.

Parmi les flavonoïdes analysés dans cette étude, seule la catéchine a été détectée, sa concentration varie de $0,99 \pm 0,04$ à $7,32 \pm 0,10$ mg/l avec les valeurs les plus basses trouvées dans les échantillons de café non torréfié. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par **Hecimovic 'et al. (2011)**. Ces valeurs sont considérées comme très faibles par rapport aux quantités trouvées dans le thé vendu dans le marché chinois (**Zuo et al. (2002)**).

Enfin, les polyphénols totaux (**Figure IV.24**) ont été déterminés par la somme des concentrations de chaque polyphénol qui varie de $12,37 \pm 0,55$ mg/l (échantillon fortement torréfié) à $200,08 \pm 6,47$ mg/l dans le café vert.

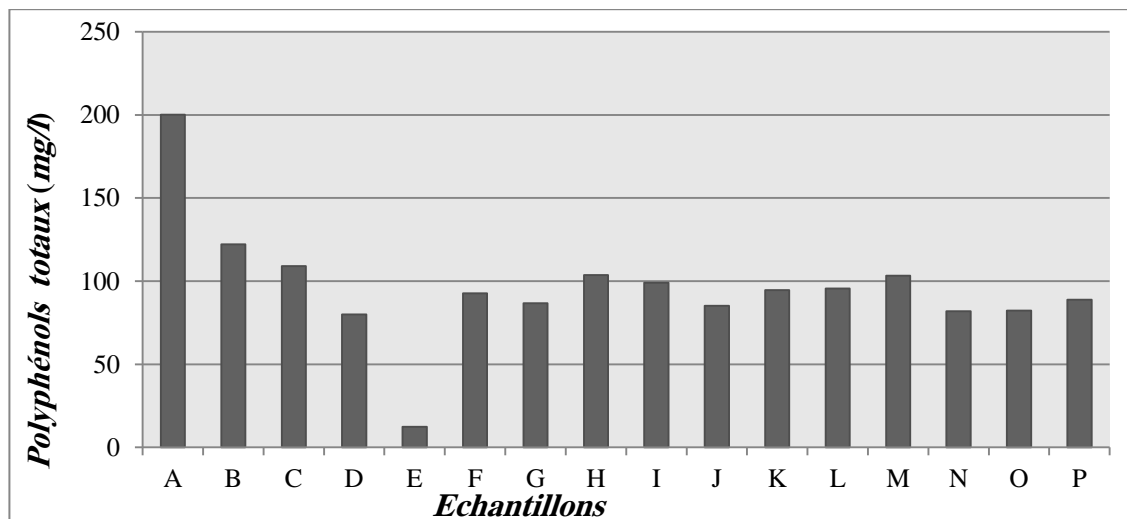


Figure IV. 24: Les polyphénols totaux dans les échantillons de café.

IV.2.5. Effet de la taille des particules de café sur la concentration des composés analysés

L'effet de la taille des particules a été étudié pour les échantillons de café vert. Dans cette étude, les particules de café vert moulu ont été séparées à l'aide de deux tamis annulaires avec des tailles de mailles de 0,75 et 0,25 mesh.

Les concentrations des composés (mg/l) en fonction de la taille des particules (fines et grosses) dans les échantillons de café vert moulu sont récapitulées dans le tableau (IV.14) et représentées par la figure (IV.25).

Tableau IV. 14: La teneur en caféine et en acides phénoliques (mg/l) dans les échantillons de café moulu fins (CVF) et gros (CVG), les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD.

Composé	CVF	CVG
Caféine	310,00 \pm 6,45	270,00 \pm 1,36
Acide chlorogénique	210,75 \pm 2,70	150,00 \pm 0,28
Acide caffeique	27,97 \pm 1,32	13,45 \pm 2,65
Acide gallique	9,50 \pm 0,02	7,40 \pm 0,01
Acide férulique	10,60 \pm 1,15	3,07 \pm 0,01
Acide cinnamique	3,01 \pm 0,01	1,19 \pm 0,01
Acide méthoxy-cinnamique	16,75 \pm 1,20	9,95 \pm 0,30

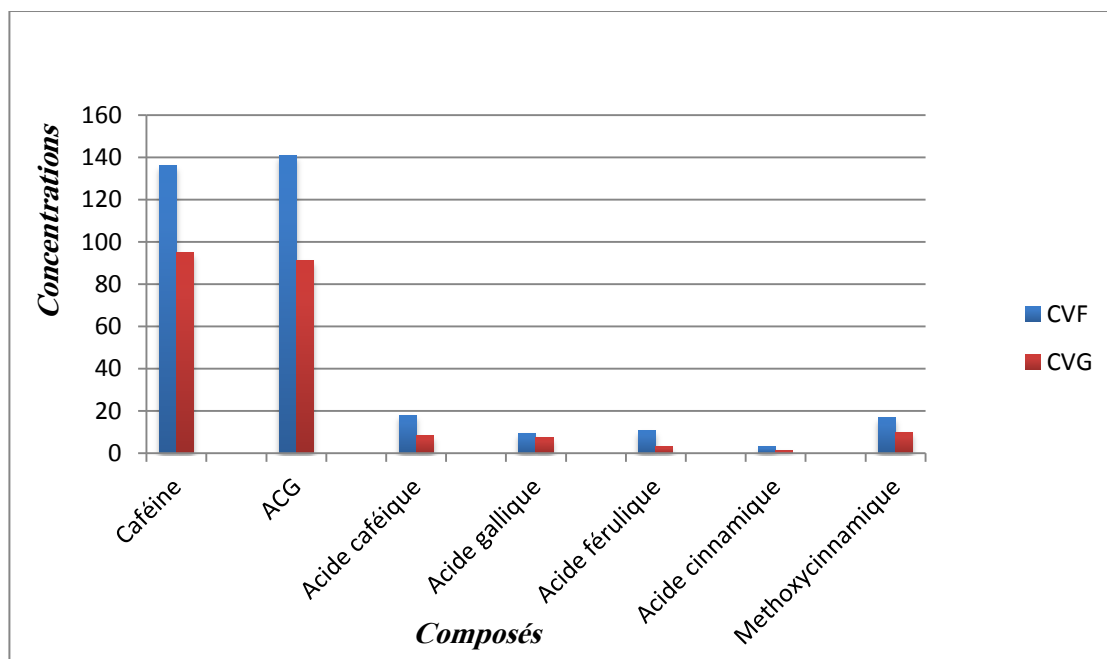


Figure IV. 25: La teneur en caféine et en acides phénoliques (mg/l) dans les échantillons de café moulu (CVF) et (CVG).

Les concentrations de tous les composés analysés sont plus élevées dans les échantillons ayant une mouture de taille fine que ceux de grosse taille, parce que plus les particules sont fines, plus l'extraction de métabolites secondaires est meilleure (**Sarker et al. (2005)**). Par conséquent, les concentrations les plus élevées de caféine ($136,00 \pm 6,45$ mg/l), des acides phénoliques; chlorogénique ($140,75 \pm 2,70$ mg/l), caféique ($17,97 \pm 1,32$ mg/l) et gallique ($9,50 \pm 0,02$ mg/l) ont été détectées dans l'échantillon de café finement moulu.

IV.2.6. Effet du degré de torréfaction sur la concentration des composés étudiés

La concentration totale des composés phénoliques dans les échantillons de café vert est la plus élevée parmi les variétés étudiées. Il est connu que le processus de grillage, se produisant à des températures élevées, conduit à la modification des métabolites secondaires du café (**Hecimovic et al. (2011)** ; **Sarker et al. (2005)** ; **Nicoli et al. (1997)** ; **Casa et al. (2000)**). Par exemple, la teneur en caféine est plus faible dans les échantillons ayant subi une torréfaction poussée, par rapport à ceux non torréfiés ou à ceux ayant subi une torréfaction modérée (**Nicoli et al. (1997)**).

Les polyphénols sont connus comme des composés thermolabiles ; De nombreuses études ont démontré que le procédé de torréfaction conduit à la destruction de ces métabolites secondaires, en particulier l'acide chlorogénique, qui est un polyphénol majoritaire du café (**Casa et al. (2000)** ; **Clifford et al. (1987)** ; **Trugo et al. (1991)** ; **Del Castillo et al. (2002)**).

Dans cette étude, les teneurs en acide chlorogénique sont plus faibles dans les échantillons de café torréfié (empaqueté et non empaqueté) que ceux dans le café vert. En outre, il a été rapporté que la dégradation des acides phénoliques conjugués lors de la torréfaction (pendant 7 - 8 minutes à environ 170°C), provoque l'augmentation des autres acides phénoliques libres, tels que les acides caféique et férulique (**Farah & Donangelo, (2006)**). Dans cette étude, la diminution de la teneur de ces deux acides phénoliques, par rapport au café vert indique que la durée et / ou la température de torréfaction du café commercial ont dépassé les conditions (temps et température) susmentionnées.

Les concentrations de l'acide gallique dans les échantillons de café torréfié variant de $3,75 \pm 0,05$ à $6,73 \pm 0,01$ mg/l étaient inférieures à celles trouvées dans les échantillons de café vert.

L'acide gallique n'a pas été détecté dans les échantillons qui ont subi une torréfaction poussée.

Les concentrations de l'acide cinnamique varient de $1,19 \pm 0,01$ à $3,01 \pm 0,01$ mg/l dans les échantillons de café vert et de $1,15 \pm 0,01$ à $2,53 \pm 0,14$ mg/l dans les échantillons torréfiés.

Les résultats chromatographiques montrent que la catéchine est le seul métabolite dont les concentrations ont augmenté sous l'influence de la torréfaction. En effet, les teneurs de catéchine varient de $0,99 \pm 0,04$ à $1,50 \pm 0,07$ mg/l dans les échantillons de café non torréfiés et augmentent de $2,75 \pm 0,25$ à $7,32 \pm 0,1$ mg/l dans ceux torréfiés. Cela confirme l'hypothèse de temps prolongé et la température élevée de torréfaction à laquelle les échantillons étudiés ont été soumis, en plus **Hecimovic' et al. (2011)** ont signalé que pendant la torréfaction poussée ; de grandes quantités de flavonoïdes sont produites par suite de la réaction de Maillard.

IV.3. Analyse de caféine et de l'acide chlorogénique (5-QCA) par HPLC-DAD-MS

IV.3.1. Identification de 5-QCA et de la caféine par HPLC-DAD-MS

Les deux composés principaux identifiés dans les échantillons de café boisson analysés, (l'acide chlorogénique (pic (b)) et la caféine (pic (a)) (**Figure IV.27**), sont bien majoritaires dans toutes les variétés analysées.

L'identification a été faite par chromatographie couplée à un détecteur à barrette de diodes et à un spectromètre de masse HPLC-DAD-MS en mode positif.

La spectrométrie de masse a confirmé la présence de ces molécules dans les échantillons. En effet la présence des ions moléculaires à m/z $[M+H]^+$ 355 et 195 correspondent à l'acide chlorogénique et à la caféine, respectivement. Ces deux substances bioactives ont été décrites dans le café par d'autres auteurs (**Trugo & Macrae, (1984)** ; **Stegen & Duijn, (1980)**).

D'après **Fang et al. (2002)**, le mécanisme de fragmentation de l'acide chlorogénique lors d'une ionisation en mode positif, peut être expliqué par la figure (**IV.26**).

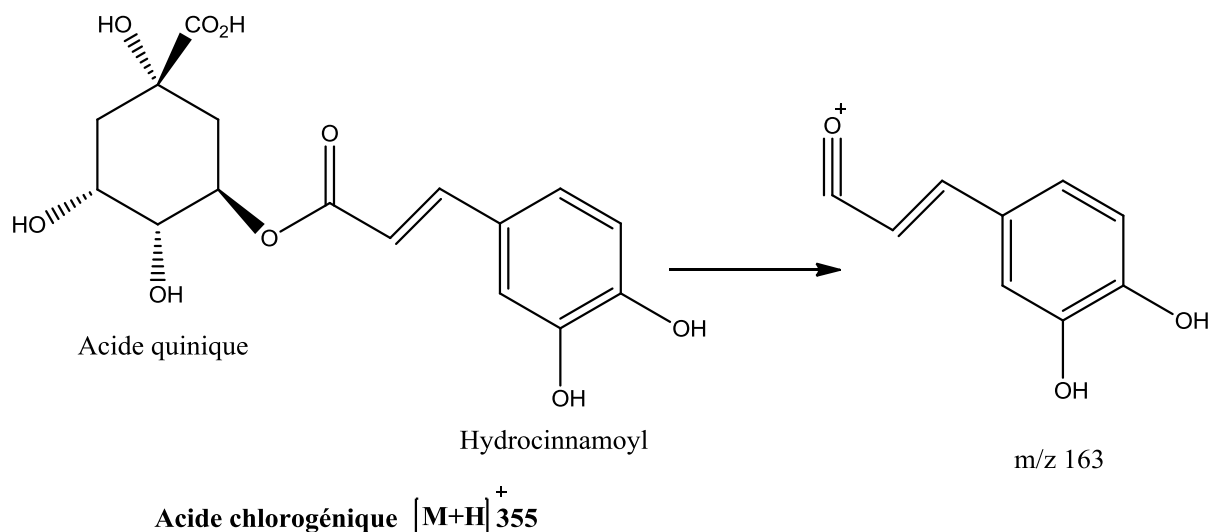


Figure IV.26 : Mécanisme de fragmentation de l'acide chlorogénique en mode positif (Fang et al. (2002)).

Le chromatogramme obtenu suite à l'analyse par HPLC-DAD-MS d'un extrait du café emballé ainsi que les spectres de masse des composants prédominants font l'objet de la figure (IV.27).

La présence de l'acide chlorogénique (5-CQA) est confirmée par le pic moléculaire à m/z 355 ainsi que par son fragment caractéristique de 163.

La caféine qui se détecte à 280 nm, a un temps de rétention de 7,9 min. Cet alcaloïde possède un pic moléculaire à m/z 195.

Le tableau (IV.15) récapitule les fragments obtenus par le détecteur MS en mode positif dans le cadre d'une analyse d'un extrait de café boisson (café emballé 80% Robusta).

Tableau IV. 15 : Substances, temps de rétention(T_R), masses molaires et pics recherchés en MS en mode positif.

Pic	substance	T_R	Masse molaire [g/mol]	MS $[M+1]^+$	Fragments issus de $[M+1]^+$
1	Caféine	7,9	194	195	-
2	5-CQA	6,5	354	355	163

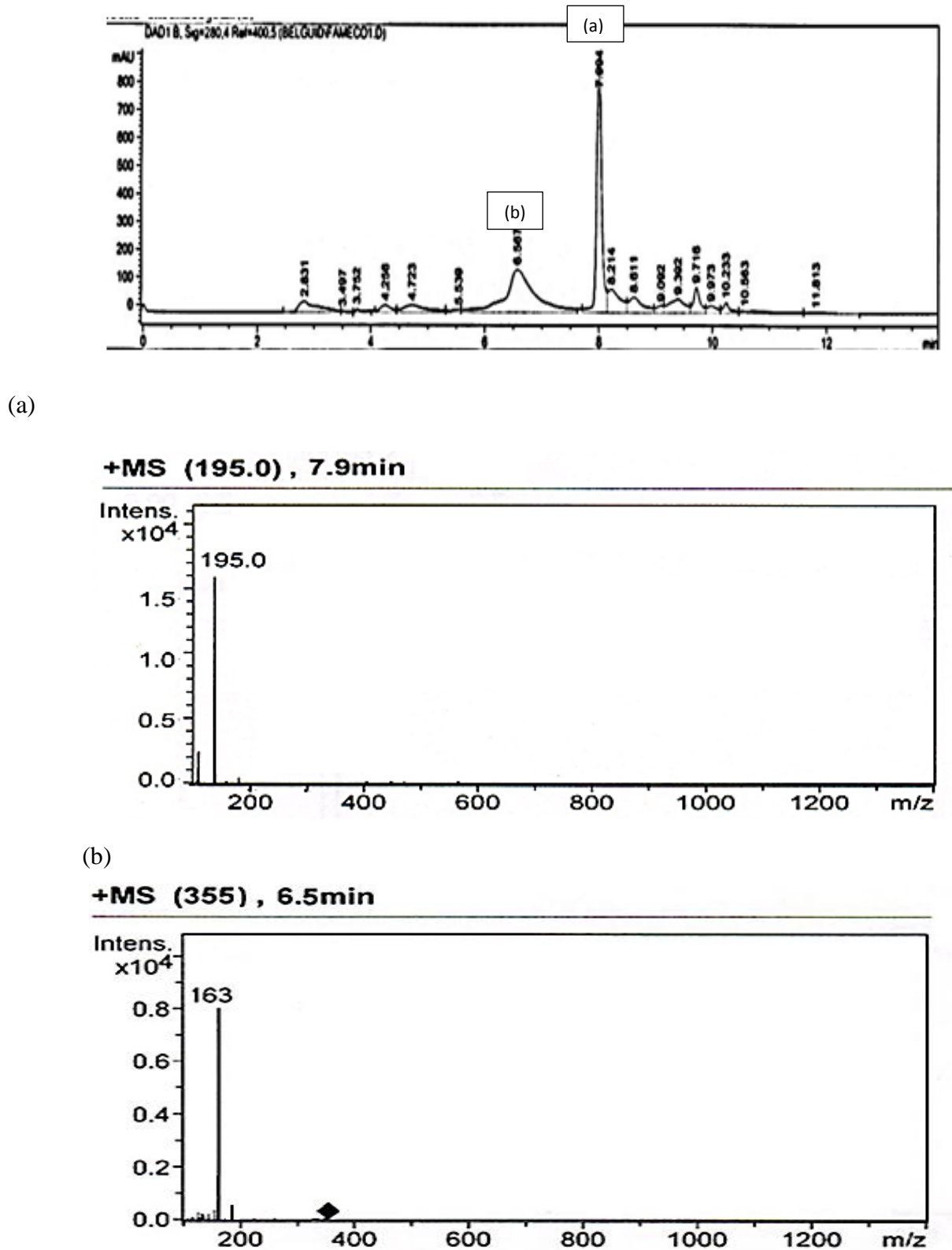


Figure IV. 27: Chromatogramme d'un échantillon de café et spectres de masse en mode positif obtenus par HPLC- MS:(a) pic de la caféine et (b) pic de l'acide chlorogénique

(5-QCA).

IV.3.2. Quantification des deux principes actifs du café (5-QCA et caféine) par HPLC-DAD

Les teneurs en caféine et en acide chlorogénique ont été déterminées dans sept échantillons de café emballé et deux cafés non emballés, qui sont les mêmes étudiés auparavant dans l'analyse de la caféine et des polyphénols par HPLC-UV-visible.

Le dosage a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de photodiodes (HPLC-DAD).

La présence de ces composés a été confirmée par comparaison de leurs caractéristiques chromatographiques à celles des molécules standards pures.

Pour l'analyse quantitative des deux principes actifs étudiés, deux courbes étalons ont été obtenues par l'injection de différents volumes de 5-QCA et de caféine. Les courbes d'étalonnage ont été construites en représentant les aires des pics (Y) en fonction des volumes (X, μl injectés) et cela pour quatre volumes différents. La gamme des volumes injectés était de $5\mu\text{l}$ à $20\mu\text{l}$ pour les deux composés. Dans cet intervalle, les deux courbes d'étalonnage sont linéaires avec un coefficient de corrélation $R^2 > 0,99$. Le tableau suivant résume les équations ainsi que les coefficients de corrélation des composés analysés.

Tableau IV. 16 : Equations des droites d'étalonnage et coefficients de corrélation des deux composés analysés.

Composé	Equation de linéarité	Coefficient de corrélation
Caféine	$y = 156,1x + 72,005$	$R^2 = 0,9976$
Acide 5-caféylquinique	$y = 117,3x - 218,09$	$R^2 = 0,9998$

La quantification des taux de récupération de la méthode a été effectuée sur des échantillons préparés à partir du café moulu Robusta (non emballé) par la méthode traditionnelle (cafetière turque) et dopés quatre fois avec 1mg/l des deux standards. La moyenne des taux de récupérations (%) était de $84,3 \pm 0,21\%$ pour CGA et $87,5 \pm 0,55\%$ pour la caféine.

Les limites de détection (LOD, $S/N = 3$) et de quantification (LOQ, $S/N = 10$) ont été déterminées pour les deux molécules (S/N , signal/ Bruit). Leurs valeurs des LOD sont, pour la

caféine et l'acide chlorogénique de 4,50 $\mu\text{g/l}$ et de 9,34 $\mu\text{g/l}$, respectivement, et les LOQ sont de 5,50 $\mu\text{g/l}$ et de 17,09 $\mu\text{g/l}$, respectivement.

Comme il a déjà été mentionné, la détermination des teneurs en ces deux composés dans les extraits de café préparé par la cafetière turque ou la cafetière électrique de chaque échantillon a été effectuée en triplicata.

Les figures (IV.28) et (IV.29) représentent les chromatogrammes obtenus par HPLC-DAD de la caféine et de l'acide chlorogénique respectivement.

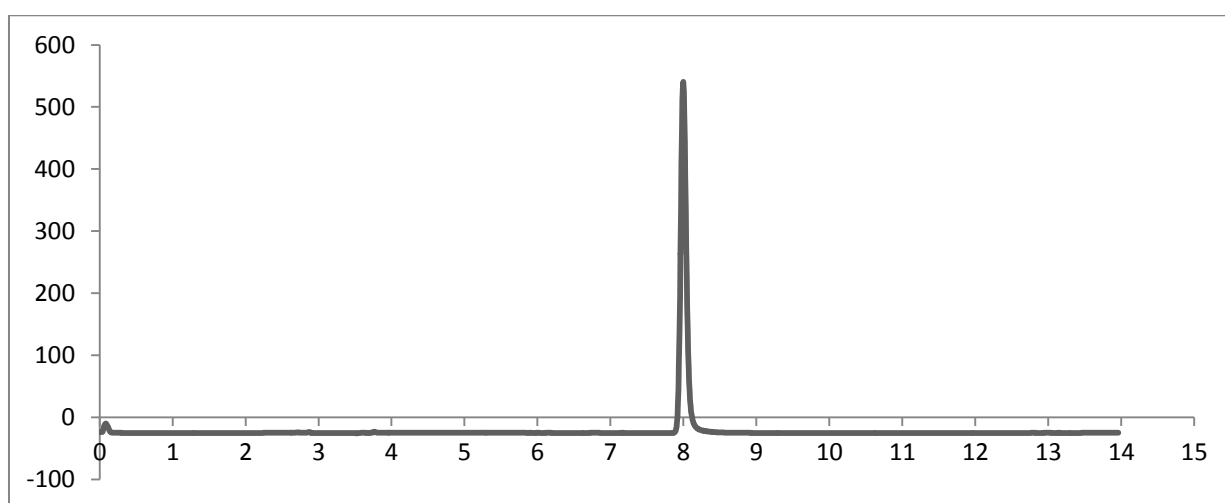


Figure IV. 28: Chromatogramme de la caféine ; $T_R=7,9$ min, $\lambda =280$ nm.

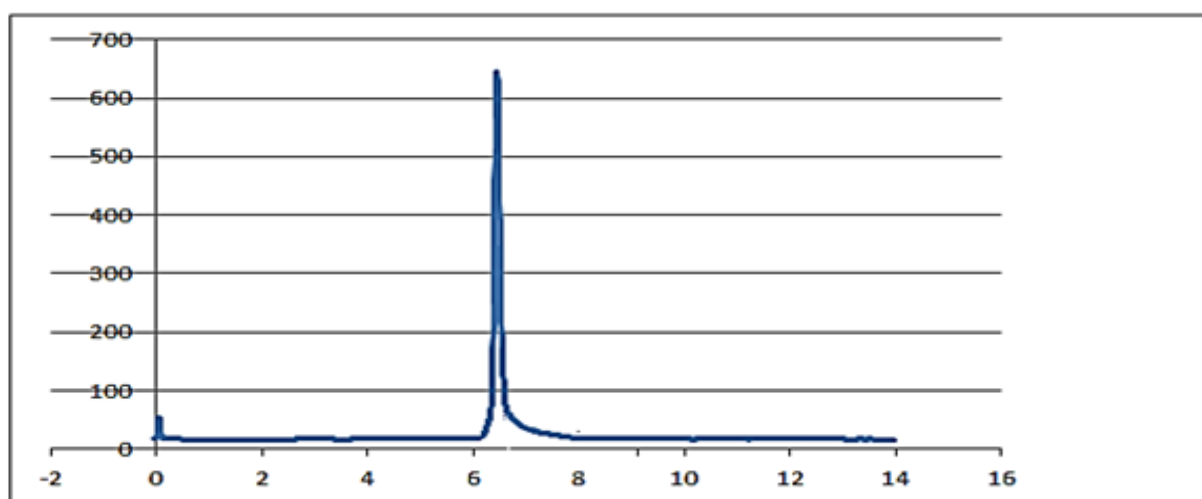


Figure IV. 29: Chromatogramme de l'acide chlorogénique ; $T_R=6,5$ min, $\lambda =310$ nm.

La figure (IV.30) montre le profil du chromatogramme obtenu par HPLC-DAD de l'extrait de café préparé par une cafetière électrique et la figure (IV.31) montre celui préparé par une cafetière turque de la même variété alors que les chromatogrammes des autres variétés seront présentés en annexe A2.

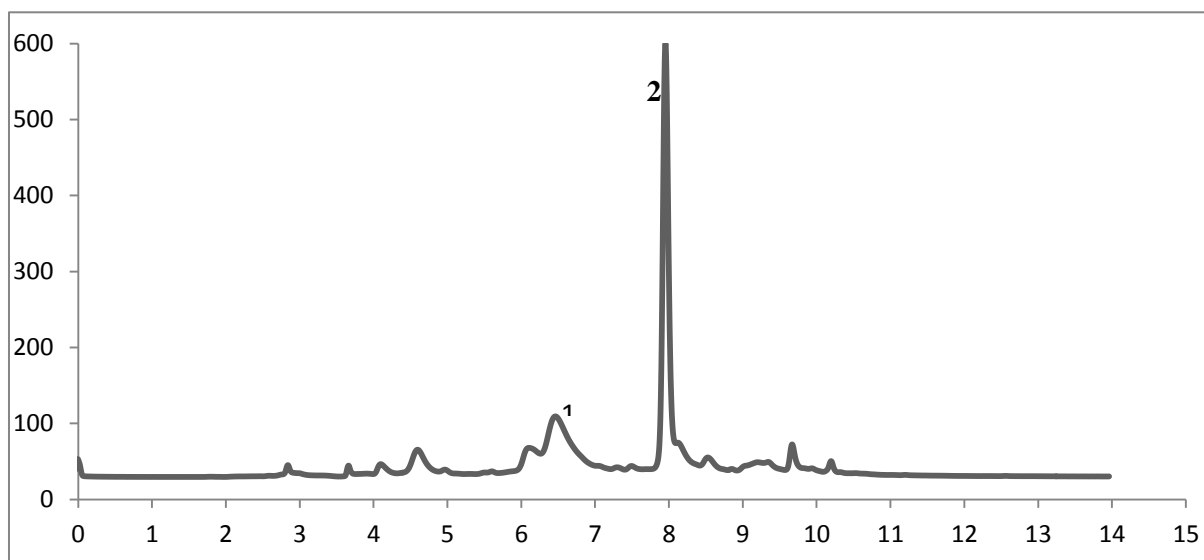


Figure IV. 30: Chromatogramme HPLC du café moulu Robusta (cafetière électrique); 1: 5-QCA, 2: caféine.

