

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Mémoire du Projet de fin d'étude

2^{ème} Année Master



Département : Génie des Procédés

Spécialité : Génie chimique

Présenté par :

**Benchanaa Noussaiba
Boukerche Ibtissem**

**Etude de l'influence de degré de torréfaction du
café sur la formation de l'acrylamide par
chromatographie liquide à haute performance**

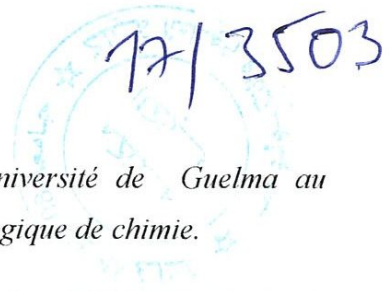
Sous la Direction de :

Dr. Belguidoum karima

Juin 2017

REMERCIEMENTS

17/3503



Le présent travail dans ce mémoire a été mené à l'université de Guelma au laboratoire de Chimie Appliquée (LCA), et au laboratoire pédagogique de chimie.

*Nos premiers remerciements vont à notre encadreur **Dr Karima BELGUIDOUM**, de qui nous avons beaucoup appris. Nous la remercions du fond du cœur pour toute l'aide et le soutien qu'elle nous a apportés du début jusqu'à la fin de notre mémoire, pour la confiance et la liberté qu'elle nous a accordées en acceptant d'encadrer ce travail de master, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées afin de diriger cette étude de manière perfectionnée et minutieuse.*

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury pour le temps consacré à lire et à juger notre travail.

*Nous tenons à remercier l'ingénieur de laboratoire pédagogique **Mme NEMOUCHI Zohra** et l'ingénieur de laboratoire de Chimie Appliquée **Mme BOULTIF Assia** pour toute l'aide qu'elles nous ont apportée à chaque fois que nous en avons besoin.*

Nous tenons également à remercier tous nos professeurs du département de génie des procédés de l'Université 08 Mai 1945 Guelma.

Nos remerciements vont aussi à toutes les personnes qui nous ont apporté de l'aide et que nous aurions malencontreusement oubliées.

Résumé

Dans ce travail, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC-UV-DAD) ; a été utilisée pour l'analyse de l'acrylamide ; un contaminant chimique dans le café torréfié emballés et en vrac.

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: Café, la torréfaction, HPLC, acrylamide.

Table des matières

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

Chapitre I : Généralités sur le café

I.1. Introduction.....	3
I.2. Historique.....	3
I.3. Les variétés de café.....	3
I.3.1. L'arabica (Coffea arabica).....	4
I.3.2. Le robusta (Coffea canephora).....	4
I.4. La production des grains de café.....	5
I.4.1. La récolte des cerises.....	5
I.4.2. L'obtention des grains de café vert.....	5
I.4.3. La torréfaction des grains de café vert.....	9
I.4.4. Réactions de Maillard.....	10
I.5. La production du café moulu et de sa boisson.....	10
I.5.1. La mouture des grains.....	10
I.5.2. La préparation du café boisson.....	11
I.6. Le café soluble.....	13
I.6.1. Le café atomisé.....	13
I.6.2. Le café lyophilisé.....	13
I.7. Composition du café.....	14
I.8. Les effets bénéfiques du café.....	15
I.8.1. L'activité anti-oxydante.....	16
I.8.2. L'activité anticancérigène ou antimutagène.....	16
I.9. Autres effets bénéfiques possibles.....	16
I.10. Les effets néfastes du café.....	16
I.11. L'acrylamide (molécule potentiellement néfaste).....	17

I.12. L'acrylamide dans les aliments.....	17
I.13. Toxicité de l'acrylamide.....	18
I.14. Dosage de l'acrylamide dans les aliments.....	19
I.15. Conclusion.....	19

Chapitre II : La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Introduction.....	20
II.1. La théorie de la chromatographie en phase liquide.....	20
II.1.1. Définition.....	20
II.1.2. Principe.....	21
II.1.3. Les différents modes de séparation.....	21
II.1.3.1. La chromatographie d'adsorption.....	21
II.1.3.2. La chromatographie de partage.....	21
II.1.3.3. La chromatographie d'échange d'ions.....	22
II.1.3.4. La chromatographie d'exclusion.....	22
II.1.4. Polarité et chromatographie.....	22
II.1.4.1. Polarité d'une molécule.....	22
II.1.4.2. Interactions entre molécules.....	22
II.1.4.3. Notion de polarisabilité.....	22
II.1.4.4. Application à la chromatographie.....	22
II.1.5. Notions fondamentales.....	24
II.1.5.1. Phases mobile et stationnaire.....	24
II.1.5.2. Notion de temps.....	24
II.1.5.3. Notion de concentration.....	25
II.1.5.4. Notion d'efficacité.....	26
II.1.5.5. Qualité de la séparation.....	27
II.2. Appareillage.....	28
II.2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant).....	29
II.2.2. Pompe.....	29

II.2.3. Injecteur.....	29
II.2.4. Colonne.....	29
II.2.5. Détecteur.....	30
II.2.6. Intégrateur.....	31
Conclusion.....	31

Chapitre III : matériels et méthodes

III.1. Introduction.....	32
III.2. Matériels.....	32
III.3. Solvants et réactifs.....	32
III.4. Appareillage.....	32
III.4.1. Lyophilisateur.....	32
III.4.2. Chromatographie liquide à haute performance.....	34
III.5. Méthodes.....	35
III.5.1. Dosage de l'acrylamide dans le café torréfié par HPLC-UV-DAD.....	35
III.5.2 Conditions de l'analyse.....	36
III.5.2.1 Phase mobile.....	37
III.5.2.2 Phase stationnaire.....	37
III.5.3 Échantillons de café.....	37
III.6. Méthode de préparation des échantillons.....	38
III.7. Détermination du pH des extraits obtenus.....	40
III.8. Méthode de préparation et injection du standard.....	40
III.9. Calcul des rendements.....	40
III.10 Validation de la méthode analytique.....	40
III.10.1 Courbe d'étalonnage.....	40
III.10.2. Détermination des limites de détection et de quantification de l'acrylamide.....	41
III.10.3. Détermination des taux de récupération.....	41
III.11. Injection.....	42
III.12. Intégration.....	42

III.13. Conclusion.....	42
-------------------------	----

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Introduction.....	43
IV.2. Résultats.....	43
IV.2.1. Analyse qualitative de l'acrylamide par HPLC-DAD.....	43
IV.2.1.1. Données chromatographiques du standard.....	43
IV.2.2. Analyse quantitative de l'acrylamide.....	45
IV.2.2.1. Présentation des chromatogrammes des échantillons du café étudiés pour le dosage de l'acrylamide.....	45
IV.2.3. Validation de la méthode d'analyse.....	48
IV.2.3.1. Linéarité des courbes d'étalonnage et résolution des pics	48
IV.2.3.2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) et le taux de récupération... ..	49
IV.2.4. Concentrations de l'acrylamide dans les échantillons étudiés.....	49
IV.3. Discussion.....	50
IV.3.1. La détection et la quantification de l'acrylamide dans des échantillons de café.....	50
IV.3.2. Influence du degré de torréfaction.....	52
IV.3.3. Impact du pH sur la formation de l'acrylamide.....	52
IV. 4. Conclusion.....	53
CONCLUSION GENERALE	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	55

Liste des figures

Figure I.1 : (a) Un exemple de caféier (<i>Coffea arabica</i>), (b) les fruits de caféier (<i>Coffea arabica</i>)..	4
Figure I.2 : Structure de la graine du caféier.....	6
Figure I.3 : Voies d'obtention des grains de café vert.....	6
Figure I.4 : (a) les fruits sont étalés au soleil après la récolte et remués régulièrement (b) ; Les fruits secs prennent une teinte grisâtre.....	7
Figure I.5 : Café en parche.....	8
Figure I.6 : Illustration de différents types de cafetière : (a) cafetière à filtre,(b) cafetière à piston, (c) cafetière napolitaine, (d) percolateur, (e) cafetière arabe.....	13
Figure I.7 : Formation du glycidamide à partir de l'acrylamide. (P450 2 F1 : Monooxygénase cytochrome).....	18
Figure II.1 : La phase stationnaire et la phase mobile.....	24
Figure II.2 : La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic.....	24
Figure II.3 : Types de temps pour un pic chromatographique.....	25
Figure II.4 : La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics.....	27
Figure II.5 : Composition d'une chaîne HPLC.....	28
Figure II.6 : Quelques types de colonnes pour HPLC.....	30
Figure III.1 : Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).....	34
Figure III.2 : Appareil pour HPLC (Agilent série 1260 Infinity) utilisé pour le dosage de l'acrylamide (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).....	35
Figure III.3 : Formule chimique de l'acrylamide en 2D et 3D.....	36
Figure III.4 : Échantillons de café (Arabica, Robusta, Robusta à petits grains (PG), Robusta à gros grains(GG)).....	37
Figure III.5 : Protocole de préparation des échantillons.....	38

Figure III.6 : Échantillons de café vert et torréfiés.....	39
Figure IV.1 : Chromatogramme HPLC de l'acrylamide pur, TR:0,30 min, λ :210 nm.....	43
Figure IV.2 : Courbe d'étalonnage de l'acrylamide.....	44
Figure IV. 3 : Chromatogramme HPLC d'un café emballé (3) ; Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm	44
Figure IV.4 : Chromatogramme HPLC d'un café emballé (3) dopé par 1 μ l d'acrylamide ; Pic(2) :acrylamide, TR : 0, 30 min, λ : 210 nm.....	45
Figure IV.5 : Chromatogramme HPLC du café torréfié à 200°C (couleur du café : claire); Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm.....	46
Figure IV. 6 : Chromatogramme HPLC du café torréfié à 245°C (couleur moyenne);Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm.....	46
Figure IV. 7 : Chromatogramme du café torréfié à 320°C (couleur foncée); Pic (3) acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm.....	47
Figure IV. 8 : Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (PG)) ; Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm.....	47
Figure IV.9 : Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (GG)) ; Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30 min, λ : 210 nm.....	48
Figure IV. 10 : Chromatogramme du café torréfié moulu non emballé (Robusta (PG + GG)) ; Pic (2) : acrylamide, TR : 0,30min, λ : 210 nm.....	48
Figure IV.11 . Les teneurs en acrylamide des différents échantillons étudiés.....	51
Figure IV.12 .Concentrations de l'acrylamide dans le café torréfié.....	52

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.....	15
Tableau.III.1 : Quelques caractéristiques de l'acrylamide.....	36
Tableau IV. 1 : Données HPLC de l'acrylamide.....	44
Tableau IV.2 : Concentrations ($\mu\text{g /l}$) de l'acrylamide dans les échantillons étudiés, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD.....	50

Liste des abréviations

HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CCM	Chromatographie en couche mince
CLS	Chromatographie liquide-solide
UV	Ultra-violet
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
TR	Temps de rétention
T _m	Temps mort
T' _r	Temps de rétention réduit
N _{th}	Nombre de plateaux théorique
N _{eff}	Nombre de plateaux effectifs
W	Largeur du pic
Min	Minute
ml	Millilitre
nd	Non détecté
R ²	Coefficient de corrélation
PG	Petit grain
GG	Gros grain
Nm	Nanomètre
ng	Nano gramme
μl	Micro litre
ACN	Acétonitrile
CH ₂ O ₂	Acide formique

FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
OMS	Organisation mondiale de la santé
pH	Potentiel de l'hydrogène
RSD	Relative Standard Deviation (écart type relatif)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
$C_4H_8N_2O_3$	Asparagine

Introduction générale

Introduction générale

Le café constitue l'une des boissons les plus consommées au monde. Sa composition varie selon la variété de café, le mode de production des grains de café vert, et les conditions de leur torréfaction. Par conséquent l'analyse des constituants du café suscite encore aujourd'hui de nombreuses études, qui se justifient par les effets physiologiques de cette boisson.

Plusieurs contaminants peuvent être présents dans le café moulu, et éventuellement se retrouver ensuite dans la boisson préparée. Parmi eux on trouve l'acrylamide (C_3H_5NO). Il s'agit d'une molécule très nocive pour la santé humaine.

En effet, La présence de l'acrylamide dans le café peut avoir comme origine : la formation in situ dans le grain lorsque celui-ci est torréfié. sa présence peut s'avérer préoccupante en raison du caractère toxique, voire carcinogène.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier la contamination du café par ce composé chimique. Pour ce faire nous avons donc analysé à la fois des cafés torréfiés en vrac et emballés.

Dans cette étude, l'effet de la torréfaction sur la teneur en acrylamide a été investigué.

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. Cette molécule a été identifiée et déterminée dans les échantillons du café étudiés, par HPLC-UV-DAD.

Ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres :

- Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur le café et sur l'acrylamide.
- Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à la chromatographie liquide à haute performance.
- Dans le troisième chapitre, sera présentée la méthode d'analyse utilisée 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 : Généralités sur le café

I.1. Introduction

Ce chapitre, consistera en une revue bibliographique sur le café, en évoquant dans un premier temps les points suivants : histoire du café, variétés de café, production des grains du café, composition chimique du café, production du café moulu et de sa boisson ainsi que ses effets sur la santé, ensuite nous présenterons l'acrylamide ; un composant toxique qui peut se retrouver dans le café.

I.2. Historique

Le caféier est un arbuste aux feuilles persistantes qui serait originaire des hauts plateaux de l'Éthiopie et de l'Afrique tropicale. Une version fait remonter la découverte du café vers 850 et la situe en Abyssinie, l'actuelle Éthiopie. Un berger aurait noté que ses chèvres étaient excitées après avoir mangé les feuilles et les fruits d'un arbuste. Il aurait apporté une branche de l'arbuste à un moine qui prépara une boisson à partir des graines recueillies. Étonnés par l'effet exaltant du liquide, les moines attribuèrent la paternité de cette boisson à une divinité.

