ASIC

Association Scientifique
Internationale du Café

3ème
COLLOQUE INTERNATIONAL
SUR LA CHIMIE DES CAFÉS

3rd
INTERNATIONAL COLLOQUIUM
ON THE CHEMISTRY OF COFFEE

3.
INTERNATIONALES KOLLOQUIUM
ÜBER DIE CHEMIE DES KAFFEES

3°
COLLOQUIO INTERNAZIONALE
SULLA CHIMICA DEL CAFFÈ

Trieste 2-9 juin 1967

TROISIÈME COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA CHIMIE DES CAFÉS VERTS, TORRÉFIÉS ET LEURS DÉRIVÉS

Trieste, 2-9 juin 1967

Liste des participants 7

Séance inaugurale 11

Rapport de synthèse 13

Communications :

Documentation — Information

— Le contrôle de la qualité des cafés commercialisés en France. Réglementation et méthodes officielles d'analyse, R. A. DEHOVE, P. NAVELLIER 19

— Proposition d'un nouveau système d'évaluation gravimétrique des défauts du café vert, E. ILLY, L. RUZZIER 24

— Les consommateurs et la réglementation du café, F. CUSTOT 46

— Quality control in coffee trade : representativity of conventional and stratified sampling, C. CALZOLARI, A. LOKAR 51

— La normalisation internationale du café, entreprise par l'Organisation Internationale de Normalisation en liaison avec l'A. S. I. C., G. CASTAN 61

— Impressioni sulla recente Legge francese sul caffè del 3 settembre 1965 n. 65-763 ritratte da un chimico della vigilanza igienico-sanitaria, B. DORO 64

Méthodes d'analyse et composition chimique

— The chemistry of coffee aroma, a survey of present knowledge, F. GAUTSCHI, M. WINTER, I. FLAMENT, B. WILLHALM, M. STOLL 67

— Rapport sur les recherches en collaboration, relatives aux méthodes de dosage de l'extrait soluble dans l'eau du café torréfié, R. WILBAUX 77

— The preparation of green coffee for chemical analysis, J. MENCHU 86

— A comparison of methods for the measurement of moisture content in parchment and green coffees, A. E. WOOTTON 92

— Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. II et III : Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés. Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages, M. d'ORNANO, F. CHASSEVENT, S. POUGNEAUD 101

— Über die Bestimmung der Chlorogensäure und des Trigonellins, G. LEHMANN, H. G. HAHN 115

— Über phenolische Substanzen im Kaffeewachs, J. WURZIGER, G. DICKHAUT 121

— Hochpolymere Kohlenhydrate des rohen und gerösteten Kaffees, H. THALER, W. ARNETH 127

— The carboxylic acids of brewed coffee, J. S. WOODMAN, A. GIDDEY, R. H. EGLI ... 137

— The chemical composition and the quality of Guatemalan coffee, J. F. MENCHU, E. IBARRA 146

— Über gaschromatographische Untersuchungen an Aufgüssen aus Röstkaffees und Kaffee-Extraktpulvern, J. WURZIGER, R. D. WEEREN 155

— Contribution à l'étude des cafés solubles au moyen de la spectrophotométrie infra-rouge, A. CHARRO ARIAS, J. SIMAL LOZANO, D. VILLAR NOGUEIRA 165

— Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. IV : Isolement et étude de la structure de la cafamarine, substance amère de *C. buxifolia*, F. CHASSEVENT, M. d'ORNANO, S. POUGNEAUD 175

— Report of the working party on coffee odour research methods, G. VERHAAR, C. WEURMAN 183

— Irregularities in gaschromatographic direct vapour analysis, G. VAN LUNTEREN, S. VAN STRATEN, C. WEURMAN 191

— Les composants furanniques de l'arôme de café : quelques aspects chimiques et spectroscopiques, I. FLAMENT, F. GAUTSCHI, M. WINTER, B. WILLHALM, M. STOLL 197

— Gaschromatographische Bestimmung von Coffein in coffeinfreiem Kaffee-Extrakt, O. G. VITZTHUM 216

— The separation and determination of mono- and di-caffeoylquinic acids in coffee by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives, J. T. KUNG, W. S. RYDER, J. R. FELDMAN 223

— Acid hydrolysis of the coffee grain, C. ROLZ, P. SOLÉ, F. AGUIRRE 231

— Effect of decaffeination on the coffee components. I : Carbohydrates, C. CALZOLARI, L. COASSINI LOKAR 240

— Effect of decaffeination on the coffee components. II : Polycyclic aromatic hydrocarbons, C. CALZOLARI, G. PERTOLDI MARLETTA 248

— Determination of caffeine in green coffee by potentiometric acid-base titration in non-aqueous solvents, C. CALZOLARI, L. FAVRETTO GABRIELLI 257

