

UNIVERSITE OE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE
DE LA PULPE OE CAFE (coffea Arabica L.)

THESE PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES PAR

JAIME ZULUAGA-VASCO

CHIMISTE DIPLOME
DE L'UNIVERSITE NATIONALE
DE LA COLOMBIE (BOGOTA)

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR ES SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITE DE
NEUCHATEL

JUIN 1981

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Contribution à l'étude de la composition
chimique de la pulpe de café (*Coffea*
arabica L.)

de Monsieur Jaime Zuluaga-Vasco

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

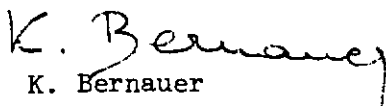
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod
et H. Moll (Lausanne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 7 juillet 1981

Le doyen:


K. Bernauer

"La chose la plus incompréhensible
du monde, c'est que le monde est
compréhensible"

Albert Einstein

à la mémoire de mon père

à ma famille

à Ute

Le présent travail a été effectué de novembre 1977 à juin 1981 dans les laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, sous la direction du Professeur Raphaële Tabacchi, à qui j'exprime ma profonde gratitude pour l'encouragement chaleureux et l'aide précieuse qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Je remercie également les Professeurs André Jacot-Guillermod et Hans Moll qui ont bien voulu faire partie de mon jury.

Mes remerciements vont à tous ceux qui de près ou de loin m'ont permis la réalisation de ce travail et spécialement

- à la Confédération Helvétique pour l'attribution d'une bourse pendant ces quatre ans,
- à la "Federación Nacional de Cafeteros de Colombia" particulièrement au Dr Marco Quijano, directeur du Laboratoire de Recherche à Bogotá, au Dr Silvio Echeverri, directeur du Centre National de Recherche sur le Café à Chinchiná et au Dr Anibal Puentes de l'usine de Café Lyophilisé à Chinchiná qui m'ont fourni les échantillons de pulpe de café,
- à tous les assistants de l'Institut de Chimie, en particulier au Dr Saturnin Georges Jean Claude pour les spectres de RMN¹H et pour la correction du texte français de ce travail,
- à Monsieur Strautmann, de l'Institut de Métallurgie, pour l'aide précieuse dans la construction du dispositif pour la chromatographie circulaire centrifuge,
- à Madame Claudine Claude qui s'est aimablement chargée de la dactylographie de cette thèse.

7.1.3	Fractionnement avec la formaldéhyde	32
7.1.4	Purification des différentes fractions avec PVP insoluble	34
7.1.5	Dosage différentiel des différents groupes phénoliques	37
7.1.5.1	Courbe d'étalonnage	39
7.1.5.2	Calculs	42
7.2	Résultats et discussions	42
8.	<u>ETUDE DES ANTHOCYANES DE LA PULPE DE CAFE</u>	45
8.1	Extraction	55
8.2	Pré-purification de anthocyanines / utilisation de PVP insoluble	55
8.3	Séparation et purification des anthocyanes / utilisation de cellulose	56
8.4	Séparation et purification des anthocyanines par chromatographie circulaire centrifuge sur papier à l'échelle préparative (CCCP)	57
8.5	Analyse qualitative des anthocyanines	61
8.5.1	Analyse des aglycones par HPLC	62
8.5.2	Analyse des sucres par G.L.C.	64
8.5.3	Analyse chromatographique sur papier	65
8.5.3.1	Hydrolyse "in situ" des hétérosides	66
8.5.4	Analyse par spectroscopie ultraviolet- visible (UV-vis.)	67
8.5.5	Analyse par résonance magnétique nu- cléaire	70
8.6	Analyse de résultats	72
9.	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	74

10. <u>CONSIDERATIONES FINALES</u>	76
11. <u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	78
11.1 Analyse des sucres libres de la pulpe de café	78
11.1.1 Appareils	78
11.1.2 Réactifs	78
11.1.3 Conditions d'analyse (CGL)	78
11.2 Estimation quantitative des différents groupes de composés phénoliques de la pulpe de café	79
11.2.1 Appareils	79
11.2.2 Réactifs	79
11.3 Etude des anthocyanes de la pulpe de café	79
11.3.1 Appareils	79
11.3.1.1 Dispositif d'extraction liquide- liquide en continu	80
11.3.1.2 Dispositif pour la chromatographie circulaire centrifuge sur papier à l'échelle préparative (CCCP)	81
11.3.2 Supports et solvants	82
11.3.3 Hydrolyse acide des anthocyanes pour analyse par HPLC	82
11.3.4 Hydrolyse acide d'hétérosides pour l'analyse de sucres par G.L.C.	83
11.3.5 Analyse chromatographique sur papier	83
11.3.6 Hydrolyse "in situ" des hétérosides	84
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	85

1. INTRODUCTION

1.1 Historique

L'histoire du café commence à une époque très lointaine.

E.C. BUERGIN [1] nous raconte, dans son magnifique livre sur le café, que Georg Paschius (dans le traité en latin qu'il a écrit vers 1700) pense en reconnaître dans le premier livre de Samuel (XXV, 18). "Les cinq mesures de grain rôti" que la belle Abigaïl remet en présent à David à l'occasion de leur réconciliation ne seraient rien d'autre que des grains de café.

Aussi Pierre Etienne Louis Dumant, pasteur et écrivain suisse, défend une interprétation originale: dans la Genèse (XXV, 30), l'épais mélange contre lequel Esaü a cédé son droit d'aînesse n'était pas un plat de lentilles, mais bien du café. De même, Pietro Della Valle (1586-1652) pense en trouver trace dans Homère: le népenthe qu'Hélène emportait avec elle pour calmer ses tourments serait du café mélangé à du vin.

D'après la plus ancienne légende que cet auteur nous transmet, Mahomet lui-même apparaît comme un ami du café. Parmi d'autres amis de cette boisson on trouve des artistes et des savants, comme Goethe, Wagner, Byron et Mendelsshon. Goethe se trouve particulièrement lié à l'histoire du café parce qu'il en a donné quelques grains au chimiste allemand RUNGE [2] lequel isola le principe actif: la caféine.

En général on admet que le pays d'origine du caféier est l'Ethiopie (KAFFA), où il est évoqué dans des écrits datant du

9ème siècle et où on le trouve aujourd'hui à l'état sauvage. Vers le début du 17ème siècle les portugais et les hollandais ont introduit le premier caféier à Ceylan. A la même époque il est importé aux Indes par un pèlerin musulman appelé Baba Budan et depuis là apporté à Java par Hendrik Zwaardkroom en 1699. Le premier caféier arriva en Europe en 1706, rapporté de Java par le gouverneur Van Hoorn au Jardin Botanique d'Amsterdam. Tous les caféiers des principaux jardins botaniques européens proviennent de cet arbuste du Jardin Botanique d'Amsterdam.

Le capitaine français Gabriel Mathieu de Clieu, après des péripéties assez rocambolesques réussit à introduire le premier caféier à la Martinique en 1723 et c'est avec les semences de cet arbuste qu'ont été créées pratiquement toutes les plantations des colonies françaises ainsi que celles d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale.

1.2 Considérations botaniques

Le botaniste suédois LINNAEUS [3] classifie la plante comme Coffea arabica. Le caféier fait partie de la famille des rubiacées. On connaît environ soixante espèces du genre Coffea (L.) (Rubiaceae) dont les plus importantes sont: C. arabica (L.) var. typica, bourbon, maragogyne et moka; C. canephora (Pierre ex Froehner) var. robusta, uganda et kouillou; C. liberica (Bull. ex Hiern); C. dewevrei (de Wild) "C. excelsa"; C. stenophylla.

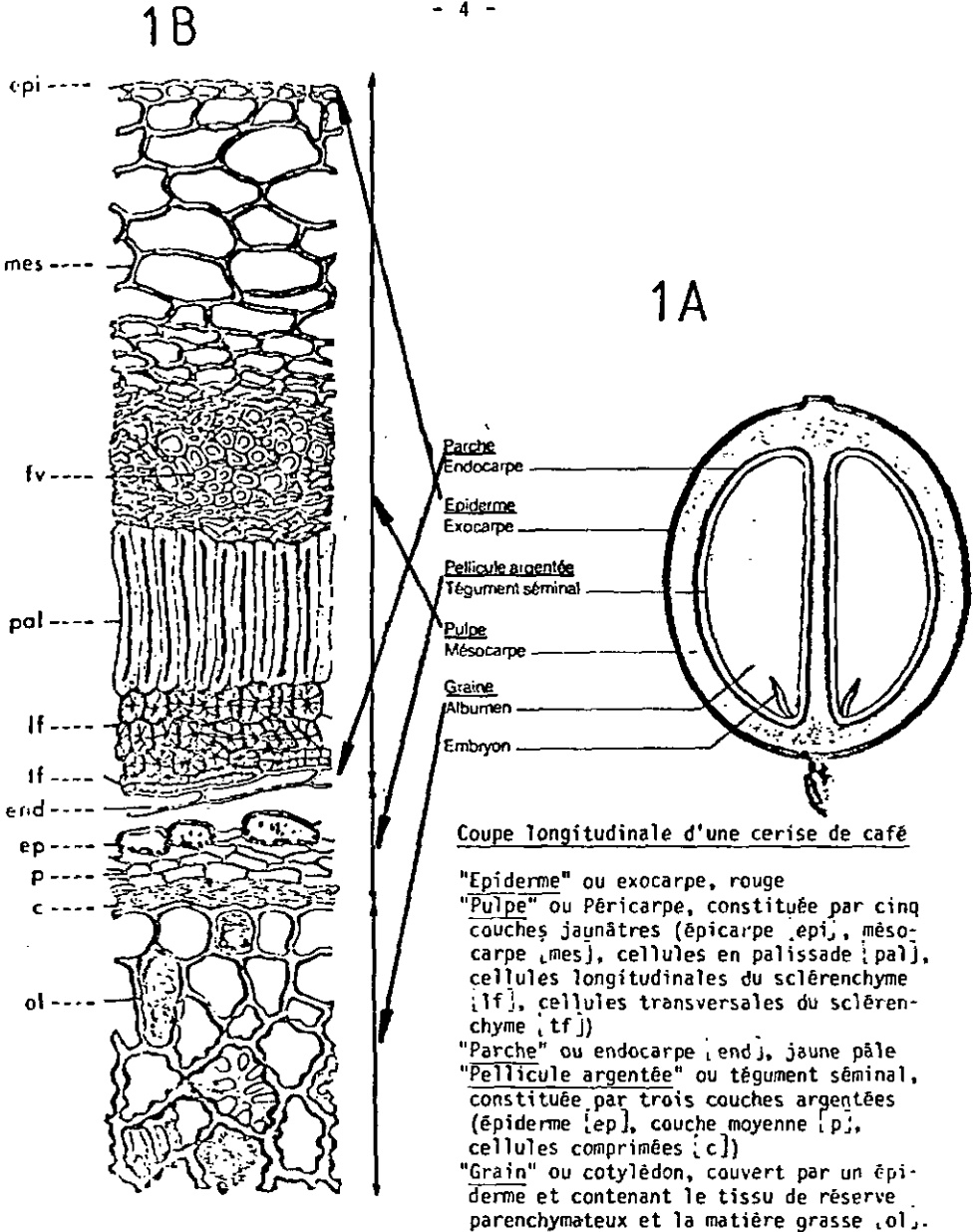
L'espèce *Coffea arabica* est la plus répandue et la variété d'*arabica* la plus cultivée est l'*arabica typica*.

1.3 Le fruit du caféier

Le fruit du caféier a le même aspect extérieur que celui d'une cerise, c'est pourquoi on le désigne également sous ce nom.

La coupe longitudinale de ce fruit (Schéma 1A) montre les différentes couches tissulaires. On remarque, à première vue, que la pulpe est formée par l'exocarpe (épiderme) et le mésocarpe. La couleur de l'épiderme varie du vert jusqu'au rouge, voire au rouge foncé, parfois même jusqu'au violet et au noir. La couleur dépend en effet de la variété du caféier et du degré de maturation du fruit. Enveloppé par l'épiderme on trouve le mésocarpe, grosse couche de tissu spongieux de cinq millimètres d'épaisseur, riche en sucres et mucilages, qui entoure deux graines accolées par leur face plane. Celles-ci sont revêtues d'une double membrane: la première communément appelée parche est de couleur jaune pâle et de consistance dure et fragile, la deuxième, beaucoup plus fine que la précédente et adhérent à la graine (albumen) est appelée pellicule argentée (tégument séminal). A la base de la graine sur la face interne on trouve le germe (embryon).

L'observation microscopique de la coupe d'un fruit montre en détail chacune des parties mentionnées ci-dessous (Schéma 1B).



SCHEMA No 1 VUE MACROSCOPIQUE 1A ET MICROSCOPIQUE 1B DE LA COUPE LONGITUDINALE D'UN FRUIT DE CAFÉ

Cette coupe permet de constater que la pulpe n'est pas composée seulement de l'exocarpe et du mesocarpe, mais également de trois autres couches de tissu cellulaire: cellules en palissade, cellules longitudinales du sclérenchyme, cellules transversales du sclérenchyme. La pellicule argentée comporte également trois couches: épiderme, couche moyenne, cellules comprimées. Dans la graine on peut remarquer le tissu de réserve parenchymatique et des matériaux gras.

2. ETAT ACTUEL DE L'ETUDE SUR LA PULPE DE CAFE

Lors de la première réunion internationale sur l'utilisation des sous-produits du café (Turrialba - Costa Rica, 11-14 juin 1974) le CATIE (Centre agronómico tropical de investigación y enseñanza) a fait une étude bibliographique des travaux effectués en Amérique tropicale, aux Etats Unis, en Europe, en Afrique et en Asie sur les sous-produits de café, pendant la période 1919-1974 [5]. Il en découle que onze travaux sur la composition chimique et la digestibilité de la pulpe ont été réalisés. Trois d'entre eux [6], [7], [8] révèlent la présence de caféine et de tanins dans la pulpe, tandis que [9], en plus de l'analyse approximative, procède à l'analyse de la caféine, des tanins totaux, des acides chlorogéniques et caféique. D'après BRESSANI et al [7] [8] la présence de caféine et de tanins limite l'utilisation de la pulpe dans l'alimentation animale.

La valeur nutritive de celle-ci dans l'alimentation pour volailles a fait l'objet de huit travaux [5] qui mettent en évidence

un caractère toxique à partir d'une faible proportion de pulpe dans la ration alimentaire. BRESSANI et al [10] attribuent cette toxicité à la caféine et à l'acide chlorogénique.

Selon [11] la pulpe peut représenter pour l'alimentation de porcins jusqu'à 16% de la ration alimentaire.

Les essais d'incorporation de la pulpe dans l'alimentation de vaches laitières ont eu des résultats encourageants dans trois cas [12] [13] [14]. ALFARO et al [14] notamment en ont incorporé jusqu'à 40% sans observer une baisse dans la production laitière.

D'une manière générale, c'est dans l'alimentation des bovins que les essais ont été les plus concluants. Les vingt huit travaux [5] sur ce sujet permettent de conclure que la pulpe peut être utilisée jusqu'à 20% dans la ration alimentaire [5] [17].

CABEZAS et al [15], [16] montrent que les effets négatifs de la pulpe, quand elle est utilisée à haut pourcentage dans la ration alimentaire du bétail, ne sont pas dus seulement à la caféine mais à l'action conjointe de celle-ci et des tanins.

Contrairement à [15], [16] JAFE [18] établit que la toxicité, ne vient ni de la caféine ni des tanins, mais peut être extraite par l'acool.

L'utilisation de la pulpe comme possible matière première dans l'agriculture et dans l'industrie est illustrée dans vingt cinq travaux [5] [19] dont cinq [19] traitent des techniques de sé-

chage, et trois autres de l'ensilage comme moyen alternatif de conservation [19].

La corporation de développement de Costa Rica (CODESA) [20] a projeté la première usine de traitement de pulpe de café pour l'utilisation dans l'élevage animal en 1975. Cette usine est déjà en fonctionnement.

En 1978 le Centre international de recherche pour le développement IDRC (International development research center) a publié un traité sur la composition, la technologie et l'utilisation de la pulpe [21].

Malgré tout ces travaux déjà effectués, on constate l'absence d'analyses détaillées de la composition chimique. Pour cette raison, nous avons commencé en 1974 une étude systématique en vue de trouver l'utilisation la plus rationnelle possible du déchet que constitue la pulpe. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication [22] et figurent dans les tableaux 1, 2, 3 et 4.