Une autre légende raconte que le moine, après avoir observé l'agitation des chèvres qui consommaient des baies, aurait eu l'idée de faire bouillir les grains afin d'obtenir une potion qui l'aiderait à demeurer éveillé les nuits de prières. Le mot café provient probablement de l'arabe qahwah, tandis que certains linguistes affirment qu'il provient du mot Kaffa, du nom de la province d'Éthiopie où il fut découvert [1].

I.3. Les variétés de café

Le caféier est un arbuste appartenant au genre *Coffea* de la famille des Rubiacées, pouvant atteindre 12 mètres de hauteur et poussant dans la zone intertropicale.

Un caféier n'est rentable qu'au bout de 5 ans et sa durée de vie est de 25 à 50 ans. Il produit des fruits charnus, le plus souvent rouges ou violets, semblables à des cerises (d'où leur appellation « cerises de café ») (**Figure I.1**). Ces fruits renferment deux noyaux, contenant chacun un grain de café [1].

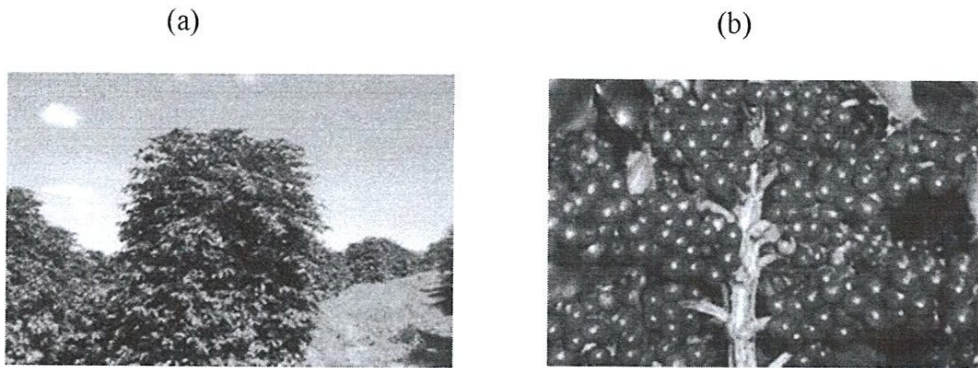


Figure I.1 : (a) Un exemple de caféier (*Coffea arabica*), (b) les fruits de caféier (*Coffea arabica*)

Il existe un grand nombre d'espèces de caféiers (plus de 80) mais seules deux d'entre elles sont réellement exploitées dans le monde : *Coffea arabica* L et *Coffea canephora*.

Le café robusta constitue la variété la plus répandue de *Coffea canephora*. Ses grains sont généralement ronds, irréguliers et assez petits, avec un goût corsé, alors que les grains de l'arabica sont plutôt ovales et longs. Ces derniers présentent un goût plus fin et un arôme plus fruité que les grains de robusta, ce qui explique la plus forte consommation d'arabica de par le monde [1].

1.3.1. L'arabica (*Coffea arabica*)

Originaire d'Ethiopie, *Coffea arabica* L comporte de nombreuses variétés. La culture de l'arabica est plus délicate et moins productive que celle du robusta. Il est essentiellement cultivé dans des plantations situées entre 1000 et 2000 m d'altitude en climat tropical, telles que l'Amérique Latine et l'Indonésie.

L'arabica occupe la première place dans le monde pour la production de café (environ 60 %) car ses qualités aromatiques sont supérieures à celles du robusta. Son prix est d'ailleurs en moyenne 20 à 25 % plus élevé que celui du robusta. Cependant, sa teneur en caféine reste très inférieure à celle du robusta [1].

1.3.2. Le robusta (*Coffea canephora*)

Le café robusta est originaire d'Afrique centrale et occidentale. En deuxième place pour la production (40 %), il est surtout cultivé en plaine en Afrique (Afrique occidentale, Ouganda, Angola, Afrique du sud, etc.) et en Extrême orient (Viêtnam, Inde, Indonésie, Philippines). C'est une espèce plus vigoureuse que l'arabica, avec une croissance plus

rapide. Son goût est puissant et corsé, il donne un café très tonique [1].

1.4. La production des grains de café

La production des grains de café nécessite différentes étapes successives : la récolte des fruits (ou cerises), la séparation des grains de café vert des fruits (dépulpage / déparchage) et la torréfaction des grains.

1.4.1. La récolte des cerises

Les fruits parviennent à maturité 6 à 8 mois après la floraison pour l'arabica, et 9 à 11 mois après pour le robusta. La couleur des cerises constitue un bon indicateur de la maturation, car au cours de cette étape la chlorophylle du péricarpe est remplacée par des pigments flavonoïdes rouges.

La meilleure technique de récolte des cerises est celle de la cueillette manuelle des fruits mûrs (également appelée picking), car elle produit les meilleures qualités de café. Cependant cette technique reste longue et onéreuse, car elle impose de procéder à plusieurs passages tout au long de la période de mûrissement. La cueillette mécanique est rapide et moins chère, mais elle a l'inconvénient d'imposer un tri secondaire car la quasi-totalité des fruits de la branche sont récoltés, quel que soit leur degré de maturité. La maturation des fruits étant très hétérogène, on peut avoir à la fois des cerises vertes, mûres ou très mûres sur une même branche. Or les cerises immatures augmentent l'amertume du café, tandis que celles trop mûres confèrent à celui-ci un goût acre et désagréable. Il est donc nécessaire de trier les cerises mûres des autres une fois la cueillette mécanique réalisée.

1.4.2. L'obtention des grains de café vert

Le fruit du caféier est une sorte de drupe, c'est-à-dire un fruit charnu à noyau. La cerise de café est entourée d'une peau très résistante, lisse et rouge, qui correspond à l'exocarpe. Celle-ci recouvre le mésocarpe riche en glucides et en pectine, mais surtout en eau (70 à 85 %). Le mésocarpe représente, selon les espèces, entre 40 et 65 % du poids du fruit et correspond à la pulpe.

Le fruit renferme deux graines qui deviendront les grains de café vert, également appelées fèves. Chaque graine est formée d'un albumen corné recouvert de deux enveloppes, l'une interne (le tégument séminal ou pellicule argentée), l'autre externe (l'endocarpe, également appelé parche ou parchemin).

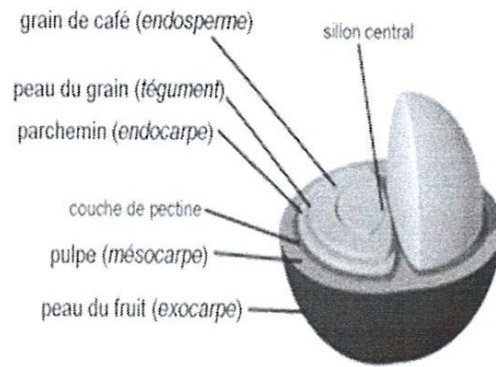


Figure I.2 : structure de la graine du caféier

Pour obtenir le grain marchand, deux méthodes de préparation du café sont pratiquées ; comme illustré par l'organigramme de la (figure I.3) ; la voie sèche et la voie humide, cette dernière comportant une étape de fermentation contrôlée.

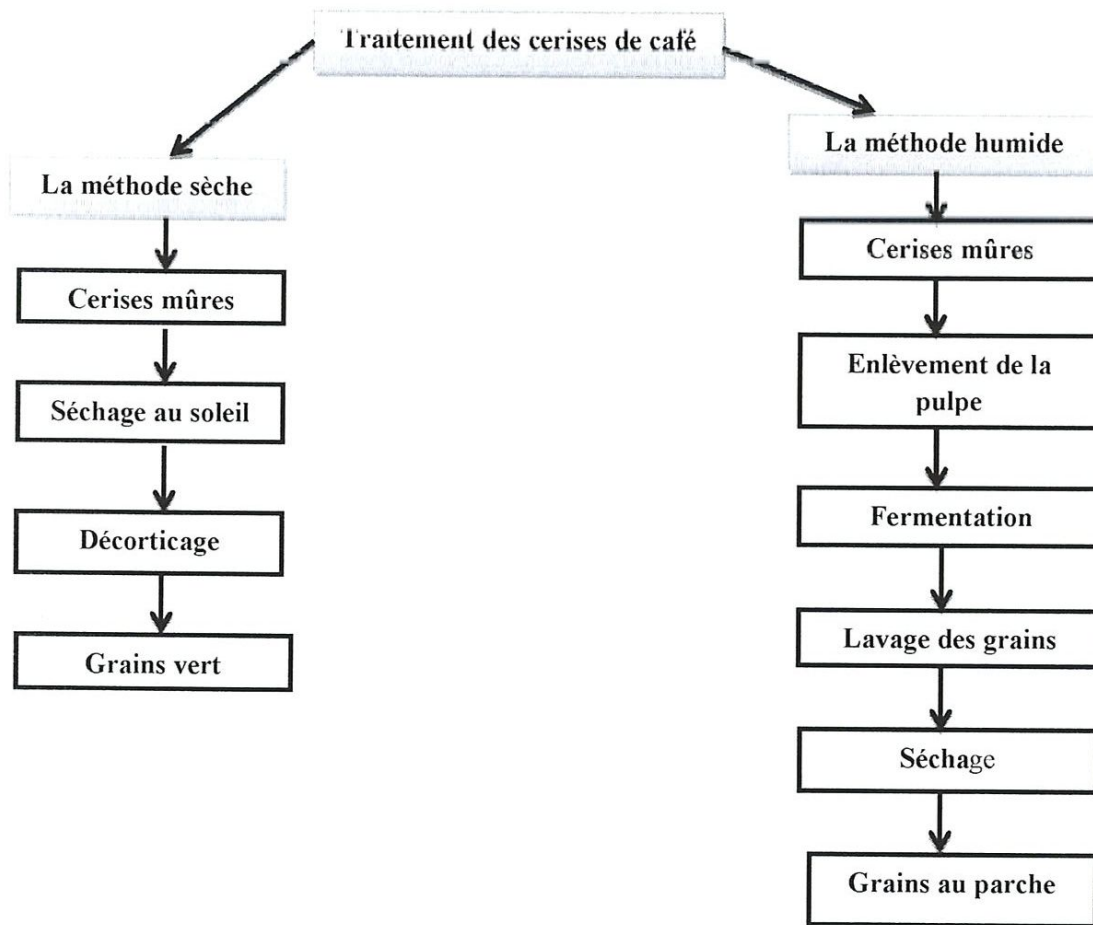
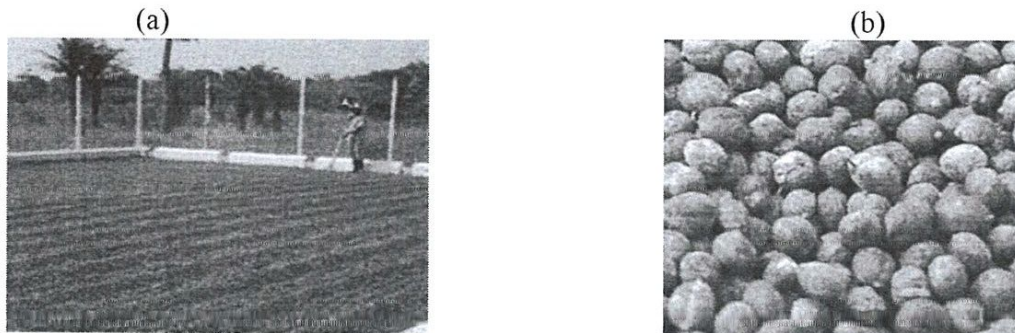


Figure I.3 : Voies d'obtention des grains de café vert.

La méthode sèche est plus ancienne et plus simple que la méthode humide, mais ses résultats sont moins performants. Les cerises sont étalées en plein air sur des aires de séchage, et régulièrement brassées pour leur permettre de sécher à l'air libre. En quelques jours, la partie charnue se déshydrate et se désagrège en partie. On reconnaît que les cerises sont séchées lorsqu'en secouant une poignée de café on entend les grains balloter à l'intérieur, les enveloppes deviennent brunes foncées et se durcissent. A ce moment-là, les cerises séchées ne contiennent plus que 12 % d'humidité environ.

A l'issue du séchage, le grain de café se trouve encore enfermé dans le noyau du fruit (l'endocarpe) : c'est ce que l'on appelle le café en coque (**Figure I.4**). Le café, protégé par sa coque, peut être conservé ainsi pendant un certain temps. Certaines récoltes sont même vieillies de la sorte afin d'améliorer la saveur du café, car le séchage du grain continue à l'intérieur de la coque.



**Figure I.4 : (a) les fruits sont étalés au soleil après la récolte et remués régulièrement.
(b) Les fruits secs prennent une teinte grisâtre [2].**

Afin de récupérer les grains de café vert, l'endocarpe doit être enlevé. Pour ce faire, les grains sont décortiqués par une machine. Le rendement cerise sèche - fève verte est généralement de 50 %: 2 kg de cerises sèches donnent 1 kg de fève verte. Au cours de cette étape, la peau fine argentée (ou tégument) est également enlevée. Les coques sont souvent récupérées et valorisées ensuite comme combustible.

La méthode humide étant plus coûteuse que la méthode sèche, elle est généralement réservée aux cafés de qualité cueillis manuellement. Plus compliquée, elle nécessite un certain nombre d'équipements adaptés à chaque étape, mais elle donne un café de meilleure qualité que la méthode sèche.

Dans un premier temps, un nettoyage préliminaire des fruits est effectué, puis ceux-ci

sont séparés des autres éléments végétaux par immersion dans l'eau (les cerises mûres sont lourdes, et ainsi séparées des éléments surnageants). Ensuite, l'élimination d'une grande partie de la pulpe est réalisée à l'aide d'un dépulpeur (à cylindres ou à disques), où la pulpe arrachée est évacuée par un courant d'eau.

Les grains, une fois dépulpés, doivent être démucilaginés afin d'éliminer la pulpe restante. La démucilagination se fait principalement selon deux procédés : par fermentation ou par un procédé mécanique.