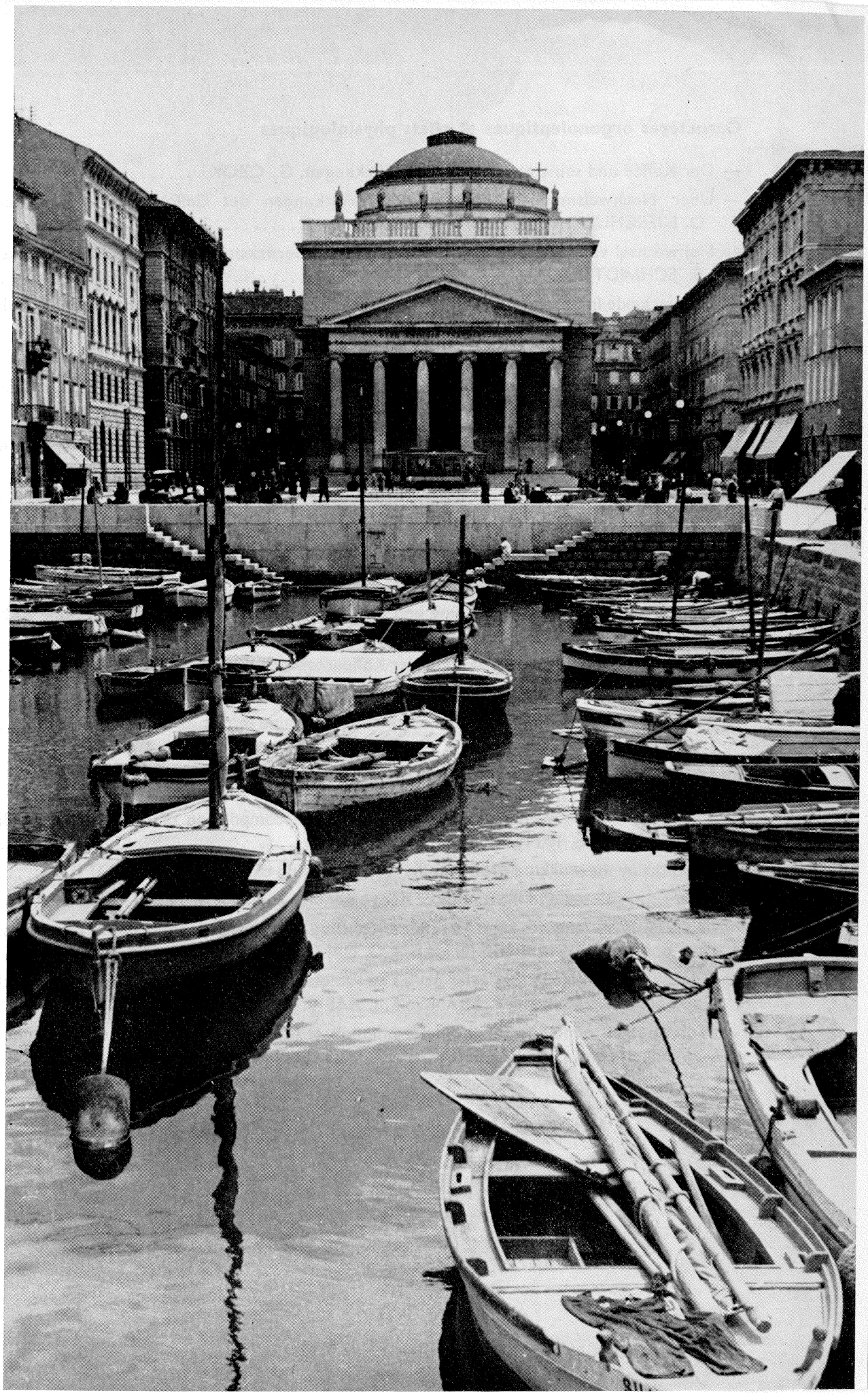
— Essais comparatifs d'extraction de la caféine en vue de son dosage, P. NAVELLIER, R. BRUNIN 264

Caractères organoleptiques et effets physiologiques

— Der Kaffee und seine physiologischen Wirkungen, G. CZOK 269
— Über Nachweismöglichkeiten zentraler Wirkungen des Coffein in Tierversuchen, O. NIESCHULZ 277
— Stoffwechsel von ^{14}C-Coffein bei der Ratte (unter Berücksichtigung des Kaffeegetränks), B. SCHMIDT 286
— Unterschiede in Resorption und Stoffwechsel von ^{14}C-Coffein bei Ratten nach oraler Gabe von Kaffee und Tee, G. CZOK 292
— Über Genusswert und Bekömmlichkeit von Röstkaffee, J. WURZIGER..... 299
— The effect of methylxanthines on lipid mobilization and transport, M. M. USARDI, C. SIRTORI 313
— Der Einfluss von Coffein und Kaffee auf den Gehalt des Serums an freien Fettsäuren beim Gesunden und Leberkranken, H. P. T. AMMON, W. ZELLER, C. J. ESTLER 317
— Die Kaffeeverträglichkeit des psycholabilen Patienten, R. ULRICH 325
— Kaffee und Sport, E. FISCHBACH 328
— Zum Problem der mutagenen Wirkung von Coffein beim Menschen, G. RÖHRBORN... 332
— Fallacies in current medical research on coffee, S. LEE 343
— Cardiovascular actions of caffeine and coffee in animals and man, W. RIKER, C. J. KENSLER 351
— Zur emetischen Wirkung fraktionierter Kaffeeröststoffe, G. MALORNY, W. WALTER... 374
— Choix des épreuves d'appréciation organoleptique, F. DEPLEDT 381
— Effects of long term administration of coffee and caffeine in rats, B. F. DAUBERT 387

Chimie dans ses relations avec la technologie

— Influence of the roasting degree on the chemical composition of coffee, L. A. FOBÉ, J. P. NERY, J. S. TANGO 389
— A report by the working group on the wet-processing of coffee, A. E. WOOTTON..... 398
— Raw bean colours and the quality of Kenya Arabica coffee, J. M. NORTHMORE..... 405
— Diverses propriétés des cafés torréfiés en fonction du degré de torréfaction et de la finesse de mouture, R. WILBAUX, D. HAHN, G. DALGER, J. MINELLE 415
— Teneur en vitamine PP des cafés grillés de l'Angola. Rôle des facteurs botaniques et technologiques, J. ADRIAN, R. FRANGNE, J. XABREGAS, A. CORTE DOS SANTOS 427
— Gas-volumetric method for the determination of the internal non-odorous atmosphere of coffee beans, C. E. BARBERA 436



Trieste
Canal grande

FOTO-ENIT

LISTE DES PARTICIPANTS

Allemagne

F. ALBANESE	— Dr., Lebensmittel-Entwicklungs-Labor, 2100 Hamburg. 9., Harburger Schlossstrasse, 20
H. P. T. AMMON	— Dr., Pharmakologisches Institut und Medizinische Klinik der Universität, Erlangen-Nuernberg
G. CZOK	— Dr., Pharmakologisches Institut der Universität, 2 Hamburg. 20 ; Martinistrasse 52
E. FISCHBACH	— Dr., 8 München. 15, Haydnstrasse, 10
K. HUWALD	— J. J. Darboven, 2000 Hamburg. 1., Wendenstrasse 35/43
O. F. KADEN	— Dr., Inhaber des Forschungslabor für Kaffee und Kakao, Hamburg. 13., Hallerstrasse 54
U. KRÖPLIEN	— Hamburg. 13., Hansastrasse 38
W. KRUEGER	— Quality Control Manager, General Foods GmbH, Elmshorn/Holst
H. LABENSKE	— Dr., Hamburg
K. LANG	— Prof., Dr. Dr., 7869 Todtnauberg/Schwarzwald
S. MALORNY	— Prof., Pharmakologisches Institut, 2 Hamburg. 20., Martinistrasse 52
O. NIESCHULZ	— Prof., Promonta GmbH, 2 Hamburg. 26., Hammer Landstrasse 162
K. PRCHAL	— Diplom-Chemiker, Coca Cola GmbH, 43 Essen, Kaninenbergstrasse 66
G. RÖHRBORN	— Dr., Institut für Anthropologie, 69 Heidelberg, Mönchhofstrasse 159
B. SCHMIDT	— Dr., Institut für physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität, 65 Mainz, Postfach 606
W. SCHULTHEISS	— Arbeitsgemeinschaft der Hersteller von löslichen Kaffee, Frankfurt/Main Eschenheimer Landstrasse 5-7
K. F. SYLLA	— Dr., Hag Aktiengesellschaft, Wissenschaftliche Abteilung, 28 Bremen, Hagstrasse
H. THALER	— Dr., Direktor des Instituts für Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule, 33 Braunschweig, Fasanenstrasse 3
R. ULRICH	— Dr., 28 Bremen, Friedrich-Missler-Strasse 7
O. G. VITZTHUM	— Dr., Hag Aktiensgesellschaft, Wissenschaftliche Abteilung, 28 Bremen, Hagstrasse
J. WURZIGER	— Prof., Dr.-Ing., Hygienisches Institut, Hamburg, Gorch-Fock Wall 15/17