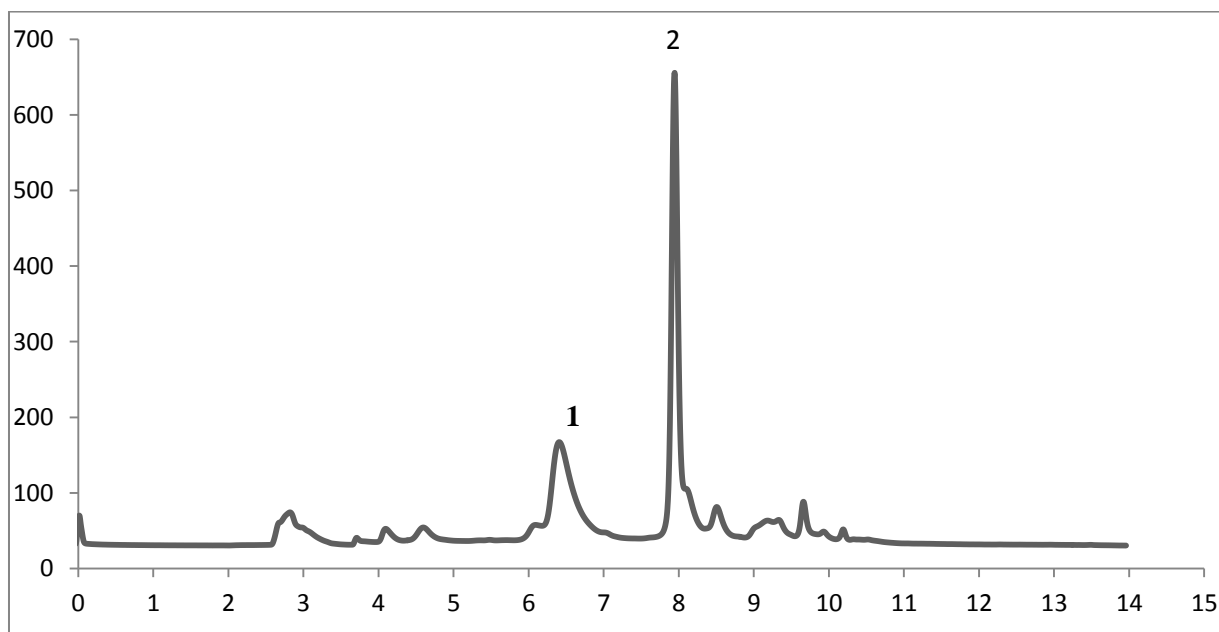


Figure IV. 31: Chromatogramme HPLC du café moulu Robusta (cafetière turque); 1: 5-QCA, 2: caféine.

IV.3.3. Concentrations en caféine et en acide chlorogénique (5-QCA) dans les échantillons de café étudiés

La teneur en ces deux principes actifs dans les échantillons de café étudiés est déterminée en mg/l, Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau IV. 17 : Teneur en mg/l en caféine et en acide chlorogénique (5-CQA) pour les différents échantillons de café boisson, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD.

Echantillon	variété	Teneur mg/l			
		Cafetière turque		Cafetière électrique	
		Caféine	5-CQA	Caféine	5-CQA
Moulu (NE)	Arabica	71,00 \pm 0,41	26,55 \pm 0,09	54,60 \pm 0,10	20,68 \pm 1,33
Moulu(NE)	Robusta	94,65 \pm 1,50	24,50 \pm 0,20	89,30 \pm 0,25	16,05 \pm 1,59
Empaqueté1	Robusta	54,90 \pm 0,07	21,97 \pm 0,70	46,44 \pm 0,54	13,98 \pm 1,44
Empaqueté2	Mélange	51,00 \pm 0,20	18,56 \pm 0,24	49,50 \pm 1,33	13,65 \pm 0,40
Empaqueté3	Robusta	66,33 \pm 0,04	22,78 \pm 1,04	52,33 \pm 1,55	12,55 \pm 0,07
Empaqueté4	Robusta	61,50 \pm 1,22	21,60 \pm 0,10	51,97 \pm 0,50	15,66 \pm 1,05
Empaqueté5	Mélange	63,33 \pm 2,03	23,00 \pm 2,36	58,45 \pm 0,10	18,40 \pm 2,37
Empaqueté6	Robusta	57,23 \pm 1,24	22,50 \pm 1,43	49,97 \pm 0,09	14,45 \pm 0,10
Empaqueté7	Robusta	65,57 \pm 3,10	25,66 \pm 0,66	54,45 \pm 0,66	16,56 \pm 0,50

Des différences significatives dans la teneur en caféine ont été trouvées entre les extraits qui ont été préparés par la cafetière turque et ceux qui ont été préparés par la cafetière électrique de la même variété. La figure (IV.32) montre les teneurs en caféine des différents échantillons de café.

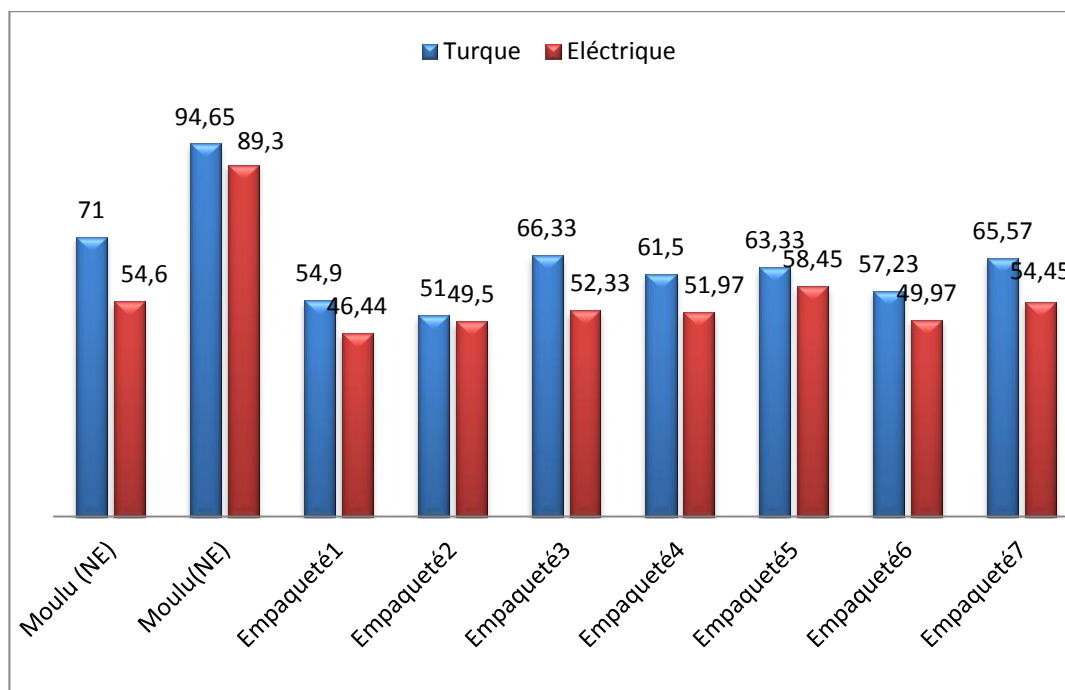


Figure IV. 32: Teneurs en caféine en (mg/l) dans le café préparé par la cafetière turque et électrique.

Dans les échantillons de café moulu non emballé (NE) préparés par la cafetière turque, la teneur en caféine est de $71,00 \pm 0,41$ mg/l dans l'Arabica, et de $94,65 \pm 1,50$ mg/l dans le Robusta. En revanche, dans les échantillons préparés par la cafetière électrique la teneur en cet alcaloïde est de $54,60 \pm 0,10$ mg/l dans l'Arabica et $89,30 \pm 0,25$ mg/l dans le Robusta.

La concentration de la caféine dans le café emballé allant de $51,00 \pm 0,20$ à $66,33 \pm 0,04$ mg/l pour les échantillons préparés par la cafetière turque et de $46,44 \pm 0,54$ à $58,45 \pm 0,10$ mg/l dans les échantillons préparés par la cafetière électrique.

Il est intéressant de noter que les concentrations en caféine de toutes les marques de café emballé sont proches les unes aux autres, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées dans le café non emballé. Il apparaît que cette différence est due à la taille des particules. Plus les particules sont fines plus la surface spécifique est grande, par conséquent, l'extraction du café emballé ayant une grosse mouture est moins efficace que celle du café non emballé possédant une mouture fine.

La figure (IV.33) montre les teneurs en acide chlorogénique (5-QCA) des différents échantillons de café.

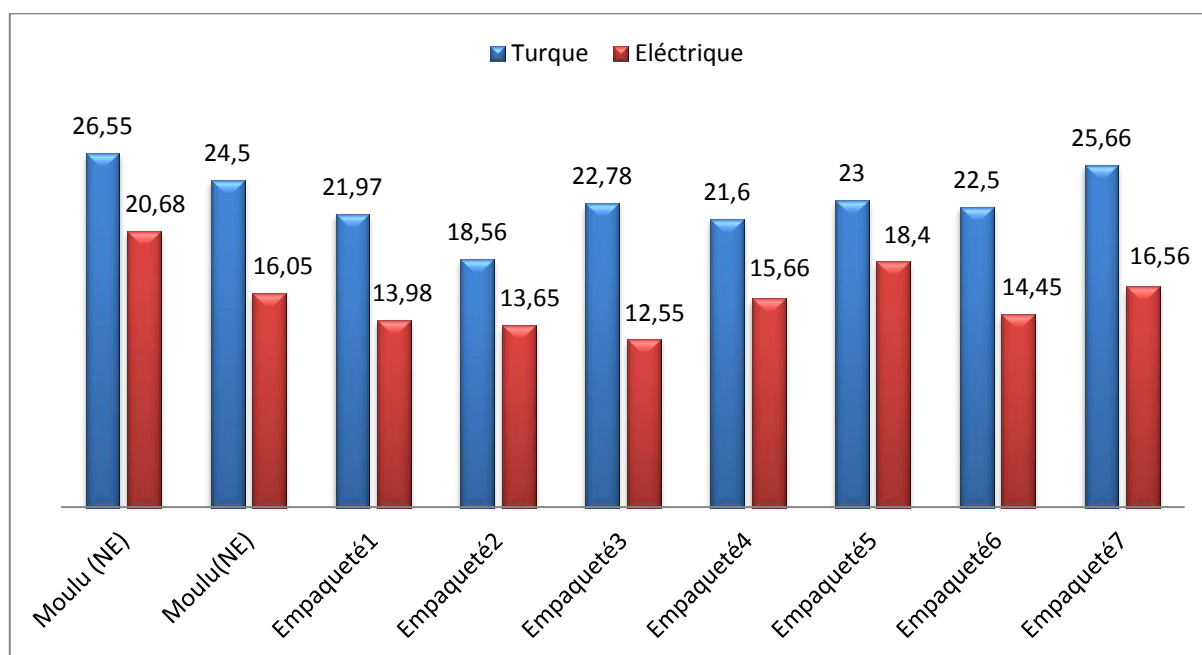


Figure IV.33: Teneurs en acide chlorogénique en (mg/l) dans le café préparé par la cafetière turque et électrique.

En ce qui concerne les échantillons préparés par la cafetière turque ; La teneur en acide chlorogénique dans le café moulu non empaqueté est de $26,55 \pm 0,09$ mg/l dans l'Arabica et de $24,50 \pm 0,20$ mg/l dans le Robusta, alors que dans les échantillons obtenus par la cafetière électrique, la concentration de l'acide chlorogénique dans le café non empaqueté est de $20,68 \pm 1,33$ mg/l dans l'Arabica et de $16,05 \pm 1,59$ mg/l dans le Robusta. En revanche pour le café empaqueté, la teneur en acide chlorogénique varie de $18,56 \pm 0,24$ à $25,66 \pm 2,66$ mg/l dans les échantillons préparés par la cafetière traditionnelle et de $12,55 \pm 0,07$ à $18,40 \pm 2,37$ mg/l dans les extraits de la cafetière électrique.

Les teneurs en ces deux principes actifs dans les échantillons de la cafetière turque, ont toujours été supérieures à ceux obtenues par la cafetière électrique. Il apparaît que le mode de préparation a une influence sur l'extraction ; en effet, dans la cafetière électrique, l'eau monte en passant par la poudre qui se trouve dans le filtre, tandis que dans la cafetière turque, en plus à l'agitation modérée, le temps et la surface de contact entre la poudre et l'eau sont supérieurs à ceux de la cafetière électrique. On outre les teneurs de ces deux composés dans le Robusta sont plus élevées que dans l'Arabica, ce qui réaffirme les résultats de la littérature (Trugo & Macrae, (1984) ; Fujioka & Shibamoto, (2008) ; Ky *et al.* (2001)).

En comparant ces résultats avec ceux trouvés dans le café qui a subi l'extraction multiple par le méthanol et analysé par la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-visible, il apparaît que les teneurs en caféine et en acide chlorogénique ont été plus élevées dans la première méthode que dans la deuxième ; ce qui est expliqué par l'avantage de l'extraction multiple dans l'eau et le méthanol. En revanche l'utilisation de la centrifugation ainsi que l'ultrason pendant 20 min améliore l'extraction. (Romdhane & Gourdon, (2002) ; (Jiao & Zuo, (2009)).

IV.4. Dosage de quelques éléments minéraux du café

IV.4.1. Analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) du Zn, Cu, Fe, Cr

Le but de cette analyse est le dosage des éléments métalliques à savoir le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le fer (Fe) et le chrome (Cr). Les analyses ont été effectuées en triplicata.

Le tableau suivant représente les équations des droites d'étalonnage et les coefficients de corrélation obtenus à partir des courbes d'étalonnage, en utilisant trois concentrations différentes.

Tableau IV. 18 : Equations des droites d'étalonnage et coefficients de corrélation caractérisant le dosage par SAA.

Elément	Equation de linéarité	Coefficient de corrélation « R ² »
Zn	$y = 0,6496x + 0,0149$	0,9987
Cu	$y = 0,0017x - 0,0001$	0,9973
Fe	$y = 0,0185x + 0,0039$	0,9993
Cr	$y = 0,0176x + 0,0216$	0,9980

IV.4.2. Analyse par photométrie à émission atomique (PEA) de K et Na

Le but de cette analyse est le dosage de deux éléments alcalins le potassium (K) et le sodium (Na) dans le café.

Les équations de linéarité ainsi que les coefficients de corrélations sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau IV. 19: Equations des droites d'étalonnages et coefficients de corrélation caractérisant le dosage par PEA.

Elément	Equation de linéarité	Coefficient de corrélation
K	$y = 0,3196x + 0,1679$	0,9971
Na	$y = 0,1433x + 0,0186$	0,9962

La linéarité a été constatée pour chacun des minéraux avec un bon coefficient de régression $R^2 > 0,99$.

Les courbes d'étalonnage de différents éléments dosés seront présentées dans l'annexe A3.

IV.4.3. Concentrations des éléments métalliques dans les échantillons de café

Les résultats du dosage des éléments minéraux déterminés par spectrophotométrie d'absorption atomique et par photométrie à flamme sont mentionnés dans le tableau (IV-20).

Tableau IV. 20: Teneur de Zn, Fe, Cr, Cu, K et Na en (mg/100 g) dans les échantillons de café vert et torréfié, en utilisant le spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) et le photomètre d'émission atomique (PEA).

Echantillon	Variété	Zn	Fe	Cr	Cu	K	Na	Minéraux totaux
Café vert								
E1	Robusta	1,50	2,75	0,07	0,09	665,21	15,09	684,71
Café moulu non emballé								
E2	Robusta	1,33	2,93	0,03	0,18	730,54	20,56	755,57
E3	Arabica	0,50	2,38	0,02	0,10	609,00	15,67	627,67
Café moulu emballé								
E4	Robusta	0,40	1,17	0,02	0,10	470,00	15,98	487,67
E5	Mélange	0,25	1,09	0,01	0,07	550,56	13,67	565,65
E6	Robusta	0,30	0,98	0,02	0,08	420,97	08,98	431,33
E7	Robusta	1,00	1,24	0,02	0,06	510,03	02,65	515,00
E8	Mélange	0,55	1,65	0,02	0,03	430,15	07,88	440,28
E9	Robusta	1,50	2,81	0,02	0,05	530,00	09,11	543,49
E10	Robusta	0,07	1,44	0,02	0,08	422,00	15,32	438,93
Café soluble								
E11	Mélange	1,50	2,94	0,02	0,12	820,00	39,00	863,58
E12	Mélange	0,98	2,51	0,01	0,12	627,57	18,50	649,69
E13	Mélange	0,50	0,96	0,02	0,08	1050,0	21,09	1072,65
Café décaféiné								
E14	Mélange	0,55	3,29	0,01	0,09	640,93	13,50	658,37
moyenne		0,78	2,01	0,02	0,08	605,49	15,50	623,88

Les déviations standards relatives moyennes des teneurs en éléments, Zn, Fe, Cr, Cu, K et Na sont respectivement de 0,003 ; 0,007 ; 0,001 ; 0,001 ; 1,5 et 0,3 mg/100g.

Les concentrations moyennes des éléments dosés dans le café ainsi que les minéraux totaux sont représentées respectivement par les figures (IV.34) et (IV.35).

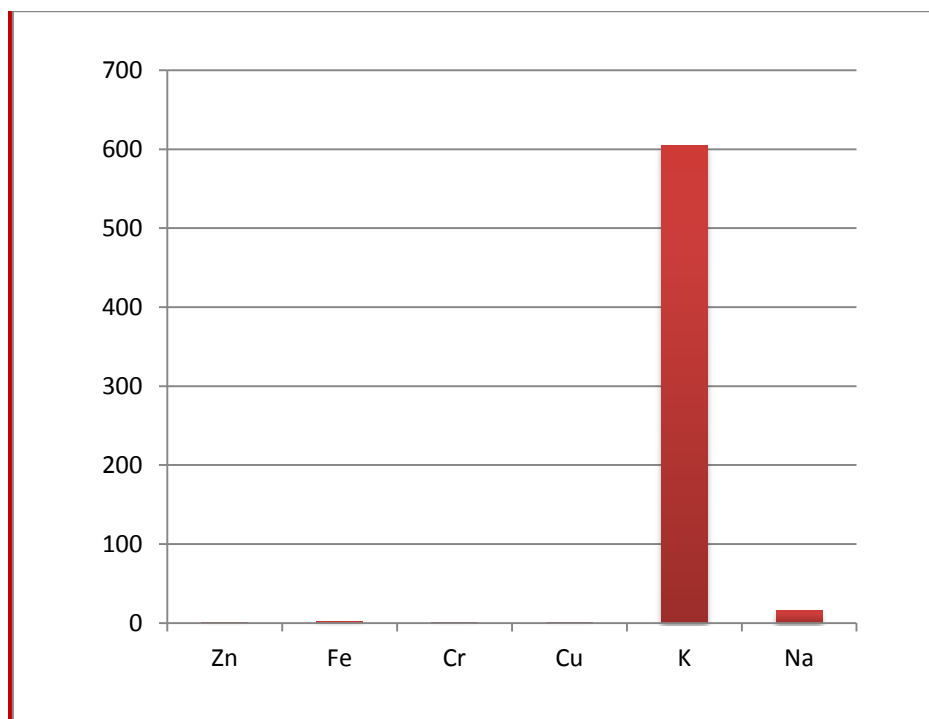


Figure IV. 34: Teneurs moyennes en Zn, Fe, Cr, Cu, K, Na dans les différents échantillons de café.

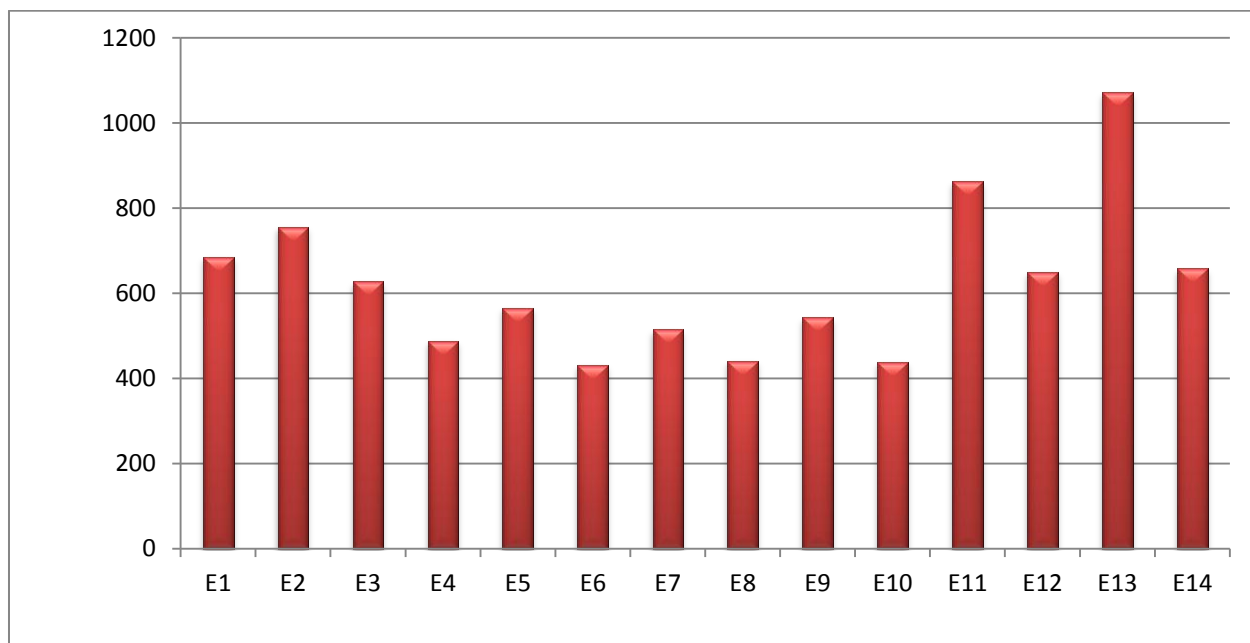


Figure IV.35: Minéraux totaux dans les échantillons de café étudiés.

Les minéraux jouent un rôle important dans l'alimentation humaine, ils sont essentiels à la croissance et à la formation des os, à la synthèse des vitamines, des enzymes et des hormones, ainsi qu'au bon fonctionnement du système nerveux, à la circulation sanguine et à l'intégrité cellulaire, s'ils sont maintenus à des niveaux exigés (**Oliveira et al. (2012)**).

L'objectif de cette analyse était la détermination de quelques éléments minéraux nutritifs ; (Fe, Zn, Cu, K, Na) ainsi que le Cr, dans le café vert, torréfié emballé et non emballé, soluble et décaféiné par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) et photométrie à flamme (PEA), afin de vérifier la composition et de là, la qualité du café vendu dans le marché algérien.

Les échantillons des différents types de café étudiés présentent des teneurs différentes en éléments analysés.

D'après les résultats obtenus, les échantillons de café emballés (E4, E5, E6, E7, E8, et E10) à l'exception de l'échantillon E9, ont des teneurs inférieures aux autres échantillons (E1, E2, E3, E11, E12, E13 et E14). Ceci, est peut-être dû d'une part, à la qualité du café ou à des additifs dans ce genre de café lors de la préparation industrielle qui ont influencé la teneur en ces éléments et d'autre part à la grosseur de la taille des particules qui diminue la surface de contact lors de l'extraction et empêche d'obtenir le maximum des métaux étudiés.

Les échantillons de café moulu torréfié (E2 et E3) présentent des différences entre eux en ce qui concerne leurs teneurs en éléments minéraux étudiés, cette différence est due à la variété de café, parce que le Robusta contient des concentrations un peu plus élevées que l'Arabica (**Malgorzata et al. (2007)**, **Oliveira et al. (2012)**, **Anderson & Smith (2002)** ; **Martin et al. (1999)**; **Souci et al. (2002)**).

Les concentrations en éléments étudiés dans les échantillons de café soluble E11, E12 et E13 sont légèrement plus élevées que celles des autres échantillons. Donc les cafés solubles fournissent des apports nutritionnels plus élevés de K, Na, Cu, Zn et Fe avec des valeurs moyennes allant de 0,11 mg/100g en Cu à 832,52 mg/100g en K. Ces valeurs sont conformes à celles de **Gillies & Birbeck, (1983)** et **Oliveira et al. (2012)**.

En ce qui concerne le café vert, les teneurs en éléments minéraux étudiés pour ce type de café sont proches de celles du café torréfié, ce qui veut dire que la torréfaction n'a pas

d'influence sur la teneur en ces éléments, c'est pareil pour le café décaféiné qui n'a pas été influencé par le procédé de décaféination.

Les résultats obtenus montrent que la teneur moyenne en fer (2,01 mg/l) est plus élevée que celle trouvée par **Santos & Oliveira, (2001)** ($0,051 \pm 0,001$ mg/100g), tandis que **Oliveira et al. (2012)** ont rapporté une concentration moyenne en fer de $5,12 \pm 2,93$ mg/100g dans le café instantané.

La teneur en cuivre (0,08 mg/100g) est inférieure à celle trouvée par **Santos & Oliveira, (2001)** ($0,233 \pm 0,023$ mg/100g) dans des études effectuées sur des échantillons de café soluble.

Le zinc, comme étant un minéral connu pour lutter contre les indigestions et les infections cutanées, se trouve dans le café soluble avec une valeur moyenne de 0,99 mg/100 g qui est supérieure à celles des autres types de café étudiés. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par **Malgorzata et al. (2007)** et **Santos & Oliveira, (2001)**.

La teneur en chrome dans les échantillons analysés varie de 0,01 à 0,07 mg/100 g (**Tableau IV.20**). Cet élément est connu pour ses effets nocifs (**Volaufova et al. (2006)**). Ses teneurs dans les différents types de café étudiés sont proches en notant que la valeur la plus élevée a été détectée dans le café vert (E1).