Le tableau 1 concerne l'étude de la distribution (en pourcent) des macro-composants de la cerise obtenus jusqu'au stade de la boisson,

le tableau 2 une analyse de la composition chimique approximative de la pulpe,

le tableau 3 une évaluation de la qualité des protéines de la

pulpe sur la base de sa teneur en amino-acides essentiels,
et

le tableau 4 une évaluation de la qualité des protéines d'un
concentré protéique de la pulpe, sur la base de sa teneur en
amino-acides essentiels.

TABLEAU 1. DISTRIBUTION EN % DES MACRO-COMPOSANTS DE LA CERISE DE CAFE

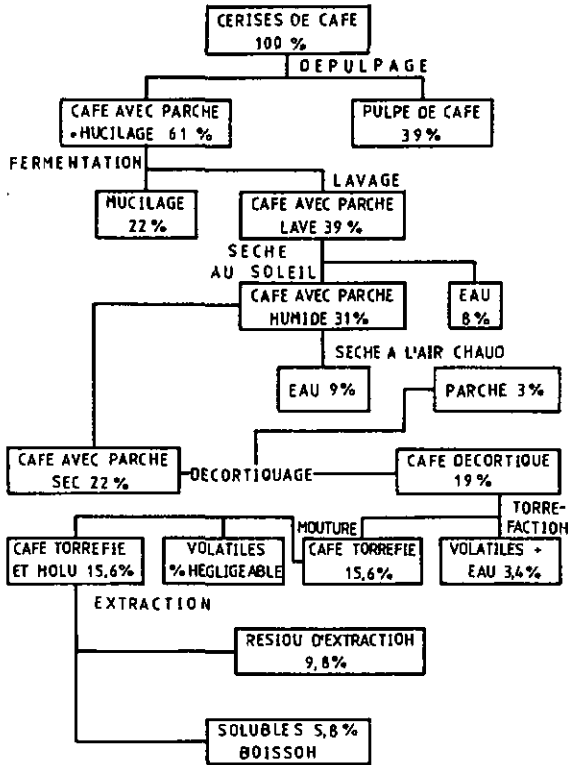


TABLEAU 2. COMPOSITION CHIMIQUE APPROXIMATIVE DE LA PULPE DE CAFE

HUMIDITE	6,93 %
MATIERE SECHE	93,07 %
EXTRAIT ETHERE	2,50 %
FIBRE CRUE	15,10 %
AZOTE	1,32 %
PROTEINE (N x 6,25)	8,25 %
CENDRES	8,12 %
EXTRAIT LIBRE D'AZOTE	59,10 %
HYDRATES DE CARBONE *	74,10 %
CAFEINE	0,75 %
TANINS	3,70 %
ACIDE CHLOROGENIQUE **	2,60 %
ACIDE CAFEIQUE TOTAL **	1,60 %
CALCIUM	0,32 %
PHOSPHORE	0,05 %
POTASSIUM	3,17 %
SODIUM ppm	160
FER ppm	250

* HYDRATES DE CARBONE = EXTRAIT LIBRE D'AZOTE + FIBRE CRUE

** BRESSANI et al

TABLEAU 3. TENEUR EN AMINO-ACIDES DE LA PULPE DE CAFE

AMINO-ACIDES	mg D'AMINO-ACIDE/g D'AZOTE OEUF	PULPE	COMPTE CHIMIQUE	COMPTE PROTEIQUE
LYSINE	436	224	51	74
TRYPTOPHANE	93	247	266	400
TREONINE	320	328	102	146
VALINE	428	347	81	122
METHIONINE	210	48	23	43
ISOLEUCINE	393	168	43	62
LEUCINE	551	310	56	84
TYROSINE	260	239	92	134
PHENYLALANINE	358	241	67	100
TOTAL AROMAT.	618	480	78	110
TOTAL	6201	4480	---	---
TOTAL ESSENTIELS	3049	2152	---	---

INDICE D'AMINO-ACIDES ESSENTIELS : 63

VALEURS MAXIMUM ET MINIMUM POUR LE CALCUL DE L'INDICE D'AMINO-ACIDES 100 ET 1
DANS CES CALCULS L'HISTIDINE N'EST PAS COMPRISE

TABLEAU 4. AMINO-ACIDES D'UN CONCENTRE PROTEIQUE DE PULPE

AMINO-ACIDES	mg D'AMINO-ACIDE/g D'AZOTE OEUF	CONCENTRE	COMPTE CHIMIQUE	COMPTE PROTEIQUE
LYSINE	436	327	75	64
TRYPTOPHANE	-	-	-	-
TREONINE	320	662	206	190
VALINE	428	530	124	107
METHIONINE	210	141	67	57
ISOLEUCINE	393	329	84	69
LEUCINE	551	578	105	88
TYROSINE	260	492	189	175
PHENYLALANINE	358	402	112	91
TOTAL AA AROMAT.	618	894	145	125
TOTAL AA	6201	6791	--	--
TOTAL AA ESSENTIELS	2956	3461	--	--

INDICE D'AMINO-ACIDES ESSENTIELS : 91

VALEURS MAXIMUM ET MINIMUM POUR LE CALCUL DE L'INDICE D'AMINO-ACIDES 100 ET 1
DANS CES CALCULS L'HISTIDINE ET LE TRYPTOPHANE NE SONT PAS COMPRIS

3. JUSTIFICATION DU TRAVAIL

Il y a trois facteurs qui justifient une recherche intensive sur la pulpe.

1. La grande quantité de pulpe disponible dans les pays producteurs. On peut calculer, d'après les données statistiques sur la production mondiale de café [24] et à l'aide de la distribution en pourcentages des macro-composants du fruit de café [22] (tableau 1), une production de 340'000 tonnes (matériel sec) en Colombie; ce qui représente 31% de la production totale d'Amérique Latine pour la période 1978-79.
2. La possibilité, d'après l'analyse chimique [22] (tableau 2), d'utiliser la pulpe comme matière première pour l'obtention de différents produits: levures [23], pectines, caféine, concentrés protéiques, aliments pour le bétail, engrais [21], charbon actif et très probablement d'autres utilisations pas encore envisagées, faute d'analyses chimiques détaillées.
3. Les problèmes de pollution engendrés par une production si élevée de ce sous-produit.

4. BUT DU TRAVAIL

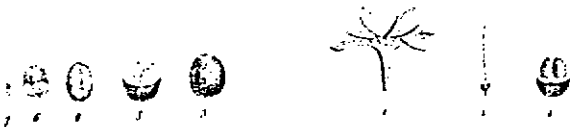
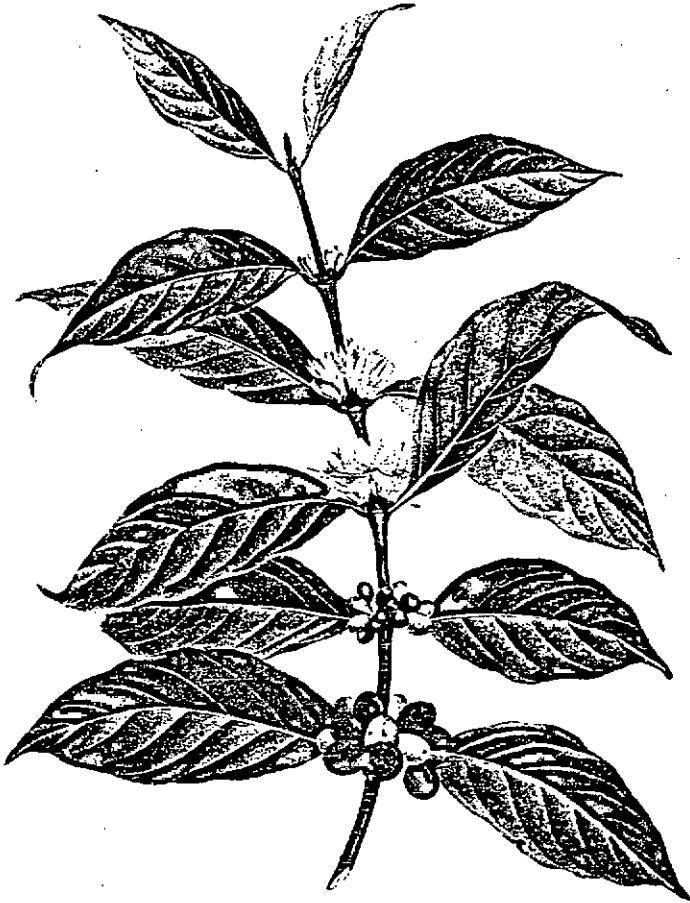
Le but général du présent travail est d'aboutir à une meilleure connaissance de la composition chimique de la pulpe de café. En particulier, nous nous sommes intéressés aux points suivants:

- a) analyse qualitative et quantitative des sucres libres
- b) analyse quantitative des différents groupes de composés phénoliques
- c) analyse qualitative des composés anthocyaniques.

5. MATERIEL VEGETAL ANALYSE

Toutes les analyses ont été faites sur des échantillons de pulpe de café Arabica, variété "tipica rojo", fournis par le Centre national de recherches sur le café "CENICAFE", Chinchina, Colombie.

La moitié de l'échantillon a été lyophilisée immédiatement après la récolte, et l'autre séchée au soleil.



Le Caffer d'arabie

Don. sup.

6. ANALYSE DES SUCRES LIBRES DE LA PULPE DE CAFE

La teneur totale en sucres libres dans les fruits frais, varie entre 1% pour le citron et 16% pour les raisins et la banane. Quelques fruits secs tels que les prunes et les abricots contiennent jusqu'à 50% de sucres totaux [25]. Les sucres libres qu'on trouve plus couramment chez les plantes sont le glucose, le fructose et un disaccharide non réducteur: le saccharose.

Les sucres sont responsables d'une partie du goût du matériel cru et peuvent changer les propriétés du matériel cuit en agissant comme précurseur ou en produisant une couleur brune par la réaction de Maillard. Rappelons que seulement les sucres réducteurs donnent cette réaction. RACENIS [26] a montré que les pentoses sont plus actifs que les hexoses et les aldoses que les cétooses. Il en découle que la détermination individuelle des sucres est, sur le plan analytique, préférable à l'estimation du total des sucres réducteurs et non réducteurs.

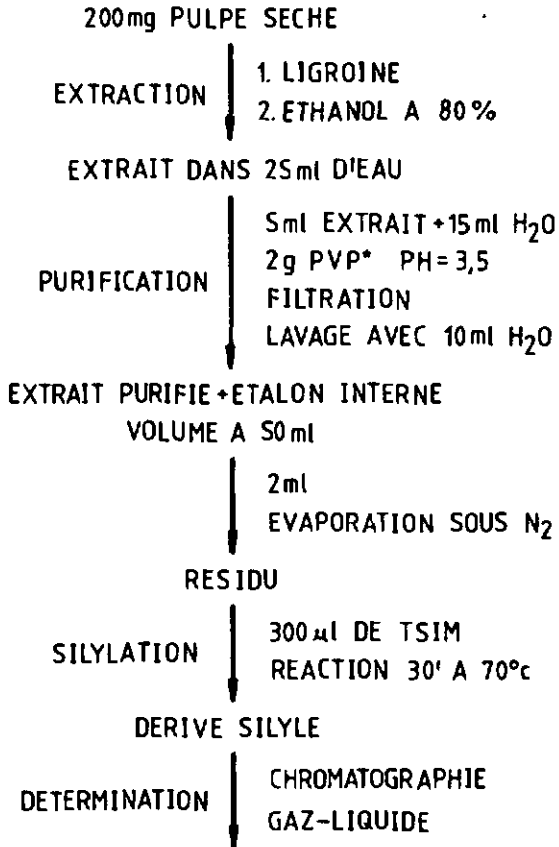
Il est connu que les hydrates de carbone peuvent donner des dérivés volatils tels que les triméthyl-silyl-éthers (SAWARDEKER et al [27] SWEeley et al [28]) et les alditol acétates (SAWARDEKER et al [29]). Ces derniers ne sont cependant pas indiqués quand le fructose doit être estimé en présence de glucose, étant donné que tous les deux produisent du glucitol par réduction. Ce fait rend impossible une détermination quantitative.

L'utilisation de la chromatographie gaz-liquide des dérivés silylés présente beaucoup d'avantages pour la détermination individuelle ou totale des sucres libres. La méthode est simple, rapide, reproductible et assez exacte (\pm 5% d'erreur)(HEATHER-BELL [30], DAVISON et al [31]). Les résultats obtenus sont comparables à ceux atteints par les méthodes standard Munson-Walker A.O.A.C.(KLINE et al [32] et SOMOGYI A.O.A.C. (Association of official agricultural chemists)). HEATHERBELL [30] et DAVIES et al [33] ont observé que les résultats obtenus par ces dernières méthodes sont entachés d'erreurs (par excès) à cause de la présence d'autres substances réductrices, telles que l'acide ascorbique et les ions métalliques.

En conséquence, pour doser les sucres libres dans la pulpe lyophilisée tout comme dans la pulpe séchée au soleil, nous avons préféré recourir à la méthode chromatographique.

La figure 1 montre le schéma général de cette analyse, dont le détail du mode opératoire figure dans la partie expérimentale.

FIG 1. SCHEMA D'ANALYSE DE SUCRES LIBRES DANS LA PULPE DE CAFE



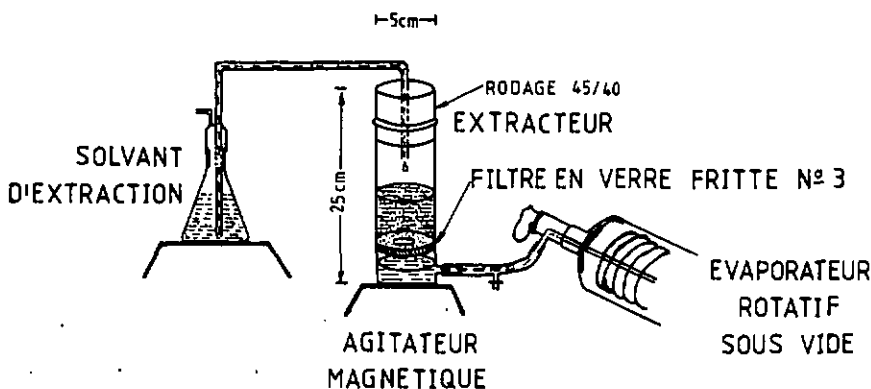
* PVP= POLYVINYLPYRROLIDONE INSOLUBLE (POLYCLAR)

6.1 Isolement et identification

6.1.1 Extraction

Le dispositif d'extraction utilisé est similaire à celui employé par ALIBERT et al [34], pour l'extraction des acides phénoliques chez *Quercus Pedunculata* Ehrh. figure 2.

FIGURE 2. DISPOSITIF D'EXTRACTION EN CONTINU
(SOLIDE-LIQUIDE)



Dans cet appareil, on place 200 mg de pulpe séchée, broyée et dépigmentée par trois lavages successifs (3 x 10 ml) à la ligroïne (fraction 40-60°C) pour extraire les lipides qui peuvent gêner l'analyse. Le résidu est

ensuite traité avec l'éthanol à 80% pour l'extraction des sucres libres.

L'extrait est évaporé à 30°C sous vide (évaporateur rotatif) et repris par 25 ml d'eau.

6.1.2 Purification

Avant la réaction de silylation il est important d'éliminer les composés phénoliques pouvant aussi réagir. A cet effet, nous avons utilisé de la PVP insoluble. Les propriétés de ce polymère sont connues:

SANDERSON et al [35] ont utilisé 1,2 g de PVP insoluble (polyclar) par gramme de matériel végétal sec dans la détermination quantitative des hydrates de carbone de la plante de thé.

MARIGO [36] a trouvé qu'en utilisant 2 g de polyclar par 8 mg de composés phénoliques on arrive à fixer le 100% d'un mélange de flavonoïdes, le 100% d'un mélange de tannins et le 95% d'un mélange d'acides phénoliques.

D'après ANDERSEN et al [37] la fixation des phénols des plantes sur la PVP insoluble s'effectue de façon optimale à PH 3,5.

Nous avons utilisé 2 g de PVP insoluble par 2,8 mg de composés phénoliques à PH 3,5. Cette proportion nous a permis d'avoir un extrait qui ne réagit pas avec le réactif $\text{FeCl}_3 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. La sensibilité de ce test est de

l'ordre de 0,05 µg pour les composés phénoliques (SMITH [38]).

La purification est effectuée sur une partie de l'extrait (5 ml) diluée avec 15 ml d'eau et amenée à PH 3,5. A cette solution sont ajoutés 2 g de PVP insoluble. Après agitation lente pendant 15 minutes, le surnageant est filtré sous vide et le complexe PVP-phénol insoluble lavé avec de l'eau (2 x 5 ml). Une fois additionné l'étalon interne, le volume final est amené à 50 ml.