Belgique

R. OLSON	— General Foods, 249 avenue Albert d'Huart, Kraainem

Brésil

L. A. FOBÉ	— Ing. agro., Dr. en Sc., Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos C. P. 655, Campinas SP
J. P. NERY	— Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, C. P. 655, Campinas SP

Danemark

A. BARKHUUS	— Copenhague
P. E. GLAHN	— Biocentralen, Bülowsvej 13, Copenhague
K. JACOBSEN	— Copenhague
H. LEVIN HANSEN	— Head Flavour Dept., Biocentralen, Bülowsvej 13, Copenhague

Espagne

A. CHARRO ARIAS — Prof., Universidad de Santiago, Facultad de Farmacia, Santiago de Compostela

Etats-Unis

J. ADINOLFI — Director, Technical Service, Pan American Coffee Bureau, 120 Wall str., New-York

B. DAUBERT — Director of nutrition, General Foods, Technical Center, 250 North Str., White Plains, N. Y.

C. J. KENSLER — Dr., A. D. Little Inc., 30 Memorial Drive, Cambridge, Mass.

E. O. KORPI — Vice-President, The Folger Coffee C°, P. O. Box 456, Kansas City, Miss.

S. LEE — Technical Editor, Tea & Coffee Trade Jal, 320 Lyncester Avenue, Fair Lawn, N. J.

H. S. LEVENSON — Director, Coffee Research, General Foods, Technical Center, Corporate Research Dept., Tarrytown, N. Y.

E. E. LOCKHART — Dr., Techn. Admin. Dept., The Coca Cola C°, P. O. Drawer 1734, Atlanta, Georgia

F. OTTERBEIN — General Foods, New York

R. STROBEL — Dr., Biochemist, 7305 Thompson Rd., Cincinnati, Ohio 45239. Procter & Gamble, 6000 Center Hill road, Cincinnati

Finlande

T. SALO — Central Laboratory, Finnish Co-operative Wholesale Society (SOK), Fleminginkatu 36, Helsinki. 51

France

G. ACCURTI — Cie Française de Décaféination, 37, bld de Levallois, 92-Neuilly sur Seine

R. BOULON — Dept. Cafés Solubles, SOPAD, 17/19, quai du Président Paul Doumer, 92-Cour bevoie

Mme R. BRUNIN — Assistante, Laboratoire Municipal, 39 bis, rue de Dantzig, 75-Paris 15e

G. CALMETTES — Ets. G. Calmettes, 87, rue Baudin, 92-Levallois-Perret

G. CASTAN — Ing. en chef, AFNOR, 23, rue Notre-Dame des Victoires, 75-Paris 2e

Mlle F. CHASSEVENT — Physicienne, Laboratoires de Recherches de l'I. F. C. C., 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94-Nogent sur Marne

J. CORVÉE — Secrétaire Général, Chambre Syndicale des Torréfacteurs de Café de France, 42, rue Pasquier, 75-Paris 8e

R. COSTE — Directeur Général de l'I. F. C. C., 34, rue des Renaudes, 75-Paris 17e

F. CUSTOT — Directeur, Laboratoire Coopératif d'Analyses et de Recherches, 10, avenue Louis Roche, 92-Gennevilliers

F. DEPLEDT — Ingénieur chimiste 16, rue de l'Estrapade, 75-Paris 5e

R. LUSSIGNY — Coffex-France S. A., B. P. 55-56, 67-Strasbourg-Neudorf

P. NAVELLIER — Chef du Service de Bromatologie, Laboratoire Municipal, 39 bis, rue de Dantzig 75-Paris 15e

M. d'ORNANO — Chef de la Division de Chimie, Laboratoires de Recherches de l'I. F. C. C., 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94-Nogent sur Marne

J. SIMON — Directeur, Méthodes et Contrôles, Ets. Damoy, 17, rue J. J. Rousseau, 94-Ivry sur Seine

R. WILBAUX — Chef de la Division de Technologie, Laboratoires de Recherches de l'I. F. C. C., 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94-Nogent sur Marne

Grande-Bretagne

J. D. CARR — J. Lyons & C° Ltd., Research & Development, Tea Division, Greenford, Middlesex

R. J. CLARKE — Alfred Bird & Sons Ltd., Maxwell House, Banbury, Oxon

J. A. DAWSON — Principal Scientific Officer, Tropical Products Institute, 56/62 Gray's Inn Road, London. W. C. 1

D. I. REES — J. Lyons & C° Ltd., The Laboratories, 149 Hammersmith Road, London. W 14

R. F. SMITH — Research Chemist, J. Lyons & C° Ltd., The Laboratories, 149 Hammersmith Road, London. W 14
Present address : 58 Elmwood road, Chiswick, Londres W. 4.