Les résultats de la présente étude sont globalement comparables aux données communiquées par **Capar & Cunningham (2000)**, mais plus faibles que celles obtenues par **Anderson & Smith, (2002)** et **Martin et al. (1999)**.

Les concentrations des principaux éléments K et Na sont plus élevées par rapports aux autres; la concentration du potassium varie de 422 mg/100g (E10) à 1050 mg/100g (E13) et celle du sodium de 2,65 à 39 mg/100g ; ces différences de concentrations de Na ont également été signalées par **Anderson & Smith, (2002)**.

Malgré leurs teneurs très élevées par rapport aux autres éléments analysés dans cette étude, les concentrations en K et en Na restent inférieures à celles trouvées par **Santos & Oliveira, (2001)** qui varient de 3250 ± 70 mg/100g à 5170 ± 200 mg/100g pour le potassium et de $28,7 \pm 1,1$ mg/100g à $666,5 \pm 17$ mg/100g pour le sodium. Cette variation peut être attribuée au type de sol où le café a été cultivé, l'utilisation de fertilisants avec différentes

compositions chimiques et/ou aux différences entre les procédés industriels de production de café. Cependant, les valeurs déterminées sont acceptables pour la consommation humaine compte tenu de leur avantage nutritionnel.

IV.5. Mise en évidence de la présence de l'acrylamide dans le café

IV.5.1. Analyse qualitative de l'acrylamide par HPLC-DAD

IV.5.1.1. Les données HPLC de l'acrylamide

La présence de l'acrylamide dans les cafés du marché algérien a été mis en évidence par la technique HPLC après l'apparition d'un pic dans certains échantillons de café ne figurant pas dans les cafés purs (en vrac, vert et torréfié).

Une recherche bibliographique minutieuse nous a mené à douter de la présence de cette molécule dans le café consommé par la population algérienne. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par une co-injection de l'acrylamide pur avec les extraits de café dans lesquels on suspectait la présence de la dite molécule. Dans ce qui suit nous présentons étape par étape la procédure de détection et de quantification de l'acrylamide dans divers échantillons de café vendu dans le marché à la ville de Guelma.

Les figures (IV. 36, IV. 37, IV. 38 et IV. 39) représentent respectivement, la courbe d'étalonnage de l'acrylamide, le chromatogramme de l'acrylamide pur à 210 nm avec le spectre UV correspondant, le chromatogramme d'un café emballé et le chromatogramme d'un café emballé dopé par 1µl du standard. Le tableau (IV.21) représente les données pour construire la courbe d'étalonnage.

Tableau IV. 21: Données HPLC de l'acrylamide.

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,25	73,38	73,07	73,46	73,30	0,20
0,50	704,41	704,74	704,61	704,58	0,16
1,00	1411,30	1411,17	1411,13	1411,20	0,08
2,00	2744,27	2744,34	2744,72	2744,44	0,24

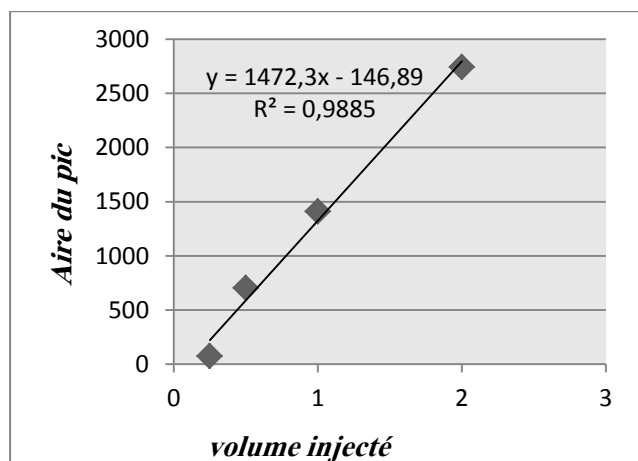


Figure IV. 36: Courbe d'étalonnage de l'acrylamide.

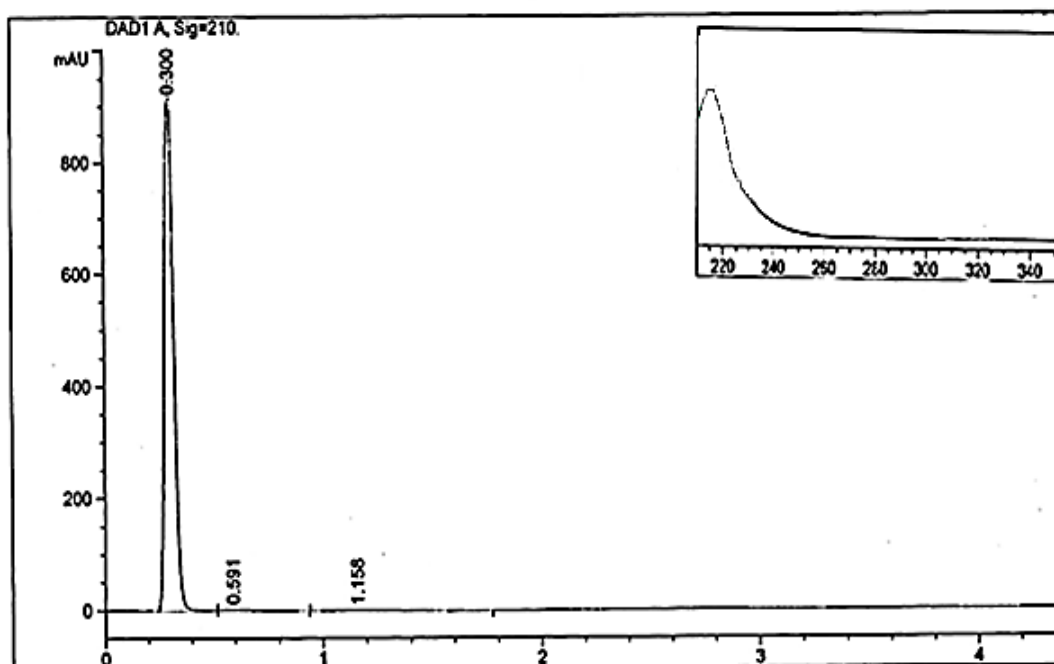


Figure IV. 37: Chromatogramme HPLC de l'acrylamide pur, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm (Agilent).

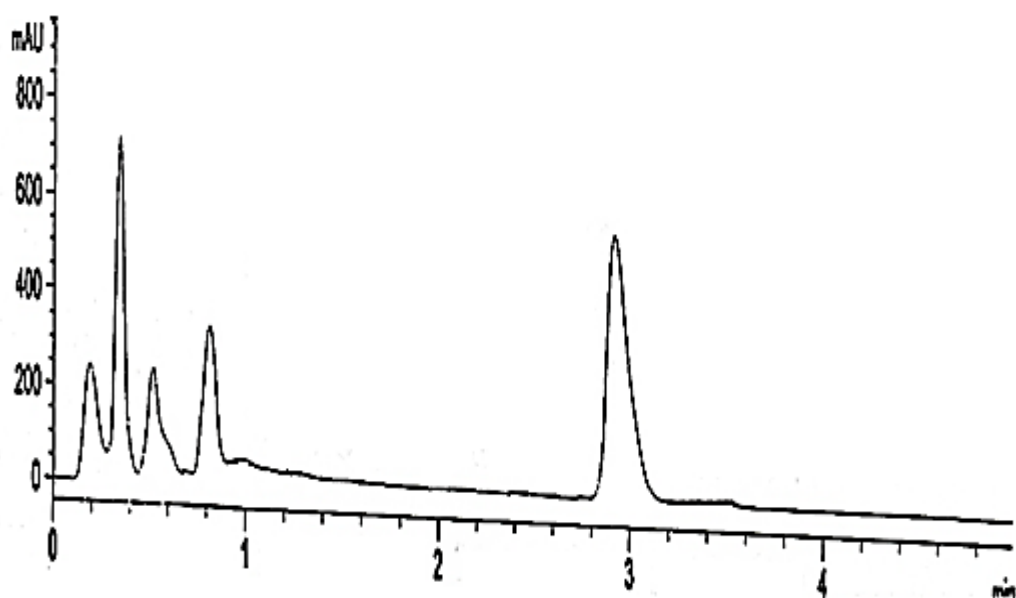


Figure IV. 38: Chromatogramme HPLC d'un café empaqueté (3) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

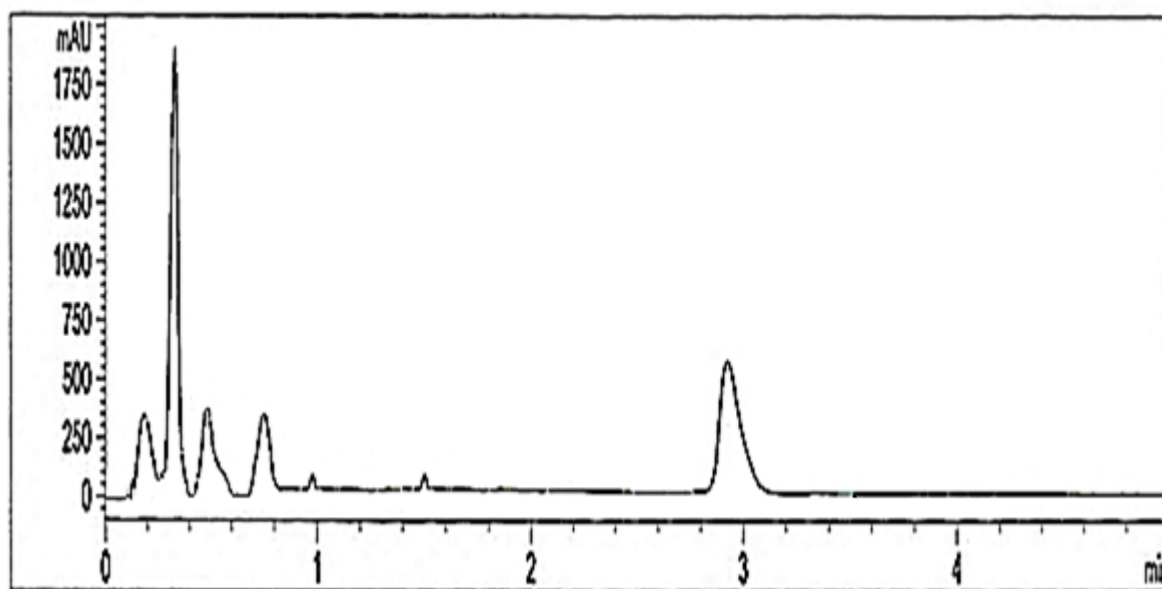


Figure IV. 39: Chromatogramme HPLC d'un café empaqueté (3) dopé par 1 μ l d'acrylamide ; Pic (2): acrylamide, T_R : 0, 30 min, λ : 210 nm.

La présence de ce composé a été confirmée par comparaison des chromatogrammes d'un échantillon de café emballé (**Figure IV.38**), d'une co-injection de 1 μ l de l'acrylamide avec le même échantillon (**Figure IV.39**) à celui de la molécule standard pure (**Figure IV.37**).

IV.5.2. Analyse quantitative de l'acrylamide

IV.5.2.1. Chromatogrammes des échantillons de café étudiés pour le dosage de l'acrylamide

Dans ce qui suit, nous présentons les résultats des injections des extraits des cafés torréfiés à différentes températures ainsi que les extraits des cafés emballés et non emballés étudiés.

Les figures ci-dessous représentent quelques chromatogrammes des cafés étudiés, (le temps de rétention de l'acrylamide est $\approx 0,30$ min).

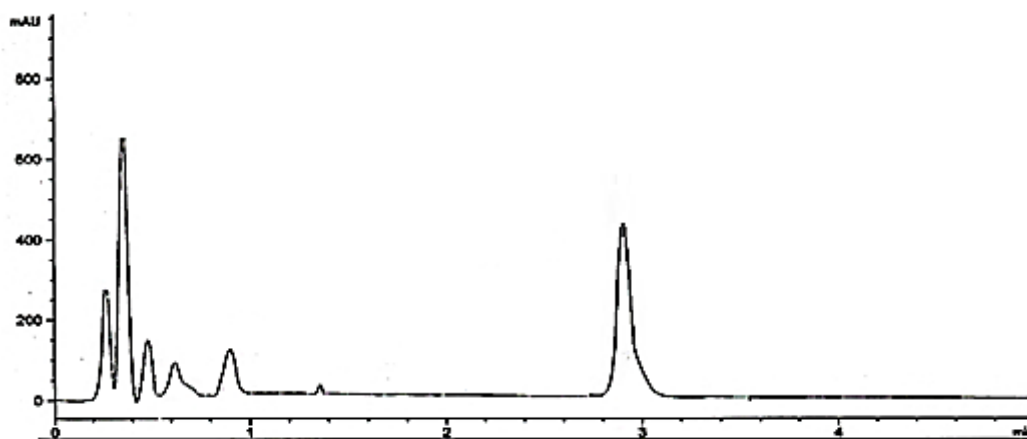


Figure IV. 40: Chromatogramme HPLC du café torréfié à 200°C (couleur du café: claire);
Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

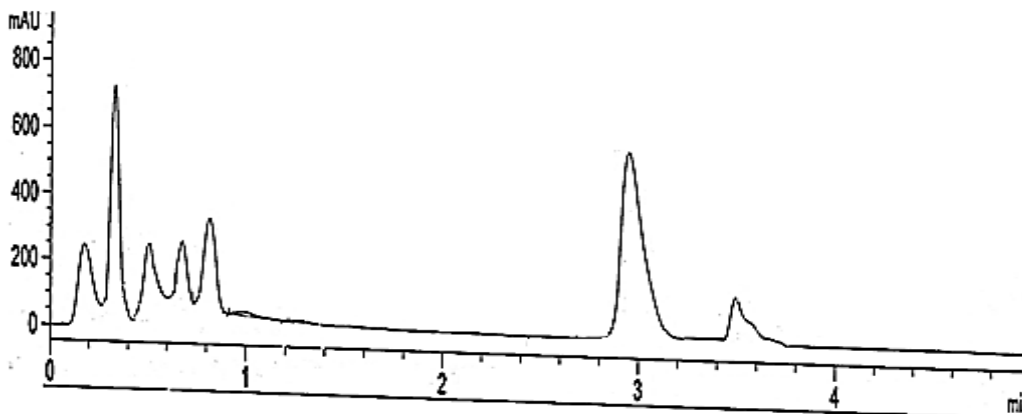


Figure IV. 41: Chromatogramme HPLC du café torréfié à 245°C (couleur moyenne);

Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

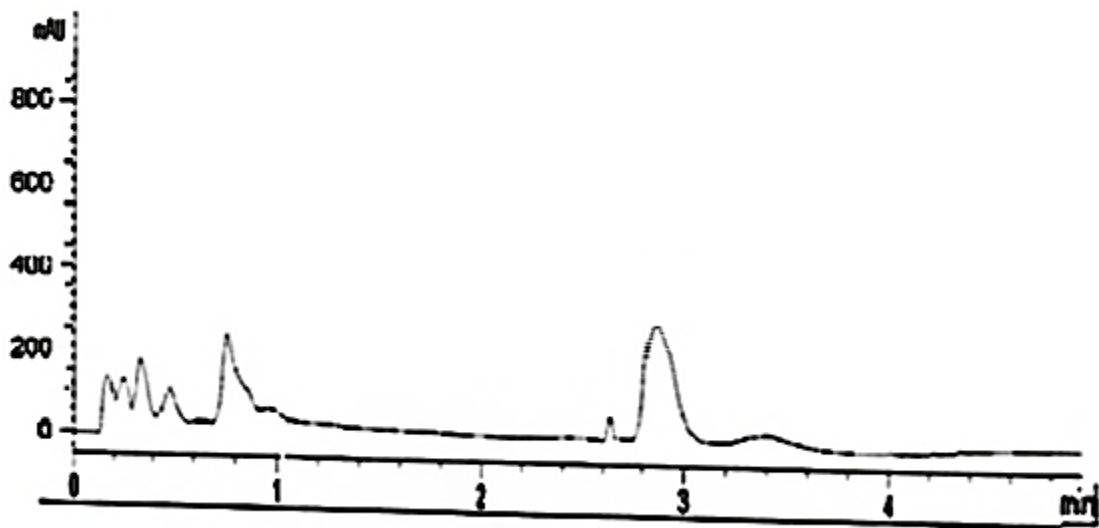


Figure IV. 42: Chromatogramme du café torréfié à 320°C (couleur foncée); Pic (3) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

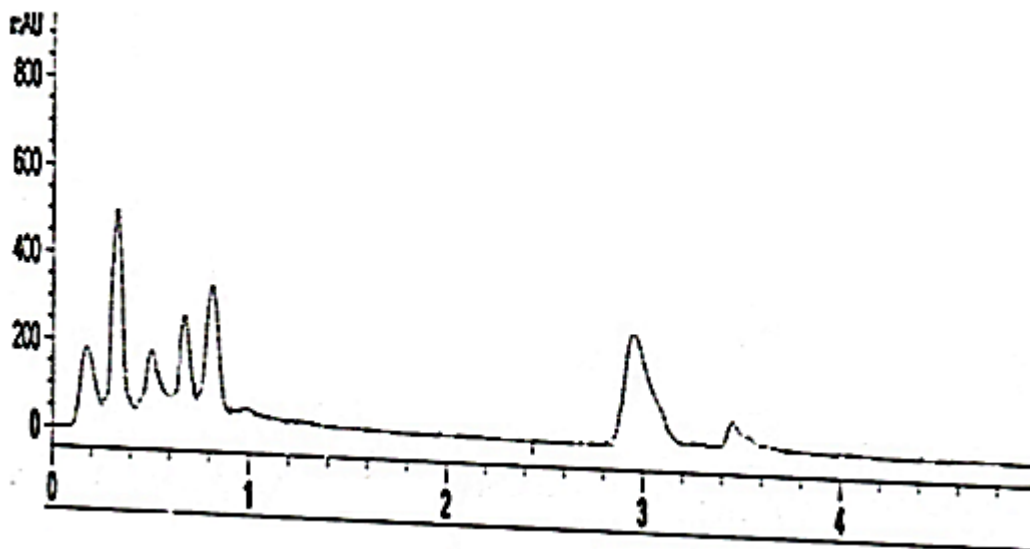


Figure IV. 43: Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (PG)) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

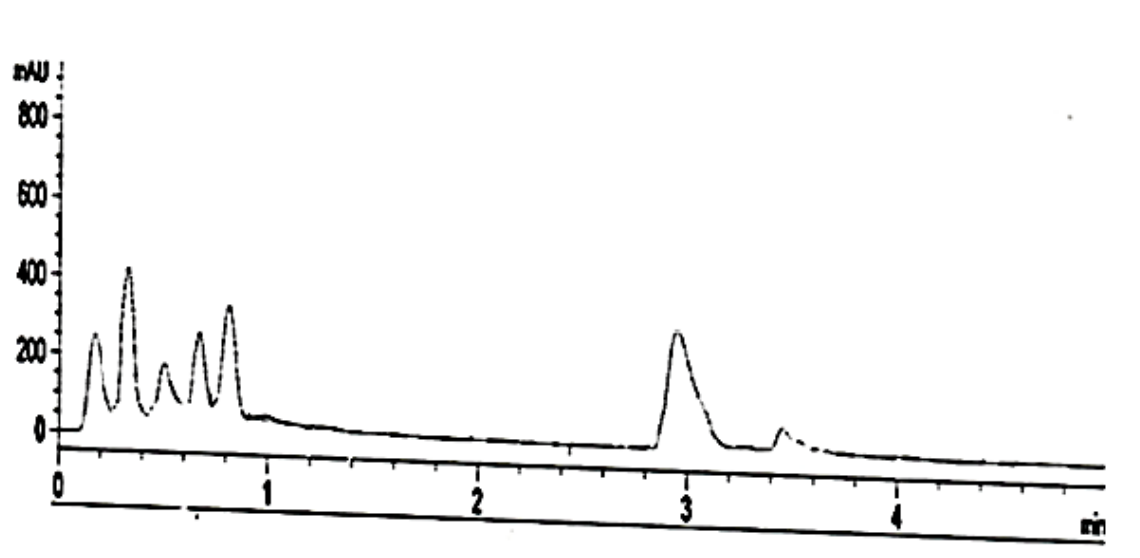


Figure IV. 44: Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (GG)) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

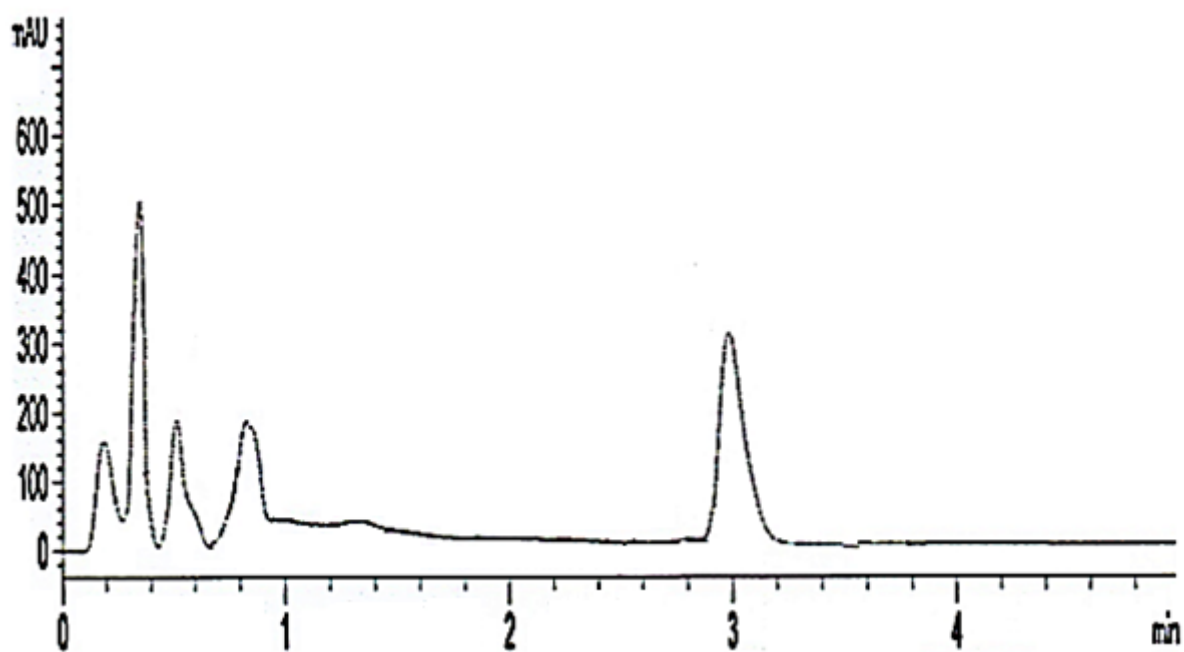


Figure IV. 45: Chromatogramme du café torréfié moulu non emballé (Robusta (PG + GG)) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30min, λ : 210 nm.

IV.5.3. Concentration de l'acrylamide dans les échantillons étudiés

La concentration de l'acrylamide a été déterminée par HPLC-UV-DAD dans les échantillons de différentes variétés de café torréfié. La séparation des composés a été réalisée en 5 min. La concentration de la substance étudiée dans chaque échantillon de café est calculée à partir de la courbe d'étalonnage à l'aide de la surface du pic du composé correspondant. Les concentrations ont été calculées par étalonnage externe. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont de 0,34 µg/l et 0,95 µg/l, respectivement.

Le taux de récupération qui a été calculé par dopage de l'échantillon de café emballé (3) par l'ajout de l'acrylamide à des concentrations de 5 µg/l, 10 µg/l et 15 µg/l est de 98,0%, 95,5% et 97,5% respectivement. Le tableau (IV.22), résume les concentrations du composé analysé dans les extraits de café en µg/l ainsi que les pH mesurés.

Tableau IV. 22 : Concentrations (µg/l) de l'acrylamide dans les échantillons étudiés, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± RSD.

Echantillons	Variété	Acrylamide (µg/l)	pH
Emballé (1)	Robusta	38,61±0,16	5,10
Emballé (2)	Mélange	39,43±1,54	4,89
Emballé (3)	Mélange	44,80±2,50	5,45
Emballé (4)	Mélange	39,89±1,95	4,99
Moulu non emballé	Arabica	10,45±0,44	4,77
Moulu non emballé (PG+GG)	Robusta	24,77±1,21	5,45
Moulu non emballé (PG)	Robusta	25,66±1,66	5,09
Moulu non emballé (GG)	Robusta	17,34±1,33	4,98
Torréfié à 100°C	Robusta	nd	5,05
Torréfié à 120°C	Robusta	14,50±1,56	4,80
Torréfié à 180°C	Robusta	25,05±1,35	5,24
Torréfié à 200°C	Robusta	30,45±2,67	5,40
Torréfié à 220°C	Robusta	32,33±1,59	5,90
Torréfié à 245°C	Robusta	25,75±3,55	5,12
Torréfié à 270°C	Robusta	21,55±1,33	5,08
Torréfié à 320°C	Robusta	11,66±0,96	4,73

IV.5.3.1. La détection et la quantification de l'acrylamide dans des échantillons de café

Dans cette étude, quatre marques de café moulu empaqueté, quatre échantillons de café en vrac (non empaquetés); de l'Arabica, du Robusta à petits grains (PG), du Robusta à gros grains (GG) et un mélange de (PG) et (GG) ainsi que du café vert (Robusta de la Côte d'Ivoire qui a été mené à des degrés de torréfaction différents comme il est décrit dans la partie expérimentale) ont été analysés afin d'y identifier et d'y déterminer la teneur en acrylamide.

Certaines études ont rapporté que les taux d'acrylamide dans les boissons de café sont compris entre 2 et 25 $\mu\text{g/l}$ (Andrzejewski *et al.* (2004) ; Dybing *et al.* (2005); Granby & Fagt, (2004); Pérez & Osterman, (2003); Svensson *et al.* (2003)).

La figure (IV.46) représente les teneurs en acrylamide des différents échantillons étudiés.