6.1.3 Dérivatisation

La formation des dérivés silylés est faite sur un aliquot de l'extrait purifié précédemment (2 ml), lequel est évaporé à sec par un courant d'azote dans un mini-réacteur. Le triméthylsilylimidazole "TSIM" présente l'avantage, sur les autres réactifs classiques de silylation, de tolérer de petites quantités d'eau dans le milieu réactionnel. 300 µl de ce réactif sont ajoutés dans le mini-réacteur, lequel est secoué fortement pendant 5 minutes, puis gardé 30 minutes sous agitation, à 70°C, et enfin secoué de nouveau fortement pendant 10 minutes. Ce procédé assure une réaction complète de tous les sucres libres présents.

6.1.4 Analyse qualitative par chromatographie gaz-liquide

L'identification des sucres a été faite par comparaison des temps de rétention avec ceux de témoins purs (supelco) figure 3.

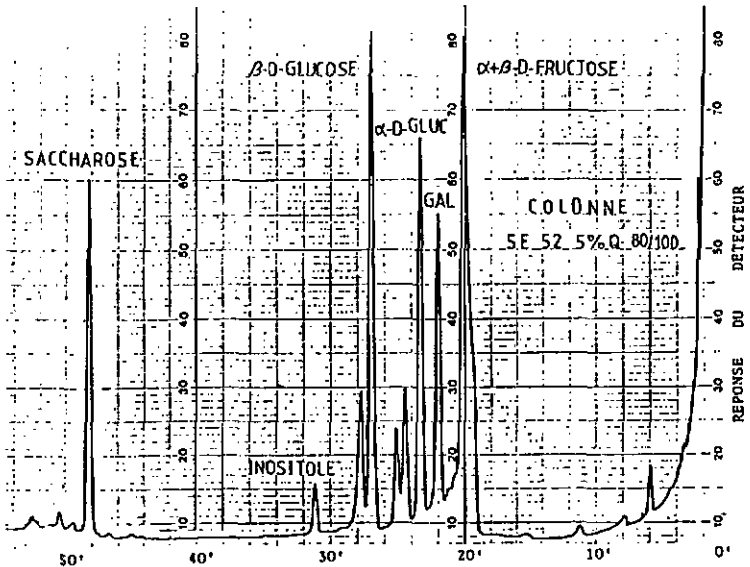


Figure 3. - Chromatogramme des sucres de la pulpe de café

6.1.5 Dosage quantitatif

Pour l'analyse quantitative, nous avons utilisé le rhamnose comme étalon interne.

La détermination des facteurs de réponse relative (FRR) du détecteur pour chacun des sucres présents dans la pulpe est effectuée à l'aide d'un mélange de sucres témoin dans des proportions comparables à celles observées dans la pulpe (d'après les surfaces dans les chromatogrammes).

Nous avons préparé des solutions standards de sucres témoins ayant une concentration de 2 mg/ml dans l'éthanol à 80%. La détermination des valeurs FRR a été faite par

dérivatisation d'un mélange de: 50 μ l de solution standard de rhamnose, 75 μ l de $\alpha + \beta$ -D-fructose, 25 μ l de α -D-glucose, 25 μ l de β -D-glucose, 20 μ l de D-galactose, 4 μ l d'inosital et 30 μ l de saccharose. Les valeurs des FRR pour chacun des sucres sont reproductibles. Pour le dosage des sucres dans l'échantillon, nous avons ajouté après l'étape de purification 1,3 ml de solution standard de rhamnose, ajusté le volume à 50 ml, puis préparé le dérivé à partir de 2 ml de cette dernière.

La quantité de dérivé silylé injecté est de 0,5 μ l (figure 1). Toutes les analyses doivent être faites entre 0-6 heures après la préparation du dérivé silylé, ceci afin de réduire la décomposition du dérivé TMS-saccharose comme reporté par REINECCIUS et al [39].

Toutes les données sont traitées au moyen d'un intégrateur Hewlett Packard 3380 A. et la quantité de chaque sucre calculé par l'équation:

$$\% \text{ sucre} = \frac{Ae \cdot FRR_e \cdot W_{si} \cdot F_d}{A_{si} \cdot FRR_{si} \cdot E} \times 100$$

Ae = surface du pic du sucre

A_{si} = surface du pic du standard interne

W_{si} = poids en mg du standard interne ajouté

FRR_e = facteur de réponse relative du sucre

FRR_{si} = facteur de réponse relative du standard interne

E = poids de l'échantillon en mg

F_d = facteur de dilution

6.2 Résultats obtenus et discussion

Parmi les sucres libres de la pulpe de café, nous avons identifié l' $\alpha + \beta$ - D - fructose, l' $\alpha + \beta$ - D - glucose, le D - galactose, le saccharose et une petite quantité d'inositol. Les temps de rétention de chacun des sucres, dans les conditions d'analyse utilisées, figurent sur le chromatogramme (figure 3). Notons que les anomères $\alpha + \beta$ du D-fructose donnent un seul pic, tandis que les anomères $\alpha + \beta$ du D-glucose produisent deux pics parfaitement résolus.

Les résultats des analyses quantitatives effectuées sont présentées dans le tableau 5. Le répartition en % est schématisée dans la figure 4 aussi bien pour la pulpe lyophilisée que pour la pulpe séchée au soleil.

TABLEAU 5. CONTENU EN SUCRES DE LA PULPE

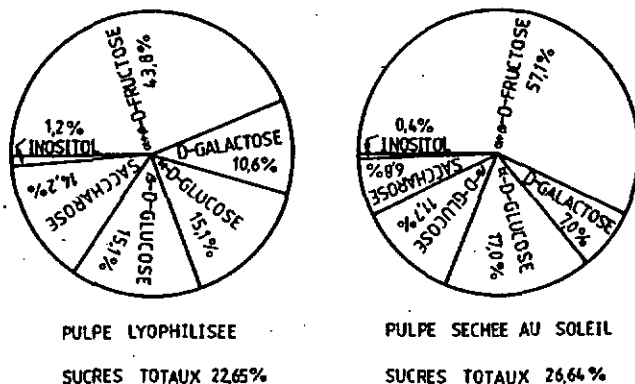
SUCRES	LYOPHILISEE		SECHEE AU SOLEIL	
	mg/100mg	% DU TOTAL	mg/100 mg	% DU TOTAL
$\alpha + \beta$ -D-FRUCTOSE	9.92	43.8	15.20	57.1
D-GALACTOSE	2.40	10.6	1.88	7.0
α -D-GLUCOSE	3.42	15.1	4.52	17.0
β -D-GLUCOSE	3.42	15.1	3.11	11.7
INOSITOL	0.28	1.2	0.10	0.4
SACCHAROSE	3.21	14.2	1.83	6.8
TOTAL	22.65		26.64	

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE DE TROIS DETERMINATIONS

L'accroissement de 4% en teneur totale des sucres libres entre la pulpe lyophilisée et la pulpe séchée au soleil peut vraisemblablement s'expliquer par l'hydrolyse de glycosides et polysaccharides pendant le séchage.

Le D-fructose (anomères $\alpha + \beta$) constitue approximativement le 50% des sucres libres et cette quantité augmente pendant le séchage au soleil. Le deuxième sucre important est le D-glucose (anomères $\alpha + \beta$) qui représente le 30% du total dans la pulpe lyophilisée. Le 20% qui reste est constitué par le saccharose et la galactose. La quantité de saccharose est diminuée de moitié pendant le séchage au soleil. La quantité d'inositol est pratiquement négligeable dans les deux cas.

FIGURE 4. REPARTITION DU CONTENU EN SUCRES DE LA PULPE DE CAFE

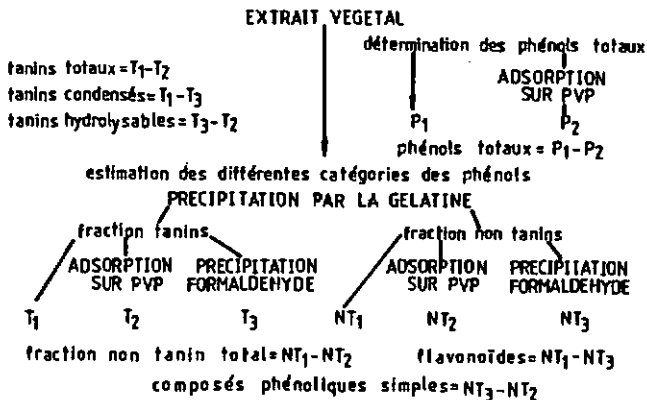


7. ESTIMATION QUANTITATIVE DES DIFFERENTS GROUPES DE COMPOSES PHENOLIQUES DE LA PULPE DE CAFE

Une estimation quantitative des différents groupes de composés phénoliques présents dans la pulpe est nécessaire si l'on veut à la fois avoir une meilleure connaissance de la composition chimique et comprendre les processus chimiques qui se produisent après la récolte (oxidations, polymérisations, etc.). Ces évaluations permettront de tirer des conclusions pratiques pour le choix des traitements les plus adéquats (séchage, conservation, magasinage) de la pulpe en vue de son utilisation.

Pour ces estimations, nous avons utilisé la méthode de MARIGO [36], figure 5.

FIGURE 5. FRACTIONNEMENT ET ESTIMATION DES COMPOSES PHENOLIQUES



Celle-ci combine deux techniques de fractionnement sélectives des composés phénoliques: la précipitation des tanins avec la gélatine, et la précipitation de substances possédant un noyau aromatique du type phloroglucinol avec la formaldéhyde (il s'agit en majorité des flavonoïdes et des tanins condensés catéchiques). L'application de ces deux techniques à un extrait végétal permet ainsi de diviser l'ensemble phénolique en: tanins condensés, tanins hydrolysables, flavonoïdes, composés phénoliques simples (dérivés du type ester ou éther-oxyde des acides phénoliques, coumarines). Chacune de ces fractions est ensuite dosée après purification sur PVP insoluble par le réactif de Polin-Ciocalteu.

MARIGO [36] a vérifié la validité de la méthode en ajoutant des quantités connues de mélanges témoins (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins) à un extrait végétal obtenu à partir de feuilles de chêne. Les différences, inférieures à 5%, relevées entre les valeurs expérimentales trouvées après addition des mélanges témoins et les valeurs théoriques démontrent bien les qualités de la méthode.

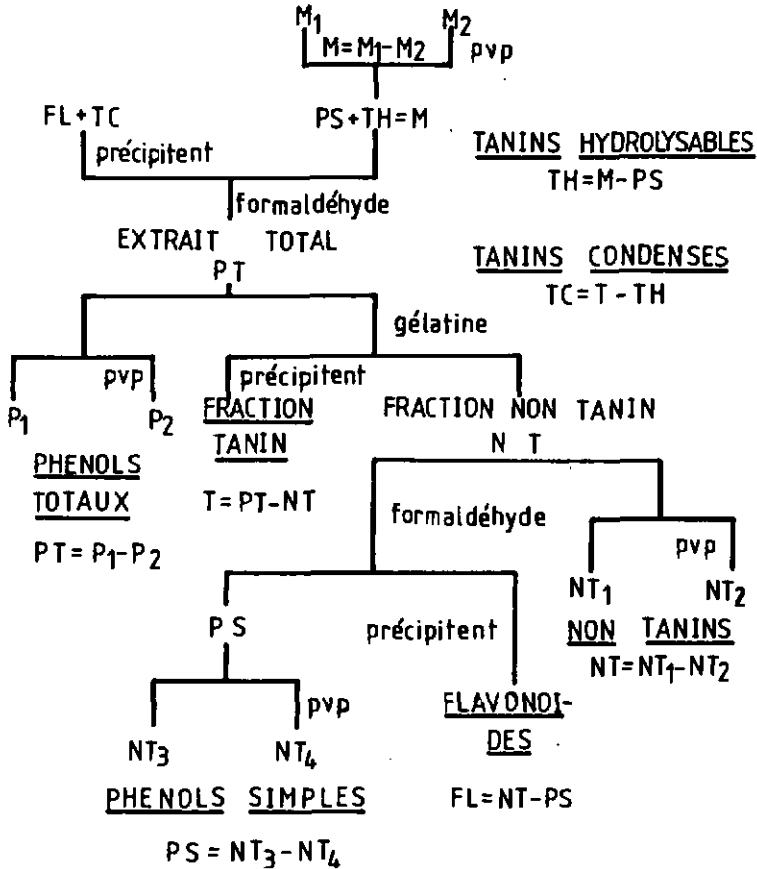
Nous avons apporté quelques modifications à la méthode originale pour l'évaluation des tanins hydrolysables et des tanins condensés à cause de la difficulté (voire impossibilité) de dissoudre le complexe gélatine-tanins (due à la grande quantité de mucilage présent dans l'extrait). Nous avons introduit, aussi, des nouvelles étapes de purification avec PVP qui se

sont révélées nécessaires pour une meilleure reproductibilité des résultats (figure 6).

La figure 6 montre que l'analyse peut être divisée en cinq étapes:

- I. - Extraction.
- II. - Fractionnement de l'extrait total avec la gélatine en phénols tanins et phénols non tanins.
- III. - Fractionnement de l'extrait total
 - a) en flavonoïdes et tanins condensés (composés possédant un noyau substitué en meta-dihydroxy) qui précipitent avec la formaldéhyde
 - b) phénols simples et tanins hydrolysables qui restent en solution.De même, la fraction non tanin (étape II) est fractionnée avec la formaldéhyde qui précipite les flavonoïdes laissant ainsi en solution les phénols simples.
- IV. - Purification des différentes fractions phénoliques avec la PVP.
- V. - Dosage différentiel des différents groupes phénoliques.

FIGURE 6. FRACTIONNEMENT ET ESTIMATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LA PULPE



ABREVIATIONS EMPLOYEES DANS LA FIGURE 6

M= Fraction de l'extrait phénolique total qui ne précipite pas avec le formaldéhyde

PVP= Polyvinylpyrrolidone insoluble

M₁ = Fraction phénolique de M

M₂ = Fraction non phénolique de M qui réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu

FL= Flavonoïdes

TC= Tanins condensés

PS= Phénols simples

TH= Tanins hydrolysables

PT= Phénols totaux

P₁ = Fraction phénolique de PT

P₂ = Fraction non phénolique de PT qui réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu

T= Fraction tanin

NT= Fraction non tanin

NT₁ = Fraction phénolique de NT

NT₂ = Fraction non phénolique de NT qui réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu

NT₃ = Fraction phénolique de NT qui ne précipite pas avec la formaldéhyde (PS)

NT₄ = Fraction non phénolique de NT, après précipitation avec la formaldéhyde, qui réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu

7.1 Isolément et dosage quantitatif

7.1.1 Extraction

Nous avons extrait la fraction phénolique à l'aide du dispositif d'extraction en continu schématisé dans la figure 2.

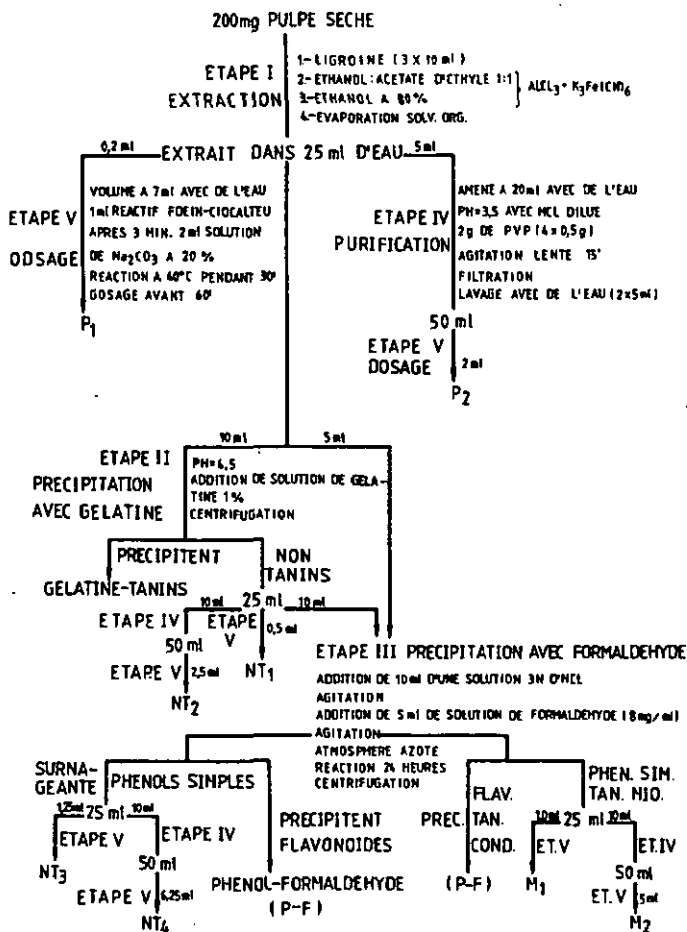
Etape I (voir figure 7)

200 mg de pulpe séchée, broyée et dépigmentée par 3 lavages successifs à la ligroïne (40-60°C) (3 x 10 ml) sont traités, d'abord avec un mélange d'acétate d'éthyle-éthanol (1 : 1 v/v) et ensuite avec de l'éthanol à 80%. A chaque système de solvant 50 mg de metabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) par litre sont ajoutés. L'extraction est réalisée en continu à température ambiante et le solvant évaporé à 30°C sous vide (évaporateur rotatif).