- ***La fermentation***

Les grains sont placés dans des bacs à l'abri du soleil pendant quelques jours durant lesquels ils subiront une fermentation, afin de permettre d'enlever plus facilement les restes de mucilage demeurés sur les parches et gênants pour le séchage ultérieur. L'ajout d'enzymes pectiques peut être utilisé pour accélérer artificiellement la fermentation.

- ***Le procédé mécanique***

Comme la fermentation présente des risques de dépréciation du café si elle n'est pas correctement conduite, des appareillages mécaniques (dépulpeur-démucilagineur) ont été construits. Ils sont plus utilisés pour le robusta que pour l'arabica qui, par tradition, est traité par la fermentation.

Quelle que soit la technique de démucilagination utilisée, les grains sont ensuite lavés à l'eau (afin d'éliminer toute trace de mucilage ou pulpe adhérent à la fève), égouttés, puis séchés. Plusieurs méthodes de séchage peuvent être mises en œuvre : la centrifugation, le séchage artificiel, ou encore l'exposition au soleil. Le produit obtenu est le café dit en parche car les grains sont toujours recouverts de leur membrane cellulosique (**Figure I.5**). Le café en parche séché ne contient plus qu'environ 10 à 15 % d'humidité.



Figure I.5 : Café en parche.

Pour débarrasser le grain de café de sa parche, on fait ensuite subir au grain un déparchage. Enfin, les grains de café sont polis pour enlever leur pellicule. Le rendement du café en parche en café vert est de 20 %.

1.4.3 La torréfaction des grains de café vert

La torréfaction est un procédé qui consiste à traiter les grains de café vert par la chaleur sèche et élevée, tout en permettant au café d'acquérir l'essentiel de ses propriétés organoleptiques (couleur, arôme, goût, « corps »). Cette technique permet donc d'accroître progressivement la température dans les torréfacteurs, par chauffage direct, chauffage indirect ou fluidisation dans un courant d'air chaud.

Le chauffage indirect est le procédé le plus utilisé dans l'industrie du café. Au cours de cette transformation du café, des réactions chimiques se développent et s'accompagnent d'importantes modifications morphologiques (forme, volume, couleur, perte de poids). Les réactions génèrent du dioxyde de carbone (CO_2), dont une partie s'échappe tandis qu'une autre est retenue dans les cellules du grain.

- Une première phase appelée séchage, ayant lieu à des températures du grain inférieures à 150-160 °C, au cours de laquelle on observe des réactions endothermiques (grâce à un apport extérieur de chaleur). De l'eau et des substances volatiles sont éliminées au cours de cette première phase, et le grain passe de la couleur verte au jaune.
- Une deuxième phase appelée torréfaction, exothermique, pour des températures du grain comprises entre 150-160 et 260 °C. Elle correspond aux réactions chimiques de dégradation et de polymérisation des précurseurs d'arômes (réactions dites de Maillard et réactions de pyrolyse). En général, la torréfaction est menée entre 200 et 250 °C pendant 0.75 à 25 min, selon le degré de torréfaction souhaité (léger, moyen ou fort), le type de torréfacteur mis en œuvre, ainsi que la nature du café vert initial (variété, teneur en eau, âge du grain, etc.). Au cours de cette phase, le grain subit d'importantes modifications, tant physiques que chimiques. De grandes quantités de dioxyde de carbone, d'eau et de substances volatiles sont éliminées, et le grain devient marron (en raison de réactions de caramélisation et de la réaction de Maillard).
- Une troisième phase appelée refroidissement, qui s'avère indispensable pour éviter de brûler le grain de café.

Dans certains cas, du sucre peut être rajouté au café avant de le torréfier, afin d'obtenir un café torréfié plus foncé.

La torréfaction modifie non seulement la composition des grains, mais également leur texture. En effet, juste après la torréfaction, les grains de café sont très friables. Plusieurs raisons à cela : le volume du grain augmente sous l'effet de la pression des gaz produits à l'intérieur du grain par des réactions chimiques (principalement de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone, mais également des produits de pyrolyse), alors que sa masse diminue (perte de gaz et de substances volatiles), ce qui a pour conséquence une baisse de la densité du grain (elle passe d'environ 1200-1300 à environ 600-650 kg.m⁻³) [1].

En outre le grain devient poreux, et la perte d'eau est très importante (environ 5-12 % en masse pour le café vert, et seulement 0-5 % pour le café torréfié). Pour cette raison, les grains doivent donc être refroidis avant d'être moulus, afin de devenir durs et cassants. Plus la torréfaction a été intense, plus le grain sera facile à mouler. La torréfaction des grains de café nécessite donc un contrôle rigoureux afin de maîtriser les réactions chimiques se produisant, et par là même la qualité des grains de café torréfiés. Ces réactions de pyrolyse et de brunissement non-enzymatique (réaction dite de Maillard) modifient la couleur du grain, qui passe du vert au brun plus ou moins foncé selon le degré de torréfaction.

Il est important de souligner que, si les grains de café vert arabica et robusta peuvent être différenciés à l'œil nu par une personne experte en café (de par des formes et couleurs différentes), ceci n'est plus possible une fois que les grains sont torréfiés, et a fortiori moulus [1].

I.4.4. Réactions de Maillard

Ce sont des réactions entre sucres réducteurs et des acides aminés (Asparagine). Elles requièrent de la chaleur pour se dérouler. Il y a formation de nouvelles liaisons pour donner des produits contribuant à l'arôme ainsi que des polymères azotés et des mélanoidines bruns. Il y a aussi potentiellement formation d'acrylamide, un cancérigène probable.

I.5. La production du café moulu et de sa boisson

I.5.1. La mouture des grains

La mouture consiste à mouler les grains de cafés torréfiés avec des appareils

électriques. Au cours de la mouture, le dioxyde de carbone inclus dans le grain de café s'échappe. Bien que réalisée parfois chez le consommateur, elle est plus fréquemment réalisée de manière industrielle. Dans ce cas, le café moulu doit être emballé très rapidement afin d'éviter toute oxydation et perte d'arômes.

Il est important que les grains de cafés torréfiés soient moulus à une granulométrie précise et très homogène, ni trop fine, ni trop grosse, pour que l'eau chaude puisse entraîner le maximum dans les composés aromatiques. En effet, si la mouture est trop grossière, l'eau filtre trop rapidement, et la saveur de la boisson obtenue est fade. A l'inverse, si la mouture est trop fine, l'opération est lente ; elle s'effectue avec de l'eau refroidie, et de plus celle-ci entraîne des particules qui se déposent au fond de la tasse, ce qui donne une café boisson boueuse et âcre. C'est donc entre ces deux extrêmes de mouture que se situe la gamme de degrés de finesse qui convient le mieux à chaque type d'appareil. Le degré de finesse de la mouture est spécifique à chaque préparation. En général, on emploie une mouture moyenne pour les cafetières à filtre, une mouture fine pour les appareils à dépression, une mouture plus fine et tassée pour les percolateurs (café expresso), et une mouture ultra- fine pour le café à la turque [1]

1.5.2. La préparation du café boisson [1]

On dénombre 6 modes de préparation du café, chacun conférant à la boisson obtenue des propriétés organoleptiques et compositions bien distinctes (le café instantané constituant un cas particulier bien spécifique) :

- ***La filtration***

Le modèle de cafetière à filtre utilisé est celui inventé par le français Du Belloy au XVIIIème siècle. 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. On verse un peu d'eau tiède pour gonfler le café puis on ajoute par petites fractions de l'eau à la limite de l'ébullition. Il faut 10 à 12 g de café moulu par tasse et la préparation dure environ dix minutes. 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, inventée par l'italien Caliman

en 1933. Sa particularité est de faire infuser le café au lieu de le faire bouillir. 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. Après avoir déposé la mouture au fond de la cafetière (on recommande 10 g de mouture par tasse), on verse l'eau frémissante et on laisse reposer 2 min environ. En exerçant une pression le filtre s'enfonce jusqu'au bas, séparant le café du marc.

- ***La percolation***

La percolation est le procédé utilisé par les cafetières dites napolitaines. Il fut inventé par le Français Louis-Bernard Rabaud en 1822. 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). Ce procédé ne donne pas les meilleurs résultats car la température trop élevée de l'eau détruit en partie les arômes du café.

- ***La percolation sous haute pression ou un 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. En général on utilise, pour une tasse de 35-67 ml, 14-17 g de café avec une eau de 88-95 °C sous une pression minimum de 9 bars et un temps de passage de 22-28 s. Le procédé utilisé permet à l'eau et à la mouture d'avoir un contact minimum, ce qui évite de diluer les saveurs et les arômes.

- ***La décoction***

Le café, moulu très finement, est jeté dans l'eau bouillante (dans une cafetière arabe ou tout autre récipient allant directement sur le feu). Après trois ébullitions très courtes et ajout de sucre, le café est versé sans filtration préalable. Cette préparation donne le café turc (ou café grec), qu'il est nécessaire de boire lentement afin d'éviter le marc restant au fond de la tasse. Il s'agit de la plus ancienne méthode de préparation du café.

- ***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 dissolution**

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

La figure (I.6) illustre les principaux types de cafetière utilisés pour ces multiples modes de préparation du café boisson.

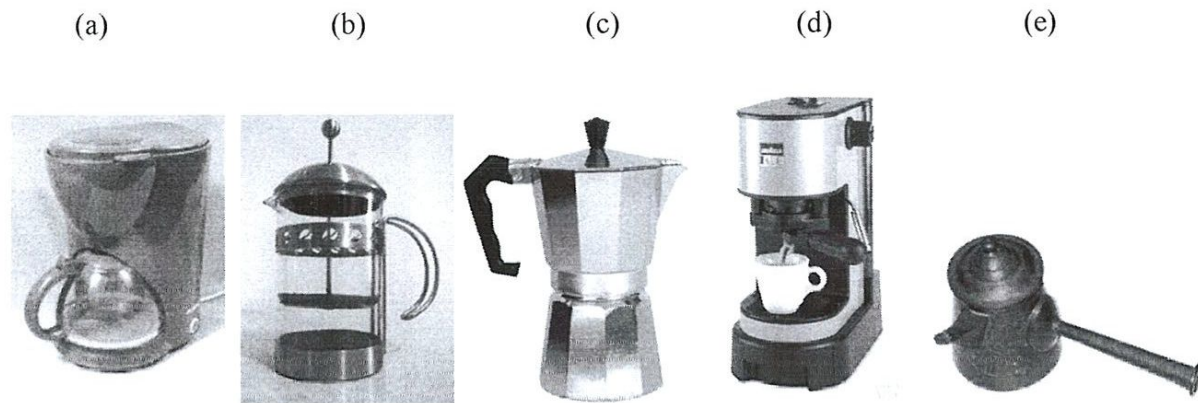


Figure I.6 : Illustration de différents types de cafetière : (a) cafetière à filtre, (b) cafetière à piston, (c) cafetière napolitaine, (d) percolateur, (e) cafetière arabe.

I.6. le café soluble

Quand on fait du café soluble, la qualité du mélange est de première importance. La fabrication du café soluble repose sur le principe de dessiccation du café obtenue par infusion. La poudre obtenue (ou café soluble) permet de reconstituer la boisson par simple dissolution dans l'eau.

I.6.1. Le café atomisé

Il est obtenu à partir de café filtré dans de grands percolateurs, et concentré. Ce concentré de café pulvérisé dans un courant d'air chaud et sec (atomisation). Les particules de café desséchées ainsi obtenues sont réceptionnées à la base de l'atomiseur (cylindre pouvant atteindre jusqu'à 15 mètres de haut dans lequel le café liquide est vaporisé). La qualité du produit ainsi obtenu est grossière et irrégulière.

I.6.2. Le café lyophilisé

Un autre procédé, la lyophilisation permet de transformer le café en granulé de meilleure qualité, par le principe de sublimation. Cette sublimation n'est possible que parce

qu'elle se fait sous vide et que le chauffage se règle automatiquement, avec la plus grande précision. C'est ainsi que se forment ces granulés bruns typiques du café lyophilisé.

On part également de café concentré que l'on congèle à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. On place ce café congelé en barres dans une chambre de lyophilisation où l'on fait le vide absolu, l'eau bout à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. De cette façon, lorsque le vide est obtenu, l'eau avec laquelle le café a été fait se sublime, c'est à dire qu'elle passe directement de l'état de solide à l'état gazeux. Il reste alors les petits granulés de café lyophilisé.

I.7. Composition du café [1]

La composition du café est très complexe, avec plus d'une centaine de substances chimiques identifiées. Elle est également variable car les espèces, les variétés végétales et les procédés technologiques contribuent à la diversité des caractéristiques organoleptiques des cafés.

Le facteur influençant le plus fortement la composition du café est avant tout l'espèce et la variété de café vert. Pour une même variété, la composition du café est également fonction, dans une moindre mesure, de la méthode de culture, du degré de maturation des cerises et des conditions de stockage des grains verts. En outre, les procédés technologiques de préparation (dépulpage, déparchage) et de traitement industriel (torréfaction) des grains verts, modifient les teneurs des constituants des grains de café. Enfin, le mode de préparation du café boisson par le consommateur influence directement la composition de la boisson obtenue.

Le tableau (I.1) récapitule les valeurs moyennes approximatives de la composition des deux principales espèces, café arabica et café robusta des grains de café verts et torréfiés.

La teneur en eau est un paramètre important à contrôler dans le café vert car elle gouverne les réactions de fermentation et de développement de moisissures durant le stockage et le transport des grains, qui peuvent entraîner le développement d'arômes indésirables ou la formation de mycotoxines, et donc altérer la qualité du café. Il est recommandé de sécher le grain jusqu'à obtenir une teneur en eau inférieure ou égale à 12 % pour minimiser ce genre de problème.

Tableau I.1 : Composition des grains de café verts et torréfiés selon la variété (en pourcentage massique par rapport à la matière sèche) [1].