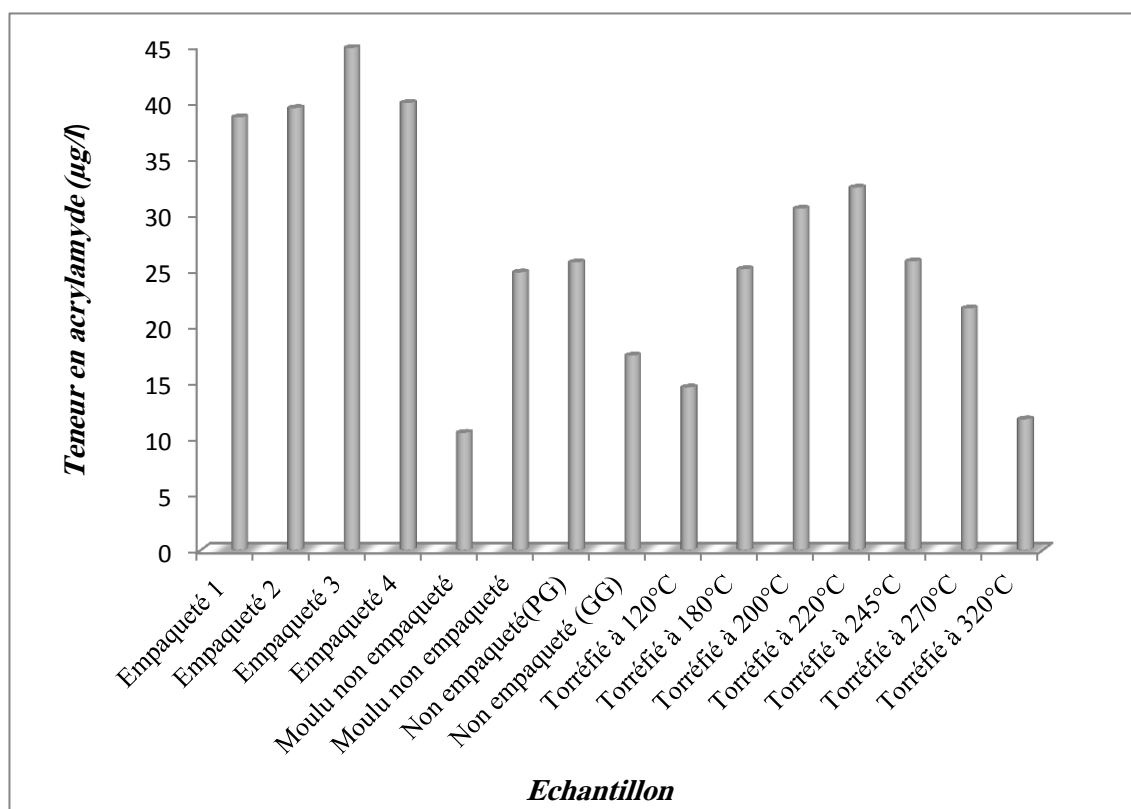


Figure IV. 46: Teneurs en acrylamide ($\mu\text{g/l}$) dans les différents échantillons de café étudiés.

La teneur en acrylamide dans les échantillons de café torréfié non emballé est de $10,45 \pm 0,44 \mu\text{g/l}$ dans la variété Arabica et de $25,66 \pm 1,66 \mu\text{g/l}$ dans le Robusta. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par **Bagdonaite et al. (2008)**; **Lantz et al. (2006)**. Cette différence semble être associée avec une teneur élevée en asparagine ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$) dans le café Robusta en comparaison avec l'Arabica.

On outre, la variété Robusta à gros grains (GG) contient relativement moins d'acrylamide que celle de la même variété à petits grains (PG) ; il apparaît que les gros grains nécessitent un temps plus long pour être bien cuits.

En revanche, des concentrations d'acrylamide légèrement plus élevées ont été détectées dans les échantillons de café torréfié emballé par rapport à ceux non emballés. La teneur en acrylamide dans le café emballé varie de $38,61 \pm 0,16 \mu\text{g/l}$ à $44,80 \pm 2,50 \mu\text{g/l}$. Comme il a déjà été décrit au chapitre 2, les sucres réducteurs et l'asparagine sont impliqués dans la formation d'acrylamide (**Mottram et al. (2002)**; **Stadler et al. (2002)**), donc par addition de glucose et de fructose, la formation d'acrylamide augmente.

Ceci amène à conclure que le sucre est ajouté pendant le processus de torréfaction; le café obtenu possède alors un goût caramélisé et une couleur plus foncée que le café pur. En outre, le poids du café torréfié avec addition du sucre va augmenter à moindre coût, puisqu'en Algérie, le coût du café est de 7 à 10 fois plus important que celui du sucre. La quantité de sucre ajouté lors de la torréfaction et non indiquée sur l'emballage peut avoir des conséquences très graves sur la santé humaine.

IV.5.3.2. Influence du degré de torréfaction

Lorsque les grains de café sont soumis à des températures de torréfaction élevées, des modifications physiques et des réactions chimiques se produisent (**Pittia et al. (1996)**). Ces dernières peuvent influencer l'extraction de certains composés de la boisson.

Dans ce travail, l'effet de la torréfaction sur la teneur en acrylamide a été étudié ; comme il a déjà été mentionné, le café vert de la Côte d'Ivoire a été grillé à 120°C , 180°C , 200°C , 220°C , 245°C , 270°C et 320°C , respectivement.

Des couleurs claire, moyenne et foncée ont été obtenues pour les différents échantillons. Le degré de torréfaction constitue un facteur clé dans la teneur de l'acrylamide (**Bagdonaite et al. (2008)**; **Guenther et al. (2007)**; **Lantz et al. (2006)**; **Senyuva & Gökmen, (2005)**; **Taeymans et al. (2004)**), en effet, cette dernière est plus élevée dans les

échantillons clairs que dans les deux autres où elle varie de $14,50 \pm 1,56 \mu\text{g/l}$ à $32,33 \pm 1,59 \mu\text{g/l}$, puis commence à diminuer dans les échantillons de couleur moyenne avec une teneur moyenne de $23,65 \pm 2,44 \mu\text{g/l}$ pour atteindre enfin une teneur de $11,66 \pm 0,96 \mu\text{g/l}$ dans l'échantillon de couleur foncée. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Guenther et al. (2007)** et **Şenyuva & Gökmen, (2005)**.

IV.5.4. Impact du pH sur la formation de l'acrylamide

D'après **Ajandouz & Puigserver, (1999)** et **Ajandouz et al. (2001)**, la contribution de la réaction de caramélisation au brunissement non enzymatique globale au-dessus de la neutralité devrait conduire à une augmentation des produits de la réaction de Maillard, y compris l'acrylamide, dans les aliments. Ce qui est en parfait accord avec les résultats de **Mestdagh et al. (2008)**, qui a stipulé qu'un faible pH contribue à la réduction des taux de l'acrylamide dans les aliments.

Dans les différents échantillons de café étudiés, le pH varie entre 4,73 et 5,90. Dans les échantillons de café emballé, où les teneurs en acrylamide sont plus élevées par rapport au café non emballé, le pH varie de 4,89 à 5,45 c'est à dire au-dessous de la neutralité ; il apparaît que lors de la torréfaction, la quantité de sucre ajoutée, qui est destinée généralement pour l'enrobage est importante, ce qui a permis d'augmenter les teneurs en acrylamide dans ces échantillons.

IV. 6. Conclusion

Cette étude est menée sur le café (vert, torréfié conditionné ou non et le café soluble) du marché algérien afin d'identifier et déterminer sa composition en éléments nutritifs (caféine, acides phénoliques, flavonoïdes et quelques minéraux) et pour cela des analyses en HPLC-UV-visible, HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS ; spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et photométrie à flamme (PEA) ont été réalisées.

Les résultats obtenus indiquent que la composition en caféine et en polyphénols est affectée par le procédé de torréfaction qui est indispensable pour le café. Leurs concentrations dans le café vert sont supérieures à celles du café torréfié.

En ce qui concerne les minéraux, les échantillons des différents types de café étudiés ont des teneurs différentes en éléments analysés. Le café soluble possède les concentrations les plus élevées en minéraux et en particulier le potassium et le sodium.

Nous signalons, pour terminer que la torréfaction qui développe des propriétés sensorielles (odeur, saveur, couleur) appétentes doit cependant être conduite avec précautions parce qu'elle développe aussi des réactions chimiques produites par la caramélisation ou par la réaction de Maillard selon les conditions de torréfaction, mettant en évidence la présence de nouvelles molécules telle que l'acrylamide, qui présente de forts risques pour la santé humaine.

Il est donc nécessaire de maîtriser l'étape de torréfaction pour limiter la présence de ce composé dans le café. Dans cette étude, l'analyse de l'acrylamide a été faite par HPLC-DAD. Des teneurs substantiels en ce composé ont été détectées dans le café emballé.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était d'une part l'analyse et le dosage du café du marché local, en composition nutraceutique, et d'autre part la mise en évidence d'un élément toxique dans ce produit ; l'acrylamide qui apparaît à la suite du traitement thermique du produit.

Les constituants de café qui ont été dosés sont (la caféine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide para-coumarique, l'acide ferulique, l'acide cinnamique, l'acide méthoxycinnamique, l'acide sinapique et l'acide gallique, ainsi que, la quercétine, la rutine, la catéchine, et quelques minéraux ; le potassium, le sodium, le zinc, le fer, le cuivre, et le chrome).

Les méthodes analytiques utilisées étaient : HPLC-UV-visible, HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS ; spectrométrie d'absorption atomique et photométrie à émission atomique.

En ce qui concerne le dosage de la caféine et des polyphénols ; les paramètres suivants ont été prises en compte: l'emballage, le degré de torréfaction, la taille des grains, l'instantanéité et la décaféination.

Les acides phénoliques ; les principaux antioxydants du café se trouvent en concentrations élevées dans le café vert. En revanche, les teneurs en ces acides dans les autres cafés conditionnés ou non, ont diminué sous l'effet de la température durant la torréfaction, leurs teneurs dans les échantillons de café ayant subi un degré de torréfaction poussé est négligeables.

La taille des grains dans les échantillons de café grillé avant le broyage, influe sur la teneur des composés ; les graines de plus grande taille sont moins soumises à la torréfaction que les plus petites, par conséquent, les concentrations en métabolites étaient plus élevées pour les grains de café de plus grande taille.

D'autre part, après le broyage, on a constaté que, plus la taille des particules est fine, plus la concentration des composés analysés, est élevée.

La différence en concentrations des composés étudiés dans les échantillons de café torréfié emballé ou en vrac, et les cafés solubles n'était pas significative.

La caféine et l'acide chlorogénique sont majoritaires dans le café. La caféine étant un alcaloïde, elle agit comme stimulant du système nerveux central et du système cardiovasculaire. Quant à l'acide chlorogénique, il possède des effets antioxydants.

Les teneurs en ces deux principes actifs dans le café vert, sont plus élevées que celles de ceux torréfiés. La teneur en caféine dans la variété robusta est presque le double de celle de l'arabica.

Aucune différence significative n'a été observée entre les teneurs en polyphénols et en polyphénols totaux du café décaféiné et les autres variétés du café torréfié. La caféine est de toute évidence, le seul composé qui se trouve en faible quantité dans l'échantillon de café décaféiné.

Quant aux flavonoïdes analysés, seul, la catéchine a été détectée, mais en plus faibles quantités que les acides phénoliques.

Le café boisson a été préparé de deux manières différentes; (i) en utilisant la cafetière turque et (ii) électrique. Ainsi, les deux substances majoritaires du café; l'acide chlorogénique et la caféine, ont été identifiées par HPLC-MS et quantifiées par HPLC-DAD.

Les teneurs de ces deux principes actifs dans les échantillons préparés par la cafetière turque, ont été toujours supérieures à celles obtenues par la cafetière électrique. Il apparaît donc clair que le mode de préparation du café boisson a une influence sur l'extraction des métabolites.

La taille de particules du café moulu emballé peut être plus grosse que celle du café non emballé, par conséquent, l'extraction du café emballé est moins efficace que celle du café non emballé.

Par comparaison des concentrations obtenues pour le café boisson avec ceux de l'analyse de ces deux mêmes composés par HPLC-UV-visible, on constate qu'elles ont été plus élevées dans la première méthode que dans la deuxième; ce qui est expliqué par l'avantage de l'extraction multiple par l'eau et le méthanol. En revanche l'utilisation de la centrifugation ainsi que l'ultrason pendant 20 min améliore l'extraction.

En ce qui concerne les minéraux qui jouent un rôle important dans l'alimentation humaine, leurs teneurs dans le café vert, sont proches de celles du café torréfié (avec ou sans caféine), ce qui veut dire que la torréfaction et la décaféination, n'ont pas d'influence sur la teneur en ces éléments, tandis que, les échantillons de café emballés, ont des teneurs en minéraux, inférieures aux autres échantillons.

Les échantillons de café moulu torréfié non emballé, présentent des différences entre eux en ce qui concerne leurs teneurs en éléments minéraux étudiés, cette différence est due à la variété du café, parce que le robusta contient des concentrations un peu plus élevées que l'Arabica.

Le café instantané possède les concentrations les plus élevées en minéraux et en particulier en potassium et en sodium (K, Na), qui sont les principaux éléments dans les différents échantillons analysés.

On constate que, les échantillons des différents types de café étudiés ont des teneurs différentes en éléments analysés. Cette différence peut être attribuée au type de sol où le café a été cultivé, l'utilisation de fertilisants avec différentes compositions chimiques et, aux différences entre les procédés industriels de production de café. Néanmoins, les valeurs obtenues sont acceptables pour la consommation humaine, suite à leurs bienfaits nutritionnels.

De l'autre côté, l'acrylamide, un produit non désirable et nocif pour la santé humaine, a été analysé en utilisant l'HPLC-UV-DAD. Des teneurs non négligeables en ce composé ont été détectées dans les cafés conditionnés. Les faibles teneurs en ce composé dans le café moulu non emballé, mène à conclure que ce composé peut bien être métabolisé par addition du sucre ajouté lors de la torréfaction. Le café torréfié en présence de sucre possède un goût caramélisé et une couleur plus foncée que celle du café pur. L'ajout de quantités non contrôlées de sucre lors de la torréfaction menant à l'augmentation de la teneur d'un composé cancérigène, tel l'acrylamide représente un danger certain pour la santé humaine.

Pour mieux détecter ce composé nous avons procédé à la torréfaction à des températures différentes et à un temps fixe en obtenant des couleurs qui vont du marron clair au foncé. Les analyses ont montré que les teneurs en acrylamide sont plus importantes que leur couleur après torréfaction est claire. Ainsi, le degré de torréfaction constitue un facteur clé dans la teneur de l'acrylamide.

Enfin, on peut conclure que la consommation de café pourrait fournir des substances nutritives telle que ; les antioxydants, la caféine et les minéraux, mais malheureusement aussi, d'autres composés ayant plusieurs effets secondaires. De ce fait la consommation de café doit être modérée.

Au vu de ces différents résultats, un certain nombre de perspectives de travail s'offrent à nous. Il nous semble important d'effectuer:

- Une étude par modélisation moléculaire de l'activité antioxydante des polyphénols du café (en cours).
- Une étude cinétique approfondie de la formation de l'acrylamide dans le café.
- Des analyses d'autres aliments du marché local pour leur teneur en acrylamide.

REFERENCES

Références bibliographiques

- Abraham S K. Inhibition *in vivo* of clastogenicity by coffee. *Mut Research*.1988; 203: 206-7.
- Abraham S K. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents. *Food and Chem Toxico* 1996; 34: 15-20.
- Abraham S K,Vukicevic V, Stopper H. Coffee-mediated protective effects against directly acting genotoxins and gamma-radiation in mouse lymphoma cells. *Cell Biology Toxico* 2004; 20: 121-32.
- Anderson K A, Smith B W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2068–75.
- Andriot I, Le Quéré J.-L, Guichard E. Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: Impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chem* 2004; 85:289-94.
- Andrzejewski D, Roach J A G, Gay M. L, Musser S.M. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem* 2004;52:1996-2002.
- Ajandouz E H, Puigserver A. Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics. *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47:1786–93.
- Ajandouz E H, Tchiakpe L S, Dalle Ore F, Benajiba A, Puigserver A. Effects of pH on Caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *J. Food Sci.* 2001; 66: 926–31.
- Alves, R C, Soares, C, Casal, S, Fernandes, G O, Beatriz M, Oliveira, P P. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chem* 2010; 119: 929–34.
- Arendash, G W, Cao C. Caffeine and Coffee as Therapeutics Against Alzheimer's Disease. *J Alzh Dis* 2010; 20:117–26.
- Avallone S, Guiraud, J P, Guyot B. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. *J Food Sci* 2000; 65: 1308-11.
- Avallone S, Guiraud J P, Guyot B. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. *J Agricul And Food Chem* 2001; 49: 5556-9.
- Ayalign A, Sabally K. Determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans using HPLC. *Am J of Res Communica* 2013; 2:78-91.
- Bagdonaite K, Derler K, & Murkovic, M. Determination of acrylamide during roasting of coffee. *J of Agric and Food Chem* 2008; 56:6081–6.
- Bambha K, Wilson L A, Unalp A. Coffee Consumption In Nafld Patients With Lower Insulin Resistance Is Associated With Lower Risk Of Severe Fibrosis. *Nonalcoholic Steatohepatitis Liver Internat* 2014; 34:1250-58.
- Bastian C. Développement d'une méthode HPLC pour l'analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques de *Coffea canephora*. Robusta, 2006. Paris. Thèse.

Références bibliographiques

Becalski A, Lau B.P.-Y, Lewis D, Seaman S.W. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem* 2003; 51:802-8.

Becalski A, Lau P.-Y. B, Lewis D, Seaman S.W, Hayward S, Sahagian M, Ramesh M, Leclerc Y. Acrylamide in French fries: influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 3801-6.

Belay A, Ture K, Redi M, Asfaw A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *J Food Chem* 2008; 108:310–5.

Belay A, Gholap, A V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *Afr J Pure App Chem* 2009; 3: 234-40.

Belguidoum K, Guebailia H A, Boulmouk Y, Houache O. HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *J of the Taiw Instit of Chem Eng* 2014; 45: 1314–20.

Brown R J C, Milton M J T. Analytical techniques for trace element analysis. *Anal Chem* 2005; 24: 266–74.

Burmester K, Eggers R. Heat and mass transfer during the coffee drying process. *J Food Eng* 2010; 99:430–6.

Candeias S X, Gallardo E, Matos A C. Caffeine content of retail market coffee in Portugal. *J F Anal Method* 2009; 2:251–6.

Cao S, Liu L, Yin X. Coffee consumption and risk of prostate cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Carcinogenesis* 2014; 35: 256-61.

Capar G S, Cunningham, W C. Element and radionuclide concentrations in food. *J AOAC Int* 2000; 83: 157–77.

Casal S, Andrade P B, Oliveira M B, Ferreres F, Viguera G C, Ferreira M A, Analysis of hydroxycinnamic. *J of Liq Chromatogr. & Rel. Techno* 1999; 22: 513–21.

Casal S, Oliveira M B, Alves M R, Ferreira M A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. *J of Agric and Food Chem* 2000; 48: 3420–4.

ChemIDplus, Base de données, consulté le 7 juillet 2014, <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>.

Chrysohoou C, Dimitriadis K, Maragiannis J. Moderate coffee consumption improves aortic distensibility in hypertensive elderly individuals. *Eur Hea J* 2010; 31: 944-944.

Chrysohoou C, Metaxa V, Lazaros, G. Moderate coffee consumption seems to improve aortic elastic properties in elderly hypertensive individuals. *Eur Hea J* 2012; 33: 618-618.

Clifford M N, Shutler S, Thomas GA, Ohiokpehai O. The chlorogenic acids content of coffee substitutes. *J Food Chem* 1987; 24:99–107.

Clifford, M N., Knight, S. The cinnamoyl-amino acid conjugates of green Robusta coffee beans. *Food Chem* 2004; 87: 457–63.

- Comer A M, Perry C M, Figgitt D P. Caffeine Citrate . *Pediatric Drugs* 2001; 3: 61 - 79.
- Conesa, S, Palanco, S, Laserna J J. Acoustic and optical emission during laserinduced plasma formation. *Spectrochim Acta Part B: Atom Spectrosc* 2004; 59: 1395–1401.
- Costa A M F, Mosca A I. Coffee geographic origin an aid to coffee differentiation. *Food Res Int* 1999; 32: 565–73.
- Czok G. Coffee and health. *J Nutr Sci Suppl.* 1977; 16: 248 – 55.
- Daglia M, Papetti A, Dacarro C. Isolation of an antibacterial component From Roasted Coffee. *J Pharml Biomed Anal* 1998;18: 219-25.
- Daglia M, Papetti A, Gregotti C. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1449-54.
- Daglia M, Papetti A, Aceti C. Isolation of High Molecular Weight Components and Contribution to the Protective Activity of Coffee against Lipid Peroxidation in a Rat Liver Microsome System. *J Agric Food Chem* 2008; 56:11653-60.
- Del Castillo M D, Ames J M, Gordon M H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3698–703.
- De Maria C A B, Trugo L C, Moreira R F A, Petracco M. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. *Food Chem* 1995; 52: 447–9.
- Dorea J G, da Costa T H M. Is coffee a functional food? *Brit J Nutr* 2005; 93: 773–82.
- Dranoff J A, Feld J J, Lavoie E G. How Does Coffee Prevent Liver Fibrosis? Biological Plausibility for Recent Epidemiological Observations. *Hepatology* 2014; 60: 464-67.
- Duarte G S, Pereira A A, Farah A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *J Food Chem* 2010; 118:851–5.
- Ducauze C, Baillet G A , Buit T X. Choix et validation d'une méthode d'analyse. Agrosparitech Ed, Paris, Agrosparitech, 30 p.
- Dybing E, Farmer P B, Andersen M, Fennell T R, Lalljie S P, Müller D J. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chem Toxicol* 2005; 43: 365–410.
- Esenaliev R O, Karabutov A A, Podymova N B, Letokhov V S. Laser ablation of aqueous solutions with spatially homogeneous and heterogeneous absorption. *Appl Phys B-Lasers* 1994; 59:73–81.
- Fang N, Yu S, Prior R L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3579-85.
- Farah A, De Paulis T, Trugo L C. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1505-13.

Références bibliographiques

Farah A, De Paulis T, Moreira D P, Trugo L C, Martin P R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 374–81.

Farah A, Donangelo C M. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol* 2006; 18: 23–26.

Farah A, Monteiro M, Donangelo C M, Lafay S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr*, 2008; 138: 2309–15.

Fennell T R, Sumner S C J, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson W.E, Friedman M.A. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci* 2005; 85:447-459.

Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A re-view. *J. Agric. Food Chem* 2003; 51: 4504-4526.

Fujioka K, Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *J ournal of Food Chem* 2008; 106:217–21.

Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, Aizawa H, Mori Y. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *J Agric Food Chem* 2009a; 57:1253–9.

Fukushima Y, Kasuga, M, Nakao, K. Effects of Coffee on Inflammatory Cytokine Gene Expression in Mice Fed High-Fat Diets. *J Agric Food Chem* 2009b; 57: 11100-5.

Gamboa D C G, Cuchwell M I, Hamilton P, Von Tungeln LS, Beland F.A, Marques M M, Doerger D R. DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol* 2003; 16:1328-37.

Gertz C, Klostermann S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 2002; 104:762-71.

Gillies M E, Birkbeck J A. Tea and coffee as sources of some minerals in the New-Zealand diet. *Am J Clin Nutr*1983; 38: 936–42.

Granby K, Fagt S. Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure to acrylamide from coffee, *J Anal Chim Acta* 2004; 520:177– 82.

Granvogl M, Jezussek M, Koehler P, Schieberle.P. Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes - a minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52:4751-7.

Granvogl M, Schieberle P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem* 2006;54:5933-8.

Guenther H, Anklam E, Wenzl T, Stadler R H. Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants* 2007; 24: 60–70.

Guyot B, Gueule D, Manez JC, Perriot JJ, Giron J and Villain L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. *Plantations, Recherche, Développement* 1996 ; 3: 272–80.

Références bibliographiques

Haler P N.G. Le café: les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. Université De Lorraine 1988. Thèse.

Hecimovic I, Belscak-C A, Horzic D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food chem* 2011; 129: 991-1000.

Houessou J K. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction. Ecole Doctorale ABIES, Paris 2007 Thèse.

Huck CW, Uggeabichler WG, Bonn GK. Analysis of caffeine theobromine and theophylline in coffee by NIR spectroscopy compared to HPLC coupled to mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 2005; 538: 195-203.

Jane V. Higdon And Balz Frei. Coffee And Health: A Review Of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Sci Nutr* 2006; 46:101–23.

Jiang X, Zhang D, Jiang W. Coffee and caffeine intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Nutr* 2014; 53: 25-38.

Jiao Y, Zuo Y. Ultrasonic extraction and HPLC determination of anthraquinones, aloemodine, emodine, rheine, chrysophanol, and physcione, in Radix Polygoni multiflori. *Phytochem Anal* 2009; 20:272–8.

Kim J H. Delay and its time-derivative dependent robust stability of time-delayed linear systems with uncertainty. *Transa Autom Control* 2001; 46: 789–92.

Ky C L, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noriot M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem* 2001; 75: 223–30.

Lantz I, Ternité R, Wilkens J, Hoenicke K, Guenther H, van der Stegen, G H D. Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. *Mol Nutr & Food Res* 2006; 50: 1039–46.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727–47.

Małgorzata G, Ewa M, Piotr S. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. *Sci Tot Envir* 2007; 383: 59–69.

Martín M J, Pablos F, González A G. Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. *Food Chem* 1999; 66: 365–70.

Meckelburg N, Pinto K C, Farah A, Iorio N L P, Pierro V S S, dos Santos K R N, Maia L C, Antonio A G. Antibacterial effect of coffee: calcium concentration in a culture containing teeth/biofilm exposed to *Coffea Canephora* aqueous extract. *App Microbio* 2014; 59: 342–7.

Meletis C D. Coffee: Functional food and medicinal herb. *J Altern Complement Thera* 2006; 12: 7–13.

Mestdagh F, Maertens J, Cucu T, Delporte K, Peteghem CV, Meulenaer BD. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms *Food Chem* 2008; 107: 26–31.

McCusker R R, Fuehrlein B, Goldberger B A, Gold M S, Cone E J. Caffeine content of decaffeinated coffee. *J. Anal. Toxicol* 2006; 30: 611-13.

Minamisawa M, Yoshida S, Takai N. Determination of biologically active substances in roasted coffees using a diode-array HPLC system. *Anal Sci* 2004; 20: 325–8.

Moon J K, Yoo H S, Shibamoto T. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: Correlation with coffee acidity. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 5365–9.

Moriette G, Lescure S, El Ayoubi M, Lopez E. Apnea of prematurity: what's new? *Arch Pediatr* 2010; 17: 186-90.

Mottram D S, Wedzicha B L, Dodson A T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002; 419:448– 9.

Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endo Metab* 2011; 300: 122–33.

Murkovic M. Acrylamide in Austrian foods. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2004; 61: 161-7.

Naegele E. Analysis of Coffee and Coffee Products by HPLC for the Determination of Natural Components and Harmful Contamination . *LC GC Eur* 2014; 27: 159-60.

Naira P R, Neura B. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn. *J Food Comp Anal* 2013; 32: 105–15.