L'extraction est poursuivie jusqu'à l'absence de réaction de l'extrait avec le réactif chlorure ferrique-ferrocyanure de potassium. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 0,05 µg pour les composés phénoliques (38).

L'évaporation des solvants d'extraction à basse température (30°C) et l'utilisation d'anti-oxydants réduisent le risque d'hydrolyse et d'oxydation.

FIGURE 7. FRACTIONNEMENT ET ANALYSE DES PHENOLS DE LA PULPE DE CAFE



7.1.2 Fractionnement avec la gélatine

Les conditions optimales de précipitation de tanins avec la gélatine ont été définies par FREUDENBERG, BAUGHMAN et VIGNAU (40). On utilise une solution de gélatine à 1%, fraîchement préparée, à laquelle on ajoute 10% de NaCl. Le pH du milieu de précipitation doit être compris entre 4 et 5 et les concentrations de solutions de tanin et de gélatine sensiblement égales.

Cette méthode est bien connue, sa sensibilité et sa spécificité très bonnes.

Etape II (voir figure 7)

L'extrait phénolique total exempt de solvants organiques (étape I) est repris dans 25 ml d'eau. 10 ml de cette solution sont amenées à pH 4,5 à l'aide d'une solution diluée d'HCl. La solution de gélatine est alors ajoutée jusqu'à absence de floculation du milieu.

On centrifuge et on sépare le culot gélatine-tanins du surnageant, correspondant à la fraction phénolique non tanin. Le volume est ajusté à 25 ml.

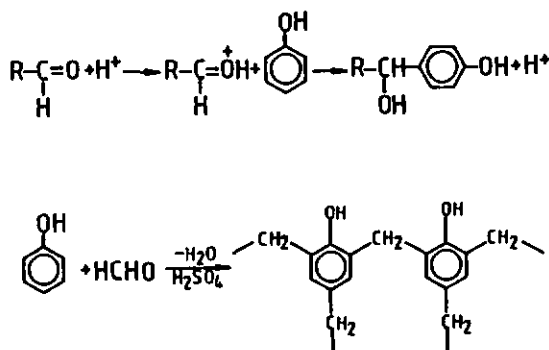
7.1.3 Fractionnement avec la formaldéhyde

La réaction des phénols du vin avec la formaldéhyde produit, à basse température et en milieu acide, un précipité résineux phénol-formaldéhyde [41].

HILLIS et URBACH [42] ont montré que seulement le noyau phloroglucinol de la catéchine réagit avec la formaldéhyde à bas pH et à température ambiante. Dans ces conditions les phénols ne possédant pas un groupe méta-dihydroxy (non flavonoïdes dans les plantes) ne précipitent pas.

La substitution méta-dihydroxy active les positions ortho et para, lesquelles peuvent être attaquées par des réactifs électrophiles. Dans les flavonoïdes, les positions 6 ou 8 peuvent ainsi réagir avec la formaldéhyde pour donner l'alcool benzylique α substitué, lequel réagit par la suite avec d'autres molécules de flavonoïdes activées pour produire des dimères ou polymères insolubles (figure 8).

FIGURE 8. REACTION DES ALOEHYDES AVEC LES PHENOLS



Cette réaction est à la base d'une méthode décrite par KRAMLING et SINGLETON [43] pour la séparation et l'estimation des flavonoïdes et des non flavonoïdes dans les extraits végétaux, méthode particulièrement utilisée dans l'analyse des vins (coefficient de variabilité 2,5%).

Etape III (voir figure 7)

Un aliquot de l'extrait phénolique total (5 ml amenés à 10 ml avec de l'eau) et un aliquot de la fraction phénolique non tanin (10 ml) sont acidifiés par adjonction de 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 3N, puis traités séparément avec 5 ml d'une solution standard de formaldéhyde (8 mg/ml). La précipitation se poursuit, sous azote, pendant 24 heures à température ambiante. Le précipité phénol-formaldéhyde est séparé des autres constituants phénoliques par centrifugation.

On a observé [43] qu'un excès de formaldéhyde peut occasionner la formation de dimères solubles, lesquels réagissent par la suite avec le réactif de folin-ciocalteu, faussant ainsi les résultats de l'analyse.

7.1.4 Purification des différentes fractions avec PVP insoluble

Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec les composés phénoliques et également avec d'autres substances réductrices telles que:

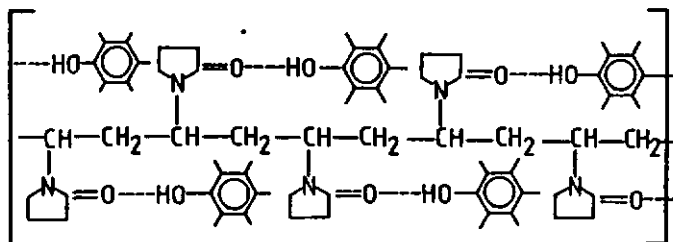
- les acides organiques possédant des groupements hydroxyles (acide shikimique, acide quinique, acide ascorbique,
- des sucres (glucose, fructose, saccharose);
- des acides aminés (sérine, cystéine).

Pour cette raison, dans la détermination du contenu phénolique d'un extrait végétal à l'aide de ce réactif, une purification préalable s'impose.

La polyvinylpyrrolidone insoluble (PVP) a donné des résultats dans la purification d'extraits de thé (SANDERSON et PERERA [35]) et dans l'étude des phénols chez *Nicotiana tabacum* (ANDERSEN et SOWERS [37]).

Ces derniers auteurs ont défini les conditions optimales de complexation des phénols de végétaux avec la PVP (par liaison hydrogène, figure 9).

FIGURE 9. COMPLEXATION DE PHENOLS PAR LA POLYVINYLPIRROLYDONE INSOLUBLE



La formation du complexe phénol-PVP est optimale à $\text{pH} = 3,5$; elle s'est révélée plus facile en solution purement aqueuse que dans des solutions aqueuses contenant plus de 10% de méthanol. Le temps de contact minimal entre la solution et la PVP est de 10 minutes, sous agitation lente. La formation du complexe est plus complète si on ajoute l'adsorbant en plusieurs étapes. Trois additions successives de 0,5 g de PVP ont fixé quantitativement 100 μg de chacun des phénols testés (acide chlorogénique, rutine, scopolétine).

L'affinité de la PVP pour un phénol est en rapport direct avec le nombre de groupes hydroxyle dans la molécule. C'est ainsi que les aglycones sont mieux complexées que leurs dérivés.

Sous conditions légèrement acides, des substances ayant des substituants tels que $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{SO}_2\text{H}$, $=\text{NH}$, $-\overset{|}{\text{C}}=\overset{|}{\text{C}}-\text{OH}$ peuvent se lier à la PVP.

MARIGO [36] a aussi déterminé le rapport optimal adsorbant - composés phénoliques. Dans le cas le plus défavorable (mélange d'acides phénoliques), une erreur de 5% a été observée en utilisant 2 g de PVP pour 8 mg de composés phénoliques.

Etape IV (voir figure 7)

Un aliquot de chacune des fractions phénoliques à purifier est amené à un volume de 20 ml avec de l'eau distillée et à pH de 3,5 avec une solution diluée d'HCl. On ajoute, en plusieurs étapes, un total de 2 g de PVP (préalablement traité pendant 10 minutes à 100°C par HCl à 10%, lavée successivement avec de l'eau distillée et l'acétone, puis séchée sous vide). On laisse sous agitation lente pendant 15 minutes, puis après filtration on lave l'adsorbant avec de l'eau (2 x 5 ml) et on amène le volume à 50 ml.

7.1.5 Dosage différentiel des différents groupes phénoliques

Les réactifs de Folin-Denis (RF-D) et Folin-Ciocalteu (RF-C) sont à la base des méthodes officielles d'analyse de phénols dans les extraits végétaux. SINGLETON et ROSSI [44] ont réalisé une étude comparative de ces deux réactifs, afin de mieux connaître la nature de la réaction et de sélectionner et normaliser un procédé simple et reproductible.

Le RF-D est le produit de réaction d'un mélange de tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et d'acide phosphorique à 85%. Pour le RF-C la réaction entre ces trois composants est poursuivie plus longtemps en présence d'HCl et à la fin on ajoute Li_2SO_4 . Le RF-D contient deux classes de substances

sensibles à la réduction, tandis que le RF-C, dont le contenu en molybdate est plus élevé, en contient une seule et est ainsi un réactif plus homogène [45].

En général, les réactifs se présentent sous forme d'une solution jaune d'ions complexes d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique. Le réactif oxyde les phénolates et une partie des ions métalliques passe de l'état +6 à l'état +5 produisant un complexe molybdène-tungstène bleu.

L'étude comparative des deux réactifs a permis d'établir que le RF-C produit avec l'acide gallique un complexe bleu plus intense que ne le fait le RF-D, avec un maximum d'absorption mieux défini (λ max. = 765 nm) et avec le temps un déplacement hypsochrome moins important. Il donne une coloration plus faible avec d'autres substances réductrices telles que: l'acide ascorbique, le dioxyde de soufre, les ions Fe^{++} et une meilleure réponse avec des phénols peu réactifs (acide salicylique).

En conclusion de leur étude, SINGLETON et ROSSI [44] proposent une méthode plus précise et plus exacte.

A une partie de l'échantillon (1 ml de vin blanc dilué à 60 ml avec l'eau) on ajoute 5 ml du réactif de folin-ciocalteu, puis après 30 secondes, mais avant 8 minutes, 15 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à

20%, le tout étant amené à 100 ml. L'absorption à 765 nm est déterminée par rapport à une solution de référence qui contient les mêmes composants, l'échantillon excepté. Avant la mesure les solutions sont chauffées à 37°C pendant deux heures.

Pour nos déterminations, nous avons utilisé ce procédé, adapté par MARIGO [36].

Etape V (voir figure 7)

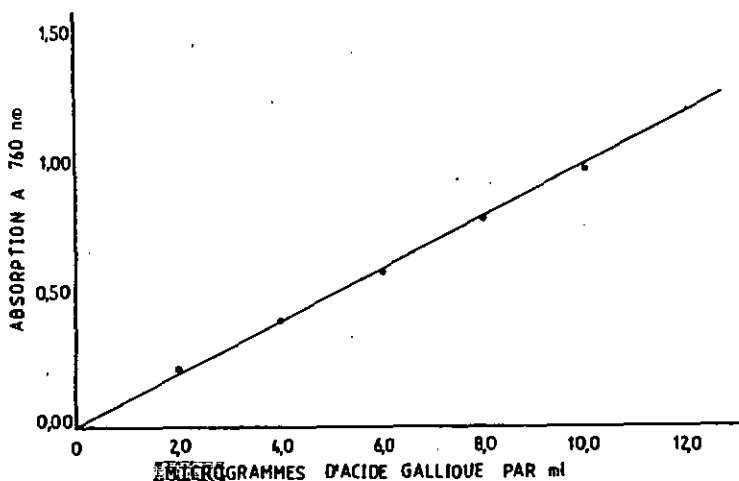
Un aliquot de l'échantillon est ajusté à un volume de 7 ml avec de l'eau distillée. La solution est agitée et 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté. Après trois minutes on additionne 2 ml d'une solution aqueuse de Na_2CO_3 anhydre à 20%. La solution est chauffée à 40°C pendant 30 minutes et la couleur bleue produite mesurée à 760 nm dans une cellule de 1 cm d'épaisseur.

7.1.5.1 Courbe d'étalonnage

L'acide gallique est utilisé couramment comme composé de référence dans le dosage de substances phénoliques des végétaux. Il présente l'avantage sur d'autres composés, par exemple l'acide tannique, d'être facilement obtainable à l'état pur et d'être conservable longtemps. Pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, nous avons préparé une première solution (A) d'acide

gallique de 200 μ g/ml (50 mg dans 250 ml d'eau distillée), puis à partir de celle-ci une deuxième solution de 20 μ g/ml. Des quantités de 1, 2, 3, 4 et 5 ml sont traitées comme décrit dans l'étape V (réaction avec le RFC). La courbe d'étalonnage (absorption en fonction de la concentration) est ensuite établie dans une gamme de concentration variant entre 2 et 10 μ g/ml (figure 10).

FIGURE 10. COURBE D'ETALONNAGE



Afin d'obtenir une bonne reproductibilité, quelques détails pratiques doivent être strictement observés:

- l'ordre dans l'addition des réactifs,
- homogénéisation par agitation des solutions après addition d'un réactif,
- dilution de l'échantillon à au moins la moitié de son volume final avant l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu,
- addition de la solution de carbonate de sodium après 3 minutes,
- réaction à température contrôlée,
- dosage entre 30 et 60 minutes après le début de la réaction (autrement garder les solutions à basse température),
- s'il y a formation de précipité, on doit centrifuger la solution avant la mesure,
- choisir une prise d'essai de la solution à doser qui donne une mesure comprise entre 0,3 et 0,7 unités d'absorption,
- s'il est nécessaire de diluer la solution à doser on utilise la solution de référence (zéro d'absorption),
- il convient de s'assurer que la PVP utilisée ne contient pas de substances réductrices solubles dans l'eau et pouvant réagir par la suite avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

7.1.5.2 Calculs

La concentration de chacune des fractions phénoliques est exprimée en milligramme d'acide gallique pour 100 mg de pulpe séchée et peut être calculée au moyen de la formule:

$$\frac{A}{10^3} \times \frac{Fd}{Pe} \times 100 = Pa.g.mg / 100 \text{ mg pulpe}$$

A = concentration en microgramme lue sur la courbe d'étalonnage

Fd = facteur de dilution = 125

Pe = poids de l'échantillon = 200 mg

Pa.g. = poids acide gallique

d'où

$$A \times 0,0625 = Pa.g.mg / 100 \text{ mg pulpe}$$

7.2 Résultats et discussions

L'analyse des résultats, sur la teneur en phénols de la pulpe de café lyophilisée et séchée au soleil (tableau 6 et figure 11), permet de constater l'absence de tanin dans la pulpe fraîche. La formation de tanins commence peu d'heures

après la récolte et est accélérée par la présence d'eau et par la chaleur.

La différence en teneur des phénols totaux, entre la pulpe lyophilisée (6,29 mg/100 mg) et la pulpe séchée au soleil (6,62 mg/100 mg), pourrait s'expliquer par une hydrolyse des glycosides, pendant le séchage, avec libération des groupes phénoliques engagés dans des liaisons esters ou étheroxydes.

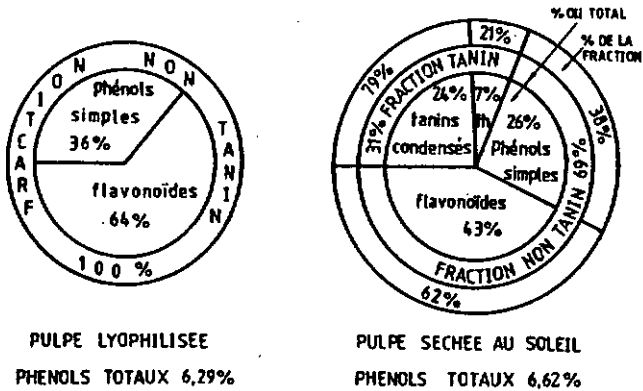
TABLEAU 6. CONTENU PHENOLIQUE DE LA PULPE DE CAFE

PULPE	PHENOLS	FRACTION NON TANIN			FRACTION TANIN		
	TOTAUX	PHENOLS SIMPLES	FLAVO- NOIDES	TOTAUX	CONDEN- SES	HYDROLY- SABLES	TOTAUX
LYOPHILISEE	6.29	2.28	4.01	6.29	0.00	0.00	0.00
SECHEE AU SOLEIL	6.62	1.72	2.83	4.55	1.64	0.43	2.07

LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN mg D'ACIDE GALLIQUE POUR
100 mg DE PULPE SECHE.