Composants	Café arabica		Café robusta	
	Vert	Torréfié	vert	Torréfié
Caféine	0,9-1,6	0,8-1,4	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.8. Les effets bénéfiques du café

De très nombreuses études ont mis en évidence des effets bénéfiques de la consommation de café sur la santé, principalement une activité anti-oxydante, anticancérogène et antimutagène [3].

I.8.1. L'activité anti-oxydante

Plusieurs constituants du café sont susceptibles de chélater certains ions métalliques, comme par exemple le fer ferreux, et donc d'avoir une activité anti-oxydante en limitant la dégradation de l'ADN. C'est le cas des polyphénols (principalement l'acide chlorogénique) et des mélanoidines (polymères bruns formés par la réaction de Maillard au cours de la torréfaction) [1]. En fait, bien que la teneur en acide chlorogénique diminue durant la torréfaction des grains, l'activité anti-oxydante de la café boisson obtenue à partir de café torréfié est plus élevée que celle du café vert grâce à la formation de produits de Maillard, en particulier les mélanoidines.

I.8.2. L'activité anticancérogène ou antimutagène

Plusieurs constituants du café semblent être à l'origine d'une activité protectrice du café contre certains types de cancer, en particulier celui du colon. Parmi ceux-ci, citons la caféine, les polyphénols (dont les acides chlorogéniques), ainsi qu'une fraction lipidique essentiellement constituée de cafestol et kahweol [1].

I.9. Autres effets bénéfiques possibles

La consommation de café semblerait limiter l'apparition de diabète de type 2. En outre, au vu de certaines études épidémiologiques, la consommation de café jouerait un rôle protecteur contre l'apparition d'autres maladies, telle la maladie de Parkinson ou des maladies hépatiques.

I.10. Les effets néfastes du café

- Une grande nervosité.
- Une situation d'anxiété.
- Des insomnies.
- Une réduction de l'activité motrice, voire des crampes [3].

I.11. L'acrylamide (molécule potentiellement néfaste)

L'acrylamide 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 [4]. 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 [5].

L'acrylamide contient une double liaison électrophile réactive et un groupe amide réactif. Il présente de faibles propriétés acides et à la fois basiques. 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 floculant, la stabilisation des sols, dans les cosmétiques, le papier et le textile. L'acrylamide est décrit comme une neurotoxine, génotoxine et est probablement cancérigène probable pour l'homme [4].

I.12. 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. Des quantités relativement faibles peuvent être trouvées dans les aliments soumis à des températures allant jusqu'à 260 °C.

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 [6].

I.13. 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 [4].

L'acrylamide est cancérigène pour les rongeurs de laboratoire et est décrit par le centre international de recherche sur le cancer, comme un cancérogène probable pour l'homme. La neurotoxicité de l'acrylamide est caractérisée par la 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.

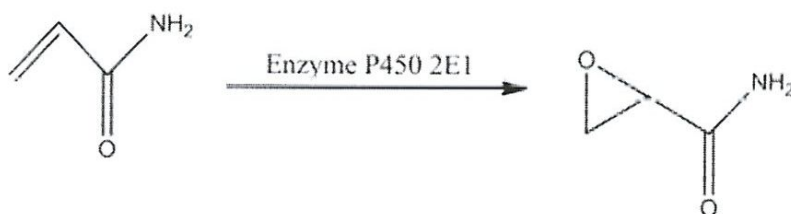


Figure I.7 : Formation du glycidamide à partir de l'acrylamide. (P450 2 E1 : Monooxygénase cytochrome) [7].

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). Cette fonction du glycidamide implique la génotoxicité. En outre, les niveaux élevés d'acrylamide peuvent causer des mutations génétiques et la transformation cellulaire.

L'acrylamide et le glycidamide peuvent être décontaminés dans les cellules par combinaison avec le glutathion, ou par hydrolyse. 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. L'acrylamide peut être absorbé par la peau, mais l'absorption cutanée n'est qu'environ 7 % de l'absorption par voie orale.

L'acrylamide se lie directement à l'ADN (acide désoxyribonucléique). Il peut être excrété par le corps humain avec de l'urine, principalement sous forme métabolisée [8].

I.14. 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. 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.

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.

I.15. Conclusion

A la fin de ce chapitre, il apparaît que les effets bénéfiques du café sont attribués aux composés bioactifs de cette boisson tels que la caféine et les polyphénols. Toutefois le café contient aussi l'acrylamide (molécule produite lors de la torréfaction) dont il 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 local en acrylamide. C'est le cas dans cette étude qui s'intéresse à la détection et la quantification de l'acrylamide dans le café.

***Chapitre II : Chromatographie liquide
à haute performance (HPLC)***

Introduction

La chromatographie est un ensemble de procédés, applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire, généralement dispersée, et une phase mobile continue, les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant. Il existe trois principaux types de chromatographie :

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- La chromatographie en couche mince (CCM).

La Chromatographie Liquide Haute Performance ou Haute Pression (HPLC) est une amélioration technologique de la chromatographie liquide.

II.1. Théorie de la chromatographie en phase liquide

II.1.1. Définition

La chromatographie est une méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances. L'appareil utilisé pour effectuer certaines chromatographies se nomme chromatographe. L'image ou le diagramme obtenu par chromatographie est appelé chromatogramme. Lorsqu'on utilise un chromatographe et un logiciel de chromatographie, le chromatogramme prend généralement la forme d'un graphique qui traduit la variation d'un paramètre relié à la concentration du soluté en sortie de colonne, en fonction du temps de rétention[9].

La chromatographie peut être analytique (visant à l'identification des substances présentes) ou préparative (visant à la séparation des constituants d'un mélange). La chromatographie analytique est largement utilisée à l'échelle du laboratoire et en chimie organique. La chromatographie préparative est rarement utilisée sur de grandes quantités en raison de son coût et de sa lenteur [9].

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de

pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire c'est-à-dire la régularité de cette phase) [9].

II.1.2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [9].

II.1.3. Différents modes de séparation

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- L'adsorption.
- Le partage (80% des séparations).
- L'échange d'ions.
- L'exclusion.

II.1.3.1. Chromatographie d'adsorption

C'est la méthode la plus ancienne et "encore" la mieux connue. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène. D'autres phases ont été utilisées avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der WAALS, hydrogène et des interactions hydrophobes. Il s'agit de chromatographie liquide-solide (CLS) [10].

La chromatographie d'adsorption en phase inverse est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire [10].

II.1.3.2. Chromatographie de partage

C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides [10].

II.1.3.3. Chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu [11].

II.1.3.4. Chromatographie d'exclusion

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration, permutation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel [11].

II.1.4. Polarité et chromatographie

II.1.4.1. Polarité d'une molécule

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires [9].

II.1.4.2. Interactions entre molécules

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions [9] :

- Les interactions diélectriques ou ioniques
- les liaisons " hydrogène "
- les forces de Van Der Waals.

II.1.4.3. Notion de polarisabilité

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables [9].

II.1.4.4. Application à la chromatographie

On utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes. On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire [9].

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

– Polarité de phase

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale [9].

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée [9].

– Composition de la phase mobile

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés [9].

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique. Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient

d'éluion, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme. Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée [9].

II.1.5. Notions fondamentales

II.1.5.1. Phases mobile et stationnaire

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne [9].

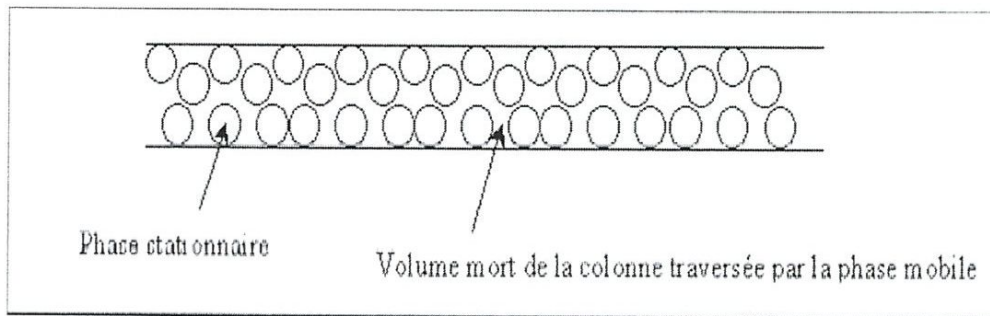


Figure II.1 : La phase stationnaire et la phase mobile [9].

II.1.5.2. Notion de temps

En chromatographie, le temps est un paramètre important pour l'analyse qualitative d'un mélange de différents solutés.

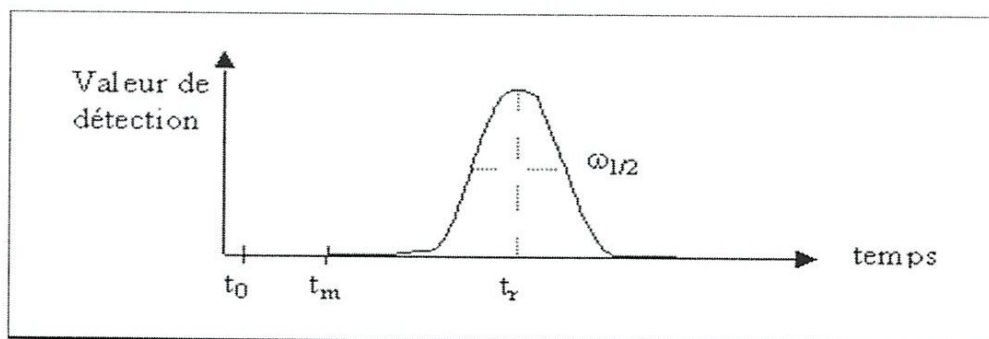


Figure II.2 : La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic [9].

- t_0 est le temps du début de l'injection.
- t_m (le temps mort) qui est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).

- t_r (le temps de rétention) est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant étudié.
- Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m$$

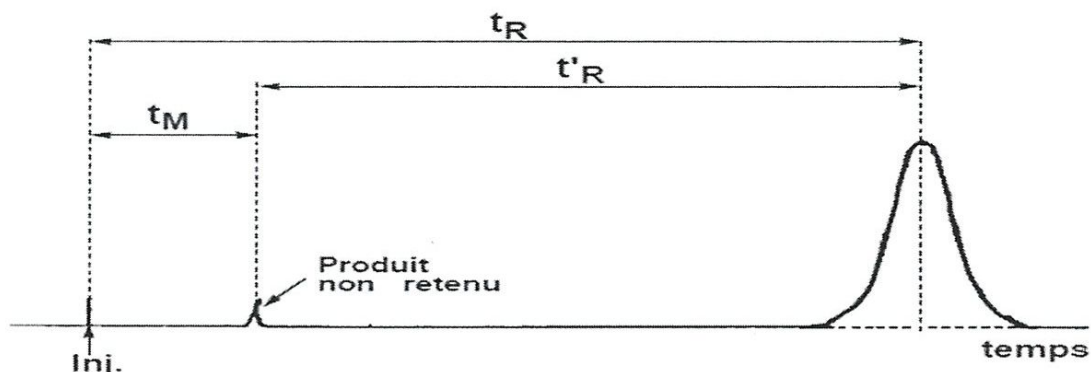


Figure II.3 : Types de temps pour un pic chromatographique [9].

II.1.5.3. Notion de concentration

- **Le coefficient de partage K**

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K [9].

$$K = C_s / C_m$$

Ce coefficient est fonction de 2 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile.
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire.

- **Le facteur de capacité K'**

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire.

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

II.1.5.4. Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- **Le nombre de plateaux théoriques N_{th}**

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right]^2$$

t_r : temps de rétention.

$\omega_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur

Remarque

N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5,54 \left[\frac{t_r - t_m}{\omega_{1/2}} \right]^2$$

Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N_{th} .

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique**

HEPT est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L : Longueur de la colonne.

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

II.1.5.5. Qualité de la séparation

Supposons un mélange liquide de deux constituants, analysé par chromatographie liquide. Le schéma ci-dessous représente le chromatogramme correspondant :

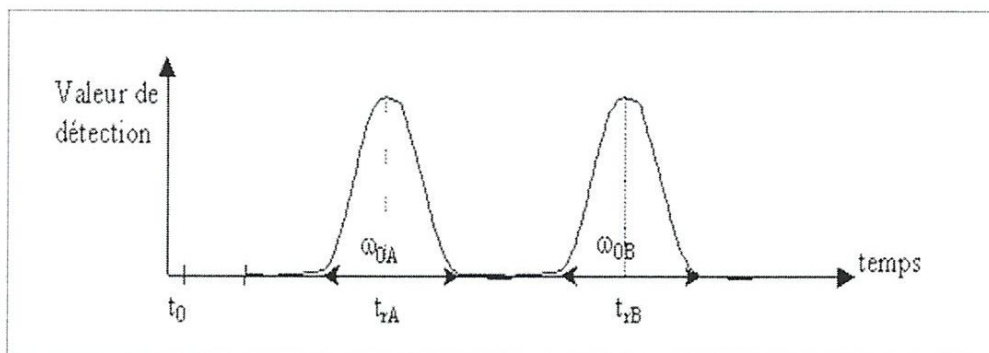


Figure II.4 : La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics [9].

- **La sélectivité (α)**

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits. α est toujours > 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$.

A et B : Solutés dans le mélange à analyser.

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

ω_{0A} et ω_{0B} sont les largeurs des pics des composés A et B respectivement.

$R < 1$: mauvaise résolution.

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable.

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale.

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est allongé.

II.2. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance, on retrouvera toujours les éléments de base suivant : réservoir de la phase mobile, pompe, injecteur, colonne, détecteur, intégrateur [10].

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse [10] :

- Des composés thermosensibles.
- des composés très polaires.
- ainsi que des composés de masses molaires élevées.