Guatemala

J. F. MENCHU — Ing., Depto. de Asuntos Agricolas, Asociación Nacional del Café, 7a. Avenida 10-36, Zona I, Guatemala

P. SOLÉ — Dr., ICAITI, Apartado Postal 1552, Guatemala

Hongrie

L. TELEGDY-KOVATS — Prof. Dr., University of Technical Sciences, Institute of Food Chemistry, Budafoki ut 4, Budapest. XI

Italie

C. E. BARBERA — Dr., Istituto di Chimica Agraria, via S. Giacomo 7, Bologna
adresse actuelle : via del Boveto, 74, Trieste

C. CALZOLARI — Prof., Istituto Merceologia, Università di Trieste, Trieste

M^me^ L. COASSINI LOKAR — Istituto Merceologia, Università di Trieste, Trieste

M^me^ L. GABRIELLI FAVRETTO — Istituto Merceologia, Università di Trieste, Trieste

M^me^ C. GANDINA — Dr., Servizio Tecnico Merceologico, « La Rinascente », via Cambiasi 8/10, Milano

E. ILLY — Dr., Illycaffè SpA, Porto Industriale, Trieste

G. IURACIC — Coffex Italiana SpA, Casella Postale 261, Trieste

A. LOKAR — Istituto Merceologia, Università di Trieste, Trieste

A. LUCCI — Dr., Crippa SpA, Milano

F. MUSTACHI — Directeur, Coffex Italiana SpA, Casella Postale 261, Trieste

R. PAOLETTI — Dr., Istituto di Farmacologia, Università di Milano, via del Sarto 21, Milano

M^me^ G. PERTOLDI MARLETTA — Istituto Merceologia, Università di Trieste, Trieste

M^lle^ L. RUZZIER — Dr., Illycaffè SpA, Porto Industriale, Trieste

C. ZANINI — Dr., via Gallina 10, Milano

Kenya

J. M. NORTHMORE — Chemist, Coffee Research Station, P. O. Box 4, Ruiru

A. E. WOOTTON — Principal Scientific Officer, East African Industrial Research Organization, P. O. Box 30650, Nairobi

Norvège

H. RUSSWURM — Central Institute for Industrial Research, Forskningsvn 1, Oslo-Blindern

Pays-Bas

J. G. DE HEUS — Dr., Douwe Egberts, Utrecht

J. PYPKER — Dr., Douwe Egberts, Utrecht

S. VAN STRATTEN — Dr., Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO, Utrechtseweg 48, Zeist

G. VERHAAR — Dr., Koninklijk Instituut voor de Tropen, 63 Mauritskade, Amsterdam. O

C. WEURMAN — Dr., Central Institute for Nutrition and Food Research TNO, Utrechtseweg 48, Zeist

Portugal

J. ADRIAN — Maître de Recherches CNRS (Paris), Instituto do Café de Angola, C. P. 342, Luanda

J. CORTE DOS SANTOS — Eng. Agro., Instituto do Café de Angola, C. P. 342, Luanda

J. XABREGAS — Eng. Agro., Servicos de Agricultura e Florestas de Angola, C. P. 238, Luanda

Suisse

E. BUERGIN — Dr. Ing.-chem., Directeur technique, Coffex S. A., CH-8201 Schaffhausen

I. FLAMENT — Dr. Sc., Firmenich & C^o^, P. O. B. 39, Jonction, Genève

F. GAUTSCHI — Dr., Firmenich & C^o^, P. O. B. 39, Jonction, Genève

A. KOUTAISSOF — Afico S. A., 4 place de la Gare, 1000 Lausanne

D. REYMOND — Dr. es Sc., Afico S. A., 4 place de la Gare, 1000 Lausanne
R. STOLL — Chef Division Exportations, Coffex S. A., CH-8201 Schaffhausen
H. STREULI — Dr., Thomi & Franck A. G., Basel
J. WOODMAN — B. sc., Ph. D., Afico S. A., 4 place de la Gare, 1000 Lausanne

Tchécoslovaquie

M^me^ A. DVORAKOVA — Balirny Obchodu, Podnikové Reditelstvi, Karlovo namesti 18, Praha. 2
Z. ZACEK — Ústav konrtoly a vývoje jokosti potravin, spálená 33/ Praha. 1

Union Douanière Equatoriale

J. HELLY — Ing. en Chef Agriculture, Directeur Service Inter-Etats, Contrôle Conditionnement, B. P. 663, Pointe Noire











SÉANCE INAUGURALE

La séance inaugurale s'est tenue dans la « Aula Magna » de l'Université de Trieste



En haut et à droite, le Président de l'ASIC, M. ILLY, pendant son allocution.

Ci-dessus, le Professeur A. ORIGONE, Recteur de l'Université de Trieste, faisant son discours.

A gauche, de haut en bas, M. STOPPER, représentant le Président de la « Junta regionale », M. SPACCINI, Maire de la ville de Trieste, et M. NAVELLIER, secrétaire scientifique de l'ASIC, au cours de leurs allocutions.

RAPPORT DE SYNTHÈSE*

P. NAVELLIER
Secrétaire scientifique de l'A.S.I.C

R. COSTE
Secrétaire administratif de l'A.S.I.C.

Le Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés verts, torréfiés et leurs dérivés s'est déroulé à Trieste du 2 au 9 juin 1967. Il a été organisé sous les auspices de l'Association Scientifique Internationale du Café (A. S. I. C.). Son objet était l'exposé des recherches fondamentales et appliquées relatives d'une part à la connaissance de la composition chimique du café et, d'autre part, aux relations de cette composition avec les propriétés organoleptiques et physiologiques du café, et avec les procédés technologiques qui lui sont appliqués.

Le colloque a été préparé par E. ILLY, président de l'Association Scientifique Internationale du Café, avec la collaboration des membres du bureau de cette association et le concours des organismes suivants : Comitato Italiano Caffè, Giunta Regionale (Trieste), Associazione Triestina degli interessati nell' industria e nel commercio del caffè, et la contribution de l'Université de Trieste qui a mis plusieurs salles et un amphithéâtre à la disposition de l'A S. I. C.

Le colloque a donc eu lieu dans un amphithéâtre de l'Université de Trieste et a effectivement réuni 98 participants représentant les pays suivants : Afrique orientale, Allemagne fédérale, Belgique, Brésil, Danemark, Espagne, Etats-Unis, Finlande, France, Grande-Bretagne, Guatemala, Hongrie, Italie, Norvège, Pays-Bas, Portugal, Suisse, Tchécoslovaquie, Union Douanière Equatoriale (Congo, Gabon, République Centrafricaine, Tchad).

* * *

Le colloque est ouvert le **vendredi 2 juin** à 9 h 30 par une allocution de bienvenue de E. ILLY, président de l'A. S. I. C.