CHAQUE VALEUR EST LA MOYENNE DE TROIS DETERMINATIONS

FIGURE 11. REPARTITION DU CONTENU PHENOLIQUE DE LA PULPE DE CAFE



On observe, aussi pendant le séchage au soleil, la formation de 2,07% de tanins. 21% de ces derniers sont des tanins hydrolysables et le reste des tanins condensés.

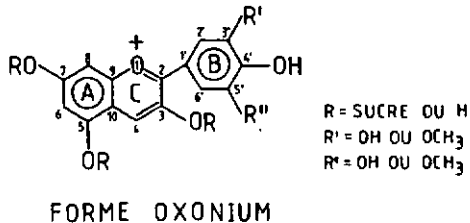
Ces résultats nous permettent de penser que la formation de tanins dans la pulpe de café se fait principalement par une réaction de polymérisation (par condensation) de molécules de type catéchine et leucoanthocyanidines, lesquelles sont les constituants des tanins condensés. Cette réaction de polymérisation explique la diminution des flavonoïdes de 4,01% dans la pulpe lyophilisée à 2,83% dans la pulpe séchée au soleil. De même, la formation de tanins hydrolysables explique la baisse en teneur des phénols simples de 2,28% (pulpe

lyophilisée) à 1,72% (pulpe séchée au soleil), bien que les acides phénoliques ou leur dérivés soient les constituants des tanins hydrolysables.

8. ETUDE DES ANTHOCYANES DE LA PULPE DE CAFE

Les anthocyanes constituent une famille du groupe des flavonoïdes. Toutes les anthocyanes (aglycones + hétérosides) possèdent le même squelette de base, à savoir le phényl-2 benzopyrylium ou flavylium (I), figure 12.

FIGURE 12. PHENYL-2 BENZOPYRYLIUM (flavylium)



Les aglycones possèdent au moins 3 fonctions hydroxyles en 5,7 et 4' et le noyau pyrilium est hydroxylé en 3.

TYPES D'AGLYCONES (ANTHOCYANIDINES)

Aglycone	R	R'	R''
pélagonidine	H	H	H
cyanidine	H	OH	H
paeonidine	H	OCH ₃	H
delphinidine	H	OH	OH
pétunidine	H	OCH ₃	OH
malvidine	H	OCH ₃	OCH ₃

La cyanidine est l'aglycone la plus répandue dans la nature. Dans la nature, les anthocyanes n'existent pas sous forme d'aglycones, mais sous forme d'hétérosides (anthocyanines). Un sucre (dans la majorité des cas: glucose, galactose, rhamnose et arabinose) peut se fixer en position 3, 5 ou 7, le plus souvent on rencontre un glucose, en 3 (monoglucoside). Parfois un deuxième sucre vient se fixer, généralement en position 5 (diglucoside). La glucosidification en position 7 est très rare. Les hétérosides les plus importantes, d'après

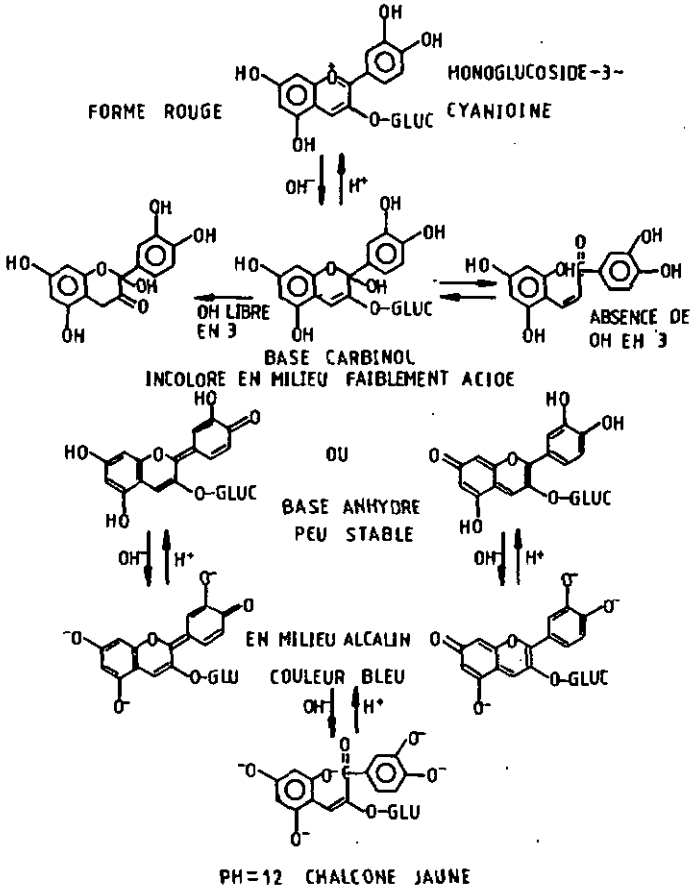
leur répartition dans la nature, sont les monoglucosides-3, les rutinosides-3 (rhamnoglucosides-3) et les dimonosides-3,5 [47].

Un hydroxyle du sucre peut être estérifié par un acide phénolique (acide benzoïque ou acide cinnamique), pour donner des anthocyanes acylées.

Les anthocyanes peuvent aussi polymériser, copolymériser ou se combiner, par exemple aux polysaccharides (polyosides).

Les anthocyanes possèdent une couleur rouge en milieu acide et virent au bleu en milieu basique. Ce phénomène est dû à l'existence de structures différentes en fonction du PH (figure 13). En variant le PH, on déplace l'équilibre entre ces structures. Ce phénomène est utilisé pour le dosage de ces pigments [49] [50].

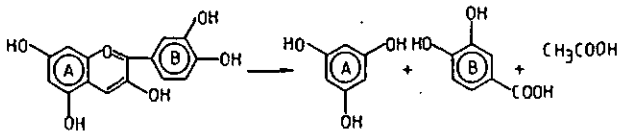
FIGURE 13. CHANGEMENT DE LA COULEUR DES ANTHOCYANES EN FONCTION DU PH



D'après [70]

Par ailleurs, la faible coloration en milieu légèrement acide, indique l'existence d'une forme incolore. En milieu basique, la structure anthocyanique est instable, et à partir de PH 8 elle est décomposée par ouverture du cycle et oxydation. La réacidification ne régénère que partiellement la forme rouge. La fusion alcaline en présence d'une base forte et à chaud décompose les anthocyanes en phloroglucinol, acide benzoïque et acide acétique [48]. (Figure 14)

FIGURE 14. FUSION ALCALINE DES ANTHOCYANES

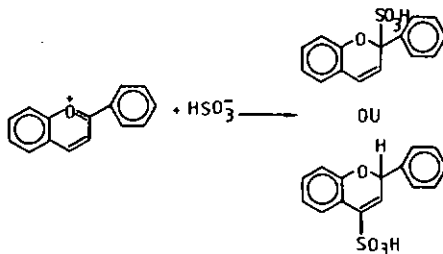


La perte de couleur lors du flétrissement des fleurs est due à l'augmentation du pH [51].

D'après JURD [52] la décoloration des anthocyanes (monomères) par l'anhydride sulfureux et les bisulfites alcalins, s'explique par l'attaque du cation flavylum (électrophile) par le réactif nucléophile HSO_3^- pour donner un acide chromène sulfonique incolore.

Cette réaction est réversible et la couleur rouge réapparaît si on acidifie le milieu (figure 15).

FIGURE 15. ACTION DU SULFITE SUR LES ANTHOCYANES



Les métaux (Fe, Al, Mg, K, Cu, Sn) donnent des complexes bleus (chélates) avec les anthocyanes possédant deux OH en ortho sur le noyau latéral B. Cette réaction est responsable de la couleur bleue de certaines fleurs [53]. Par ailleurs, elle permet de différencier les anthocyanes possédant un groupe ortho-diphénol des autres.

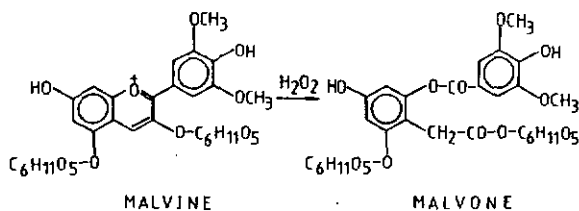
Les anthocyanes sont assez solubles dans l'eau, mais le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants. L'addition d'anhydride sulfureux améliore le rendement d'extraction et la stabilité des pigments [54] [55].

Les anthocyanes sont facilement oxydables par les enzymes du type oxydases tels que: laccase (spécifique des paradiphénols), tyrosinase ou polyphénoloxydase (spécifique des orthodiphénols), peroxydase et anthocyanase. L'oxydation par ces enzymes conduit à la disparition de la couleur rouge. L'activité de ces enzymes est favorisée par la présence de fer, de cuivre, par la lumière et par les températures de conservation élevées (20 à 35°C) [55]. Par contre, la présence de tanins ralentit la destruction oxydative. L'oxydation non enzymatique des anthocyanes produit des pigments bruns insolubles. L'eau oxygénée est couramment utilisée comme oxydant des anthocyanes et pour leur dosage [46].

KARRER et al [56] ont développé cette réaction pour mettre en évidence l'existence d'une molécule glucidique en position 3

de l'aglycone. En général, on obtient un produit dans lequel la molécule de sucre est liée par une liaison ester. Celle-ci peut être coupée par hydrolyse alcaline et le produit obtenu analysé par chromatographie. HRAZDINA [57] a établi par cette réaction la structure du produit d'oxydation de la malvine (la malvone), figure 16.

FIGURE 16. OXYOATION DE MALVINE PAR H_2O_2



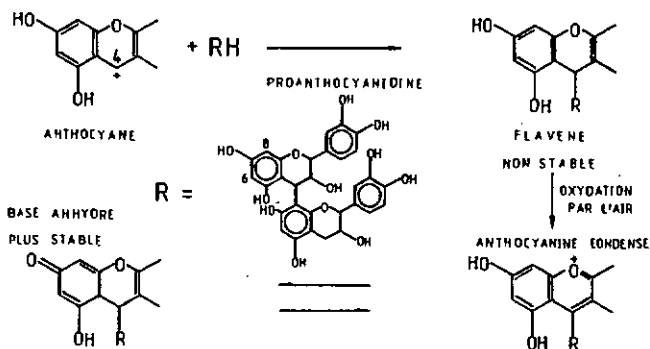
D'après SHRIKHANDE et al [58] la présence de flavonols protège les anthocyanes en retardant l'oxydation de l'acide ascorbique, lequel en produisant de l'eau oxygénée a un effet destructeur sur les anthocyanes.

Les sucres ont un effet négatif sur les pigments anthocyaniques. Ceci est particulièrement important en présence de quantités importantes de pentoses et d'hexoses [59] [60].

Il est bien connu, dans l'industrie alimentaire, que les températures élevées, l'exposition à la lumière et à l'humidité accélèrent la dégradation des échantillons anthocyaniques.

Les anthocyanes, les leucoanthocyanes et les catéchines forment par polymérisation ou copolymérisation les tanins condensés. Ces réactions comportent, très probablement une substitution électrophile en position 4 de l'hétérocycle [61], comme indiqué dans la figure 17.

FIGURE 17. FORMATION DES TANINS CONDENSES



Le substituant R, une proanthocyanidine dimérique se lie ainsi par sa position 6 ou 8 à l'anthocyanane.

Les flavonoïdes forment aussi des complexes avec les anthocyanines produisant un effet hyperchrome et un déplacement bathochrome de la bande d'absorption dans le visible. La formation du complexe se fait par des liaisons hydrogènes entre le groupe carbonyle de la base anhydre anthocyanique et les groupes hydroxyles aromatiques du flavonoïde [62].

Les anthocyanes sont de plus en plus utilisées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Notamment l'activité vi-

taminique P des anthocyanes (renforcement de la résistance des capillaires sanguins et diminution de leur perméabilité) est utilisée pour combattre affections artérielles, maladies veineuses et troubles de la vision. Les anthocyanes ont aussi une activité antivirale et bactéricide importante [63].

8.1 Extraction

Toutes les extractions ont été faites en continu (figure 2) sur des échantillons dépigmentés à la ligroïne (fraction 40-60°C). Comme solvant, nous avons utilisé MeOH-HCl 0,012N. L'extraction a été effectuée à température ambiante jusqu'à absence de coloration. Le solvant organique a été ensuite évaporé sous vide à 30°C.

8.2 Pré-purification de anthocyanines / utilisation de PVP insoluble

La PVP insoluble (polyclar) est fréquemment utilisée dans la purification et séparation de composés anthocyaniques [64], [65], [66], [67]. Elle permet d'une part une bonne récupération sans dégradation [66], d'autre part d'établir un rapport entre la structure et l'ordre d'éluion des composés à séparer [64].

Il est connu que la présence de certains composés organiques, particulièrement les sucres [59] [60], accélèrent la dégradation de composés anthocyaniques. Vu la haute teneur en sucres

de la pulpe, nous avons estimé nécessaire d'effectuer une pré-purification rapide de l'extrait méthanolique pour protéger ces composés.

A cet effet, nous avons utilisé une colonne courte et large (L = 10 cm, Ø 6 cm) équipée d'un filtre en verre fritté permettant un débit très élevé de solvant et remplie de PVP insoluble (Aldrich).

La PVP a été traitée préalablement comme décrit par HRAZDINA [67]. L'extrait méthanolique évaporé sous vide a été repris dans l'eau, centrifugé et déposé à la tête de la colonne de PVP. Les composés non retenus sur la phase stationnaire ont été élués avec de l'eau jusqu'à absence de couleur et de goût de l'éluant. L'excès d'eau sur la PVP a été éliminé avec du méthanol et le groupe des composés anthocyaniques élué avec du MeOH-HCl 0,012N. La PVP peut être réutilisée après régénération comme décrit par BRAUN [68].

8.3 Séparation et purification des anthocyanes / utilisation de cellulose

La cellulose a beaucoup été utilisée dans la séparation et purification des anthocyanes. La chromatographie sur papier a été largement utilisée pour l'analyse et la séparation de ces mêmes composés [69], [70], [71], [72].

Les colonnes de cellulose ou de cellulose-polyamide se sont aussi révélées d'une grande utilité [73]. Tout comme les

plaques de couches épaisses fabriquées avec ces supports [74].

Pour notre travail, après purification partielle sur PVP insoluble, les anthocyanines ont été séparées et repurifiées sur une colonne de cellulose de la manière suivante:

La fraction anthocyanique brute a été évaporée à sec, reprise dans un mélange d'acide chlorhydrique 2N : eau : acide acétique (3 : 10 : 0,5 v/v) et déposée à la tête d'une colonne (L = 25 cm, Ø int. 2,5 cm) remplie avec 28 g de cellulose (avicel). L'élution des anthocyanines a été effectuée à faible débit avec HCl 2N : H₂O : AcOH (3 : 10 : 0,5 v/v). Toutes les fractions ont été concentrées sous vide à 30°C et l'acide acétique résiduel évaporé en faisant un mélange azéotropique avec n-heptane.

Ce système chromatographique permet une parfaite séparation et purification des deux anthocyanines présentes dans la pulpe de café.

8.4 Séparation et purification des anthocyanines par chromatographie circulaire centrifuge sur papier à l'échelle préparative (CCCP)

Dans le passé, la chromatographie sur papier a été fort utilisée pour la séparation de composés polaires. Elle a donné de très bons résultats dans l'étude de composés polyphénoliques, tels que les flavonoïdes (MABRY et al [75]), les acides

phénoliques et tanins (RIBEREAU - GAYON [70]) et les flavonoïdes anthocyaniques (HARBORNE [69]). De plus en plus, la chromatographie sur papier a été remplacée par d'autres techniques, parfois moins simples, souvent plus chères, mais aussi plus rapides. Citons la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide à haute pression (HPLC), la chromatographie en contre-courant (DDC), etc.

Récemment, HOSTETTMANN et al [76] ont décrit l'application de la chromatographie sur couche mince à force centrifuge dans l'isolement de xanthones, triterpènes et saponines à l'aide d'un nouvel appareil appelé "chromatotron" et développé par "Harrison research" Palo Alto, Ca, USA. Les applications se limitent cependant à l'utilisation de plaques de gel de silice pour la séparation de composés peu polaires ou apolaires.