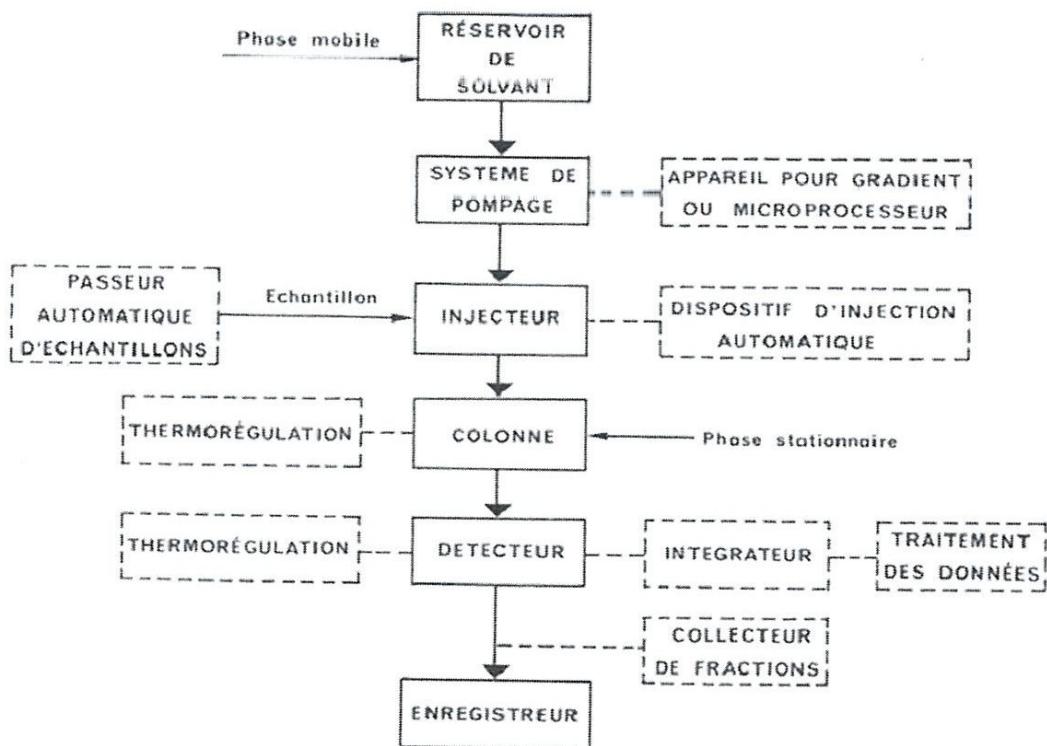


Figure II.5 : Composition d'une chaîne HPLC [12].

II.2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le dégazage de la phase mobile (solvants) est indispensable avant de commencer une analyse par HPLC [10].

II.2.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux [10].

Elle permet de travailler :

- En mode isocratique, c'est-à-dire avec 100 % d'un même éluant ou à des concentrations fixes de plusieurs éluants tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

II.2.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [10].

Vanne à boucle d'échantillonnage possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique [10].

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. Actuellement, les appareils pour HPLC sont munis des auto échantillonneurs et injecteurs, le volume injecté est programmé.

II.2.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne inférieur ou égal à 4,6 mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm ou même moins. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires [9].

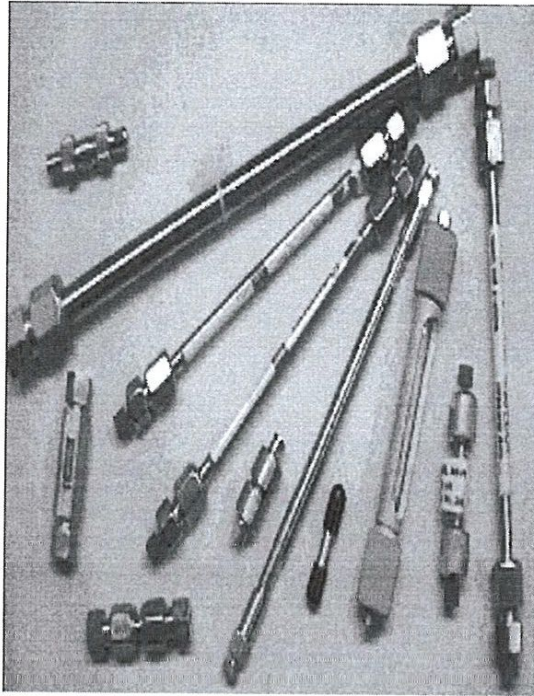


Figure II.6 : Quelques types de colonnes pour HPLC [10].

II.2.5. Détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne [9].

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel.
- UV à barrette de diodes.
- Electrochimique.
- Fluorimétrie.

Ainsi, il existe aussi différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge.
- Spectrométrie de masse.
- Résonance magnétique nucléaire.

II.2.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

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

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions 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 [9].

Conclusion

A partir des informations exposées dans ce chapitre, on peut conclure que :

- La chromatographie de partage est la plus usuelle et permet la mise en œuvre de deux types de phase stationnaire :
 - Une phase stationnaire normale (polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures).
 - Une phase stationnaire inverse ou greffée (non polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire (mélanges : eau-méthanol ; eau-acétonitrile ; eau-tétrahydrofuranne).
- Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance, on retrouvera toujours les éléments de base suivant : réservoir de la phase mobile, pompe, injecteur, colonne, détecteur, intégrateur.

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Introduction

Dans ce chapitre nous présenterons le matériel, les réactifs, les conditions de torréfaction du café, le mode opératoire et la méthode analytique mise en œuvre pour l'analyse de différents types de cafés.

La méthode analytique utilisée est la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barattes de diode (HPLC-UV-DAD) pour le dosage d'un composé qui apparaît lors de la torréfaction de café : L'acrylamide.

III.2. Matériels

Dans ce travail, différents matériels et appareils ont été utilisés dont les plus importants :

- Verrerie usuelle de laboratoire.
- Agitateur magnétique.
- Balance technique.
- Balance analytique (sortoniuscp 2245).
- Broyeur (POLYMIX PX-MFC 90 D).
- Lyophilisateur (Alpha 1-2 LD plus).
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260.
- Centrifugeuse (EBA III Pehich).
- PH mètre(Hana).

III.3. Solvants et réactifs

- Acétonitrile grade HPLC.
- Acide formique d'une pureté supérieure à 97%.
- Eau distillée et filtrée.
- Acrylamide.

III.4. Appareillages

III.4.1. Lyophilisateur

- **Principe de fonctionnement**

La lyophilisation est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés, par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation [13].

- **Les étapes du processus de lyophilisation**

- **Congélation**

La première étape consiste à congeler les produits pour que l'eau qu'ils contiennent soit transformée en glace. La température doit rester plus basse que -20 °C tout au long du processus de lyophilisation [13].

- **Lyophilisation primaire**

Elle doit se dérouler sans décongeler le produit avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace (conditionnée par la température). Plus cette température sera basse et plus le vide devra être bas.

- **Lyophilisation secondaire**

Destiné à éliminer les dernières traces d'eau retenues par absorption ou pour assurer une quantité d'eau résiduelle la plus faible possible.

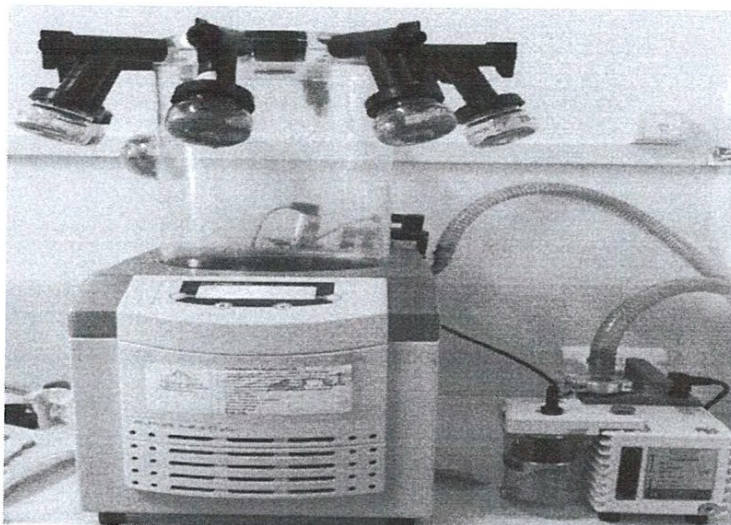
La chute ne doit pas conduire à la destruction partielle ou totale par dénaturation du produit.

- **Caractéristiques du lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus**

- Performance 2 kg de glace par 24 h.
- Piège -55 °C en acier inox 316, volume 2,5 kg de glace.
- Affichage numérique température condenseur et pression.
- Contrôleur de vide et micro vanne pour casser le vide.
- Chambre transparente avec 8 embouts pour robinets.
- Kit de tubulure pour raccordement DN16 pour pompe à vide livrée avec 8 flacons.

Pour lyophilisation sur manifold ayant :

- Un volume 75 ml.
- Un col large 49 mm.
- Filtre retenant le lyophilisat, stérilisable à 121 °C .
- Diamètre 60 mm.
- Hauteur 87 mm.
- Poids 130 g.



*Figure III.1 : Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus
(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

III.4.2. Chromatographie liquide à haute performance (Agilent, série 1260 Infinity) [14]

- Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 Infinity (**Figure III-2**) est muni d'un réservoir contenant la phase mobile, 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). La colonne de type C18 à silice greffée.
- Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation.
- 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.

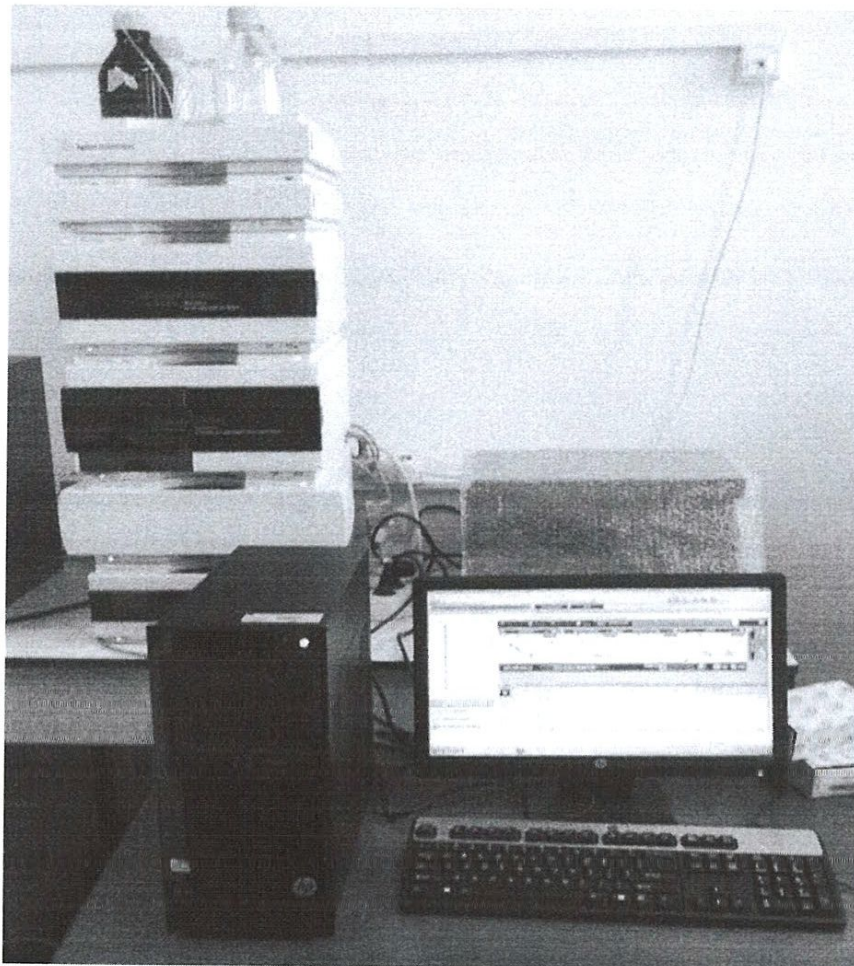


Figure III.2: Appareil pour HPLC (Agilent série 1260 Infinity) utilisé pour le dosage de l'acrylamide (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

III.5. Méthodes

III.5.1. Dosage de l'acrylamide dans le café 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.

Le but de cette analyse est la détermination de la teneur de l'acrylamide dans les différents cafés concernés par cette étude. L'influence de la température de torréfaction sur le taux d'acrylamide a également été étudiée.

Quelques caractéristiques de l'acrylamide ainsi que sa structure moléculaire sont respectivement, représentées dans le tableau (III.1) et la figure (III.3).

Tableau.III.1 : Quelques caractéristiques de l'acrylamide [5].

Composé	Formule brute	Nom chimique	Masse molaire (g/mol)	Solubilité
Acrylamide	C ₃ H ₅ NO	2-propénamide	71.08	dans l'eau à 30 °C

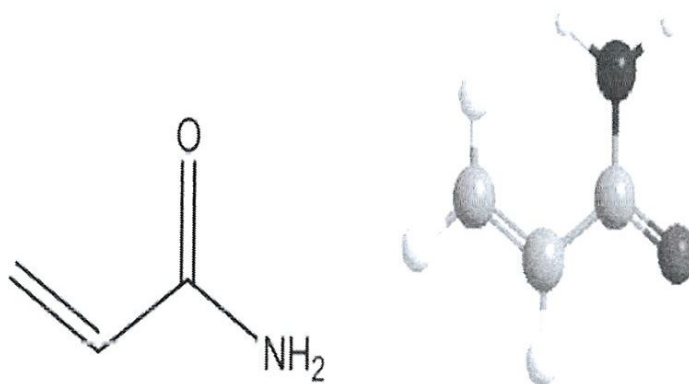


Figure III.3 : Formule chimique de l'acrylamide en 2D et 3D.

III.5.2 Conditions de l'analyse

Pour ce dosage, le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min. La détection du composé étudié a été réalisée à 210 nm; la longueur d'onde maximale d'absorption de l'acrylamide. La séparation a été réalisée en mode isocratique avec 95 % eau et 5 % acétonitrile et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 5 minutes.