Les séances de travail débutent, sous la présidence de R. COSTE (France). Celui-ci rappelle que les deux précédents colloques, réunis en France, avaient été organisés par l'Institut Français du Café, du Cacao et autres plantes stimulantes, dont il est le directeur général. Au cours de ces réunions, les participants avaient souhaité se retrouver au sein d'une association internationale, susceptible de rassembler les chercheurs de tous les pays, et représentative auprès d'autres organismes internationaux, tels que la F. A. O., l'I. S. O., l'I. C. O., la C. E. E., etc... Conformément à cette demande, l'Association Scientifique Internationale du Café a été créée par arrêté ministériel français du 19 janvier 1966, ce qui a permis à l'A. S. I. C. de prendre la relève de l'I. F. C. C. pour organiser à Trieste ce troisième colloque.

R. COSTE annonce ensuite que les exposés seront groupés d'après les centres d'intérêt des quatres commissions permanentes constituées à l'issue du premier colloque, et qui concernent respectivement la documentation, l'analyse, la technologie et la physiologie.

P. NAVELLIER, au nom de R. DEHOVE et au sien, aborde les **exposés relatifs à la première commission** en informant l'assemblée des principales caractéristiques de la nouvelle réglementation française des cafés. Il insiste sur les méthodes officielles d'analyse récemment publiées en France, qui ont pour base les recherches exposées aux précédents colloques et les travaux de divers membres de l'A. S. I. C.

A. CORTE DOS SANTOS (Portugal) prend alors la présidence.

M^lle^ L. RUZZIER (Italie), rapportant une étude faite avec E. ILLY, propose un nouveau système d'évaluation gravimétrique des défauts du café vert, d'une conception originale, qui permettrait d'apporter des simplifications aux pratiques traditionnellement en usage dans le monde.

F. CUSTOT (France) évoque ensuite le point de vue des consommateurs devant la nouvelle réglementation française des cafés ; il en souligne les nombreux avantages par rapport aux textes précédents, mais en dénonce aussi quelques insuffisances.

A. LOKAR et C. CALZOLARI (Italie) insistent sur l'importance de la représentativité de l'échantillon soumis à l'analyse et montrent les avantages du prélèvement par stratification.

Puis, sous la présidence de L. TELEGDY-KOVATS (Hongrie), G. CASTAN (France) commente succinctement le rôle

* Ce rapport a été présenté à la fin de la dernière séance de travail du Colloque.

de l'I. S. O. et plus précisément celui du comité technique TC 34 (produits agricoles alimentaires) et de son sous-comité « stimulants » dans la normalisation des cafés. Il fait connaître que la République Argentine qui assure le secrétariat du groupe de travail « café » présentera un projet de terminologie à la prochaine réunion de l'I. S. O. Il souligne enfin l'importance de la contribution apportée à ce travail par l'Institut Français du Café et du Cacao, et se félicite des liaisons qui existent maintenant entre l'I. S. O. et l'A. S. I. C., dont la compétence est reconnue comme organisme consultatif sur le plan scientifique.

E. ILLY (Italie) précise que l'Organisation Internationale du Café (I. C. O.) a admis à son tour la priorité de l'I. S. O. dans les orientations qu'elle peut prendre pour ses propres besoins. Ainsi, l'A. S. I. C. a mis au point une méthode de dosage de l'eau dans le café vert ; l'I. S. O. a entrepris la normalisation de cette méthode et l'I. C. O. se propose de l'utiliser pour fixer des critères. L'I. C. O. demande toutefois à l'A. S. I. C. d'étudier les conséquences de la teneur en eau du café sur ses qualités, en particulier sur son aptitude au stockage.

Un groupe de travail, composé de M^lle^ L. RUZZIER (Italie), MM. G. CASTAN (France), A. CORTE DOS SANTOS (Portugal), J. HELLY (U. D. E.), E. ILLY (Italie), A. KOUTAISSOF (Suisse), H. S. LEVENSON (États-Unis), E. E. LOCKHART (États-Unis), F. MENCHU (Guatemala), P. NAVELLIER (France), J. M. NORTHMORE (Kenya), R. OLSON (Belgique), D. REYMOND (Suisse), H. STREULI (Suisse), R. WILBAUX (France), A. E. WOOTTON (Afrique orientale), est constitué pour étudier, sous la présidence de L. TELEGDY-KOVATS (Hongrie), le projet de terminologie évoqué plus haut, en vue de proposer à l'I. S. O. des définitions basées sur des considérations scientifiques. En raison de l'ampleur de la tâche à accomplir, ce groupe reprend et poursuit ses travaux tout l'après-midi du samedi 3 juin.

L'inauguration officielle du colloque a lieu le 3 juin à 10 h (le 2 juin étant fête nationale) dans le grand amphithéâtre de l'université. Les personnalités suivantes prononcent de cordiales allocutions :

M. ORIGONE, recteur de l'Université de Trieste,
M. ILLY, président de l'A. S. I. C.,
M. NAVELLIER, secrétaire scientifique de l'A. S. I. C.,
M. SPACCINI, maire de Trieste,
M. STOPPER, ministre de la région de Trieste.

Puis, sous la présidence de R. F. SMITH (Grande-Bretagne), G. CZOK (Allemagne) présente une ample revue des connaissances actuelles sur **l'action physiologique du café.** Il rappelle qu'on avait jadis administré du café à des condamnés à mort sans parvenir à les tuer, puis il évoque successivement les constatations faites sur les organes humains : systèmes nerveux, circulatoire, digestif, en distinguant chaque fois que cela est possible les actions de la caféine, de l'acide chlorogénique et de la trigonelline de celles des substances résultant de la torréfaction. Il estime que le café est devenu l'aliment habituel de l'activité intellectuelle.

F. GAUTSCHI (Suisse) fait ensuite un vaste tour d'horizon sur les connaissances actuelles des **constituants aromatiques du café.** Dans la première partie de son exposé, il passe en revue les moyens d'investigation dont il dispose (matériel et techniques), tandis que dans la seconde partie, il procède à une énumération des substances chimiques aujourd'hui identifiées, au nombre d'environ trois cents. Il estime que l'établissement d'un inventaire complet nécessitera encore de très importantes et difficiles recherches.

Le lundi 4 juin, le colloque aborde les travaux présentés dans le cadre de la deuxième commission : méthodes d'analyse et composition chimique, sous la présidence de H. S. LEVENSON (Etats-Unis).

L. TELEGDY-KOVATS (Hongrie), président de cette commission, rappelle son objet : étude et choix de méthodes d'analyse en vue de parvenir à une meilleure connaissance de la composition du café. Il se félicite que les travaux de l'A. S. I. C. apportent une base objective aux projets de l'I. S. O. Puis il demande à R. WILBAUX (France) de donner les résultats obtenus par le groupe de travail chargé de l'étude de la détermination de l'extrait soluble du café. Une importante étude statistique des résultats obtenus permet de retenir deux ou trois méthodes parmi lesquelles un choix devra être fait à la suite d'une nouvelle chaîne internationale d'analyses.