Combinant les principes de la chromatographie préparative sur papier et de la chromatographie à force centrifuge, nous avons construit à l'aide d'un rotor, d'une résistance variable et d'une chambre circulaire en polypropylène, un dispositif qui nous a permis d'isoler les composés anthocyaniques de la pulpe de café (figure 18).

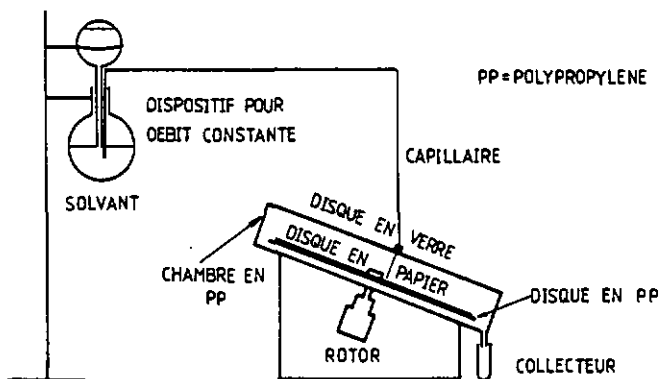


FIG.18-DISPOSITIF POUR LA CHROMATOGRAPHIE CIRCULAIRE CENTRIFUGE SUR PAPIER A L'ECHELLE PREPARATIVE

Nous avons en particulier utilisé des disques de papier (\varnothing 24 cm) Whatmann 17 Chr, préparative. Sur un premier disque, nous avons réalisé le fractionnement d'un extrait méthanolique (voir méthode d'extraction plus haut), obtenu à partir de 2 g de pulpe.

Après évaporation sous vide à 30°C , le mélange repris dans HCl 0,12N, centrifugé, évaporé de nouveau et repris dans MeOH-HCl 0,012N et ensuite déposé sur le papier. Pour cette première séparation, on utilise HCl 0,12N comme solvant d'éluion (débit 5 ml/min.). Les fractions contenant la même anthocyanine ont été évaporées à sec, reprises dans EtOH-HCl 0,012N, déposées sur un deuxième disque et éluées

avec un mélange HCl 2N : H₂O : AcOH (3 : 10 : 0,5 v/v).

Avant l'analyse spectroscopique des composés séparés, une dernière purification a été effectuée sur un troisième disque en utilisant comme solvant nBuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5 v/v). Notons qu'avant l'emploi, les feuilles de papier ont été lavées avec le solvant d'élution et que celles-ci peuvent être utilisées de nouveau après lavage. Toutes les fractions (20 ml) ont été évaporées sous vide à 30°C et reprises dans EtOH-HCl 0,012N. Le dépôt du mélange à séparer a été effectué avec une seringue et en faisant tourner le papier à 500 R.P.M. Pour toutes les séparations, le rotor a tourné à 800 R.P.M. La composition des fractions a été contrôlée par chromatographie sur plaque de cellulose (Macherey-Nagel UV₂₅₄) en utilisant comme solvant un mélange HCl 2N : H₂O : AcOH (3 : 10 : 3 v/v).

Pendant la première étape de purification (solvant HCl 0,12N), les anthocyanines se séparent des sucres libres et des aglycones. L'ordre d'élution est le suivant: sucres - diglycosides - monoglycosides - aglycones. On constate aussi une séparation presque totale entre les hétérosides. Dans la deuxième étape de purification (solvant HCl 2N : H₂O : AcOH, 3 : 10 : 0,5 v/v), on achève la séparation des hétérosides et on les sépare des acides phénoliques. L'ordre d'élution est le suivant: acides phénoliques - diglycosides - monoglycosides - aglycones (ne migrent pas quelques composés brunâtres qui

peuvent être élués avec HCl 2N : H₂O : AcOH, 3 : 10 : 3 v/v) puis n-BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5 v/v).

D'une manière générale, la séparation des composés intéressants nécessite que ceux-ci possèdent un Rf < 0,5 et un Δ Rf > 0,1 sur papier. Dans ces conditions, l'obtention de composés purs pour les analyses spectroscopiques demande entre une demi-heure et quelques heures, suivant la complexité de l'extrait. Dans notre cas, à partir d'un extrait méthanolique brut en quatre heures nous avons isolé une quantité suffisante d'hétérosides pour faire les analyses.

Il est évident que cette technique présente de nombreux avantages. Par sa simplicité, son prix (peu de solvant et phase stationnaire récupérable) et surtout par sa rapidité, qualité très importante pour une méthode de séparation lorsqu'on a affaire à des substances chimiquement instables, telles que les anthocyanines.

8.5 Analyse qualitative des anthocyanines

L'analyse qualitative d'une anthocyanine comporte:

- A) La caractérisation de l'aglycone (anthocianidine), obtenu par HPLC ou chromatographie sur papier après hydrolyse acide de l'hétéroside (anthocyanine), à l'aide de témoins. La spectroscopie UV-VIS. indique la nature du substituant sur

le noyau B (figure 12). La formation d'une couleur bleue par réaction avec $AlCl_3$ indique la présence de deux hydroxyles en ortho l'un de l'autre sur le noyau latéral B.

B) La détermination de la nature des sucres liés à l'aglycone qui peut être faite par chromatographie gaz-liquide du dérivé silylé des produits d'hydrolyse acide, ou par chromatographie de couche mince à l'aide de sucres témoins.

La position de substitution des sucres sur l'aglycone peut se déterminer par spectroscopie UV-visible et à l'aide de la chromatographie sur papier en comparant les valeurs R_f dans différents systèmes de solvant.

C) Les anthocyanes acylées se caractérisent par chromatographie des produits d'hydrolyse alcaline et par spectroscopie UV-visible.

Enfin, l'analyse RMN- 1H permet la confirmation de la structure.

8.5.1 Analyse des aglycones par HPLC

WILKINSON et al [77] ont séparé six anthocyanidines par HPLC sur une colonne de μ -Bondapak / C18 en utilisant un mélange d'eau: acide acétique: méthanol (71 : 10 : 19) et un débit de 2 ml/min.

Nous avons pour notre part utilisé une colonne Lichrosob RP 8, phase inversée (Knauer) et réalisé la séparation de quatre anthocyanidines témoins au moyen d'un mélange d'eau: acide acétique: méthanol (45 : 5 : 50)

et avec un débit de 2 ml/min. (figure 19).

La préparation de l'échantillon est similaire à celle décrite par WILKINSON (voir partie expérimentale).

Nous avons effectué une extraction en continu, comme décrit plus haut et réalisé l'hydrolyse pendant 120 minutes, au lieu de 30 minutes.

Par rapport à WILKINSON, une élution en ordre inverse pour la malvidine et la pélargonidine a été observée. Ceci peut s'expliquer par les différences des conditions d'analyse, la nature des colonnes et surtout par différence de polarité de la phase mobile. L'analyse de la pulpe nous a ainsi révélé que celle-ci contient une seule anthocyanidine: la cyanidine (figure 19).

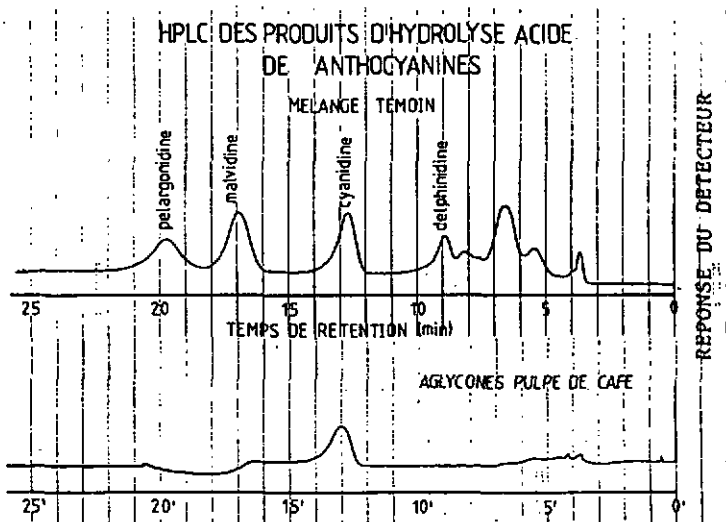


FIGURE 19. ANALYSE D'ANTHOCYANIDINES DE LA PULPE DE CAFE PAR HPLC

8.5.2 Analyse des sucres par G.L.C.

L'analyse des sucres liés à l'aglycone a été faite par chromatographie gas - liquide du dérivé silylé des produits d'hydrolyse acide à partir de 0,5 mg d'hétéroside, suivant la technique d'hydrolyse de CHANDLER et HARPER [78] (voir partie expérimentale). La préparation et la chromatographie des dérivés silylés sont réalisées comme décrit dans l'analyse de sucres (6.1.5). Les résultats de l'analyse montrent la présence de glucose et rhamnose dans la molécule de l'hétéroside 1 (figure 20).

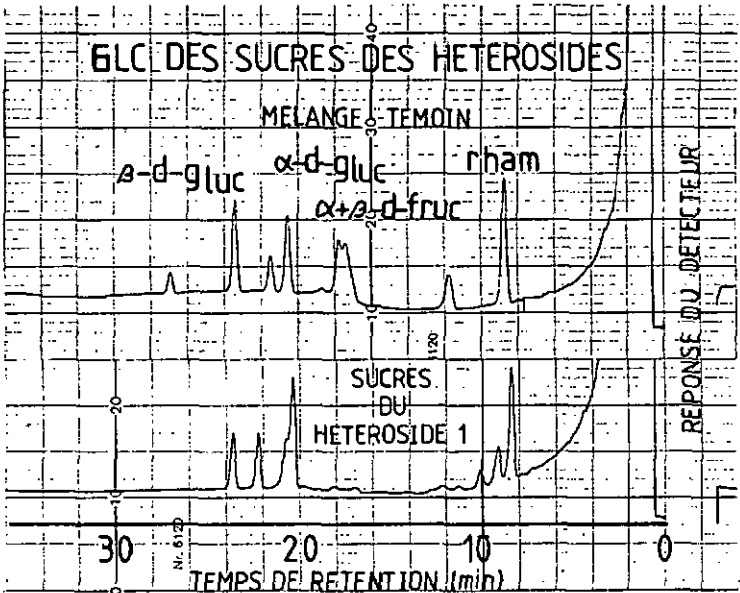


FIGURE 20. ANALYSE DES SUCRES DES ANTHOCYANINES DE LA PULPE DE CAFE PAR G.L.C.

8.5.3 Analyse chromatographique sur papier

Nous avons déterminé les valeurs R_f sur papier, afin de pouvoir les comparer avec ceux de la littérature. Les détails de l'analyse sont groupés dans la partie expérimentale et les résultats obtenus dans le tableau 7.

TABLEAU 7. VALEURS R_f SUR PAPIER ET COULEURS DES ANTHOCYANES DE LA PULPE DE CAFE

ANTHOCYANE	VALEURS R _f DANS			COULEUR VIS.	COULEUR UV
	HCL 1%	B:A:W**	FORESTAL*		
HETEROSIDE 1	0,19	0,40		ROUGE	ROUGE
HETEROSIDE 2	0,09	0,41		"	"
AGLYCONE		0,70	0,50	"	"
3-RHAMNOGLUCOSIDE DE CYANIOINE	0,19*	0,37*		"	"
3-MONOGLUCOSIDE DE CYANIOINE	0,07*	0,38*		"	"
CYANIDINE		0,68*	0,49*	"	"

* HARBORNE 1691

* FORESTAL = acide acétique:eau:HCl concentré (3:1:0,3 v/v)

** B:A:W = n-butanol:acide acétique:eau (4:1:5 v/v)

8.5.4 Analyse par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-vis.)

Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 8.

TABLEAU 8 MAXIMAS D'ABSORPTION DANS LE VIS-UV DES ANTHOCYANES DE LA PULPE

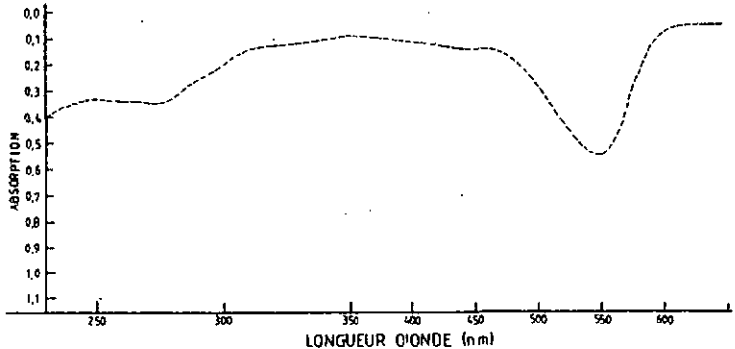
COMPOSE	SOLVANT ETHANOL 0,1% HCL		
	BANOE II	BANOE I	DEPLACEMENT BANDE I EN PRESENCE D'ALCL ₃ (nm)
HETEROSIDE N° 1	283	539	12,5
HETEROSIOE N° 2	283	537	25
AGLYCONE	279	548	

La différence d'environ 10 nm entre les hétérosides et l'aglycone est due à une glucosidification [70].

D'après R. GAYON [70], le rapport des densités optiques à 440 nm et au maximum d'absorption dans le visible (E_{440} / E_{max} en %), pour les dérivés de la

cyanidine, varie de 19 à 26 si l'OH en position 5 est non substitué, et de 12 à 13 dans le cas contraire. Ces rapports sont de 23 pour l'hétéroside 1 et de 17 pour l'hétéroside 2. Ceci nous permet de penser que dans nos composés, la position 5 est libre (figures 22, 23, 24).

Les spectres ne présentent pas de bande entre 310-330 nm (ce qui indique l'absence de dérivés acylé).

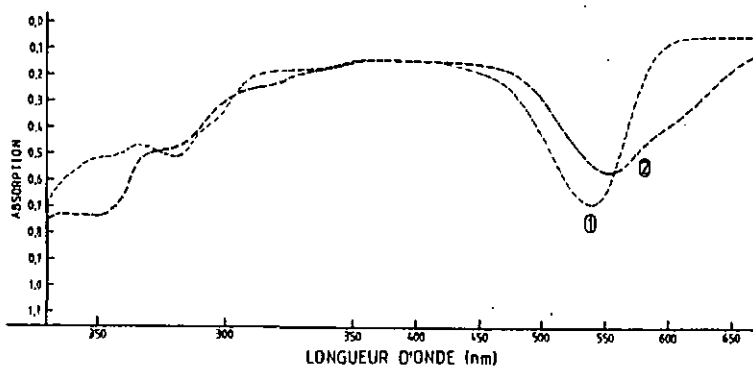


AGLYCONE

SOLVANT : ETOH 0,1% HCL

BLANC : ETOH 0,1% HCL

FIGURE 22. SPECTRE ULTRA VIOLET-VISIBLE DE L'AGLYCONE



HETEROSIDE 1

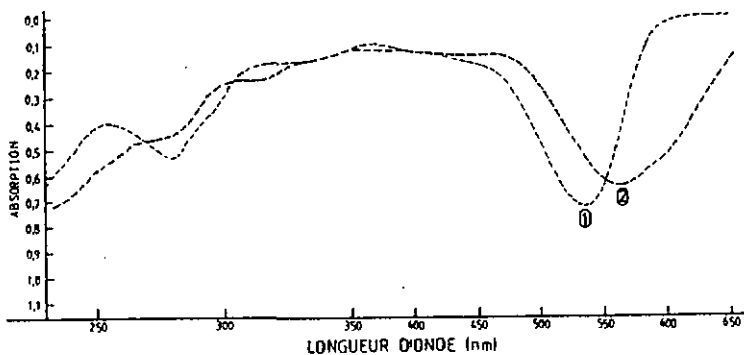
SOLVANT: ETOH 0,1% HCL

① DANS ETOH

BLANC: ETOH 0,1% HCL

② DANS ETOH + ALCL₃

FIGURE 23. SPECTRE ULTRA VIOLET-VISIBLE DE L'HETEROSIDE 1



HETEROSIDE 2

SOLVANT: ETOH 0,1% HCL

① DANS ETOH

BLANC: ETOH 0,1% HCL

② DANS ETOH + ALCL₃

FIGURE 24. SPECTRE ULTRA VIOLET-VISIBLE DE L'HETEROSIDE 2

8.5.5 Analyse par résonance magnétique nucléaire

Les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker 200 MHz ¹H, dans un micro-tube en utilisant 1 mg d'hétéroside dans CD₃OD. Les résultats sont présentés dans le tableau 9 et dans les figures 25, 26.