III.5.2.1 Phase mobile

Les solvants de la phase mobile utilisés dans le dosage de l'acrylamide sont :

Solvant A : Eau / Acide formique (0,1%).

Solvant B : Acétonitril / Acide formique (0,1%).

III.5.2.2 Phase stationnaire

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).

III.5.3 Échantillons de café

Des marques différentes de cafés (empaquetés, non empaquetés (en vrac (vert et torréfiés)) ont été achetées au marché local dans la ville de Guelma et utilisées dans cette étude. Ces échantillons de café sont principalement composés de Robusta et d'Arabica purs ou de mélanges des deux.

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 (**Figure III.4**).

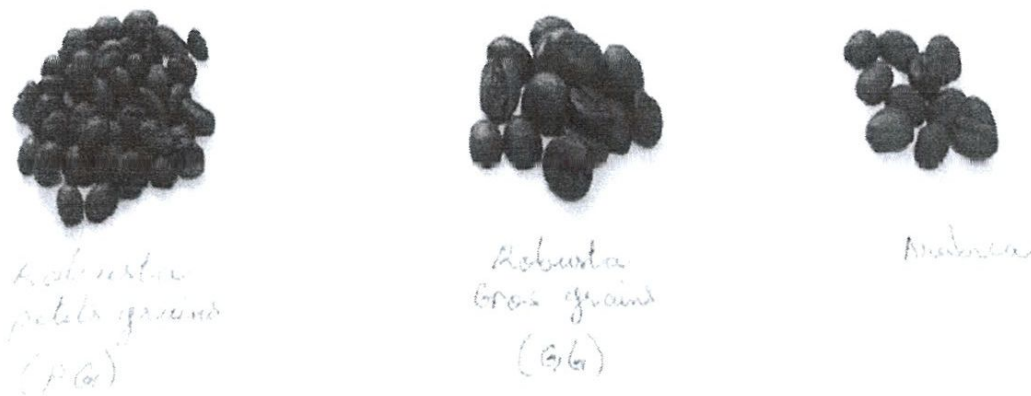


Figure III.4 : Échantillons de café (Arabica, Robusta, Robusta à petits grains (PG), Robusta à gros grains(GG)).

III.6. Méthode de préparation des échantillons

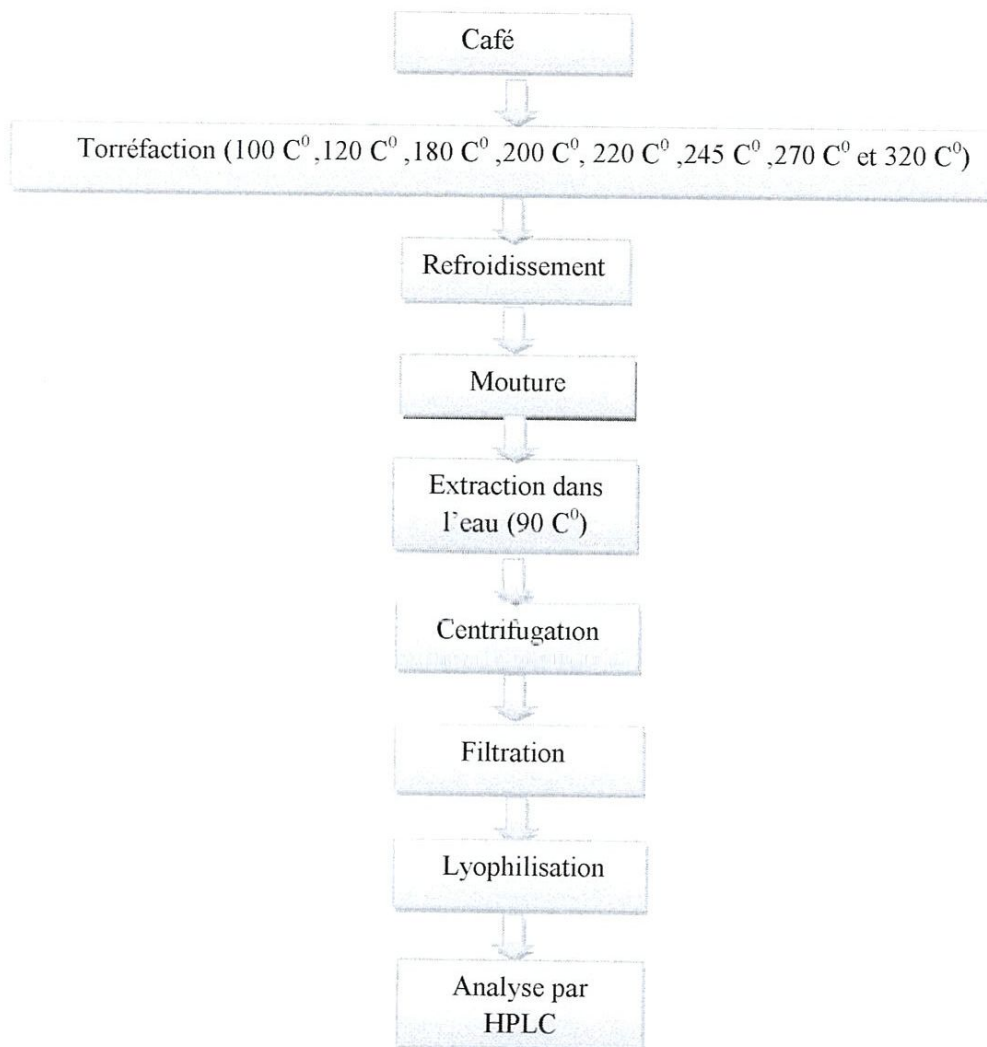


Figure III.5 : Protocole de préparation des échantillons.

Comme il est illustré par la figure (III.5), 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 pendant 10 minutes et broyés à l'aide d'un broyeur à 6000 tours/min.

Des photographies des échantillons torréfiés sont présentées par la figure (III.6). On y voit clair que les couleurs virent du jaune au marron et finalement vers le noir à des torréfactions poussées.

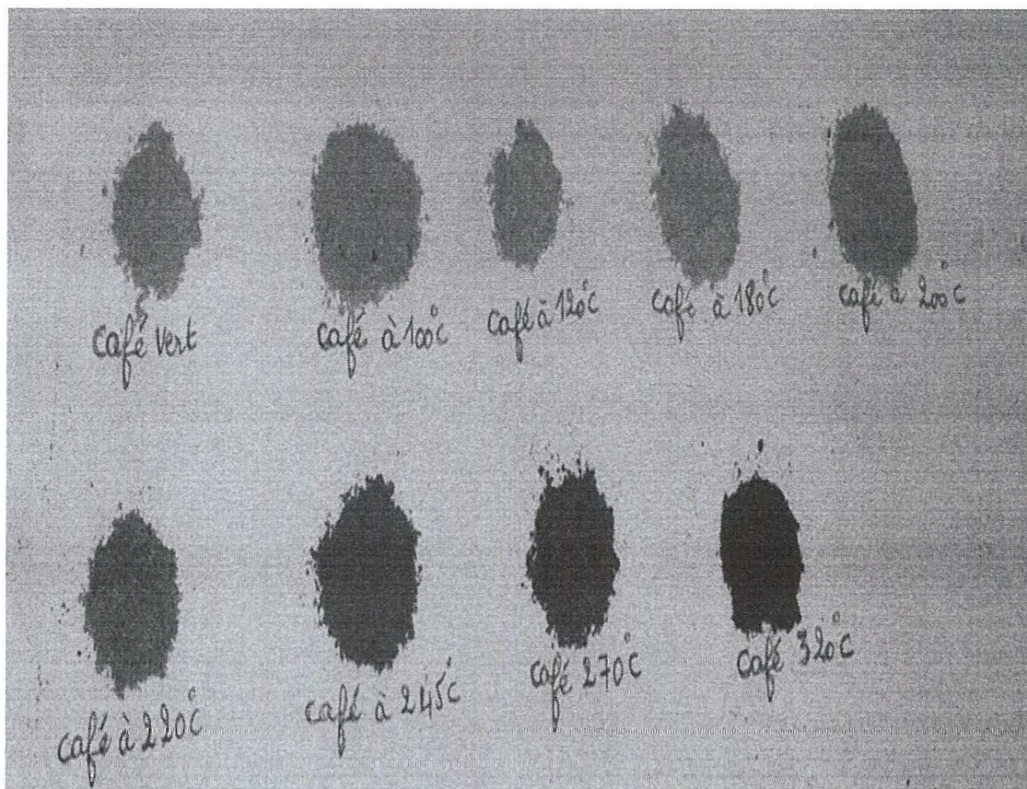


Figure III.6 : Échantillons de café vert et torréfiés.

Étant donné que l'acrylamide est très soluble dans l'eau (215,5 g/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, et lyophilisé pendant deux jours avant d'être analysé par HPLC- UV-DAD.

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

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

Une quantité de 1g du produit obtenu a été prélevée et incorporée dans une solution de 10 ml d'eau. Un volume de 2 µl de chaque échantillon a été, ensuite, injecté dans l'appareil HPLC (en triplicata).

III.7. 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. 2).

III.8. Méthode de préparation et injection du standard

Le but de cette étape est de construire la courbe d'étalonnage du composé pur (standard) qu'on veut doser ultérieurement, dans les différents échantillons du café.

La solution mère est préparée à partir de 1 mg du standard pur dans 100 ml d'eau pure.

Des volumes de : 0,25 µl ; 0,5 µl ; 1 µl ; 2 µl de la solution standard préparée ont été injectés en triplicata dans l'appareil d'HPLC. La courbe étalon a été tracée.

La courbe est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2010) qui donne la variation des aires des pics en fonction des volumes injectés.

La concentration en acrylamide des échantillons a été calculée par étalonnage externe.

III.9. Calcul des rendements

Les valeurs des rendements montrent l'efficacité de l'extraction. Le calcul de rendement a été basé sur la relation suivante :

$$R = \frac{mf}{mi} \times 100$$

mf: La masse de l'extrait du café après la lyophilisation (g).

mi: La masse du café pesée avant l'extraction (g).

III.10 Validation de la méthode analytique

III.10.1 Courbe d'étalonnage

La molécule a été dosée par la méthode du standard externe. La gamme de volumes injectés était de 0,25 à 2 µl. La courbe d'étalonnage a été tracée en représentant les aires des pics (Y) par rapport aux volumes injectés (X, µl) pour quatre volumes différents, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures indépendantes de surface.

III.10.2. Détermination des limites de détection et de quantification de l'acrylamide

La limite de détection (LD) est la plus petite masse ou concentration de l'analyte pouvant être détectée. Alors que, la limite de quantification (LQ) est la plus petite masse ou concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, bien entendu, dans les conditions expérimentales de la colonne.

La limite de détection (LD) a été calculée en considérant une valeur égale à trois fois l'écart type des trois essais effectués pour tracer la courbe d'étalonnage, divisée par la pente de la courbe. La limite de quantification (LQ) a été déterminée en tenant compte d'une valeur égale à dix fois l'écart type obtenue, divisée par la pente de la courbe [15].

Les LD et LQ sont déterminés comme suit :

$$\mathbf{LD = 3. \text{ Ecart type/Pente}}$$

$$\mathbf{LQ = 10. \text{ Ecart type/Pente}}$$

III.10.3. 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

Afin de déterminer le taux de récupération de l'acrylamide, une solution de café préparée à partir de café torréfié emballé a été enrichie par des quantités connues en standard, puis analysée dans les mêmes conditions. Les quantités supplémentaires détectées ont alors été soustraites aux quantités déterminées dans la même solution de café non enrichie. Quatre répétitions sont réalisées par échantillon.

Le taux de récupération de la méthode analytique proposée à trois niveaux d'enrichissement différents de composés standard dans le café moulu [16].

$$\mathbf{\text{Taux de récupération}(\%) = \frac{C_e - C}{C_a} * 100}$$

Où :

Ce : Concentration mesurée d'un échantillon enrichi.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non enrichi.

Ca : Concentration de la substance ajoutée.

III.11. Injection

L'appareil HPLC-UV-DAD analytique 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 2 µl. L'appareil d'HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives [15].

III.12. 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. 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 au composé étudié pour chaque échantillon 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 [15].

III.13 Conclusion

Après le détail du matériel et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que la méthode d'analyse choisie pour notre étude est une méthode simple, efficace et adéquate ; en fait, elle a permis d'identifier et de doser avec une grande précision, l'acrylamide dans le café. Cette méthode a été convenablement validée.

Chapitre VI : Résultats et discussions

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons, la courbe de standard, les chromatogrammes, les rendements d'extraction et les résultats du dosage des différents types de café étudiés. Le constituant de café qui a été dosé est : l'acrylamide, et la méthode analytique utilisée est : HPLC- UV-DAD.

IV.2. Résultats

IV.2.1. Analyse qualitative de l'acrylamide par HPLC-DAD

IV.2.1.1. Données chromatographiques du standard

Les figures de (IV. 1) à (IV.2) représentent successivement le chromatogramme par HPLC et la courbe étalon du composé pur dosé, et le tableau (IV.1) montre les données pour construire la courbe d'étalonnage.