Nicoli M C, Anese M, Manzocco L, Lericri CR. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *J Sci Technol* 1997; 30:292–7.

Oliveira M, Casal S, Morais S, Alves C, Dias F, Ramos S. Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chem* 2012; 130:702–9.

Olthof M R, Hollman P C H, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001; 131: 66–71.

Oosterveld A, Voragen A G J, Schols H A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea Arabica* beans. *Carbohydr Polym* 2003; 54:183–92.

Orecchio, S., Ciotti, V. P., & Culotta, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food and Chem Toxicol* 2009; 47: 819–26.

Park J, Kamendulis L.M, Friedman M.A, Klaunig J. Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicol. Sci* 2002; 65:177-83.

Références bibliographiques

Pérez H L, Osterman G S. A sensitive gas chromatographic–tandem mass spectrometric method for detection of alkylating agents in water: Application to acrylamide in drinking water, coffee and snuff. *Analyst* 2003; 128:1033–36.

Perez N J, Valdes V E, Roman M E H. Rain, runoff and soil erosion in shaded coffee agroforestry systems . *Agro-cienc* 2005; 39: 409-18.

Perrone D, Farah A, Donangelo C M, De Paulis T, Martin P R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry* 2008; 106: 859–67.

Pimentel G D, Zemdegs J C S, Theodoro J A, Mota J F. Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk? *J Diabetol Metab Syndr* 2009; 16:1–6.

Pittia P, Wilde P G, Husband F A, Clark D C. Functional and structural properties of lactoglobulin as affected by high pressure treatment. *J Food Sci* 1996; 61: 1123–8

Rakotomalala J J, Cros J, Charrier A, Anthony F, Noirot M. Marqueurs biochimiques de la diversité des cafeiers. *Proc Coll ASIC* 1993; 15: 47 – 55.

Ranic M, Nikolic M, Pavlovic M. Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *J Clean Product* 2014; 80: 69-79.

Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods. *J Food Eng* 2001; 49:311–9.

Richard B. L, Walter F. S, Robert E. R, Joel S, Stephen S, Fred S. Efficacy and Safety of Acetaminophen, Aspirin, and Caffeine in Alleviating Migraine Headache Pain Three Double-blind, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *Arch Neurol* 1998; 55: 210-7.

Romdhane M, Gourdon C. Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chem Eng J* 2002; 87: 11-19.

Rosado J C D. Étude et développement de la spectroscopie d'émission optique sur plasma induit par laser pour la réalisation d'analyses de terrain : application à l'analyse en ligne de métaux dans les liquides. Thèse, 2013 ; Paris.

Rostagno MA, Manchona N, Arrigoa MD, Guillamona E, Villares A, Garcia-Lafuenta A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *J Anal Chim Acta* 2011; 685:204–11.

Salazar M E, Willett W C, Ascherio A, Manson J E, Leitzmann M F, Stampfer M J., Hu F B. Coffee Consumption and Risk for Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 140:1-8.

Santos E J, Oliveira E. Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *J Food Comp and Anal* 2001; 14: 523–31.

Sapozhnikova Y. Development of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee. *Food Chem* 2014; 150: 87–93.

Sarker S D, Zahid L, Gray A I. Natural products isolation. *Meth in Biotechno* 2005; 20: 1-25.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T. *In vitro and in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International J Pharm* 2011; 403: 136–8.

Senyuva H Z, Go'kmen V. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Addit and Contam* 2005; 22: 214– 20.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:215–7.

Silvani D, Whitmore T. A Review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation and control. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr* 2004; 44:323–47.

Souci S W, Fachmann H, Kraut H. Food composition and nutrition tables. *J Food Compo and Anal* 2002; 15:465–72.

Speer K, Sehat N, Montag A. Fatty-Acids in coffee. *Sponsor(S): Assoc Sci Int Café* 1993; 2: 583-92.

Speer K, Kurzrock T, Hruschka A. Diterpene degradation products in roasted coffees. *Sponsor(s): Assoc Sci Int Cafe* 1999; 65-70.

Stadler R H, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M C, Riediker S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419:449–50.

Stadler R.H, Verzeegnassi L, Varga N, Grigorov M, Studer A, Riediker S, Schilter B. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol* 2003; 16:1242-50.

Stadler R H, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S, Goldmann T, Hau J, Blank I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 5550-8.

Stegen VD, Duijn JJHDV. Analysis of chlorogenic acids in coffee. *París (Francia), ASIC*, 1980; 107-112.

Suseela B, Bhalke S, Kumar AV. Daily intake of trace metals through coffee consumption in India. *Food Addit & Contam* 2001; 18: 115-20.

Svensson K, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenäs K E, Lind Y. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chem Toxicol* 2003; 41: 1581– 6.

Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH. Review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation and control. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr* 2004; 44: 323–47.

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50:4998-5006.

Références bibliographiques

- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Acrylamide: A cooking carcinogen. *Chem. Res. Toxicol* 2000; 13:517-22.
- Tavani A, Bertuzzi M, Gallus S, Negri E & La Vecchia C. Risk factors for non-fatal acute myocardial infarction in Italian women. *Prev.Med* 2004;39: 128–34.
- Toledo A T, Mehltreter K, Garcia F J G. Benefits and costs of epiphyte management in shade coffee plantations. *Agric Ecosys Env* 2013; 181: 149-56.
- Trockel M D, Barnes D L. Health-related variables and academic performance among first-year college students: implications for sleep and other behaviors. *J Am Col Hea* 2000; 49: 125–31.
- Trugo L C, Macrae R A, Chlorogenic acid composition of instant coffee, *Analyst* 1984; 109: 263– 6.
- Trugo L C, De Maria C A B, Werneck C C. Simultaneous determination of total chlorogenic acid in coffee by high performance gel filtration chromatography. *J Food Chem* 1991; 42: 81–7.
- Urakova I N, Pozharitskaya O N, Shikov A N. Comparison of high performance TLC and HPLC for separation and quantification of chlorogenic acid in green coffee bean extracts. *J Sep Sci* 2008; 31: 237-41.
- Vial J, Jardy A. Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse quantitative par Chromatographie en Phase Liquide. *Analysis* 1998 ; 26 : 15-24.
- Vignoli J A, Bassoli D G, Benassi M T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem* 2011; 124: 863–8.
- Volaufova J, Matthews D E, Cefalu W T, Martin J, Wang Z Q, Zhang X H. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 1826–32.
- Wang Y, Ho C T. Polyphenolic chemistry of tea and coffee. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 8109–14.
- Weisshaar R. Acrylamide in heated potato products analytics and formation routes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 2004; 106:786-92.
- Wilson K M, Kasperzyk J L, Rider J R, Kenfield S T, Van Dam R, Stampfer M R. Coffee Consumption and Prostate Cancer Risk and Progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 876-84.
- Yaylayan V A, Wnorowski A, Locas C P. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem* 2003; 51:1753-7.
- Yusaku N, Kuniyo I. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I. *J Food Chem* 2011;127:1532–9.

Références bibliographiques

Zhong S, Chen W, Yu X. Coffee Consumption and risk of prostate cancer: an up-to-date meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2014; 68: 330-7.

Ziyatdinova G, Aytuganova I, Nizamova A. Differential pulse voltammetric assay of coffee antioxidant capacity with mwnt-modified electrode. *Food Anal Meth* 2013; 6: 1629-1638.

Zuo Y, Chen H, Deng Y. Simultaneous determination of catechins, phenolic acids and caffeine in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 2002; 57: 307–16.

Zyzak D V, Sanders R A, Stojanovic M, Tallmadge D H, Eberhart B L, Ewald D.K. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem* 2003; 51:4782-7.

ANNEXES

ANNEXE A1 : Les chromatogrammes des différents échantillons de café obtenus par HPLC- UV-visible (Schimadzu, Université de Guelma).

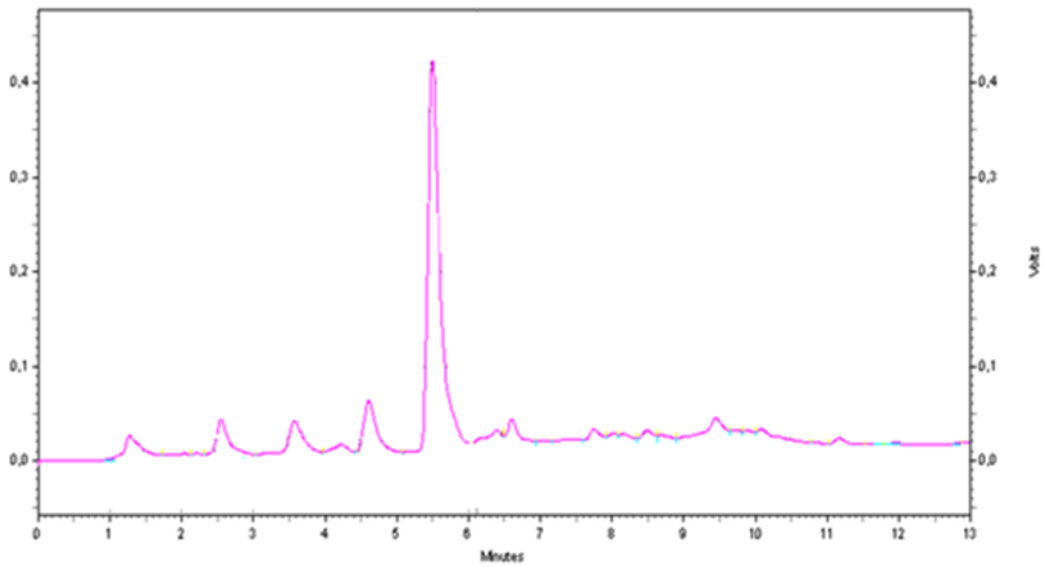


Figure 1 : Chromatogramme du café en vrac moulu (Robusta).

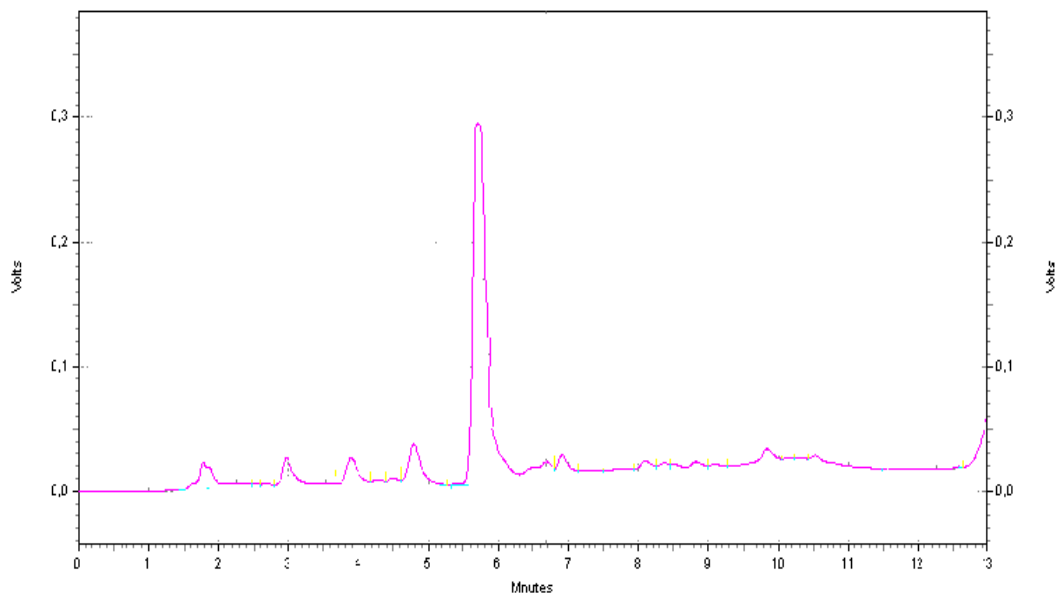


Figure 2: Chromatogramme du café en vrac moulu (Arabica).

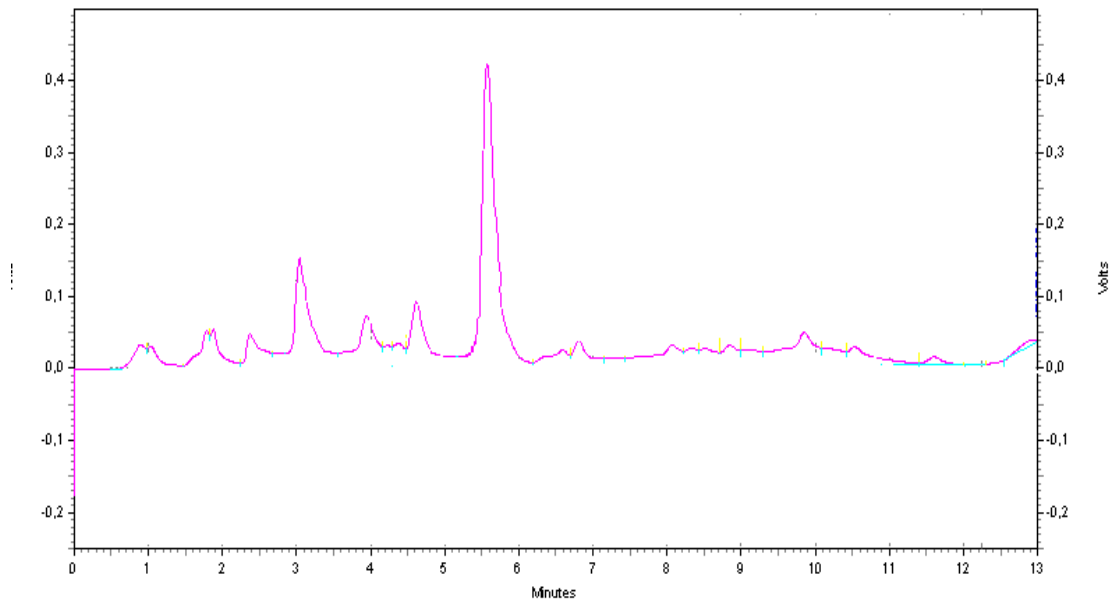


Figure 3 : Chromatogramme du café emballé (F).

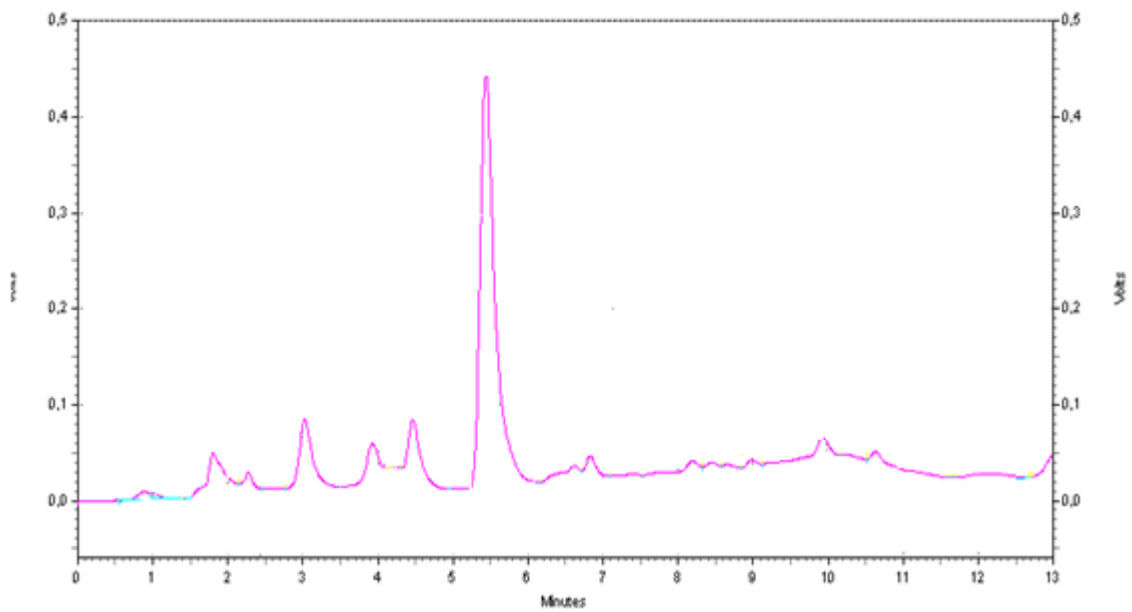


Figure 4: Chromatogramme du café emballé (G).

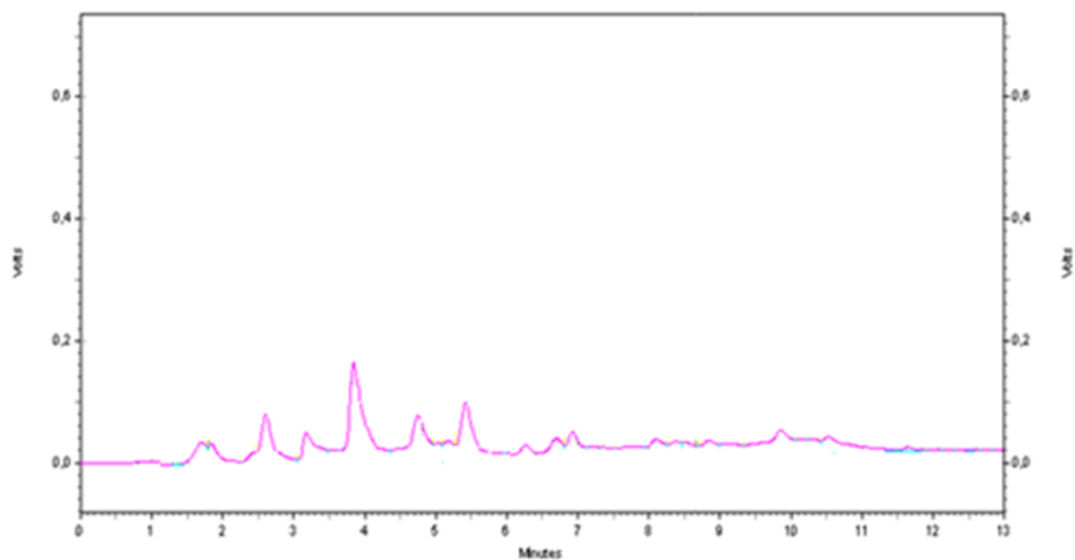


Figure 5 : Chromatogramme du café décaféiné.

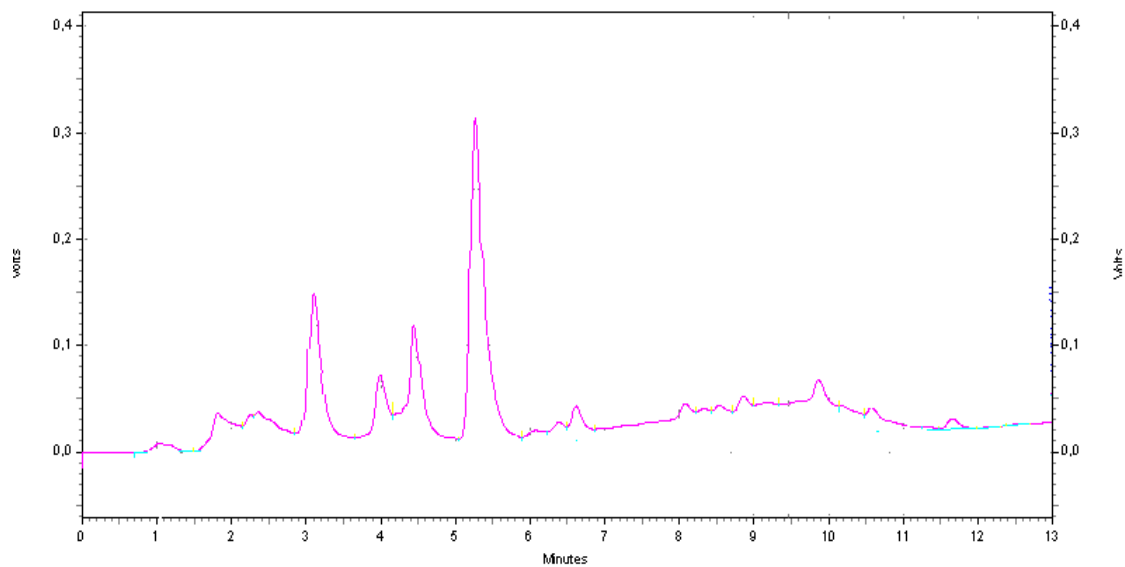


Figure 6 : Chromatogramme du café soluble.

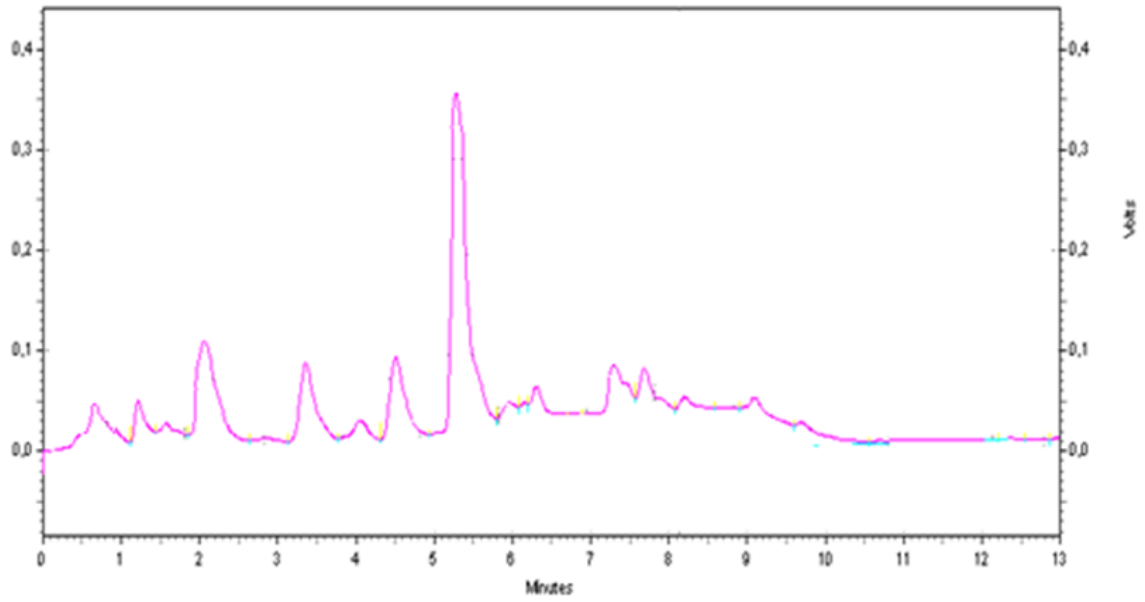


Figure 7 : Chromatogramme du café emballé (H).

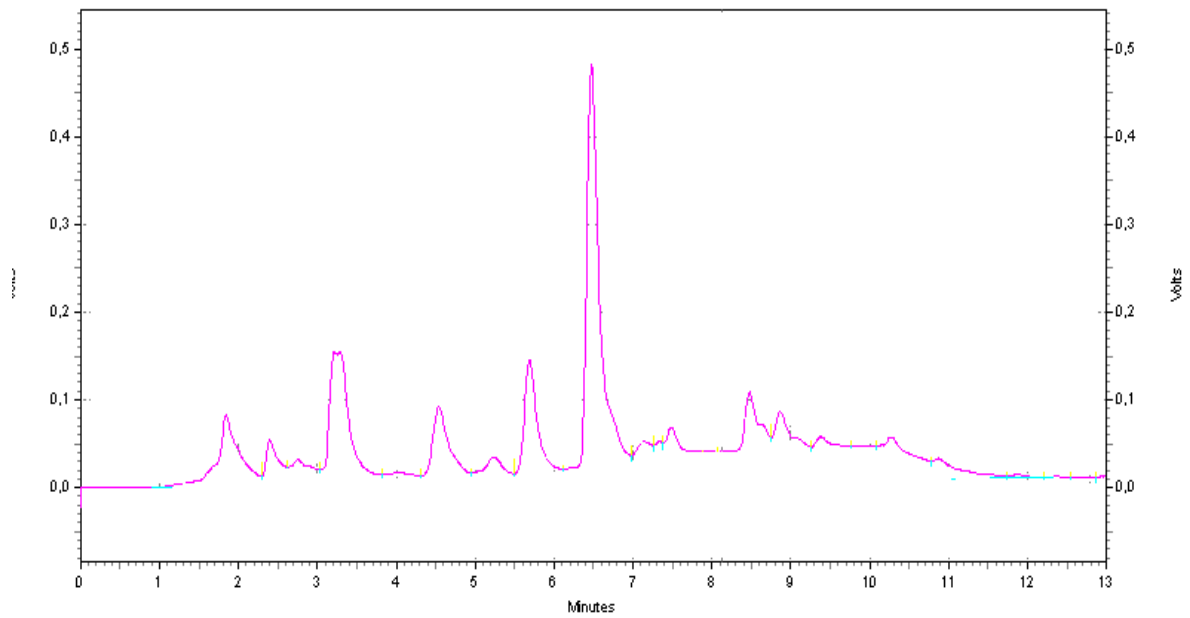


Figure 8 : Chromatogramme du café emballé (J).

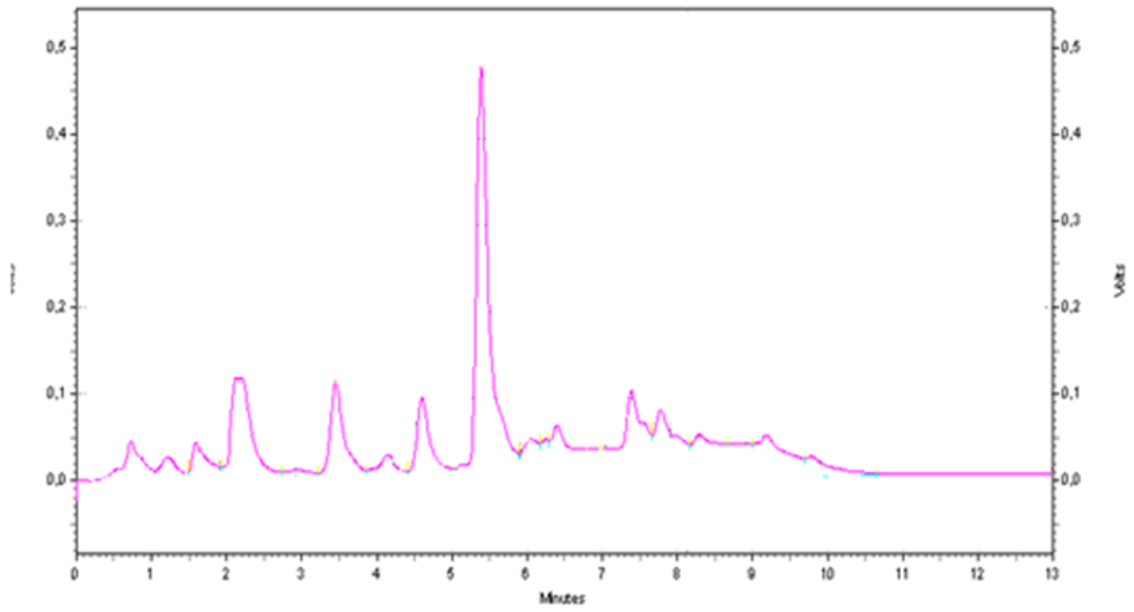


Figure 9 : Chromatogramme du café empaqueté (L).