TABLEAU 9. DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS DES ANTHOCYANES DE LA PULPE DE CAFE

HETEROSIDE	POSITION DU PROTON ET DEPLACEMENT CHIMIQUE										
	NOYAU B C ₂ C ₅ C ₆			NOYAU A C ₄ C ₆ C ₈			RHAMNOSYL C ₁ C ₂ CH ₃			3-GLUCORHAMNO-SYL C ₁ SYL	
HETEROSIDE 1	8,07	7,07	8,34	8,96	6,73	6,83	4,71	4,07-4,37	1,21	5,35	3,25-4,0
	d	d	q	s	d	d	s	m	d	d	m
	(9 protons)										
HETEROSIDE 2	8,05	7,02	8,27	9,00	6,66	6,91	-	-	-	5,30	3,25-4,0
	d	d	q	s	d	d				d	m
	(6 protons)										
	d=doublet q=quadruplet s=singulet m=multipler										

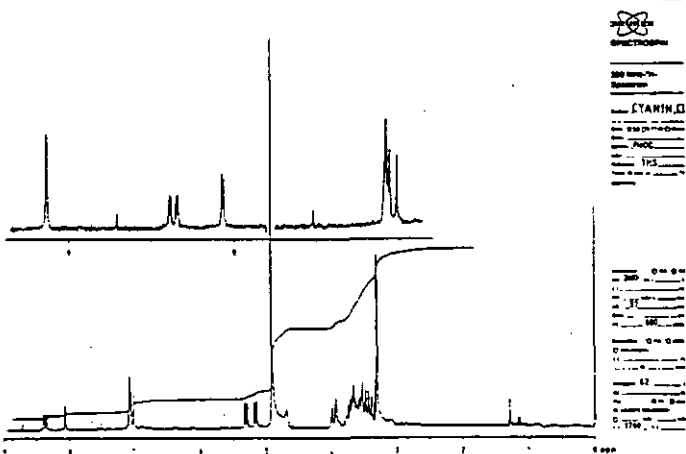


FIGURE 25. SPECTRE 200 MHz-¹H- DE LA CYANINE

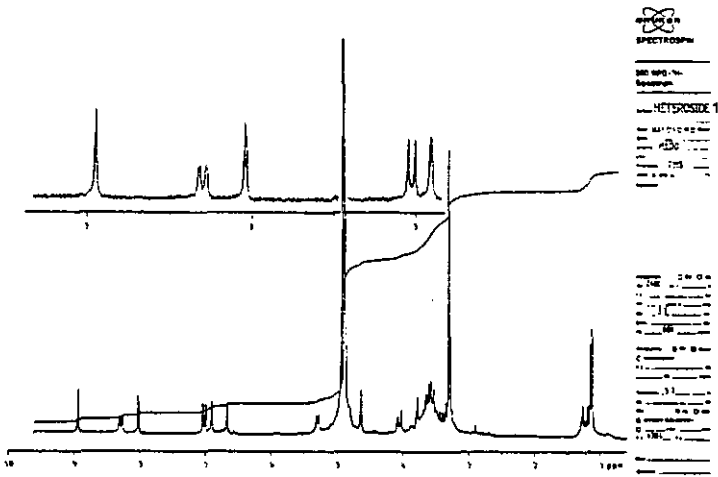


FIGURE 25 A. SPECTRE 200 MHz-¹H- DE L'HETEROSIDE 1

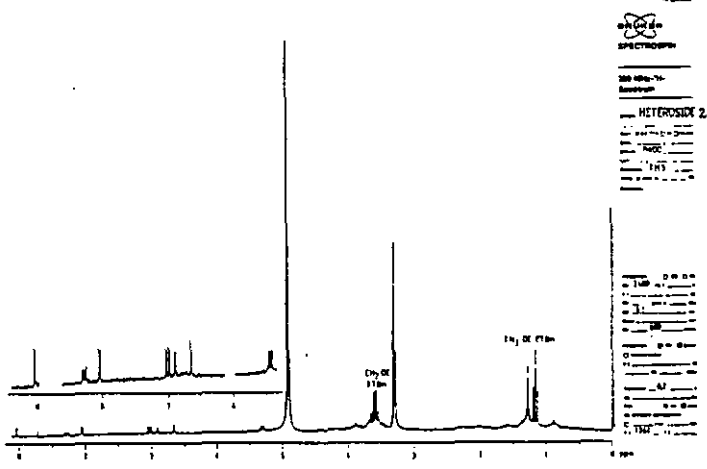


FIGURE 26. SPECTRE 200 MHz-¹H- DE L'HETEROSIDE 2

8.6 Analyse de résultats

L'analyse des anthocyanidines par chromatographie liquide à haute pression nous a montré la présence de la cyanidine comme la seule aglycone anthocyanique de la pulpe de café. Ce fait est aussi confirmé par les analyses chromatographiques sur papier, par les spectres UV-visible et RMN¹H.

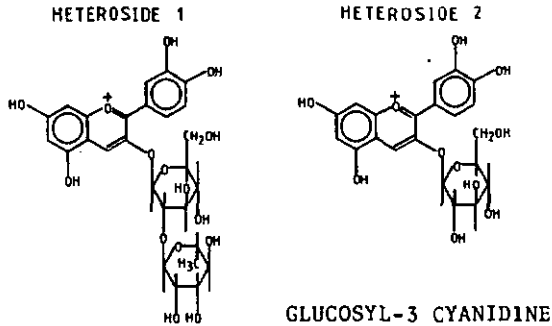
L'analyse des sucres de l'hétéroside 1 (voir 8.5.2) a montré la présence de glucose et de rhamnose. Les valeurs R_f (sur papier) pour les hétérosides 1 et 2, dans différents systèmes de solvant, sont très proches de ceux de rhamnoglucoside-3 cyanidine et glucoside-3 cyanidine respectivement, reportés dans la littérature.

Les spectres UV-vis. des hétérosides 1 et 2 permettent d'exclure une substitution en position 5 et la présence de résidus acylés.

L'hydrolyse "in situ" et les observations au cours des étapes de purification et de séparation sur colonne, nous permettent de penser que l'hétéroside 2 est un produit d'hydrolyse partielle de l'hétéroside 1. Les spectres de RMN¹H de ces deux hétérosides montrent la présence pour l'hétéroside 1 d'un doublet à 1,21 ppm (J = 6 c.p.s.) typique de rhamnose dans les neohesperidosides [82]. Ce signal est absent dans le spectre de l'hétéroside 2.

Dans les rutinosides ce signal est mal résolu et apparaît entre 0,8 et 1,0 ppm.

Ces résultats nous amènent aussi à conclure que l'hétéroside 1 est: neohesperidosyl-3 cyanidine et l'hétéroside 2: glucosyl-3 cyanidine.



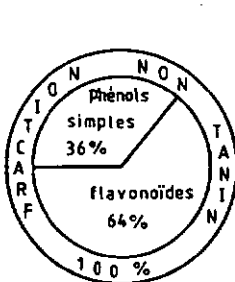
NEOHESPERIDOSYL-3 CYANIDINE

Notons que l'hétérosides de cyanidine tels que le rutinosyl-3 cyanidine et le glucosyl-3 cyanidine ont été trouvés dans des plantes appartenant à la même famille du caféier (*Rubiaceae*) *Mussaenda erythrophylla* et *M. philippica* var. *aurorae* x *erythrophylla* [83].

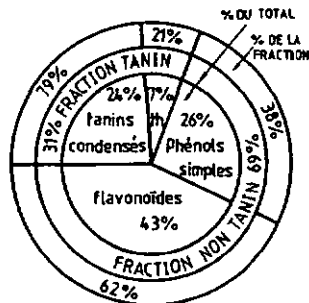
9. CONCLUSION GENERALE

Le fruit de café est communément appelé "cerise". L'exocarpe et le mesocarpe (environ 40% en poids) de ce fruit constituent la pulpe de café. L'analyse chimique semi-quantitative montre que la pulpe renferme beaucoup d'hydrates de carbone et, dans une moindre proportion des protéines, des matières grasses et des sels minéraux. On constate aussi la présence de caféine, de tanins, d'acide chlorogénique et d'acide caféique.

Dans ce travail nous avons effectué une estimation quantitative des différents groupes de composés phénoliques. L'ensemble polyphénolique de la pulpe de café a été subdivisé en phénols non tanins (phénols simples + flavonoïdes) et phénols tanins (tanins condensés + tanins hydrolysables). Les proportions relatives de ces substances ont été déterminées quantitativement. Elles varient, suivant que la pulpe a été lyophilisée ou séchée au soleil, dans les proportions suivantes:

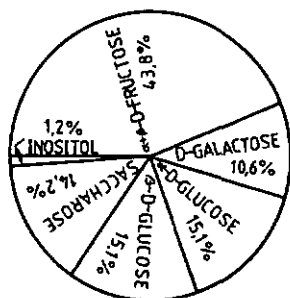


PULPE LYOPHILISEE
PHENOLS TOTAUX 6,29%

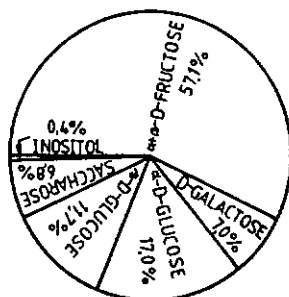


PULPE SECHEE AU SOLEIL
PHENOLS TOTAUX 6,62%

Une séparation, identification et analyse quantitative des sucres libres a aussi été réalisée par chromatographie gazeuse de leurs dérivés silylés. La répartition en pourcentage de ces composés est la suivante:



PULPE LYOPHILISEE
SUCRES TOTAUX 22,65%



PULPE SECHEE AU SOLEIL
SUCRES TOTAUX 26,64%

Nous avons enfin effectué l'étude qualitative d'une partie des flavonoïdes, les composés anthocyaniques. Cette étude a pu être réalisée grâce à l'association des principes de la chromatographie circulaire centrifuge et de la chromatographie sur papier à l'échelle préparative (CCCP).

Cette technique originale, que nous avons mis au point, s'est révélée particulièrement avantageuse par sa simplicité, sa rapidité et son économie. Il a été ainsi possible de montrer

la présence d'un composé nouveau le neohesperidesyl-3 cyanidine ainsi que le glucosyl-3 cyanidine dans la pulpe de café arabica, variété típica rojo.

10. CONSIDERATIONES FINALES

Le but de la culture de café est l'obtention de la graine, à partir de laquelle on prépare la boisson. Ce procédé qui n'utilise que le 6% de la cerise du café (méthode traditionnelle) est actuellement le seul facteur économique des pays producteurs.

D'après l'étude effectuée, la pulpe est qualitativement et quantitativement le sous-produit le plus important. Une utilisation rationnelle de ce sous-produit pourrait devenir une source supplémentaire de revenu pour les producteurs et une solution aux problèmes de pollution dus à l'accumulation des sous-produits pendant les périodes de récolte.

L'application des méthodes analytiques employées dans ce travail permettra de suivre l'évolution quantitative des différents groupes phénoliques et des sucres libres, pendant les traitements technologiques de la pulpe.

L'utilisation des sous-produits exige une centralisation des procédés de traitement de la cerise après la récolte et l'emploi de l'énergie solaire pour le séchage. En effet, un des

facteurs limitatifs dans l'utilisation de la pulpe est sa haute teneur en eau (80 - 85%).

L'utilisation de la pulpe de café peut être envisagée sous deux formes complémentaires:

- A) Extraction et purification de composés industriellement intéressants comme les anthocyanines, la caféine et les dérivés de l'acide cinnamique (du type acide chlorogénique) qui peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.
- B) Emploi du résidu d'extraction riche en sucres, protéines et fibre dans l'élaboration de fourrage pour le bétail.

L'emploi des résidus d'extraction de la pulpe dans l'alimentation animale est d'un grand intérêt dans les pays producteurs de café, étant donné que l'homme est en concurrence avec l'animal pour la même nourriture, par exemple le maïs. En effet, si on peut substituer, par des matériaux tels que la pulpe de café, une partie du maïs ou de la farine de soya ou de coton utilisée dans la préparation de rations alimentaires pour les animaux, on pourra disposer du reste de ces produits pour la consommation humaine.

11. PARTIE EXPERIMENTALE

11.1 Analyse des sucres libres de la pulpe de café

11.1.1 Appareils

- dispositif d'extraction solide - liquide en continu, fig. 2
- mini-réacteurs pour réactions de silylation (SUPELCO)
- chromatographe Perkin-Elmer 900 avec détecteur FID
- colonne en verre (L = 4 m, Øi = 2 mm) remplie de silicone SE-52 5% sur gaz chrom. Q 80/100 MESH
- intégrateur Hewlett Packard 3380 A.

11.1.2 Réactifs

- sucres témoins purs (SUPELCO)
- triméthylsilylimidazol "TSIM" (SUPELCO)
- polyvinylpyrrolidone "PVP" insoluble (Aldrich)

11.1.3 Conditions d'analyse (CGL)

Gaz vecteur N₂, 40 ml/min.

T_{inj.} = 190°C

T_m = 270°C

Programme: Isotherme 160°C pendant 12 min.
puis 3°C/min. → 265°C

11.2 Estimation quantitative des différents groupes de composés phénoliques de la pulpe de café

11.2.1 Appareils

- dispositif d'extraction solide - liquide en continu, fig. 2
- spectrophotomètre UV-vis. Perkin-Elmer, modèle 402
- PH-mètre Methohm Herisau, modèle E 396 B

11.2.2 Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de pureté analytique

- folin-ciocalteu (Merck)
- solution de formaldéhyde 36% (FLUKA)
- acide gallique cristallisé pur (Merck)
- gélatine en poudre (Merck)
- eau desionisée puis distillée

11.3 Etude des anthocyanes de la pulpe de café

11.3.1 Appareils

- dispositif d'extraction solide - liquide en continu, fig. 2
- dispositif d'extraction liquide - liquide en continu, fig. 27
- dispositif pour la chromatographie circulaire centrifuge sur papier à l'échelle préparative (CCCP), fig. 18

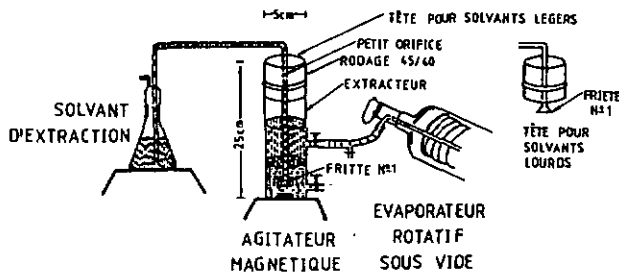
- chromatographie liquide à haute pression Siemens, modèle S 111, équipé avec une colonne Lichrosorb RP8 phase inversée (Knauer)
- chromatographie gaz - liquide (voir 11.1.1)
- spectromètre UV-vis. Parkin-Elmer, modèle 402
- spectromètre de résonance magnétique nucléaire Brüker 200 MHz-¹H.

11.3.1.1 Dispositif d'extraction liquide - liquide en continu

Nous avons construit un extracteur liquide - liquide qui permet une extraction en continu avec de solvants ayant une densité plus grande ou plus petite par rapport à la solution à extraire.

L'extracteur est constitué par un récipient cylindrique, équipé avec deux robinets en téflon et deux têtes possédant chacune dans sa partie inférieure un filtre en verre fritté de porosité 1, fig. 27.

FIGURE 27. DISPOSITIF D'EXTRACTION EN CONTINU
(LIQUIDE-LIQUIDE)



L'extracteur est relié d'une part avec le récipient contenant le solvant et d'autre part avec le tube d'admission d'un évaporateur rotatif sous vide Büchi. La dépression réalisée dans ce dernier provoque un appel continu du liquide d'extraction, lequel est mis en contact avec l'autre face liquide grâce à une agitation magnétique qui renouvelle continuellement l'interface des deux liquides. Le solvant d'extraction est ensuite amené directement dans le ballon d'évaporation où il est distillé à basse température.

11.3.1.2 Dispositif pour la chromatographie circulaire centrifuge sur papier à l'échelle préparative (CCCP)

Cet appareil (fig. 18) est constitué d'un rotor (commandé par une résistance variable), d'une chambre et d'un disque en polypropylène, d'un couvercle en verre et d'un dispositif pour assurer un débit constant de solvant.

La pression du solvant (débit) est donnée par la différence de niveau entre les deux extrémités libres du capillaire.

Les séparations sont faites sur disques de papier Whatmann 17 Chr. préparative ($\emptyset = 24$ cm), fixés au disque de polypropylène par un écrou vissé à l'axe du rotor.

Pour déposer le mélange à séparer sur le disque de papier, nous avons utilisé la seringue (0,1 ml) fournie avec l'équipement CAMAG pour la chromatographie sur couche épaisse. Le dépôt est fait à 3 cm du centre du disque et en faisant tourner le papier à 500 tours à la minute.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats de séparation avec un débit de solvant de 5 ml/min. et une vitesse de rotation de 800 tours à la minute.