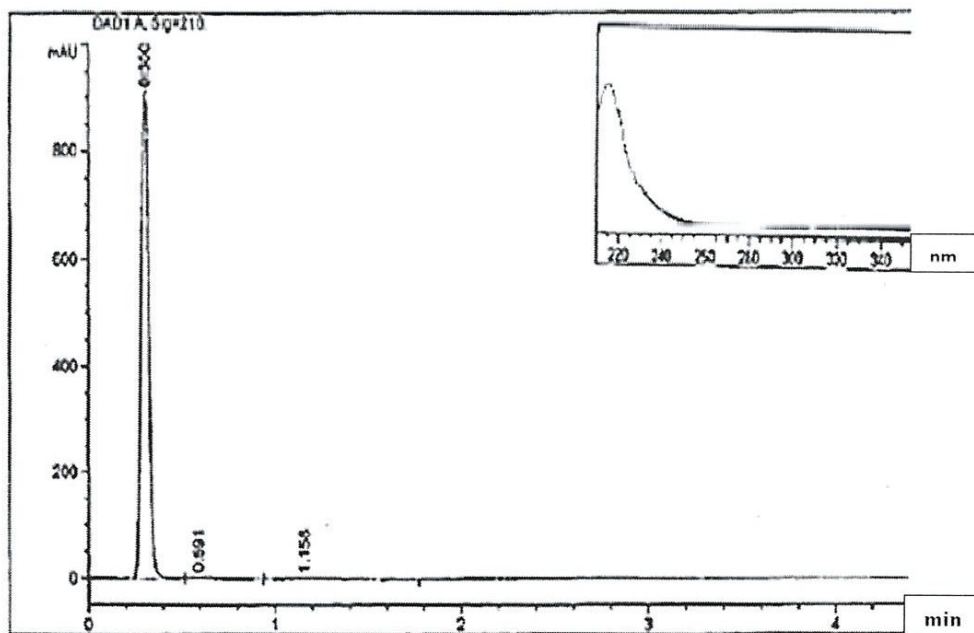


Figure IV. 1 : Chromatogramme HPLC de l'acrylamide pur (T_R : 0,30 min, λ : 210 nm) et le spectre UV correspondant.

Tableau IV. 1 : 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
0,5	704,41	704,74	704,61	704,58	0,16
1	1411,30	1411,17	1411,13	1411,20	0,08
2	2744,27	2744,34	2744,72	2744,44	0,24

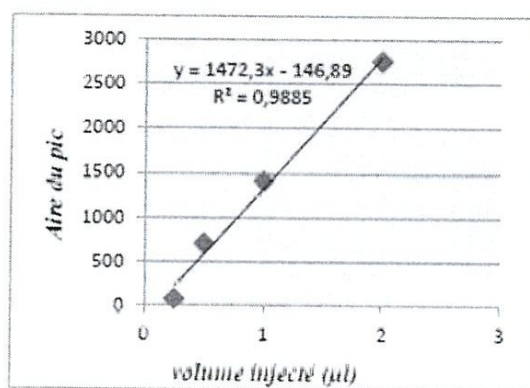


Figure IV.2 : Courbe d'étalonnage de l'acrylamide.

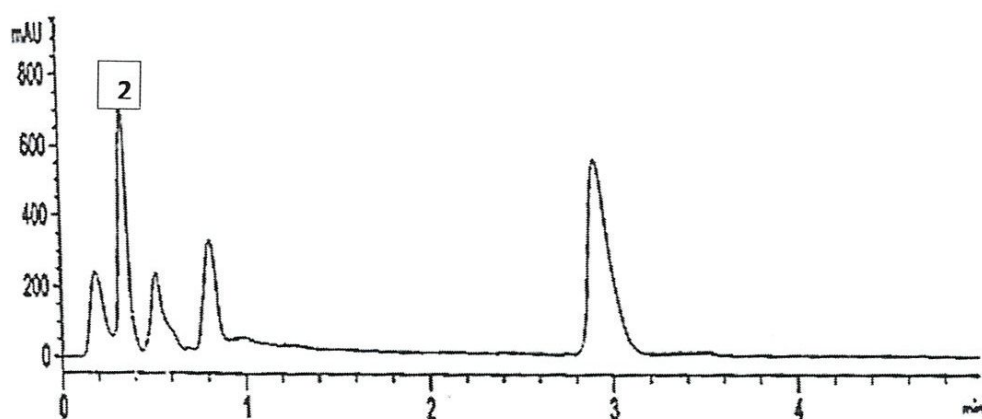


Figure IV. 3 : Chromatogramme HPLC d'un café emballé (3) ; Pic (2) : acrylamide,

T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

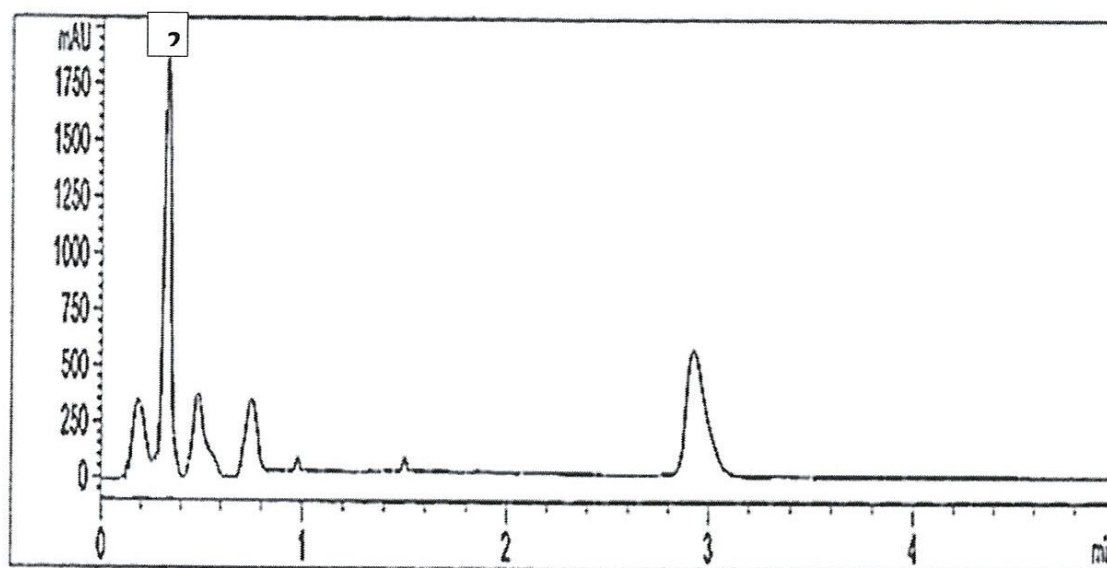


Figure IV.4 : Chromatogramme HPLC d'un café empaqueté (3) dopé par 1 μ l d'acrylamide ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

La présence de ce composé a été identifiée par comparaison des chromatogrammes d'un échantillon de café empaqueté (Figure IV.3) à celui de la molécule standard pure (Figure IV.1) et pour confirmer on a effectué une co-injection de 1 μ l de l'acrylamide avec le même échantillon (Figure IV.4).

IV.2.2. Analyse quantitative de l'acrylamide

IV.2.2.1. Présentation des chromatogrammes des échantillons du 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 empaquetés et non empaquetés étudiés.

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

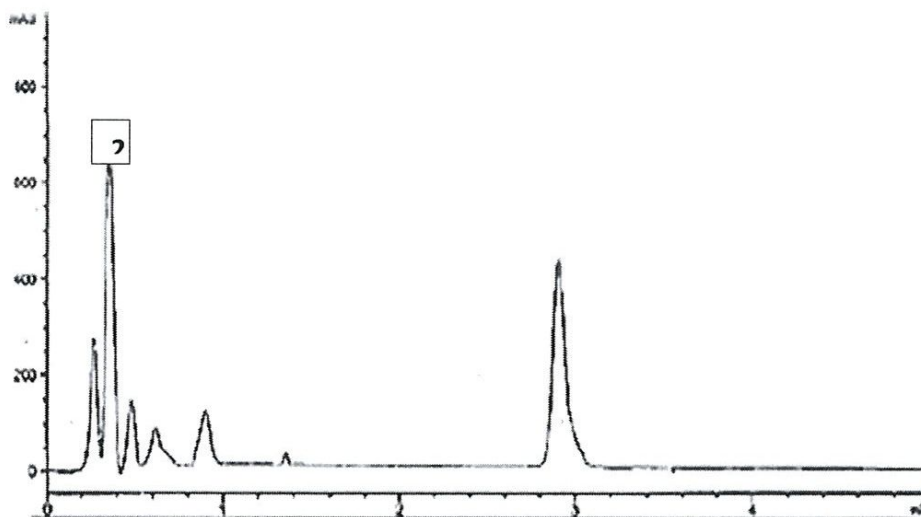


Figure IV.5 : Chromatogramme HPLC du café torréfié à 200 °C (couleur du café : claire) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

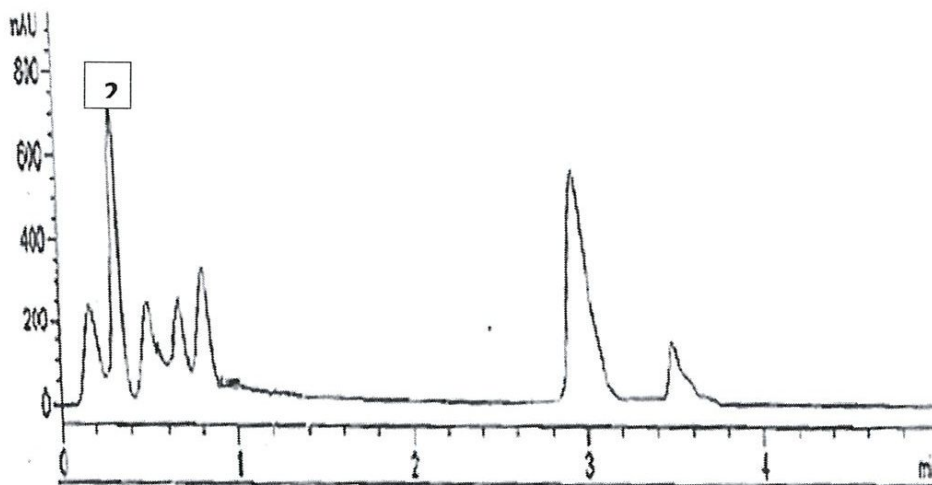


Figure IV. 6 : Chromatogramme HPLC du café torréfié à 245 °C (couleur moyenne) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

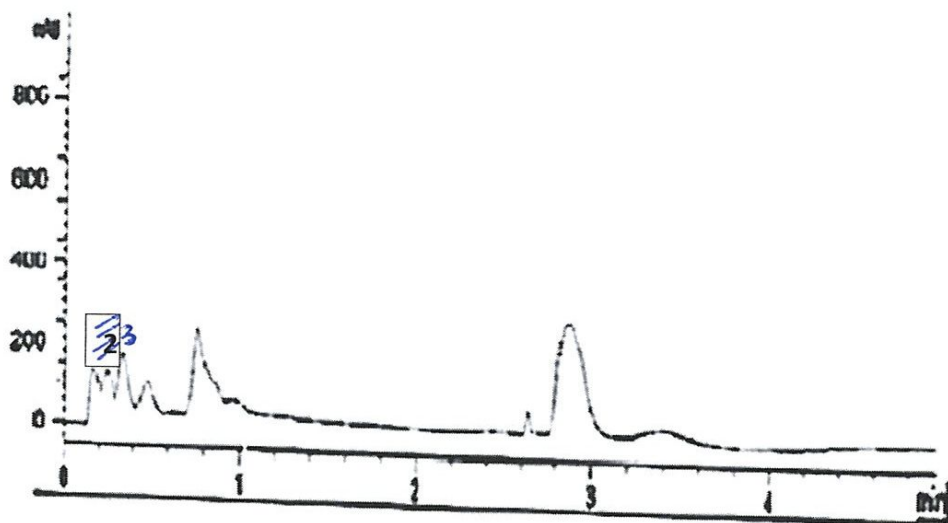


Figure IV. 7 : Chromatogramme du café torréfié à 320 °C (couleur foncée) ; Pic (3)
acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

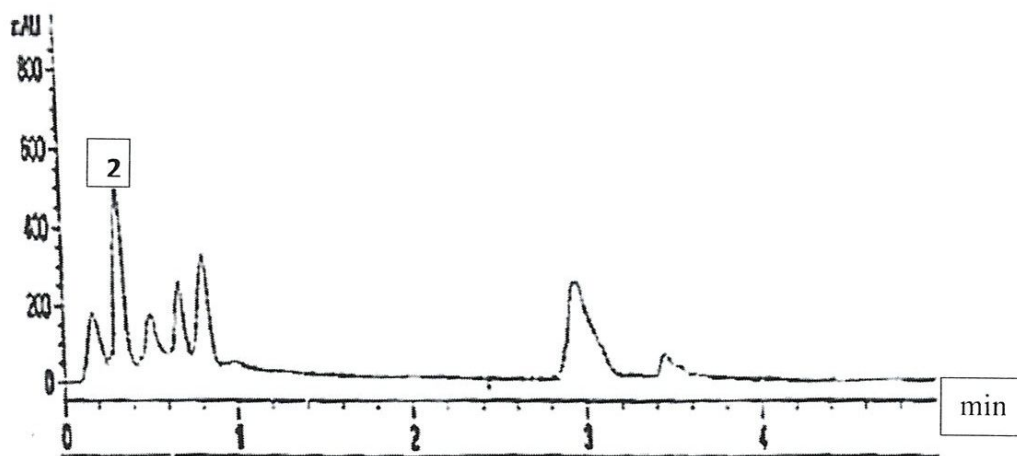


Figure IV. 8 : Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (PG)) ; Pic (2) :
acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

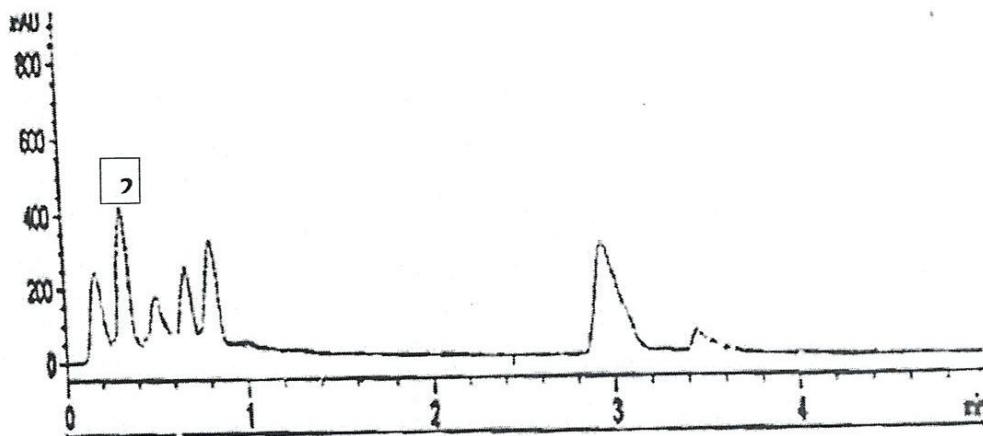


Figure IV. 9 : Chromatogramme du café torréfié moulu (Robusta (GG)) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30 min, λ : 210 nm.