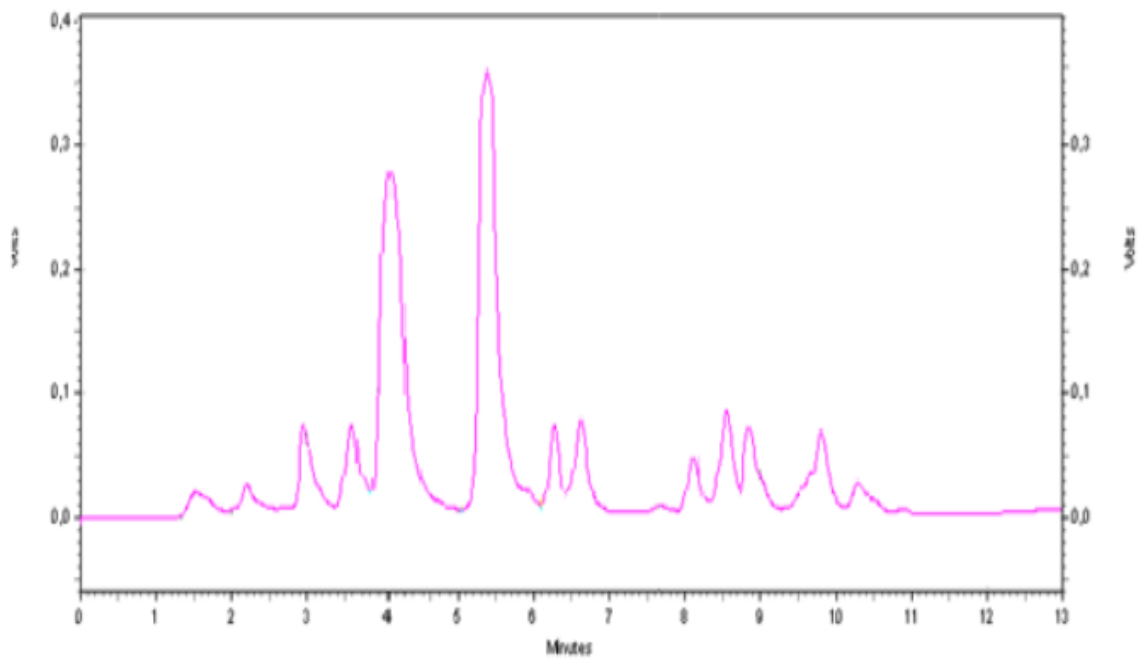


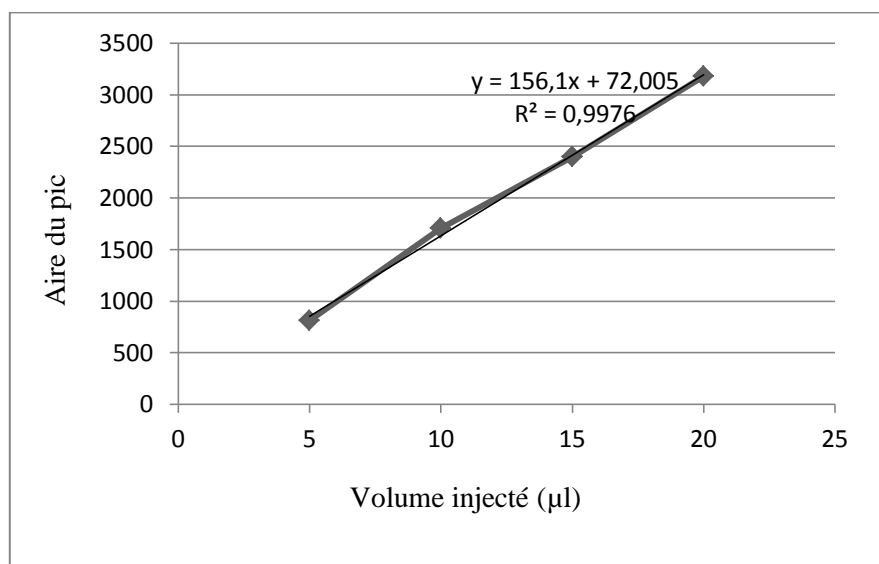
Figure 10: Chromatogramme du café vert à fines particules.

ANNEXE A2: Données chromatographiques, courbes étalons de la caféine et de de l'acide chlorogénique et chromatogrammes des différents échantillons des café boissons obtenus par HPLC- UV-DAD (Agilent, Université de Bordeaux, France).

- **Données chromatographiques de la caféine.**

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	809,65	811,40	810,15	810,40	0,9
10	1704,75	1703,99	1705,04	1704,59	0,5
15	3181,92	3180,87	3181,37	3181,38	0,5
20	2397,65	2396,79	2395,13	2396,52	1,3

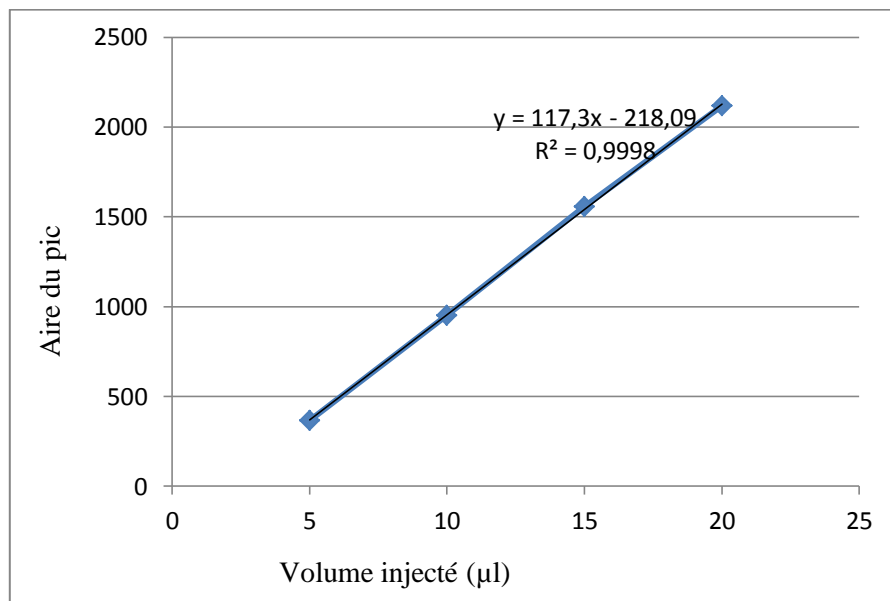
- **Caféine**



- **Données chromatographiques de l'acide chlorogénique (5-CQA).**

Volume injecté (µl)	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
5	366,84	367,40	365,15	366,46	1,17
10	950,84	949,99	951,15	950,66	0,60
15	2119,27	2121,04	2118,97	2119,76	1,11
20	1535,11	1536,19	1535,95	1535,75	0,57

- **Acide chlorogénique**



- **Chromatogrammes des échantillons de café étudiés**

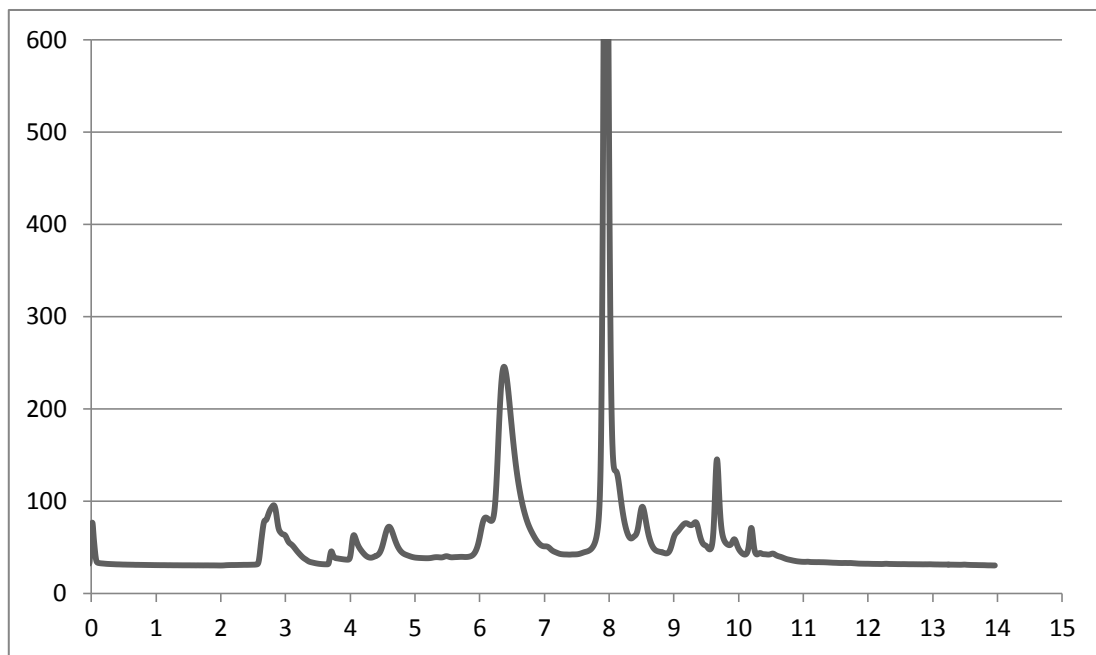


Figure 1: Chromatogramme du café non emballé (cafetière turc).

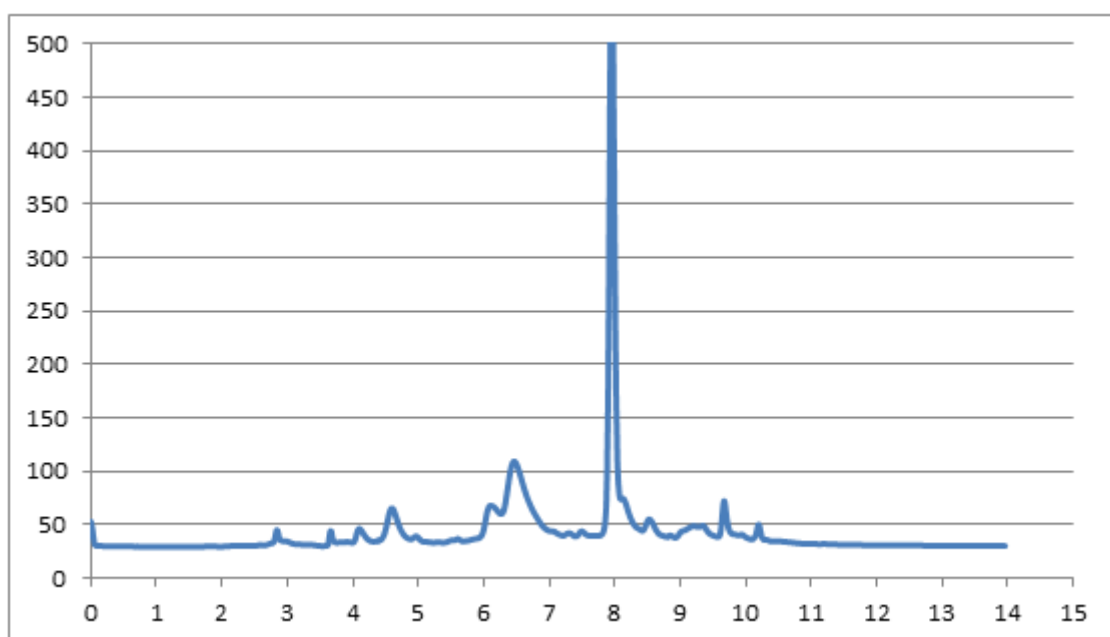


Figure 2: Chromatogramme du café non emballé (cafetière électrique).

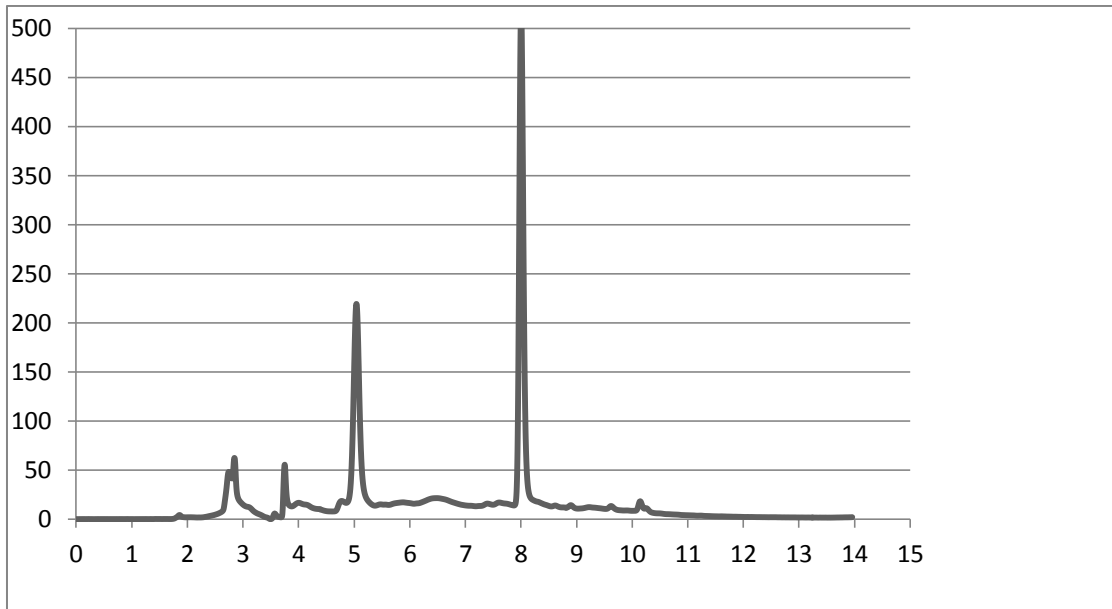


Figure 3: Chromatogramme du café empaqueté 1, (cafetière électrique).

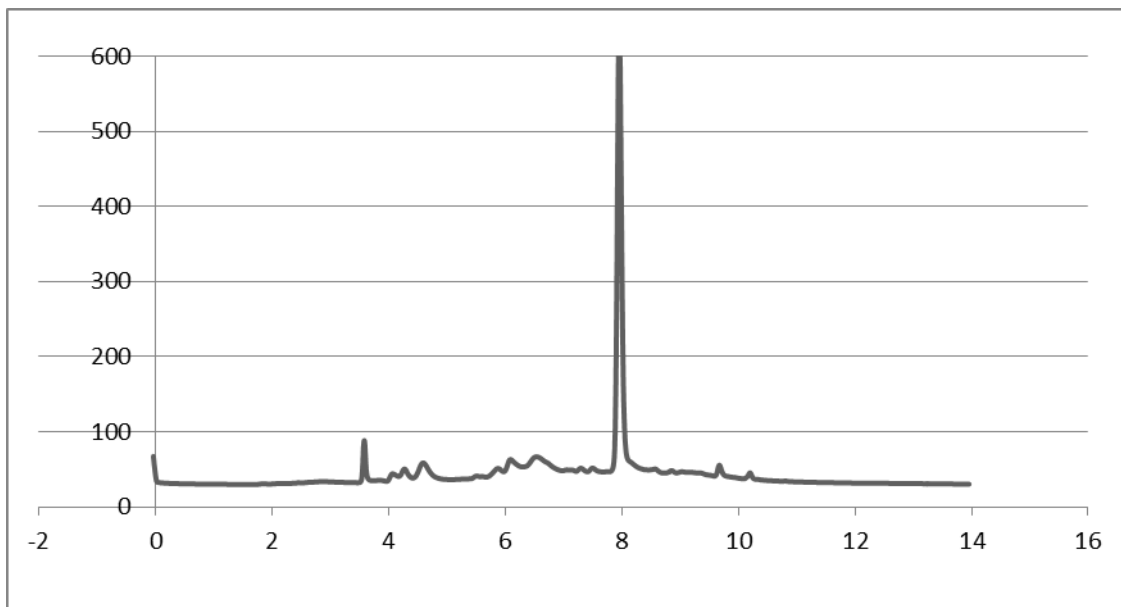


Figure 4: Chromatogramme du café empaqueté1, (cafetière turque).

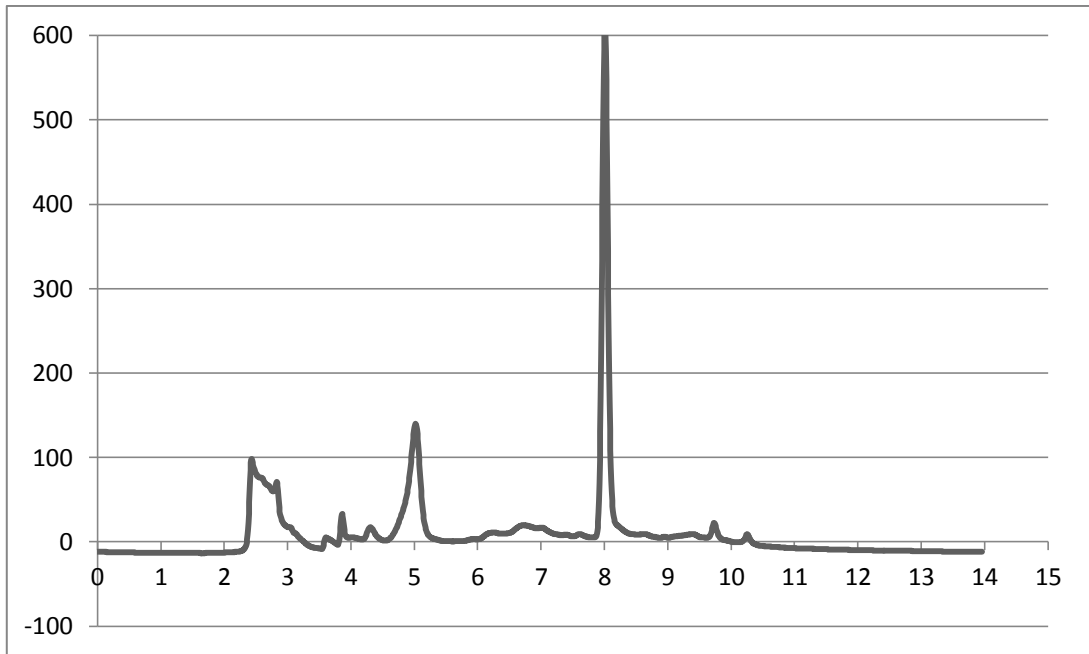


Figure 5: Chromatogramme du café empaqueté 3, (cafetière électrique).

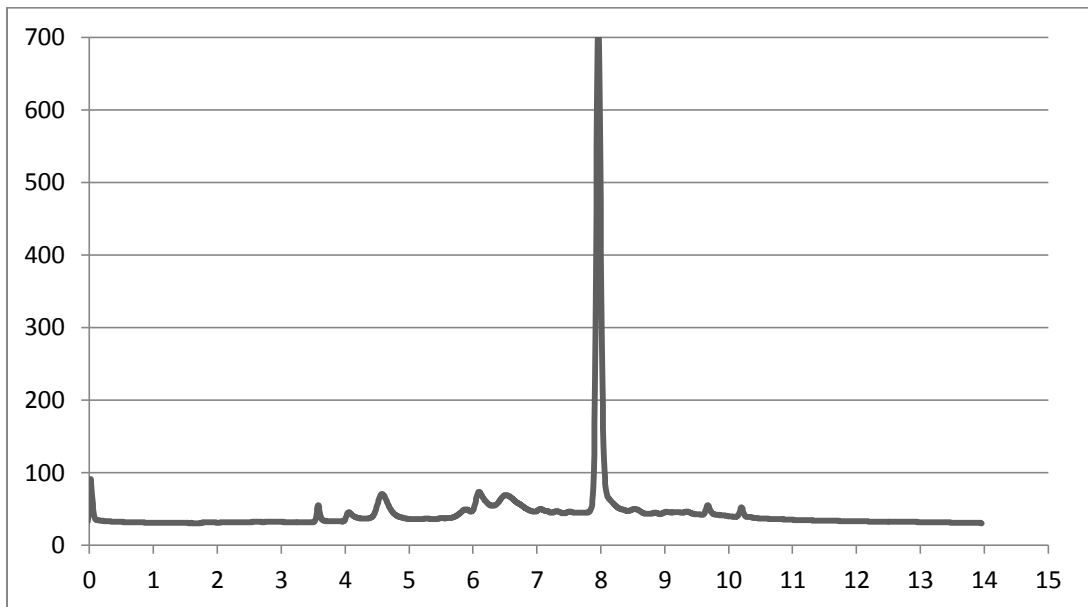


Figure 6: Chromatogramme du café empaqueté 3, (cafetière turque).

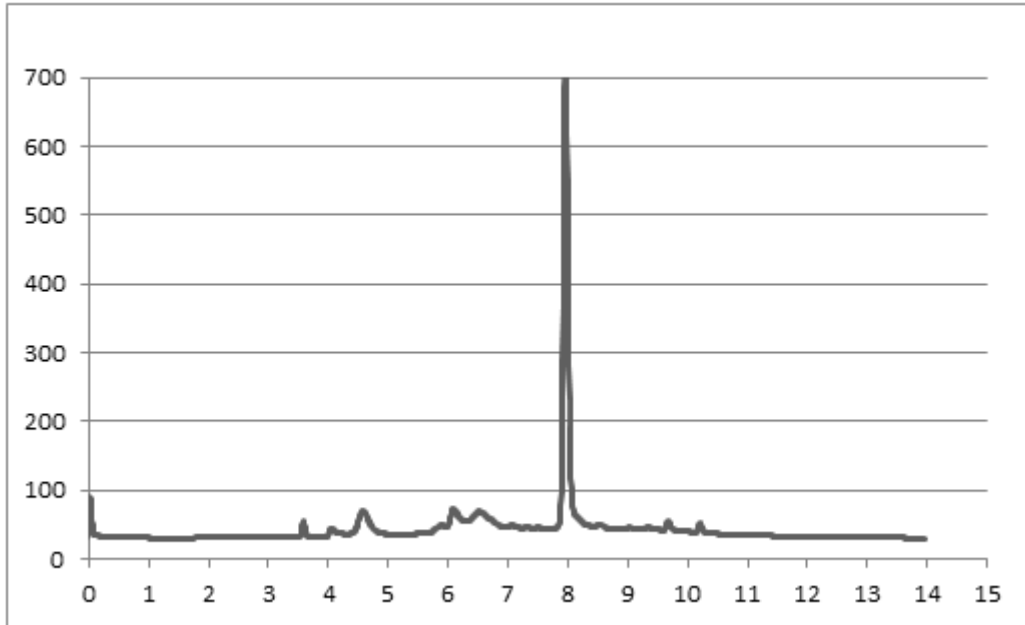


Figure 7: Chromatogramme du café emballé 5, (cafetière turque).

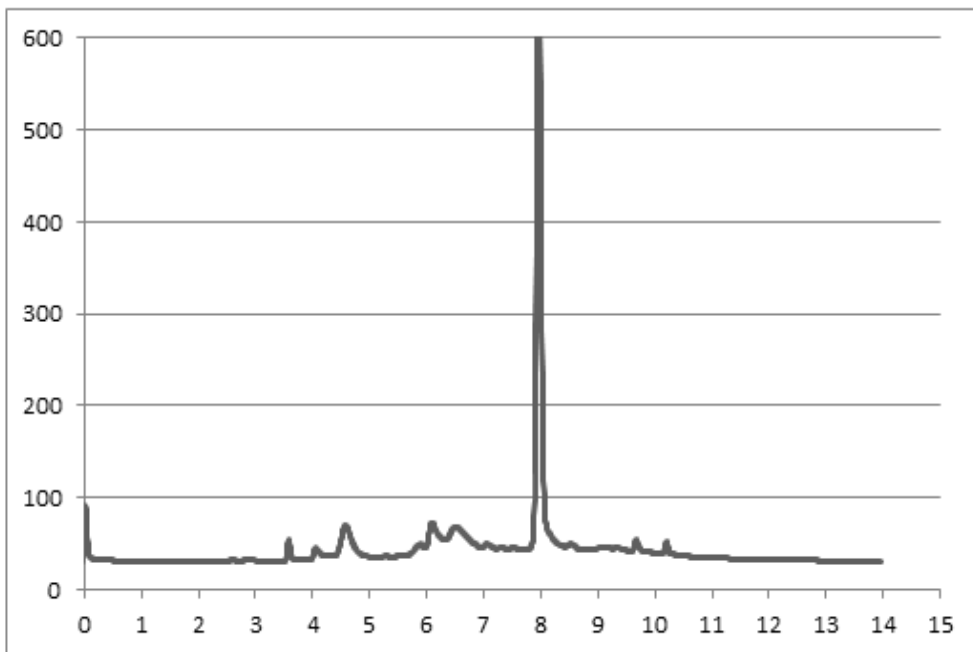
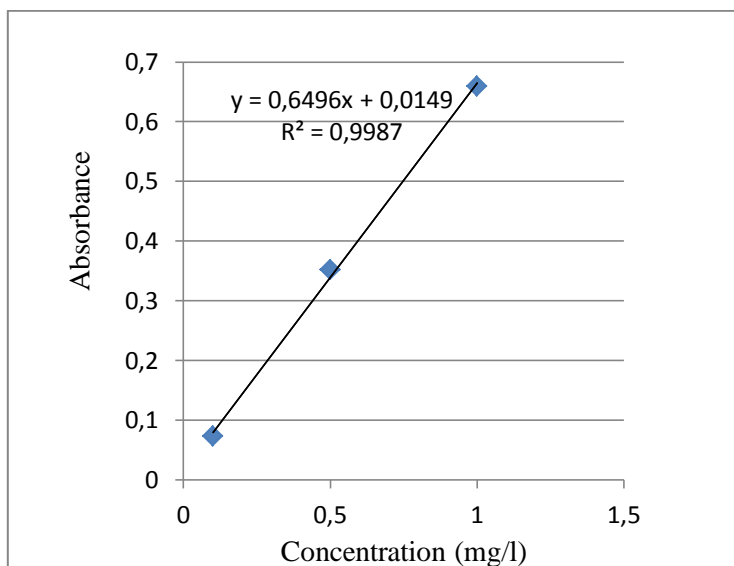


Figure 8: Chromatogramme du café emballé 5, (cafetière électrique).