Tous les disques de papier utilisés sont lavés, avant utilisation, avec le solvant d'élution et ils peuvent être réutilisés après lavage avec des solvants appropriés.

11.3.2 Supports et solvants

Polyvinylpyrrolidone "PVP" (Aldrich)

Cellulose "AVICEL" (Merck)

Papier Whatmann no. 1

Papier Whatmann 17 Chr

Plaques de cellulose (Macherey-Nagel UV₂₅₄)

Ethanol pour spectroscopie (Fluka)

CD₃OD (Ciba-Geigy)

11.3.3 Hydrolyse acide des anthocyanes pour analyse par HPLC

0,50 g de pulpe sont extraits en continu (fig. 2) avec MeOH-HCl 0,012N, l'extrait est évaporé sous vide et le

résidu hydrolysé (à reflux) à 100°C pendant 120 minutes avec 5 ml d'HCl 2N. Les produits d'hydrolyse sont passés par une colonne courte (2 x 0,3 cmØint) de PVP, laquelle est lavée avec 7 ml d'HCl 0,012N et les anthocyanidines éluées avec 25 ml de MeOH-HCl 0,012N. Le tout est amené, par évaporation à basse température (< 30°C), à un volume de 1 ml avant l'injection dans le chromatographe.

11.3.4 Hydrolyse acide d'hétérosides pour l'analyse de sucres par G.L.C.

0,5 mg d'hétéroside sont hydrolysés (à reflux) à 100°C pendant 30 minutes avec 0,5 ml d'HCl 0,5N. Les produits d'hydrolyse sont passés par une microcolonne de PVP et les sucres élués avec H₂O. L'eau est évaporée et les sucres analysés comme décrit dans la partie 6.1.3.

11.3.5 Analyse chromatographique sur papier

Nous avons utilisé du papier Whatmann no. 1 pour la détermination des valeurs R_f des hétérosides et d'aglycones dans trois systèmes de solvants, à savoir:

- HCl 1%
- Forestal (acide acétique : eau : HCl concentré 3 : 1 : 0,3 v/v)
- B : A : W (n-butanol : acide acétique : eau 4 : 1 : 5 v/v)

De ce dernier système de solvants on utilise la phase supérieure. Il ne doit pas être employé avant 48 heures après sa préparation.

11.3.6 Hydrolyse "in situ" des hétérosides

Pour cette analyse, nous avons utilisé des plaques en verre de cellulose (Macherey-Nagel UV₂₅₄).

Nous avons déposé 30 µg de l'hétéroside à 2,5 cm du bord inférieur de la plaque (2,5 x 10 cm), ensuite en chauffant celle-ci entre 40 et 50°C (à l'aide d'une plaque chauffante) on a déposé 15 µl d'HCl concentré sur le spot de l'anthocyane. Les produits d'hydrolyse ont été séparés avec un mélange d'HCl 2N : eau : acide acétique (3 : 10 : 0,5 v/v).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Buergin, E.C., *Café*, Sigloch Edition, Salzburg (1978)
- [2] Runge F., *Neueste phytochemische Entdeckungen*. G. Reimer, Berlin 1820, 1:144. In Viani R., *Coffee, History-Botany-Trade-Processing-Chemistry-Nutritional Value*, NESTLE, Lausanne (1979)
- [3] Von Linne C., *Species Plantarum*, Laurentius Salvus, Stockholm 1753, 1:172. In Viani R., *Coffee, History-Botany-Trade-Processing-Chemistry-Nutritional Value*, NESTLE, Lausanne (1979)
- [4] Viani R., *Coffee, History-Botany-Trade-Processing-Chemistry-Nutritional Value*, NESTLE, Lausanne (1979)
- [5] Bibliografía anotada sobre los sub-productos del café en América Tropical, Europa, Africa, Asia y Estados Unidos de América durante el periodo 1917-1974. Editado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba-Costa Rica (1974)
- [6] Anónimo., *Café para bovinos?*, La Hacienda 39 (2): 84, (1944)
- [7] Bressani R., Jarquin R., Estrada E.E., Gomez B.R., *Composición química de la pulpa de café*. Alpa 6: 113-114 (1971)
- [8] Bressani R., Estrada E., Jarquin R., *Pulpa y Pergamino de Café. I.-Composición Química y Contenido de Amino-ácidos de la Proteína de la Pulpe*. Turrialba 22 (3): 299-304 (1972)
- [9] Molina M.R., de la Fuente H., Gudiel H., Bressani R., *Pulpa y pergamino de café. VIII. Estudios básicos sobre la deshidratación de la pulpa de café*. Turrialba, 24 (3): 2B0-2B4 (1974)

- [10] Bressani R., Elias L.G., Estrada V.E., Jarquin R., Valor nutritivo de la pulpa de café en monogastricas. *Alpa* 6: 142-143 (1971)
- [11] Jarquin R., Rosales F.A., Gonzalez J.M., Graham J.E., Bressani R., Pulpa y pergamino de café. IX. Uso de la pulpa de café en la alimentación de cerdos en la fase de crecimiento y acabado. *Turrialba* 24: 41-46 (1974)
- [12] Mather R.E., Apgar Jr. W.P., Dried Extracted Coffee Meal as a Feed for Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 39 (7): 938 (1956)
- [13] Work S.H., Van Severen M.L., Escalon L., Informe preliminar del valor de la pulpa de café seca como sustituto del maíz en la ración de vacas lecheras. *El Café en El Salvador* 16 (185): 773-780 (1946)
- [14] Alfaro E.E., Fonseca H., Boschini R.E., Incorporación de la pulpa de café deshidratada en la preparación de concentrados para vacas lecheras en producción. Editado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica (1974)
- [15] Cabezas M.T., Estrada E., Gonzales J.M., Braham J.E., Bressani R., Pulpa de café y cafeina en raciones para terneros. IV, Reunión de Alpa, México, Compendio R-15 (1973)
- [16] Cabezas M.T., Conzales J.M., Bressani R., Pulpa y pergamino de café. V. Absorción y retención de nitrógeno en terneros alimentados con raciones elaboradas con pulpa de café. *Turrialba*, 1: 90-94 (1974a)
- [17] Estrada E., Cafeina y taninos como factores limitantes en el uso de la pulpa de café en la alimentación de terneros, Tesis Magister Scientificas, Facultad de ciencias químicas y farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala/ INCAP (1973)

- [18] Jaffé W., Ortiz D.S., Notas sobre el valor alimenticio de la pulpa de café. AGRO (Venezuela) 7 (23): 31-37 (1952/1953)
- [19] Primera reunion internacional sobre la utilización de sub-productos del café en la alimentación animal y otras aplicaciones agrícolas e industriales. Informe final, CATIE Turrialba, Costa Rica, 11-14 de junio de 1974
- [20] Alvarado C.M., CODESA instalara la primera planta industrial para procesamiento de la pulpa de café para dedicarla a la industria animal. El Agricultor Costarricense, 33 (7): 217-228, julio (1975)
- [21] International Development Research Centre ICRC-108s. Pulpa de Café. Composición, Tecnología y Utilización. Editores J.E. Brahm y R. Bressani. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP (1978)
- [22] Zuluaga V.J., Bonilla C., Quijano R.M., Contribución al estudio y utilización de la pulpa de café, Séptimo Coloquio Internacional sobre la Química de los Cafés (Hamburgo, 9-14 de junio, 1975) ASIC, Paris, p. 233-242
- [23] Calle V.E., Proceso industrial para la propagación de levaduras. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia, junio (1974)
- [24] Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Boletín de Información estadística sobre café, No 46 (1978)
- [25] Joslyn M.A., Methods in food analysis, In Kline A.D., Fernandez F.E., Johnson R.A., Quantitative determination of sugars in fruits by GLC separations of TMS derivatives, Journal of the AOAC Vol 53, No 6 (1970)

- [26] Racenis V., Factors affecting browning of potato chips, In Davison P.K., Young R., Gas chromatography of carbohydrates. The quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers, J. Chromatog., 41, 12-21 (1969)
- [27] Sawardecker J.S., Slonecker J.H., Anal. chem. 37, 945-947 (1965)
- [28] Sweeley C.C., Bentley R., Makita M., Wells W.W., J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497-2507 (1963)
- [29] Sawardecker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A., Anal. Chem. 37, 1602-1604 (1965)
- [30] Heatherbell D.A., Rapid concurrent analysis of fruit sugars and acids by gas-liquid chromatography, J. Sci. Fd Agric. 25, 1095-1107 (1974)
- [31] Davidson P.K., Young R., Gas chromatography of carbohydrates. The quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers, J. Chromatog., 41, 12-21 (1969)
- [32] Kline A.D., Fernandez F.E., Johnson R.A., Quantitative determination of sugars in fruits by GLC separations of TMS derivatives, Journal of the AOAC Vol. 53, no 6 (1970)
- [33] Davies J.N., Kempton R.J., in [30]
- [34] Alibert G., Marigo G., Boudet A., Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Identification des acides phénoliques de *Quercus pedunculata* Ehrh. *Physiol. Veg.*, 7 (1), 57-68 (1969)
- [35] Sanderson G.W., Perera P.M., Removal of polyphenolic compounds interfering with carbohydrate determinations in plant extracts with an insoluble polyphenol adsorbent, *analyst* vol. 91, 335-36 (1966)

- [36] Marigo G., Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analisis.*, vol. 2, No 2, p. 106 (1973)
- [37] Andersen R.Å., Sowers J.A., Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinyl-pyrrolidone, *Phytochemistry* Vol. 7, 293-301 (1968)
- [38] Smith I. *Chromatographic and electrophoresis techniques.* Intersciences publishers inc. New York, Col. 1, p. 324 (1960)
- [39] Reineccius G.A., Andersen D.A., Kavanagh T.E., Philip G.K., *J. Agric. Fd. Chem.* 20 (2), 199 (1972) in [30]
- [40] Boudet A., Gadal P., sur l'inhibition des enzymes par les tanins des feuilles de *Quercus Sessilis* Ehrh. Isolement des tanins. *Comptes rendus*, 260, 4057 (1960)
- [41] Singleton V.L., Esau P., Phénolic substances in grapes and wine and their significance, in [4]
- [42] Hillis W.E., Urbach G., The reaction of (+)-catechin with formaldehyde. *J. Appl. Chem. (London)* 9:474-482 (1959)
- [43] Kramling T., Singleton V., An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, 20, 86, (1969)
- [44] Singleton V.L., Rossi Jr. A.J., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. and Vitic.* 16:144-158 (1965)
- [45] Wu H., Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances. *J. Biol. Chem.* 43: 189-220 (1920)
- [46] Swain T., Hillis W.E., The phenolic constituents of *Prunus Domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 10, January (1959)

- [47] Harborne J.B., Fortschr. Chem. der Org. Nat., 20, 165 (1962)
- [48] Ribéreau-Gayon P., Recherches sur les anthocyanes des végétaux, application au genre vitis, librairie générale de l'enseignement, Paris (1959)
- [49] Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E., Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bull. Soc. Chim. de Fr., 2649-2652 (1965)
- [50] Timberlake C.F., Bridle P., Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. Nature, 212, 158-159 (1966)
- [51] Asen S., Stewart R.N., Norris K.H., Anthocyanin and PH involved in the colour of "Heavenly blue" Morning Glory. Phytochemistry, 16, 1118-1119 (1977)
- [52] Jurd L., Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. J. Food Sci., 29, 16-19 (1964)
- [53] Bayer E., Komplexbildung und Blütenfarben. Angew. Chem., 78, 834-841 (1966)
- [54] Timberlake C.F., Bridle P., The anthocyanins of apples and pears: The occurrence of acyl derivatives. J. Sci. Food Agric., 22, 509-514 (1971)
- [55] Palamidis N., Markakis P., Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. J. Food Sci., 40, 1047-1049 (1975)
- [56] Karrer P., De Meuron G., Zur Kenntnis des Oxydations-Abbaus der Anthocyane. Konstitution des Malvones. Helv. Chim. Acta, 15, 507-512 (1932)
- [57] Hrazdina G., Oxidation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides with H_2O_2 : Structure of malvone. Phytochemistry, Vol. 9, 1647-1652 (1970)

- [58] Shrikande A.S., Francis F.J., Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *J. Food Sci.*, 39, 904-906 (1974)
- [59] Shrikande A.J., Anthocyanins in Food. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 7, 193-198 (1976)
- [60] Adams J.B., Ongley M.H., The degradation of anthocyanins in canned strawberries. II. The effect of various additives on the retention of pelargonidin 3 glucoside. *J. Food Technol.*, 8, 305-307 (1973)
- [61] Somers T.C., The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, Vol. 10, 2175-2186 (1971)
- [62] Chen Lao-Jer., Hrazdina G., Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*. Vol. 20, 297-303 (1981)
- [63] Bourzeix M., La matière colorante du raisin, Groupe Polyphenols, *Compte rendu de l'assemblée générale annuelle* p. 367. Logroño-España 2-4 mai (1979)
Bulletin de liaison Eté 1980-Vol. 9
- [64] Van Teeling G.C., Cansfield E.P., Callop A.R., Chromatography of anthocyanins on columns of insoluble polyvinylpyrrolidone. *Journal of chromatographic science* Vol. 9, 505-509 (1971)
- [65] Bourzeix M., Heredia N., Isolement quantitatif du monoglucoside du malvidol du vin rouge ou d'extraits méthanoliques de marc de raisins. *Journal of chromatography*, 87, 269-270 (1973)
- [66] Wrolstad R.E., Putnam T.B., Isolation of strawberry anthocyanin pigments by adsorption on insoluble polyvinylpyrrolidone. *Journal of food science* Vol. 34, 154-155 (1969)

- [67] Hrazdina G., Column chromatographic isolation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides from grapes. *J. Agr. Food Chem.*, Vol. 18, No 2, 243-245 (1970)
- [68] Braun A., Les anthocyanes florales de *primula officinalis aurantica*. Communication présentée sous forme de poster aux journées internationales d'étude et assemblée générale du groupe polyphénols. Neuchâtel (Suisse) 17-19 septembre (1980)
- [69] Harborne J.8., The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *Journal of chromatography*, Vol. 1, p. 473 (1958)
- [70] Ribéreau-Gayon P., Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris (1968)
- [71] Wrolstad E.R., Heatherbell A.D., Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt.). *J. Sci. Fd Agric.*, 25, 1221-1228 (1974)
- [72] Thomas P., Antocyanins of beauty seedless grapes. *Journal of food science*, Vol. 39, 449-451 (1974)
- [73] Chandler B.V., Harper K.A., A procedure for the absolute identification of anthocyanins: The pigments of blackcurrant fruit. *Australian Journal of chemistry*, Vol. 15, 114-120 (1962)
- [74] Barrit B.H., Torre C.L., Cellulose thin-layer chromatographic separation of *Rubus* fruit anthocyanins. *Journal of chromatography*, 75, 151-155 (1973)
- [75] Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M. 8., The systematic identification of flavonoids, Springer, New York (1970)
- [76] Hostettmann K., Hostettmann-Kaldas M., Sticher O., Rapid preparative separation of natural products by centrifugal thin-layer chromatography. *Journal of chromatography*, 202, 154-156 (1980)

- [77] Wilkinson M., Sweeny J.G., Jacobucci G.A., High pressure liquid chromatography of anthocyanidins. *Journal of chromatography*, 132, 349-351 (1977)
- [78] Chandler B.V., Harper K.A., Identification of saccharides in anthocyanins and other flavonoids. *Australian Journal of chemistry* Vol. 14, 586-595 (1961)
- [79] Dallas M.S.J., In situ chemical reactions on thin layers in the identification of organic compounds. *J. Chromatog.*, 48, 193-199 (1970)
- [80] Lombard A., Tourn M.L., Buffa M., In situ reactions on silica gel thin layers in studies on plant oligo-saccharides. *J. Chromatog.*, 134, 242-245 (1977)
- [81] Kartnig T., Wegschaider O., Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Zuckern aus kleinsten Mengen von Glykosiden oder aus Zuckergemischen. *J. Chromatog.*, 61, 375-377 (1971)
- [82] Rösler H., Mabry T. J., Cranmer M. F., Kagan J., The nuclear magnetic resonance analysis of the disaccharide in flavonoid rhamnoglucosides. *J. Org. Chem.*, 30, 4346-49 (1965)
- [83] Harborne 8. J., Mabry J. T., Mabry H., *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London (1975)