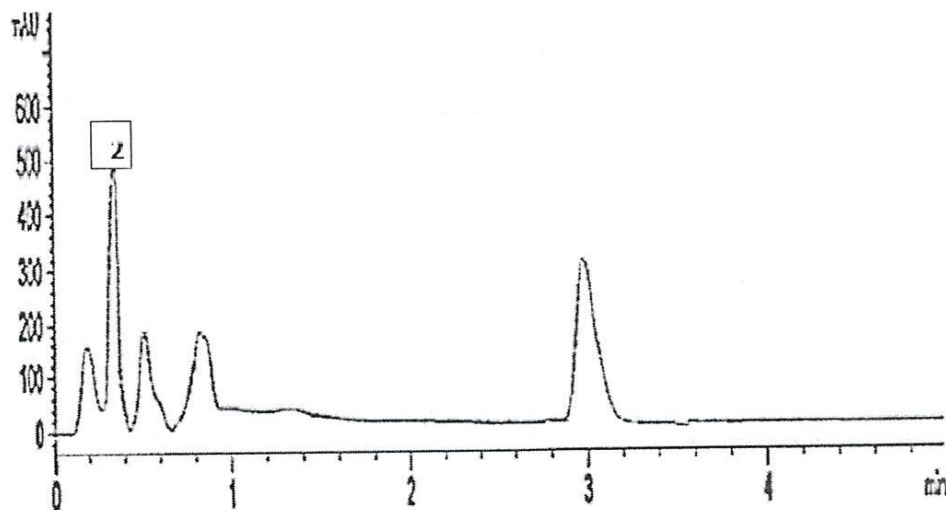


Figure IV. 10 : Chromatogramme du café torréfié moulu non emballé (Robusta (PG + GG)) ; Pic (2) : acrylamide, T_R : 0,30min, λ : 210 nm.

IV.2.3. Validation de la méthode d'analyse

IV.2.3.1. Linéarité de la courbe d'étalonnage et résolution des pics

Comme nous l'avons vu précédemment, la courbe d'étalonnage était linéaire et un facteur de régression, ($R^2 = 0,98$) a été obtenu pour la solution de composé standard et la résolution des pics était acceptable.

Tableau IV.2 : Concentrations ($\mu\text{g/l}$) de l'acrylamide dans les échantillons étudiés, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm RSD

Echantillons	Variété	Acrylamide ($\mu\text{g/l}$)	pH	Rendement (%)
Empaqueté (1)	Robusta	38,61 \pm 0,16	5,10	27.14
Empaqueté (2)	Mélange	39,43 \pm 1,54	4,89	21.42
Empaqueté (3)	Mélange	44,80 \pm 2,50	5,45	20
Empaqueté (4)	Mélange	39,89 \pm 1,95	4,99	21.42
Moulu non empaqueté	Arabica	10,45 \pm 0,44	4,77	34.28
Moulu non empaqueté (PG+GG)	Robusta	24,77 \pm 1,21	5,45	35.71
Moulu non empaqueté (PG)	Robusta	25,66 \pm 1,66	5,09	41.42
Moulu non empaqueté (GG)	Robusta	17,34 \pm 1,33	4,98	35.71
Torréfié à 100 °C	Robusta	nd	5,05	38.57
Torréfié à 120 °C	Robusta	14,50 \pm 1,56	4,80	41.42
Torréfié à 180 °C	Robusta	25,05 \pm 1,35	5,24	41.42
Torréfié à 200 °C	Robusta	30,45 \pm 2,67	5,40	35.71
Torréfié à 220 °C	Robusta	32,33 \pm 1,59	5,90	42.85
Torréfié à 245 °C	Robusta	25,75 \pm 3,55	5,12	42.85
Torréfié à 270 °C	Robusta	21,55 \pm 1,33	5,08	38.57
Torréfié à 320 °C	Robusta	11,66 \pm 0,96	4,73	42.85

IV. 3. Discussion

IV.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 $\mu\text{g/l}$ [6].

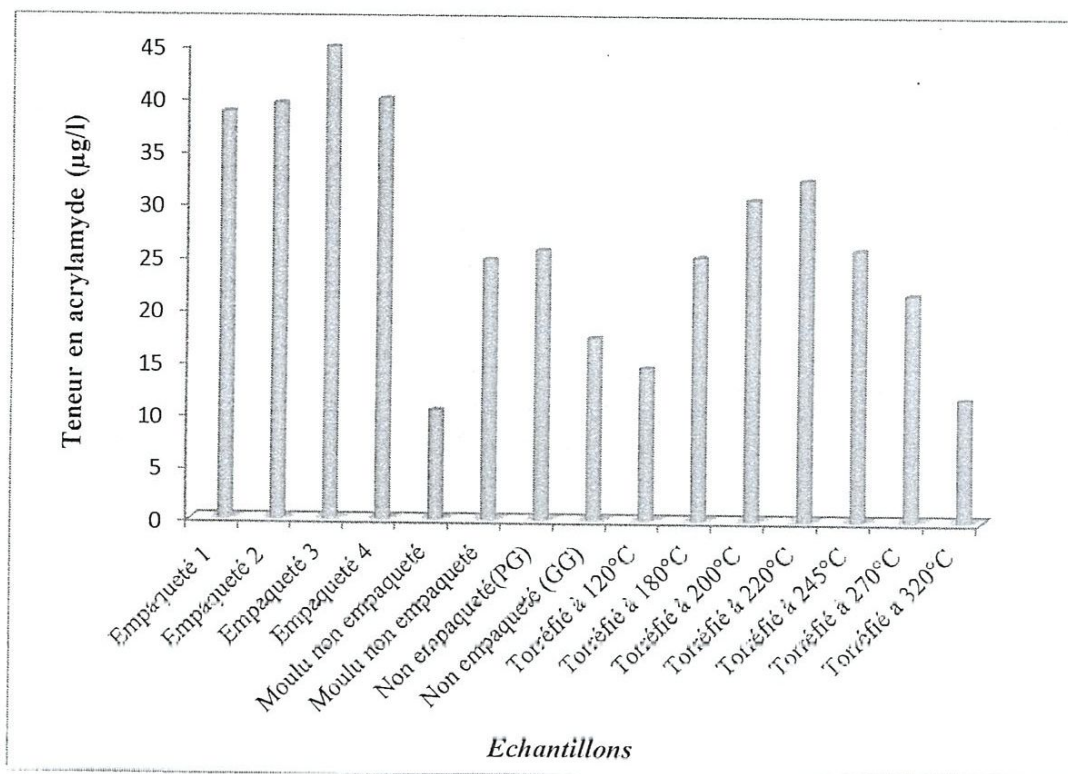


Figure IV.11. Teneurs en acrylamide des différents échantillons étudiés.

La teneur en acrylamide dans les échantillons de café torréfié non empaqueté 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. Cette différence semble être associée avec une teneur élevée en acides aminés et spécialement l'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 apparait 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 $44,80 \pm 2,50 \mu\text{g/l}$, les sucres réducteurs et l'asparagine sont impliqués dans la formation d'acrylamide ; 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.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 [7]. 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, 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 obtenus sont bien illustrés par la figure suivante :

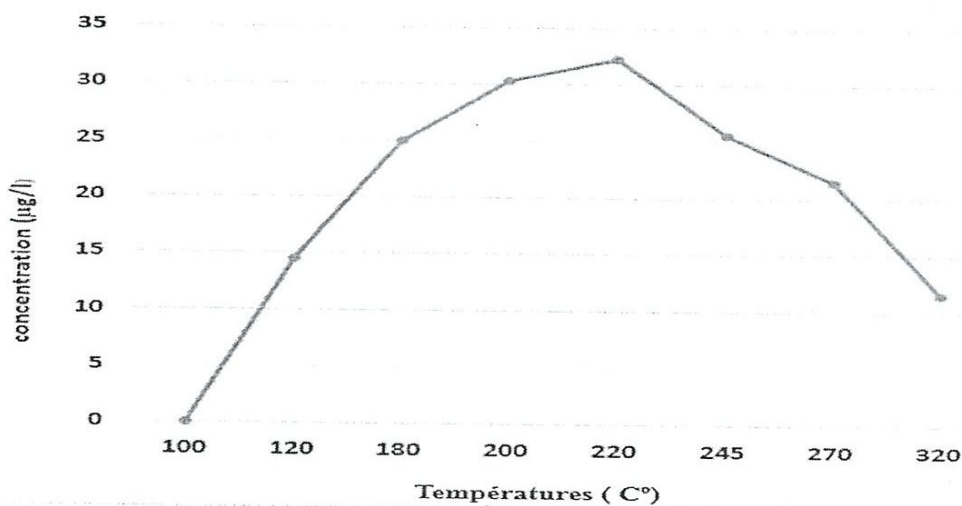


Figure IV.12. Variation de la concentration de l'acrylamide dans le café en fonction de la température de torréfaction.

IV.3.3. Impact du pH sur la formation de l'acrylamide

D'après la littérature [7], 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. En revanche un faible pH contribue à la réduction de taux de l'acrylamide [7].

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.3.4. Les rendements

Il est intéressant de noter que les rendements de l'extraction de toutes les marques de café emballé sont proches les uns aux autres, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées dans le café en vrac. 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.

IV. 4. Conclusion

Cette étude est menée sur le café (torréfié conditionné ou non) du marché local afin d'identifier et déterminer sa composition en un contaminant chimique. (L'acrylamide) et pour cela des analyses en HPLC-UV-DAD, ont été réalisées.

Les résultats obtenus indiquent que :

- La composition en acrylamide est affectée par le procédé de torréfaction qui est indispensable pour le café. Ses teneurs dans le café conditionné sont supérieures à celles du café non conditionné.
- Les Arabicas ont une teneur plus faible que les Robustas.
- Les fortes torréfactions réduisent la teneur en acrylamide.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était l'analyse et le dosage du café du marché local, en un contaminant chimique ; l'acrylamide qui apparait à la suite du traitement thermique du produit.

La méthode analytique utilisée était : 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.

Afin de suivre la cinétique de formation de ce composé ; nous avons étudié l'influence de la torréfaction à des températures différentes et à un temps fixe (15 min). Des couleurs qui vont du marron clair au foncée ont été observées. Les analyses ont montré que les teneurs en acrylamide sont plus importantes que leur couleur après torréfaction est clair (entre 180 et 220 °C). La teneur en ce composé commence ensuite à diminuer dans les échantillons de couleur moyenne (245 °C) pour atteindre la plus faible valeur à la couleur foncée (310 °C). Ainsi, le degré de torréfaction constitue un facteur clé dans la teneur en 'acrylamide. La quantité d'acrylamide présente dans le café peut énormément varier. Les grains qui ont été torréfiés récemment et de la bonne manière, qui ont une couleur plutôt sombre, contiennent normalement le taux le plus bas d'acrylamide.

Le taux d'acrylamide indiqué est à prendre au sérieux même s'il s'avère faible .Il faut noter également que le taux limite d'acrylamide fixé par la commission FAO/OMS pour le café boisson est de 450 ug/kg.

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. De ce fait la consommation de café doit être modérée.

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

- 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
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- [1] **HOUSSOU J. K.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction. Thèse: Ecole Doctorale ABIES, Paris. **2007**.
- [2] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/cafe.htm> (Consulté Avril 2017).
- [3] **HALER P. N.G.** Le café : les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. Thèse. Université De Lorraine. **2013**.
- [4] **KLEIN C.** L'acrylamide, Contaminant alimentaire cancérigène méconnu. Thèse de doctorat : Université Henri Poincaré – Nancy I. **2007**.
- [5] Acrylamide <https://fr.wikipedia.org/wiki/> (Avril 2017).
- [6] **BAGDONAITE K., DERLER K., & MURKOVIC. M.** Determination of acrylamide during roasting of coffee. J of Agric and Food Chem. **2008**.
- [7] **GAMBOA D.C.G, CUCHWELL M.I, HAMILTON P., VON TUNGELN I.S, 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**.
- [8] **KLEIN C.** Génotoxicité d'un contaminant néoformé dans les aliments. L'acrylamide, et de son métabolite époxyde, le glucidamide -Approche expérimentale par le test des comètes. Mémoire de Master ; Procédés biotechnologiques et alimentaires : Université de Nancy I. **2005**.
- [9] HPLC. www4.ac-nancy-metz.fr/physique/ancien_site/CHIM/Jumber/pdf./pdf. (Avril 2017).
- [10] **FRANCIC R., ANNICK R.** Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Livre 6 ème Edition. **2004**.
- [11] **RENE L.** Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Université pierre et marie curie - ufr de biologie. **2005**.
- [12] **LATIFA BEN SAAD.** Étude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : Application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma. Mémoire Pour l'obtention du Mastère en chimie analytique. Université Tunis El Manar. **2013**.
- [13] Lyophilisateur <http://www.machine.lyophilisation.fr/> (Avril 2017).
- [14] Chromatographie [http://ead.univvangers.fr/%7ejaspard/page2/cours/6cours deust/ /1cho](http://ead.univvangers.fr/%7ejaspard/page2/cours/6cours%20deust/%201cho). (Avril 2017).
- [15] Extrait du Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen. <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article209>. **2016**.

[16] **DUCAUZE C., BAILLET G. A., BUIT T. X.** Choix et validation d'une méthode d'analyse. Agrosparitech Ed, Paris, Agrosparitech, 30 p.