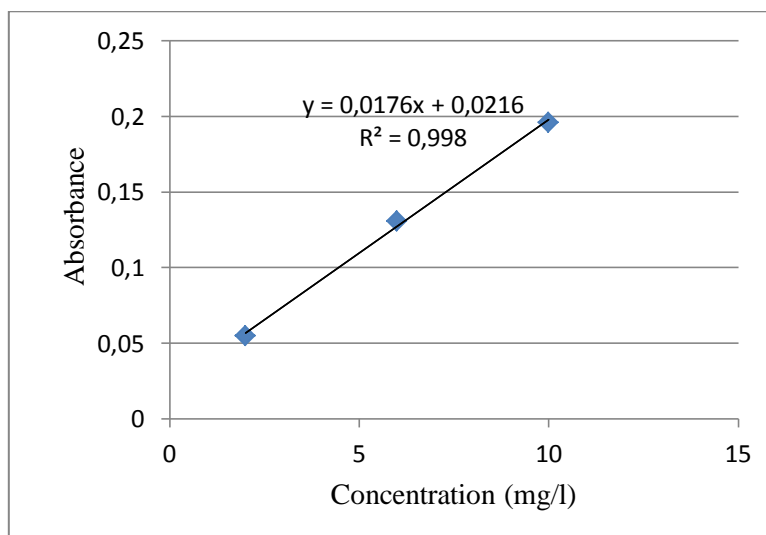
ANNEXE A3: courbes étalons obtenues par l'analyse par spectromètre d'absorption atomique (SAA) et par photomètre à émission atomique (PEA) du, Zn, Cr, Cu, Fe, K et Na.

1. Courbes étalons obtenues de l'analyse par spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) du, Zn, Cr, Cu et Fe.

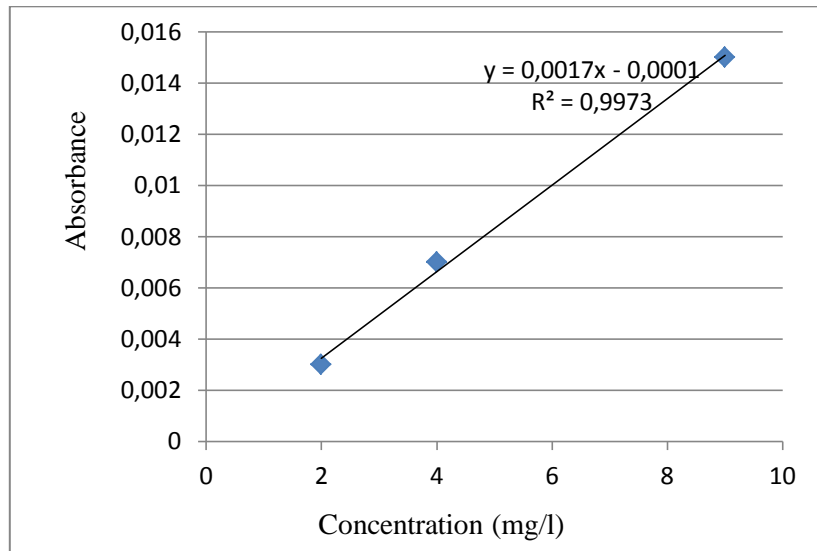
• **Zinc**



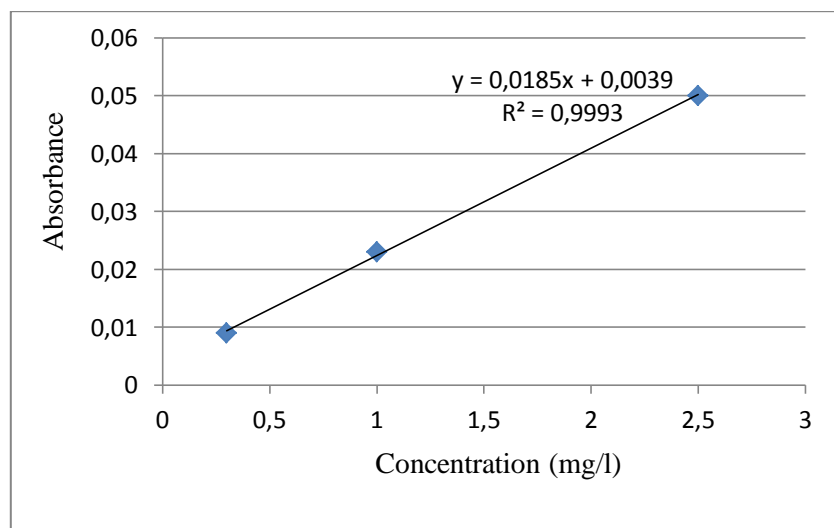
• **Chrome**



- *Cuivre*

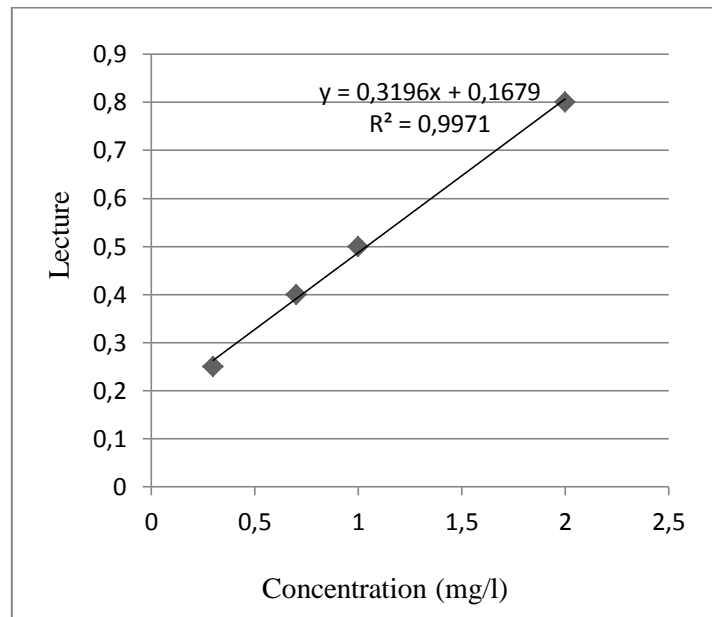


- *fer*

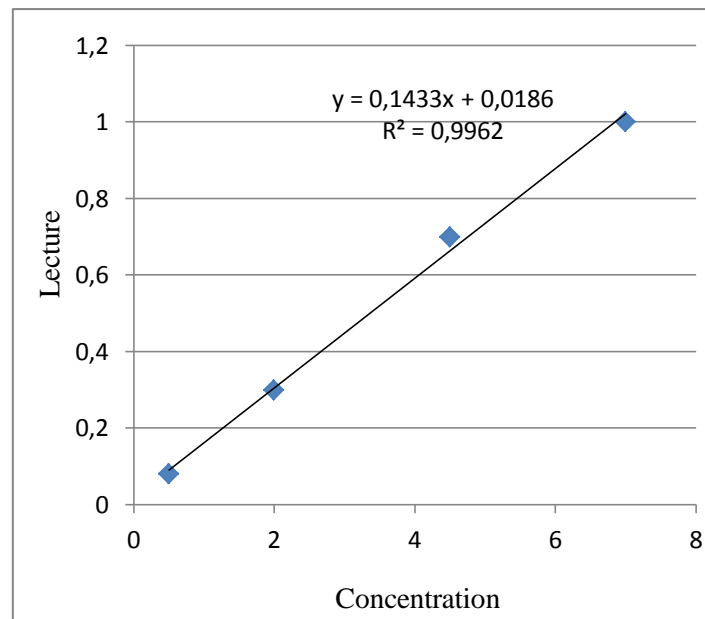


2. Courbes étalons obtenues par l'analyse par photométrie à flamme de K et Na.

- **Potassium**



- **Sodium**



Publications et communications relatives à ce travail

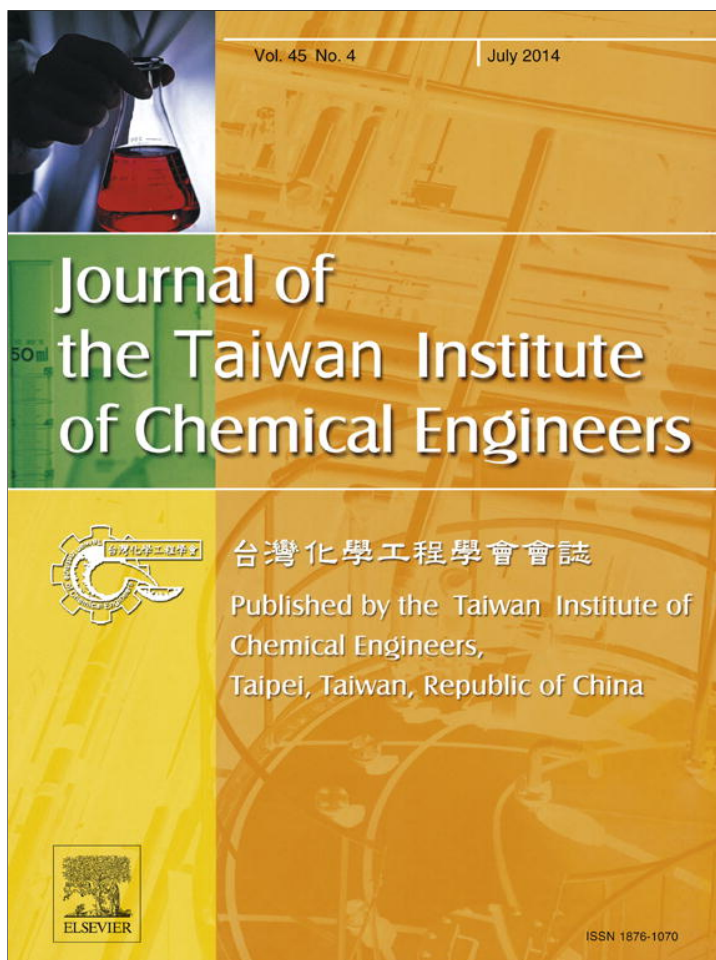
- **Publication**

K. Belguidoum, H. Amira-Guebailia *, Y. Boulmokh, O. Houache (2014) HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 45 (2014) 1314–1320.

- **Communications Internationales**

- 1- K. Belguidoum, H. Amira-Guebailia, Y. Boulmokh and O. Houache. (2014) Rapid sensitive and reproducible HPLC/UV-VIS Method for quantitative analysis of Polyphenols in different coffee samples, Nanotech MEET Tunisia, 24-26 April.
- 2- Y. Boulmokh, H. Amira-Guebailia, K. Belguidoum and O. Houache. (2014) Quantitative analysis of caffeine in various coffee brands of the Algerian market by high performance liquid chromatography, Nanotech MEET Tunisia, 24-26 April.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

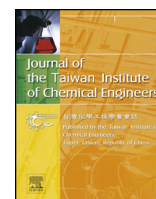
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtice

HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market

K. Belguidoum^a, H. Amira-Guebailia^{a,*}, Y. Boulmouk^a, O. Houache^b^a Laboratory of Applied Chemistry, Guelma University, 8 Mai 1945, Guelma 24000, Algeria^b Petroleum & Chemical Engineering Department, Sultan Qaboos University, P.O. Box 33, AlKhoud 123, Muscat, Oman

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2013
Received in revised form 20 March 2014
Accepted 23 March 2014
Available online 18 April 2014

Keywords:

Caffeine
Coffee
Polyphenols
Phenolic acids
Catechin
HPLC

ABSTRACT

HPLC coupled to UV–vis detection was used for the analysis of eight phenolic acids, three flavonoids, and caffeine in sixteen coffee samples (roasted, green and instant) collected from the Algerian market. The following parameters were taken into account for coffee analyses: packaging, roasting degree, grain size, instantaneity, and decaffeination.

The total polyphenols and caffeine levels in coffee extracts were found to vary from 12.37 ± 0.55 to 200.08 ± 6.47 mg/l, and 38.00 ± 1.89 to 136.00 ± 6.45 mg/l, respectively.

Evaluation of chromatographic performance showed excellent reproducibility, resolution, selectivity, and reasonable peak symmetry. The limit of detection (LOD) ranged from 0.75 to 14.79 $\mu\text{g/l}$, while the limit of quantification (LOQ) ranged from 2.26 to 44.44 $\mu\text{g/l}$. The separation of all compounds was achieved within 13 min.

© 2014 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coffee is one of the most consumed beverages in the world [1,2]. Therefore, research studies on coffee constituents are taking place on a continuous basis to examine the relationship between coffee consumption and a range of medical conditions [3].

The main coffee secondary metabolites are alkaloids, such as caffeine occurring also in some other popular beverages such as tea [4], and acting as a stimulant of both heart and central nervous system, decreasing sleepiness and increasing the attention. Caffeine is also known to increase blood pressure [5]. It also increases the content of homocysteine in the plasma blood about 2 $\mu\text{mol/l}$ [6].

Coffee also contains polyphenols, mainly chlorogenic acids (CGA) such as caffeic, ferulic and p-coumaric acids [7,8]. They play an important role in the quality and flavors of coffee [9]. Moreover, they possess antioxidant and anticancer activities [10–13]. Cohort studies revealed a substantially lower risk of type 2 diabetes mellitus with frequent coffee intake.

This activity was observed with normal coffee as well as decaffeinated one, indicating that caffeine is not the only molecule which could have antidiabetic activity [14]. Moreover, a series of experiments reported by Scalbert et al. [15] showed that two coffee polyphenols, caffeic and ferulic acids, reduce cholesterol levels by helping its transport from the macrophage foam cells to the liver, where it is processed for elimination. Coffee polyphenols were also reported to modulate the whole-body substrate oxidation and suppress postprandial hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia [16]. Ota et al. [17] and Murase et al. [18] found that long term ingestion of coffee polyphenols reduce body fat in human.

Despite these beneficial effects of coffee, it has to be consumed with moderation to avoid undesired effects such as nervousness, jitteriness, and anxiety related especially to the presence of caffeine [19].

Caffeine and polyphenols contents in commercial coffee may be highly influenced, not only by coffee beans species, variety, and geographical origin but also, by roasting conditions [20–22]. Therefore, simultaneous determination of these components both before and after coffee processing should be a useful tool for quality control and for monitoring of coffee roasting conditions.

The aim of this study was the simultaneous determination of polyphenols (phenolic acids and flavonoids) and caffeine in sixteen

* Corresponding author. Tel.: +213 795 164 562.

E-mail address: amira_h_g@yahoo.co.uk (H. Amira-Guebailia).

coffee samples (roasted, green and instant) collected from the Algerian market using an HPLC method with UV–vis detection [23].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All solvents used for analytical chromatography were of HPLC grade. Those used for extraction were of a purity >99%. Water was distilled and filtered. Methanol, acetonitrile, phosphoric acid, and caffeine were purchased from Sigma–Aldrich (Sigma, Germany). Phenolic acids: gallic, chlorogenic, caffeic, p-coumaric, ferulic, sinapic, cinnamic and methoxycinnamic; flavonoids: quercetin, rutin and catechin have been provided by the GESVAB group (University Bordeaux 2, France).

The standard molecules were of purity greater than 97%. The stock solutions prepared were stored at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

2.2. Apparatus

The analytical procedure was performed using a Shimadzu HPLC apparatus (Tokyo, Japan) equipped with a Nucleosil-100 C8 column (CS-chromatography Service GMBH, Germany) (125 mm \times 4.6 mm ID, 5 μm particle size) (CS-chromatography Service GMBH, Germany). The apparatus is equipped with a UV–vis detector (model SPD-10Avp), a dual solvent pump (model LC-10Avp) and an injection valve (model EIG 001), a system controller (SCL-10Avp), a 20 μl injection loop, and an on-line solvent degasser (DGU-14A). The whole system was monitored by class-Vp 5 software. The column was maintained at room temperature, the flow rate was set at 1 ml/min. The detection of compounds was performed at 280 and 310 nm.

2.3. Coffee samples

Different coffee brands (packaged, pure unpackaged and instant) were purchased from a local market at Guelma town (east of Algeria) and used in this study, six samples of each brand was analyzed. Seven brands of packaged milled coffee, three instant coffees and a decaffeinated instant coffee were analyzed. Three samples of roasted unpackaged and two samples of green unroasted coffee beans were manually ground and used for analysis. These coffee samples are mainly composed of pure Robusta and Arabica or blends of both of them.

After grinding, green unroasted coffee beans were separated in two samples in accordance with grain size.

Roasted unpackaged coffee beans were separated, before grinding, in two samples, according to grain size. Smaller grains were darker than the larger ones, which means that the former have undergone deeper roasting. Both samples were milled and analyzed separately.

2.4. HPLC analyses

2.4.1. Preparation and injection of standards

1 mg of each compound was dissolved in 1 ml of 50% methanol and injected in triplicate in the HPLC apparatus. The calibration curves of standards were linear with regression coefficients greater than 0.98. The concentration of each component in coffee samples was calculated using the regression equation of the best adjustment line drawn using Microsoft Excel 2010.

2.4.2. Preparation and injection of coffee extracts

The extraction protocol was based on the conditions previously optimized by Rostagno et al. [24]. In short, 0.5 g of each coffee sample were extracted with 15 ml of 50% methanol/water,

Table 1
Analytical HPLC gradient used.

Time (min)	% A	% B
0	85	15
5	63	37
10	20	80
11	0	100
12	0	100
13	85	15

followed by 15 ml of 75% methanol/water, and finally with 15 ml of 100% methanol. Extraction was performed on a multi-frequency ultrasound bath [10,25,26], operating at 25 kHz for 20 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. After each extraction step, the sample is centrifuged for 10 min at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a velocity of 4000 rpm using a universal centrifuge. The supernatant was collected and the solid residue was subjected to the next extraction step. After the final extraction, the supernatants were combined, and water was added to obtain a final volume of 100 ml. 20 μl of the obtained extract was filtered and injected into the HPLC apparatus. Analyses were performed in triplicate.

2.4.3. HPLC gradient

A binary gradient elution (Table 1) was used. The mobile phase was as follows: 1% phosphoric acid in water (solvent A) and 1% phosphoric acid in acetonitrile (solvent B). The flow rate was systematically controlled and set at 1 ml/min.

2.4.4. Analytical method validation

The limit of detection (LOD) was determined considering a value three times the standard deviation of the background noise obtained from blank samples (solvent; methanol), divided by the slope of the calibration curve. The limit of quantification (LOQ) was determined considering a value 10 times the standard deviation of the background noise, obtained from noise samples divided by the slope of the calibration curve. The limit of detection (LOD) ranged from 0.75 to 14.79 $\mu\text{g/l}$, while the limit of quantification (LOQ) ranged from 2.26 to 44.44 $\mu\text{g/l}$ (Table 2a).

The recovery capacities of the method were assessed in quadruplicate by spiking coffee extracts with three different concentrations of pure standards (phenolic compounds and caffeine) (0.5, 0.7 and 1.0 mg/100 g). The average recovery was greater than 98% for all molecules (Table 2b).

3. Statistical analysis

The elution of each standard molecule and extract was performed in triplicate. Data were expressed as means \pm standard standard errors of three separate experiments. Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) from Microsoft Excel 2010.

4. Results and discussion

Concentrations of chlorogenic, caffeic, coumaric, ferulic, cinnamic, methoxycinnamic, sinapic and gallic acids as well as quercetin, rutin, catechin, and caffeine (Fig. 1) were determined by HPLC in different varieties of roasted and unroasted coffee samples. The separation of compounds was achieved within 13 min. Quantitation was by peak area comparison with standards. The correlation coefficients were always higher than 0.98.

The concentrations (mg/l) of analyzed compounds are summarized in Tables 3a and 4a and the concentrations in mg/100 g (dry weight), are presented in Tables 3b and 4b.

Table 2a

Chromatographic parameters of the proposed analytical method.

Component	RT	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LOQ ($\mu\text{g/l}$)
Gallic acid	1.80	14.79	44.44
Coumaric acid	7.91	1.67	5.00
Ferulic acid	8.54	4.34	13.04
Sinapic acid	8.78	2.74	8.22
Cinnamic acid	6.38	0.75	2.26
Methoxycinnamic acid	9.76	5.34	15.96
Caffeic acid	6.75	5.72	17.32
Chlorogenic acid	4.70	1.65	5.00
Caffeine	5.95	1.90	5.70
Catechin	3.99	2.36	7.14
Rutin	7.40	7.95	23.89
Quercetin	9.37	2.44	7.32

RT, retention time (min); LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

Table 2bRecovery of the proposed analytical method at three different spike levels of standard compounds in ground coffee. Coffee extracts were prepared from green and roasted ground coffee (Robusta). Values are presented as mean \pm standard deviation.

Compound	Spike level (mg/100g)	n	Recovery (%)	
			Roasted extract	Green extract
Caffeine	0.5	4	102.3 \pm 4.2	98.8 \pm 1.6
	0.7	4	100.6 \pm 3.7	105.2 \pm 2.4
	1.0	4	98.7 \pm 4.0	107.2 \pm 2.0
Catechin	0.5	4	105.3 \pm 5.1	99.3 \pm 1.0
	0.7	4	99.0 \pm 1.4	102.0 \pm 2.7
	1.0	4	98.2 \pm 1.0	98.7 \pm 1.3
Gallic acid	0.5	4	110.0 \pm 4.7	114.1 \pm 4.6
	0.7	4	117.9 \pm 4.5	119.0 \pm 4.4
	1.0	4	101.7 \pm 2.2	106.2 \pm 2.3
Chlorogenic acid	0.5	4	109.6 \pm 1.0	98.9 \pm 1.2
	0.7	4	107.0 \pm 4.0	99.6 \pm 1.9
	1.0	4	106.5 \pm 2.4	109.7 \pm 2.4
Caffeic acid	0.5	4	98.1 \pm 1.0	99.1 \pm 1.2
	0.7	4	99.8 \pm 1.2	105.7 \pm 3.7
	1.0	4	104.5 \pm 2.0	106.3 \pm 4.6
Cinnamic acid	0.5	4	102.0 \pm 4.7	103.2 \pm 2.7
	0.7	4	110.0 \pm 3.2	105.0 \pm 3.2
	1.0	4	102.7 \pm 4.6	98.6 \pm 1.6
Ferulic acid	0.5	4	109.6 \pm 4.1	103.4 \pm 3.0
	0.7	4	104.4 \pm 1.7	108.0 \pm 5.0
	1.0	4	106.3 \pm 3.6	107.2 \pm 3.1
Methoxy-cinnamic acid	0.5	4	98.5 \pm 0.4	99.5 \pm 2.9
	0.7	4	103.0 \pm 3.2	109.5 \pm 3.4
	1.0	4	99.3 \pm 1.6	102.7 \pm 2.6

Fig. 2 shows the chromatograms of unroasted green, roasted unpackaged (Arabica) and roasted packaged coffee samples.

We must point out that p-coumaric and sinapic acids as well as rutin, and quercetin were not detected in studied coffee samples.

Roasted milled (packaged or not) and instant coffee samples present a phytochemical profile similar to that of green coffee, but with relatively lower concentrations.

4.1. Caffeine content in coffee samples

The amount of caffeine varied considerably within studied samples. Caffeine was the predominant compound in all samples, except for the decaffeinated one whose caffeine concentration was the lowest [27,28]. It was also noticed that caffeine content in Arabica variety samples is lower than that of Robusta ones; this result is in full concordance with literature [29,30]. Moreover,

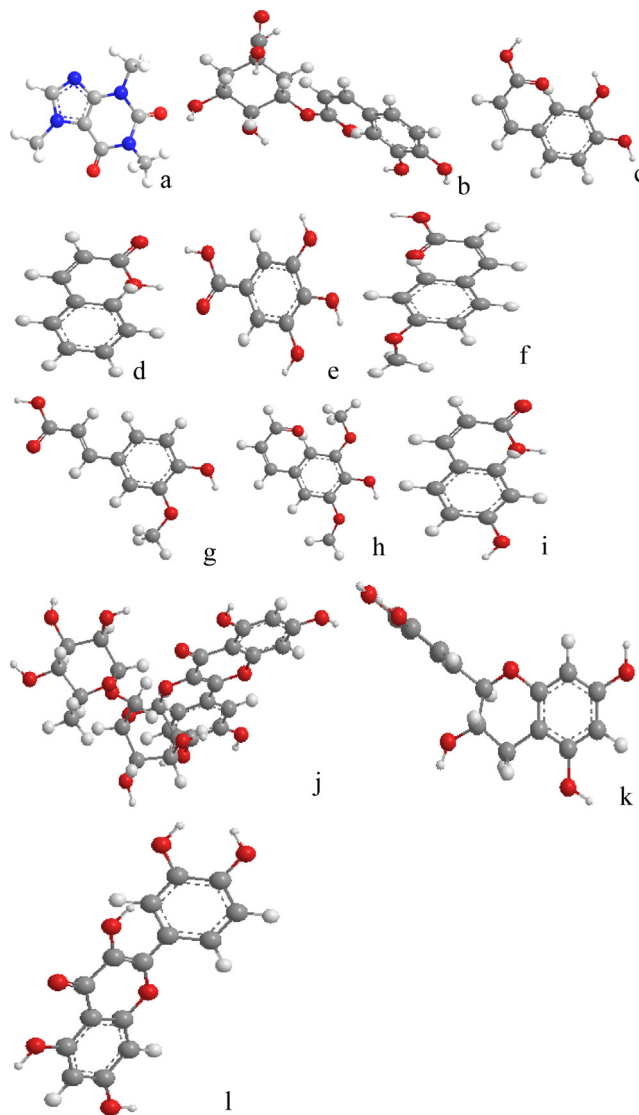


Fig. 1. Structure of studied molecules: (a) caffeine, phenolic acids; (b) chlorogenic; (c) caffeic; (d) cinnamic; (e) gallic; (f) methoxycinnamic; (g) ferulic; (h) sinapic; (i) p-coumaric, flavonoids; (j) rutin; (k) catechin; and (l) quercetin.

levels of caffeine in packaged coffee samples were close to those of unpackaged ones. Moreover, caffeine content in instant coffee samples, ranging from 69.70 ± 1.61 mg/l to 77.50 ± 0.78 mg/l, are close to that in insoluble ones, because instant coffee is obtained by a freeze-drying process having no influence on coffee composition [31,32]. The amount of caffeine in decaffeinated coffee sample is 1.85 ± 0.20 mg/l.

4.2. Polyphenols content in coffee samples

It's worth noting that conjugated phenols are usually the predominated polyphenol species in coffee (such as 3-caffeoylquinic acid, 1-feruloylquinic acid, 3-p-coumaroylquinic acid, etc.) and ultrasound irradiation may accelerate the hydrolysis of conjugate compounds under certain conditions, it's the reason for which free phenolic acids are found in substantial amounts in coffee.