Puis F. MENCHU (Guatemala) montre les difficultés inhérentes à la préparation du café vert en vue de son analyse. Il expose l'influence de la mouture de l'échantillon sur les résultats trouvés pour les teneurs en eau, en matières grasses et en cellulose brute.

A. E. WOOTTON (Afrique orientale), parlant du dosage de l'eau dans le café vert, compare la méthode de référence de A. GUILBOT avec la méthode en deux temps (100° C sous pression normale puis 70° C sous pression réduite) en usage dans l'organisation de l'Est africain. Il conclut à la bonne concordance de ces méthodes.

Sous la présidence de F. MENCHU (Guatemala), M. d'ORNANO (France), poursuivant l'étude de la recherche et du dosage de la caféine dans les graines et les feuilles de diverses espèces de caféiers sauvages et cultivés, montre que d'autres méthylxanthines accompagnent souvent la caféine. La présence de ces bases risque de perturber les dosages et il importe de les distinguer.

Puis P. SOLE (Guatemala) envisage le problème de la diversification des usages du café. Il étudie les conditions d'hydrolyse acide du grain et examine les produits obtenus en appliquant divers modes opératoires. Il estime qu'aucune des solutions envisagées ne peut trouver actuellement un débouché rentable.

O. G. VITZTHUM (Allemagne) présente un travail de D. LEHMANN, qui dose l'acide chlorogénique et la trigonelline selon un nouveau procédé de séparation chromatographique sur polyamide, suivi d'un dosage spectrophotométrique.

J. WURZIGER (Allemagne), poursuivant les recherches présentées lors du premier colloque, sur les graisses de café, étudie la mise en évidence des dérivés phénoliques, la localisation de ces substances dans la graine, et tire de ces observations des critères d'appréciation des grains de café examinés. Il pense notamment déceler ainsi les cafés décaféinés.

D. REYMOND (Suisse) prend alors la présidence et H. THALER (Allemagne) expose ses travaux sur les polysaccharides de quelques cafés Arabica et leurs produits d'hydrolyse. Il recherche les corrélations entre ces produits, les variétés des cafés examinés et les traitements qu'ils ont subis.

P. NAVELLIER et R. BRUNIN (France) évoquent les problèmes posés par l'extraction quantitative de la caféine en vue de son dosage, comparent divers modes opératoires et indiquent une technique d'extraction par l'azéotrope méthylal-méthanol, qui permet d'obtenir simultanément la caféine et la matière grasse.

Le mardi 6 juin, sous la présidence de H. THALER (Allemagne), J. S. WOODMAN (Suisse) annonce qu'il a identifié douze acides carboxyliques présents dans des infusions de café et examine l'influence de la torréfaction sur l'évolution des teneurs.

J. F. MENCHU (Guatemala) examine les variations de la composition chimique de cafés du Guatemala en fonction des divers types produits dans ce pays.

J. WURZIGER (Allemagne) compare par chromatographie en phase gazeuse les distillats aqueux obtenus à partir de cafés torréfiés ou d'extraits solubles de café et en souligne les différences.

Sous la présidence passée alors à L. A. FOBE (Brésil), A. CHARRO ARIAS (Espagne) examine le délicat problème de la recherche des produits dits « surfactifs », éventuellement ajoutés aux extraits solubles de café pour en développer le pouvoir moussant. Il estime que la spectrophotométrie infra-rouge sera d'une grande utilité dans ce travail.

M^lle^ F. CHASSEVENT (France) continue ses travaux sur la cafamarine, principe contenu dans certains cafés sauvages dépourvus de caféine, et essentiellement caractérisée jusqu'à présent par sa saveur fortement amère. Après isolement et examen spectroscopique de ce principe, l'auteur estime qu'il en existe au moins deux types : cafamarine et cafamarine *bis*.

Sous la présidence de H. STREULI (Suisse), G. VERHAAR et C. WEURMAN (Pays-Bas) présentent alors le compte rendu du groupe de travail constitué pour l'étude de l'arôme du café.

S. VAN STRATEN (Pays-Bas) fait une critique attentive des analyses effectuées par chromatographie en phase gazeuse. Il dénonce les erreurs imputables à l'emploi d'un matériel mal adapté ou à des manipulations défectueuses.

I. FLAMENT (Suisse) présente les formules de cinquante furannes actuellement isolés et caractérisés dans le complexe aromatique du café torréfié. Il expose leurs caractères, évoque leur origine et annonce l'existence probable de termes intermédiaires. Les moyens utilisés pour cette recherche ont été la chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

Puis, sous la présidence de G. VERHAAR (Pays-Bas), O. G. VITZTHUM (Allemagne) applique la chromatographie en phase gazeuse au dosage de la caféine, en utilisant le pyrène comme étalon interne. Cette méthode rapide permet le contrôle industriel des extraits solubles de café décaféiné.

H. S. LEVENSON (Etats-Unis) présente, au nom de J. T. KUNG, une méthode de séparation et d'identification des divers acides caffeoylquiniques et chlorogéniques contenus dans le café vert ou torréfié. La préparation de dérivés volatils, obtenus par sililation de ces acides, permet de recourir à la chromatographie en phase gazeuse. Les résultats quantitatifs, rapportés au café vert mis en œuvre, sont très significatifs.

C. CALZOLARI (Italie) évoque les recherches sur la chimie du café effectuées dans son laboratoire et présente trois de ses collaboratrices, qui exposent leurs travaux :

M^me^ COASSINI LOKAR compare la composition glucidique des cafés normaux et celle des cafés décaféinés.

M^me^ G. PERTOLDI MARLETTA, recherchant les hydrocarbures polycycliques du café, n'en décèle que des quantités infimes.

M^me^ L. FAVRETTO GABRIELLI suggère une méthode de dosage de la caféine par potentiométrie dans un milieu non aqueux, constitué par un mélange de chloroforme et d'anhydride acétique.

C. WEURMAN (Pays-Bas), responsable du **groupe de travail pour l'étude de l'arôme du café,** réunit son groupe en fin d'après-midi pour examiner les résultats de la précédente chaîne internationale d'analyses et préparer le travail futur.

Le mercredi 7 juin, sous la présidence de S. MALORNY (Allemagne), commence la présentation des **travaux effectués dans le cadre de la quatrième commission,** présidée par G. CZOK (Allemagne). Celui-ci rappelle que les études entreprises dans cette commission concernent les répercussions de la composition chimique sur les caractères organoleptiques et les effets physiologiques du café.

B. F. DAUBERT (Etats-Unis) étudie les effets comparatifs du café soluble, du café décaféiné, du café-boisson et de la caféine sur des rats, auxquels ces produits ont été administrés pendant deux ans. Seules les doses élevées ont provoqué des lésions du foie et des reins.

O. NIESCHULZ (Allemagne) compare les effets de la caféine, du café et de l'alcool sur des souris et des rats, dont le comportement est observé au moyen de dispositifs ingénieux. Les effets sur le système nerveux central sont attribuables non seulement à la caféine, mais aussi à d'autres substances présentes dans le café.

O. NIESCHULZ (Allemagne) prend alors la présidence et F. DEPLEDT (France) consacre son exposé au choix des épreuves rationnelles d'appréciation organoleptique, épreuves dont il faut préciser les modalités si l'on veut parvenir à établir des corrélations convenables entre la composition chimique et les caractères organoleptiques.

S. MALORNY (Allemagne) étudie sur le pigeon les effets émétiques de certains constituants décelés dans le café. Il estime que c'est l'acroléine qui présente cette activité au degré le plus élevé.

Sous la présidence de J. KENSLER (Etats-Unis), B. SCHMIDT (Allemagne) et G. CZOK (Allemagne), dans deux exposés complémentaires, montrent que l'administration de caféine radioactive, marquée par le carbone 14, permet de suivre chez le rat la résorption, la rétention et l'élimination de cette substance. La caféine du thé semble être retenue plus longtemps dans l'organisme que celle du café, lorsque ces deux boissons sont utilisées comparativement.

Puis F. DEPLEDT (France) préside un exposé de J. WURZIGER (Allemagne), qui insiste pour que les méthodes de préparation et d'appréciation du café soient choisies en fonction des qualités organoleptiques de la boisson qui, en fin de compte, intéresse seule le consommateur.

En fin d'après-midi, une brève **réunion de quelques membres de la deuxième commission,** sous la présidence de H. THALER (Allemagne), vice-président de cette commission, permet d'en préciser les objectifs : étude de la composition chimique du café et de ses dérivés, en mettant au point et en utilisant des méthodes analytiques appropriées. Une ample discussion se développe au sujet du choix de ces méthodes. Des groupes de travail seront chargés d'étudier et de sélectionner des méthodes pour doser l'eau, la caféine, l'extrait soluble, ainsi que les constituants de l'arôme. Les méthodes retenues seront diffusées, d'une part à l'intention des membres de l'A. S. I. C. et d'autre part aux organismes internationaux, tels que l'I. S. O., qui pourraient les adopter pour leur propre usage.

Le 8 juin, les travaux de la quatrième commission reprennent sous la présidence de K. LANG (Allemagne) avec un exposé de R. PAOLETTI (Italie), qui compare les effets de la caféine et de la théophylline sur le transport des lipides, *in vitro* et *in vivo*.

H. P. T. AMMON (Allemagne) examine l'influence de la caféine sur la teneur du sérum en acides gras libres, chez des êtres sains et sur des malades porteurs de lésions hépatiques : une augmentation plus sensible du taux de lipides sériques apparaît chez ces derniers.

A. CHARRO ARIAS (Espagne) occupe alors le fauteuil présidentiel et C. J. KENSLER (Etats-Unis), considérant l'action du café sur le système cardio-vasculaire, note que certaines notions actuellement admises sont à reconsidérer. Des effets favorables sont à retenir, par exemple le soulagement des maux de tête. D'autres principes que la caféine présentent une action notable et il faut tenir compte de la nature du café expérimenté et des conditions de sa préparation. L'auteur signale enfin des travaux récents qui attribuent au rapport zinc-cadmium un effet sur l'hypertension.

R. ULRICH (Allemagne) considère la façon dont les malades psycholabiles bénéficient de l'action du café sur leur psychisme. Il estime que cette boisson stimule les facultés intellectuelles des gens bien portants, mais n'apporte pas grand chose aux sujets intellectuellement déficients.

Sous la présidence de R. PAOLETTI (Italie), E. FISCHBACH (Allemagne) examine le café comme stimulant de l'effort physique. Il pense qu'il ne faut pas l'assimiler à un dopant sportif, car s'il développe souvent les possibilités d'effort, il doit cependant être conseillé avec discernement sans atteindre des doses excessives et il faut l'éviter dans le cas des sujets hypernerveux.

E. E. LOCKHART (Etats-Unis) préside ensuite et C. RÖHRBORN (Allemagne) étudie le problème de l'action mutagène de la caféine chez les êtres humains. D'après des expériences sur les souris et sur des cultures de tissus humains, il conclut que cette action n'est établie que lorsque des doses très élevées sont administrées et un important complément d'étude est nécessaire.

S. LEE (Etats-Unis) passe en revue les insuffisances expérimentales dans le domaine de la recherche médicale sur la café. Il pense que beaucoup de travaux sont à reconsidérer, car, sur des bases d'observations discutables, on avait naguère critiqué le café comme on critique actuellement les hallucinogènes, et certains faits ont été admis sans avoir été vérifiés scientifiquement.

Sous la présidence de A. E. WOOTTON (Afrique orientale) **les exposés relatifs à la troisième commission** commencent le **vendredi 9 juin.** O. F. KADEN (Allemagne), président de la troisième commission (chimie dans ses relations avec la technologie), rappelle quelques travaux effectués dans le cadre des activités de sa commission ; notamment, il évoque des nouveautés concernant la technologie du café, la préparation des grains par voie humide, la torréfaction et l'extrait soluble. Il souhaite que cette commission poursuive sa tâche sur un programme précis.

J. P. NERY (Brésil), soucieux de dégager des données intéressantes pour la fabrication de l'extrait soluble de café, relate des travaux effectués dans son laboratoire et concernant les conséquences de la torréfaction sur divers constituants du grain : caféine, sucres totaux, extrait soluble, matières grasses, matières protéiques. Un café Santos, soumis à six torréfactions différentes, a été utilisé pour ces essais.