In our study, the multiple steps extraction procedure (15%, 75% and finally 100% MeOH) using ultrasound at 60°C allowed the maximum recovery of coffee metabolites, this is in agreement with results reported by Zuo et al. [4] and Jiao and Zuo [26] who used

Table 3

Concentration of phenolic acids in mg/l (a) and in mg/100 g DW (b), in green and roasted commercial coffee samples, using the proposed analytical method.

Coffee sample	Species	Gallic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Cinnamic acid	Ferulic acid	Methoxy-cinnamic acid
<i>(a)</i>							
Green coffee samples							
A	Robusta	9.50 ± 0.02	140.75 ± 2.70	17.97 ± 1.32	3.01 ± 0.01	10.60 ± 1.15	16.75 ± 1.20
B		7.40 ± 0.01	91.00 ± 0.28	8.45 ± 0.65	1.19 ± 0.01	3.07 ± 0.01	9.95 ± 0.30
Unpackaged roasted coffee samples							
C	Robusta	5.30 ± 0.01	75.86 ± 1.23	8.35 ± 1.33	1.96 ± 0.01	5.37 ± 0.01	7.00 ± 1.06
D	Arabica	3.80 ± 0.06	59.45 ± 2.03	4.07 ± 0.94	1.36 ± 0.05	2.95 ± 0.01	5.50 ± 1.32
E	Robusta	nd	05.05 ± 0.45	nd	nd	nd	nd
Packaged coffee samples							
F	Robusta	4.89 ± 0.01	65.69 ± 0.46	3.94 ± 0.71	1.90 ± 0.01	5.29 ± 0.03	6.50 ± 0.57
G	Blend	4.07 ± 0.03	63.64 ± 1.07	4.81 ± 0.13	1.76 ± 0.02	3.87 ± 0.01	5.46 ± 1.15
H	Robusta	5.04 ± 0.01	76.00 ± 0.22	3.01 ± 0.04	2.53 ± 0.14	5.09 ± 0.01	7.01 ± 0.14
I	Robusta	4.91 ± 0.08	70.76 ± 1.19	3.55 ± 0.98	2.01 ± 0.10	5.20 ± 0.07	6.87 ± 0.21
J	Blend	4.28 ± 0.03	62.64 ± 0.98	4.00 ± 0.34	1.19 ± 0.01	3.90 ± 0.01	5.75 ± 0.05
K	Robusta	4.55 ± 0.06	68.20 ± 1.76	3.60 ± 0.85	1.99 ± 0.05	5.25 ± 0.01	6.38 ± 0.10
L	Robusta	4.50 ± 0.04	67.45 ± 0.79	3.80 ± 0.01	1.54 ± 0.04	6.03 ± 0.01	7.15 ± 0.22
Instant coffee							
M	Blend	6.73 ± 0.01	75.32 ± 0.07	4.90 ± 0.03	2.44 ± 0.06	3.85 ± 0.01	6.00 ± 0.05
N	Blend	3.89 ± 0.04	60.00 ± 1.54	4.20 ± 0.06	1.50 ± 0.01	3.90 ± 0.05	5.45 ± 0.35
O	Blend	4.00 ± 0.08	60.12 ± 1.49	3.94 ± 0.01	1.15 ± 0.01	4.50 ± 0.01	5.03 ± 0.04
Decaffeinated coffee							
P	Blend	3.75 ± 0.05	65.00 ± 1.91	3.95 ± 0.05	2.50 ± 0.01	4.90 ± 0.01	5.44 ± 0.51
<i>(b)</i>							
Green coffee samples							
A	Robusta	190.0 ± 0.4	2815.0 ± 54.0	359.4 ± 26.4	60.2 ± 0.2	212.0 ± 23.0	335.0 ± 24.0
B		148.0 ± 0.2	1820.0 ± 5.6	169.0 ± 13.0	23.8 ± 0.2	61.4 ± 0.2	199.0 ± 6.0
Unpackaged roasted coffee samples							
C	Robusta	106.0 ± 0.2	1517.2 ± 24.6	167.0 ± 26.6	39.2 ± 0.2	107.4 ± 0.2	140.0 ± 21.2
D	Arabica	76.0 ± 1.2	1189.0 ± 40.6	81.4 ± 18.8	27.2 ± 1.0	59.0 ± 0.2	110.0 ± 26.4
E	Robusta	nd	101.0 ± 9.0	nd	nd	nd	nd
Packaged coffee samples							
F	Robusta	97.8 ± 0.2	1313.8 ± 9.2	78.8 ± 14.0	38.0 ± 0.2	105.8 ± 0.6	130.0 ± 11.4
G	Blend	81.4 ± 0.6	1272.8 ± 21.4	96.2 ± 2.6	35.2 ± 0.4	77.4 ± 0.2	109.2 ± 23.0
H	Robusta	100.8 ± 0.2	1520.0 ± 4.4	60.2 ± 0.8	50.6 ± 2.8	101.8 ± 0.2	140.2 ± 2.8
I	Robusta	98.2 ± 1.6	1415.2 ± 23.8	71.0 ± 19.6	40.2 ± 2.0	104.0 ± 1.4	137.4 ± 4.2
J	Blend	85.6 ± 0.6	1252.8 ± 19.6	80.0 ± 6.8	23.8 ± 0.2	78.0 ± 0.2	115.0 ± 1.0
K	Robusta	91.0 ± 1.2	1364.0 ± 35.2	72.0 ± 1.7	39.8 ± 1.0	105.0 ± 0.2	127.6 ± 2.0
L	Robusta	90.0 ± 0.8	1349.0 ± 15.8	76.0 ± 0.2	30.8 ± 0.8	120.6 ± 0.2	143.0 ± 4.4
Instant coffee							
M	Blend	134.6 ± 0.2	1500.0 ± 1.4	98.0 ± 0.6	48.8 ± 1.2	77.0 ± 0.2	120.0 ± 1.0
N	Blend	77.8 ± 0.8	1200.0 ± 30.8	84.0 ± 1.2	30.0 ± 0.2	78.0 ± 1.0	109.0 ± 7.0
O	Blend	80.0 ± 1.6	1202.4 ± 29.8	78.8 ± 0.2	23.0 ± 0.2	90.0 ± 0.2	100.6 ± 0.8
Decaffeinated coffee							
P	Blend	75.0 ± 1.0	1300.0 ± 38.2	79.0 ± 1.0	50.0 ± 0.2	98.0 ± 0.2	108.8 ± 10.2

nd, not detected. Values are mean ± standard deviation ($n=3$).

multiple extraction with 80% methanol and 70% ethanol, respectively and succeeded to extract the maximum metabolites.

Our results showed that chlorogenic acid level varied from 5.00 ± 0.45 to 140.75 ± 2.70 mg/l with the highest values found for green coffee samples. Chlorogenic acid concentration in unpackaged roasted Arabica coffee is 59.45 ± 2.03 mg/l, which is lower than that found for Robusta variety (75.86 ± 1.23 mg/l). This result is in agreement with literature [33]. In instant coffee samples, chlorogenic acid content varied from 60.00 ± 1.54 to 75.32 ± 0.07 mg/l, these values are markedly greater than those reported by Rostagno et al. for tea (7.0, 2.4, 1.2 mg/l for green, white and black tea, respectively).

Caffeic acid content ranged from 3.01 ± 0.04 to 17.97 ± 1.32 mg/l, with the highest value found for green coffee sample. For unpackaged Arabica coffee, caffeic acid concentration was 4.07 ± 0.94 mg/l, which is lower than that found for Robusta variety (8.35 ± 1.33 mg/l).

Gallic and ferulic acids concentrations varied from 3.75 ± 0.05 to 9.50 ± 0.02 mg/l and from 2.95 ± 0.01 mg/l to 10.60 ± 1.15 mg/l,

respectively. Values of gallic acid are closer to those found by Rostagno et al. [24] for green, white and black teas but remain very low compared to those reported by Zuo et al., for Chinese tea [4].

Cinnamic and methoxycinnamic acids are among the main coffee polyphenols [7,8,34], their concentrations ranged from 1.15 ± 0.01 to 3.01 ± 0.01 mg/l and from 5.03 ± 0.04 to 16.75 ± 1.20 mg/l, respectively, with the highest value found for green coffee sample.

Among the flavonoids analyzed in this study, only catechin was detected, its content varied from 0.99 ± 0.04 to 7.32 ± 0.10 mg/l with the lowest values found for unroasted coffee samples. This is in agreement with the results found by Hečimović et al. [35]. These values are considered to be very low compared to amounts found in Chinese tea [4].

Finally, total polyphenols, determined as the sum of individual amounts of each polyphenol varied from 12.37 ± 0.55 mg/l (highly roasted sample) to 200.08 ± 6.47 mg/l in green unroasted coffee.

Table 4
Caffeine, catechin, and total polyphenols content (TPC) in mg/l (a) and in mg/100 g DW (b) in green and commercial coffee samples, using the proposed analytical method.

Coffee sample	Species	Caffeine	Catechin	Total polyphenols
<i>(a)</i>				
Green coffee samples				
A	Robusta	136.00 ± 6.45	1.50 ± 0.07	200.08 ± 6.47
B		95.02 ± 1.36	0.99 ± 0.04	122.05 ± 1.30
Unpackaged roasted coffee samples				
C	Robusta	85.00 ± 1.05	5.20 ± 0.13	109.04 ± 3.78
D	Arabica	49.81 ± 0.40	2.75 ± 0.25	79.88 ± 4.66
E	Robusta	38.00 ± 1.89	7.32 ± 0.10	12.37 ± 0.55
Packaged roasted coffee samples				
F	Robusta	76.00 ± 4.01	4.55 ± 0.02	92.76 ± 1.81
G	Blend	69.53 ± 2.29	3.05 ± 0.08	86.66 ± 2.49
H	Robusta	72.00 ± 5.73	4.97 ± 0.01	103.65 ± 0.57
I	Robusta	74.50 ± 5.08	5.66 ± 0.01	98.96 ± 2.64
J	Blend	81.20 ± 4.52	3.34 ± 0.06	85.10 ± 1.48
K	Robusta	63.46 ± 3.47	4.73 ± 0.05	94.70 ± 2.88
L	Robusta	60.00 ± 1.87	5.10 ± 0.05	95.57 ± 1.16
Instant coffee				
M	Blend	70.20 ± 4.40	4.00 ± 0.01	103.24 ± 0.24
N	Blend	77.50 ± 0.78	2.89 ± 0.03	81.83 ± 2.08
O	Blend	69.70 ± 1.61	3.47 ± 0.01	82.21 ± 1.65
Decaffeinated coffee				
P	Blend	1.85 ± 0.20	3.35 ± 0.02	88.89 ± 2.56
<i>(b)</i>				
Green coffee samples				
A	Robusta	2720.0 ± 129.0	30.0 ± 1.4	4001.6 ± 129.4
B		1900.4 ± 27.2	19.8 ± 0.8	2441.0 ± 26.0
Unpackaged roasted coffee samples				
C	Robusta	1700.0 ± 21.0	104.0 ± 2.6	2180.8 ± 75.6
D	Arabica	996.3 ± 8.0	55.0 ± 5.0	1597.6 ± 93.2
E	Robusta	760.0 ± 37.8	146.4 ± 2.0	247.4 ± 11.0
Packaged coffee samples				
F	Robusta	1520.0 ± 80.2	91.0 ± 0.4	1855.2 ± 36.2
G	Blend	1390.6 ± 45.8	61.0 ± 1.6	1733.2 ± 49.8
H	Robusta	1440.0 ± 114.6	99.4 ± 0.2	2073.0 ± 11.4
I	Robusta	1490.0 ± 101.6	113.2 ± 0.2	1979.2 ± 52.8
J	Blend	1624.0 ± 90.4	66.8 ± 1.2	1702.0 ± 29.6
K	Robusta	1269.2 ± 69.4	94.6 ± 1.0	1894.0 ± 57.6
L	Robusta	1200.0 ± 37.4	102.0 ± 1.0	1911.4 ± 23.2
Instant coffee				
M	Blend	1404.0 ± 88.0	80.0 ± 0.2	2064.8 ± 4.8
N	Blend	1550.0 ± 15.6	59.6 ± 0.6	1636.6 ± 41.6
O	Blend	1394.0 ± 32.2	69.4 ± 0.2	1644.2 ± 33.0
Decaffeinated coffee				
P	Blend	37.0 ± 4.0	67.0 ± 0.4	1777.8 ± 51.2

nd, not detected. Values are mean ± standard deviation ($n=3$).

4.3. Effect of coffee particle size on the concentration of analyzed compounds

The effect of particle size was studied for unroasted green coffee sample. In this study, milled green coffee was separated using two sieves with annular mesh sizes of 0.75 and 0.25 mm, respectively.

Table 5
Caffeine and phenolic acids content (mg/l) in finely (FGC) and coarse ground coffee samples (CGC).

Compound	FGC	CGC
Caffeine	136.00 ± 6.45	95.02 ± 1.36
Chlorogenic acid	140.75 ± 2.70	91.00 ± 0.28
Caffeic acid	17.97 ± 1.32	8.45 ± 0.65
Gallic acid	9.50 ± 0.02	7.40 ± 0.01
Ferulic acid	10.60 ± 1.15	3.07 ± 0.01
Cinnamic acid	3.01 ± 0.01	1.19 ± 0.01
Methoxycinnamic acid	16.75 ± 1.20	9.95 ± 0.30

Concentrations of all analyzed compounds were higher in samples with fine grain size than those of large one, because the smaller the grains size the better the secondary metabolites extraction [36].

Hence, the highest concentrations of caffeine (136.00 ± 6.45 mg/l), phenolic acids; chlorogenic (140.75 ± 2.70 mg/l), caffeic (17.97 ± 1.32 mg/l) and gallic (9.50 ± 0.02 mg/l) were detected in the finely ground coffee sample.

Table 5 shows the differences in compounds concentration (mg/l) according to particle size.

4.4. Effect of roasting degree on the concentration of studied compounds

Total concentration of phenolics in green coffee samples was the highest among the studied varieties. It's known that the roasting process, occurring at high temperatures, leads to the alteration of coffee secondary metabolites [35–38]. For example, the content of caffeine was lower in highly roasted samples,

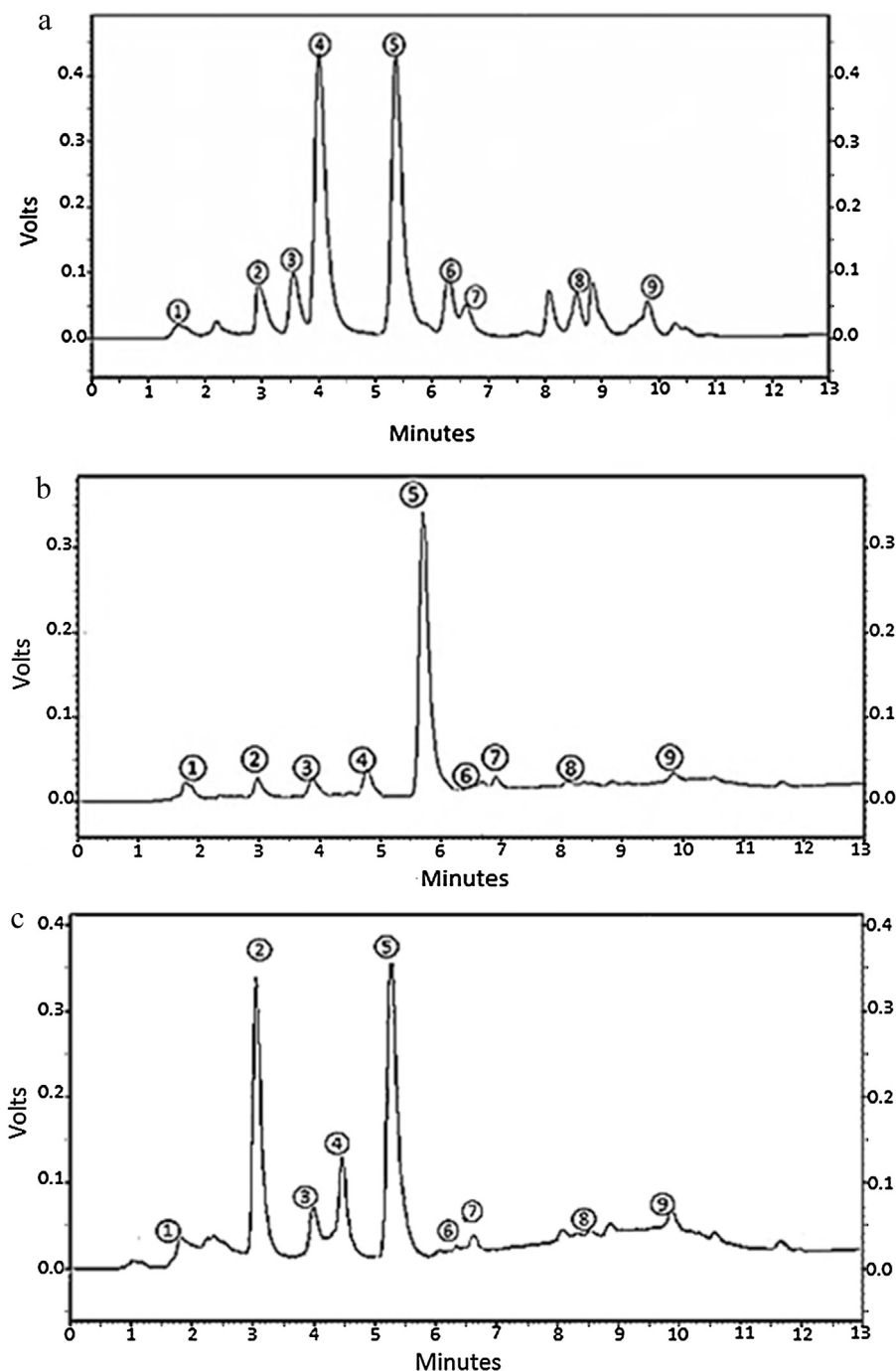


Fig. 2. HPLC chromatograms of: (A) unroasted coffee, (B) unpackaged roasted coffee, (C) packaged ground coffee. ① Gallic acid, ② unknown, ③ catechin, ④ chlorogenic acid, ⑤ caffeine, ⑥ caffeic acid, ⑦ cinnamic acid, ⑧ ferulic acid, and ⑨ methoxycinnamic acid.

compared to unroasted ones or to those having undergone a moderate roasting [37].

Polyphenols are known to be thermo-labile compounds; many studies have demonstrated that the roasting process leads to the destruction of these secondary metabolites, especially chlorogenic acid which is a major coffee polyphenol [38–41]. In this study, levels of chlorogenic acid were lower in roasted coffee samples (packaged and unpackaged) compared to those in green coffee. Moreover, it was reported that the degradation of conjugated phenolic acids during roasting (for 7–8 min at about 170 °C), causes the increase of other free phenolic acids such as caffeic and ferulic acids [42]. In our samples, the decrease in these two phenolic acids levels, compared to green coffee indicates that

duration and/or temperature of commercial roasted coffee have exceeded the later mentioned time and temperature values.

Gallic acid concentration in roasted coffee samples varied from 3.75 ± 0.05 to 6.73 ± 0.01 mg/l and is lower than that found for green coffee samples. Gallic acid was not detected in samples with high degree of roasting.

Concentration of cinnamic acid varied from 1.19 ± 0.01 to 3.01 ± 0.01 mg/l in unroasted coffee samples and from 1.15 ± 0.01 to 2.53 ± 0.14 mg/l in roasted ones.

Catechin is the only metabolite found to increase under the influence of roasting. Indeed, catechin levels were found to vary from 0.99 ± 0.04 to 1.50 ± 0.07 mg/l in unroasted coffee samples and increase from 2.75 ± 0.25 to 7.32 ± 0.1 mg/l in roasted ones. This

reaffirms the hypothesis of prolonged time and heat of coffee beans roasting to which the studied samples have been subjected, since Hečimović et al. [35] reported that during dark roasting, high amounts of flavonoids are produced as a consequence of Maillard reactions.

5. Conclusion

The aim of this work was the analysis of coffee samples from Algerian market for their caffeine, phenolic acids (chlorogenic, caffeic, ferulic, synapic, gallic, coumaric, cinnamic and methoxycinnamic) and flavonoids (catechin, rutin and quercetin) levels. The following parameters were taken into account: packaging, roasting degree, grain size, instantaneity, and decaffeination.

Phenolic acids, the main coffee antioxidants are found in high concentrations in green coffee but lower levels were detected for roasted coffee samples. No significant differences were observed between levels of polyphenols in decaffeinated coffee and the other roasted coffee varieties.

The results have shown that caffeine and chlorogenic acid are predominant in the green coffee and in a general manner, contents of compounds in green coffee are higher than those of roasted ones. This result is in full agreement with literature [28,29].

The roasted coffee samples grain size before milling affects the level of compounds in that the grains of larger size are less submitted to roasting than the smaller ones, consequently, levels of metabolites were found to be higher in larger grains.

On the other hand, after milling, it was found that the lower the grain size, the higher the concentration of analyzed compounds.

No significant differences were observed between instant and roasted coffee samples regarding the studied compounds.

Caffeine is the only compound found in lower level in decaffeinated coffee sample, the level of total polyphenols is very similar to the other samples.

As for the analyzed flavonoids, only catechin was found, but in smaller amounts than phenolic acids.

It could be concluded that the consumption of coffee could provide high amounts of antioxidants, nevertheless, its consumption have to be moderated, since besides polyphenols, coffee contains other compounds having several side effects.

Acknowledgement

The authors wish to thank the GESVAB group (University Bordeaux 2, France) for the supply of polyphenols standards studied herein.

References

- [1] Kummer C. The joy of coffee: the essential guide to buying, brewing, and enjoying. Boston: Houghton Mifflin; 2003.
- [2] Villanueva CM, Cantor KP, King WD, Jaakkola JJK, Cordier S, Lynch CF, et al. Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk. *Int J Cancer* 2006;118:2040–7.
- [3] Yu X, Bao Z, Zou J, Dong J. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer* 2011;11:96–7.
- [4] Zuo Y, Chen H, Deng Y. Simultaneous determination of catechins, phenolic acids and caffeine in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 2002;57:307–16.
- [5] Clarke RJ, Macrae R. Coffee: physiology. London and New York: Elsevier applied science publishers LTD: Springer; 1988.
- [6] Grubben MJ, Boers GH, Blom HJ, Broekhuizen R, de Jong R, Rijt LV, et al. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial 1, 2, 3. *Am J Clin Nutr* 2000;71:480–4.
- [7] Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, Aizawa H, Mori Y, et al. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *J Agric Food Chem* 2009;57:1253–9.
- [8] Wang Y, Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee. *J Agric Food Chem* 2009;57:8109–14.
- [9] Ferruzzi MG. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *J Physiol Behav* 2010;100:33–41.
- [10] Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavanoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2001;913:387–95.
- [11] Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2000;48:1449–54.
- [12] Cammerer B, Kroh LW. Antioxidant activity of coffee brews. *J Eur Food Res Technol* 2006;223:469–74.
- [13] Nkondjock A. Coffee consumption and the risk of cancer. *J Cancer Lett* 2009;277:121–5.
- [14] Pimentel GD, Zemdegs JCS, Theodoro JA, Mota JF. Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk? *J Diabetol Metab Syndr* 2009;16:1–6.
- [15] Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005;81:215–7.
- [16] Murase T, Yokoi Y, Misawa K, Ominami H, Suzuki Y, Shibuya Y, et al. Coffee polyphenols modulate whole-body substrate oxidation and suppress post-prandial hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia. *Br J Nutr* 2012;107:1757–65.
- [17] Ota N, Soga S, Murase T, Shimotoyodome A, Hase T. Consumption of coffee polyphenols increases fat utilization in humans. *J Health Sci* 2010;56:745–51.
- [18] Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, et al. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:122–33.
- [19] Smith BD, Gupta U, Gupta BS. Caffeine and activation theory effects on health and behavior. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis; 2007.
- [20] Perrone D, Donangelo CM, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Food Chem* 2008;110:1030–5.
- [21] Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea Arabica* L. and *Canephora* P. accessions. *J Food Chem* 2001;75:223–30.
- [22] Trugo LC, Macrae R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *J Food Chem* 1984;15:219–27.
- [23] Zuo Y. High-performance liquid chromatography (HPLC): principles, procedures and practices. North Dartmouth, MA, USA: Nova Science Publishers, Inc.: Nova Science Publishers, Inc.; 2014.
- [24] Rostagno MA, Manchona N, Arrigoa MD, Guillaumona E, Villares A, Garcia-Lafuentea A, et al. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *J Anal Chim Acta* 2011;685:204–11.
- [25] Wang C, Zuo Y. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *J Food Chem* 2011;128:562–8.
- [26] Jiao Y, Zuo Y. Ultrasonic extraction and HPLC determination of anthraquinones, aloe-emodin, emodin, rhein, chrysophanol, and physcion, in *Radix Polygoni multiflori*. *Phytochem Anal* 2009;20:272–8.
- [27] Belay A, Ture K, Redi M, Asfaw A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *J Food Chem* 2008;108:310–5.
- [28] Candeias SX, Gallardo E, Matos AC. Caffeine content of retail market coffee in Portugal. *J Food Anal Method* 2009;2:251–6.
- [29] Huck CW, Guggenbichler W, Bonn GK. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *J Anal Chim Acta* 2005;538:195–203.
- [30] Fujioka K, Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *J Food Chem* 2008;106:217–21.
- [31] Burmester K, Eggers R. Heat and mass transfer during the coffee drying process. *J Food Eng* 2010;99:430–6.
- [32] Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods. *J Food Eng* 2001;49:311–9.
- [33] Duarte GS, Pereira AA, Farah A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *J Food Chem* 2010;118:851–5.
- [34] Yusaku N, Kuniyo I. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I. *J Food Chem* 2011;127:1532–9.
- [35] Hečimović I, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *J Food Chem* 2011;129:991–1000.
- [36] Sarker S, Zahid L, Gray AI. Methods in biotechnology, natural products isolation. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press: Humana Press; 2006.
- [37] Nicoli MC, Anese M, Manzocco L, Lerici CR. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *J Sci Technol* 1997;30:292–7.
- [38] Casa IS, Oliveira MB, Ferreira MA. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *J Food Chem* 2000;68:481–5.
- [39] Clifford MN, Shuttler S, Thomas GA, Ohiokpehai O. The chlorogenic acids content of coffee substitutes. *J Food Chem* 1987;24:99–107.
- [40] Trugo LC, De Maria CAB, Werneck CC. Simultaneous determination of total chlorogenic acid in coffee by high performance gel filtration chromatography. *J Food Chem* 1991;42:81–7.
- [41] Del Castillo MD, Ames JM, Gordon MH. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 2002;50:3698–703.
- [42] Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol* 2006;18:23–36.