S. LEE (Etats-Unis) préside ensuite la communication de A. E. WOOTTON (Afrique orientale), qui expose les résultats obtenus en étudiant six variantes de préparation du café par voie humide. Le trempage dans l'eau, après élimination chimique et fermentaire de la pulpe, a donné une amélioration de qualité supérieure à celle observée après trempage dans une solution de méta-bisulfite. L'emploi d'enzymes pectolytiques semble être une solution économique, donnant des produits de qualité : la qualité de ces cafés a été appréciée par des dégustateurs.

J. M. NORTHMORE (Afrique orientale) recherche les relations entre la qualité des cafés Arabica du Kenya et la couleur du café vert, mesurée après extraction des pigments par divers solvants. Le rôle de l'acide chlorogénique et de ses dérivés, notamment du chlorogénate de magnésium, est important, et celui de la chlorophylle négligeable ou inexistant.

L'après-midi, sous la présidence de L. A. FOBE (Brésil), R. WILBAUX (France) considère les variations de diverses propriétés du café en fonction du degré de torréfaction et de la finesse de mouture. Il propose de caractériser une mouture au moyen de deux valeurs représentant sa finesse moyenne et son homogénéité, puis examine l'influence de ces facteurs sur la couleur et sur l'extrait soluble.

Puis H. LEVIN HANSEN (Danemark) prend la présidence et J. ADRIAN (Portugal) rappelle que la torréfaction du café provoque la formation de vitamine PP ou niacine. Il étudie ensuite les rapports qui existent entre la teneur en niacine et divers facteurs botaniques, écologiques et technologiques. Il observe enfin que la richesse en niacine du café torréfié est indépendante de sa qualité et par conséquent de sa valeur commerciale. Il suggère alors de développer la lutte contre la pellagre, maladie due à la carence en vitamine PP et que l'on observe notamment dans les régions chaudes du globe où le maïs représente la nourriture essen-

tielle des populations pauvres, en favorisant dans ces régions la consommation de cafés bon marché.

Le dernier rapport scientifique présenté au colloque est celui de C. E. BARBERA (Italie), qui décrit un dispositif ingénieux destiné à recueillir et à doser les gaz inodores inclus dans les grains de café, il rappelle que, à côté des substances odorantes qui créent l'arôme du café, il existe des gaz inodores, essentiellement constitués par de l'anhydride carbonique, qui jouent un rôle important du point de vue technologique.

E. ILLY, président de l'A. S. I. C., occupe alors le fauteuil et demande à P. NAVELLIER (France), secrétaire scientifique de l'A. S. I. C., de présenter le **rapport de synthèse** du colloque. Le rapporteur remarque que, au cours des trois colloques de 1963, 1965 et 1967, le nombre des pays représentés est passé de 11 à 15 et à 19, celui des rapports présentés de 29 à 32 et à 49 et celui des participants de 50 à 81 à 98.

Il note toutefois que l'abondance même des sujets traités, utilement complétés par des discussions souvent longues et animées, a exigé des participants un effort de présence qu'il n'a pas toujours été possible de soutenir. Il souhaite donc que, d'ici le prochain colloque, les commissions spécialisées et leurs groupes de travail examinent séparément, dans le détail, les sujets qui sont de leur compétence, afin de présenter pendant le colloque des conclusions déjà élaborées. Ceci permettrait de réduire la durée des réunions plénières et favoriserait sans doute l'assiduité des participants, tous partagés entre de nombreuses tâches, mais qui reviennent cependant chaque fois plus nombreux au colloque suivant.



R. COSTE, secrétaire administratif de l'A.S.I.C., et le président ILLY

Enfin, le président ILLY prononce une brève **allocution de clôture**. Il confirme le rôle essentiellement scientifique de l'A. S. I. C., notamment dans ses rapports avec les autres organismes internationaux, tels que l'I. S. O., l'I. C. O., la C. E. E. et la F. A. O. Ces organismes sont informés des résultats des travaux de l'A. S. I. C. et peuvent les utiliser pour leurs propres besoins. Mais l'A. S. I. C. se limite à un rôle consultatif et n'élabore pas de normes ni de règlements. Pour éviter toute interprétation erronée des objectifs de l'A. S. I. C., le Conseil a décidé de modifier les titres des première et deuxième commissions, qui s'appelleront dorénavent :

I. Documentation, information.
II. Méthodes d'analyse et composition chimique.

Le président ILLY se réjouit de constater combien l'atmosphère de coopération amicale, instaurée dès les premiers colloques, n'a fait que se développer malgré le nombre accru de participants.

Il souhaite au futur nouveau président de l'A. S. I. C. le plus grand succès dans l'accomplissement de sa tâche et la réalisation du quatrième colloque, puis il déclare clos le troisième colloque sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés.

H. THALER (Allemagne) vient alors, au nom des participants, féliciter et **remercier** E. ILLY, le bureau et les organisateurs du colloque, l'Université de Trieste qui a prêté un amphithéâtre et donné l'accès à son restaurant, ainsi que le secrétariat, les interprètes et le technicien de la salle qui ont efficacement contribué au succès de cette manifestation. Il exprime également la reconnaissance de l'assemblée à l'égard des organisations professionnelles qui ont offert de brillantes et fort agréables réceptions.



Une séance de travail

LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES CAFÉS COMMERCIALISÉS EN FRANCE

RÉGLEMENTATION ET MÉTHODES OFFICIELLES D'ANALYSE

R. A. DEHOVE

Service central de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité, Paris

P. NAVELLIER

Laboratoire municipal de Paris

C'est avant tout par la dégustation que l'on apprécie la qualité d'un café. Cependant, le commerce international a été amené à élaborer des spécifications qui permettent de classer les divers cafés en fonction de leur valeur marchande. Il s'agit en premier lieu de mentionner l'espèce (*C. arabica*, *C. canephora*, et notamment la variété Robusta, *C. excelsa*, etc...), le lieu de production et le type de préparation (voie sèche ou voie humide). Ensuite interviennent les critères relatifs à la granulométrie, aux défectuosités, à l'humidité, à la couleur, etc...

Ces informations ne suffisent certes pas à définir la qualité des cafés, qui reste subordonnée à l'appréciation subjective du dégustateur, mais elles permettent de fixer des catégories de qualité et d'établir dans chacune d'elles une hiérarchie basée notamment sur le nombre de défauts. Ainsi, un café de grande origine, mais altéré par de nombreuses défectuosités (fèves noires, fèves puantes, etc...) peut être déprécié par rapport à un café de moindre renom, mais parfaitement sain.

Cette appréciation objective, après avoir servi de base aux contrats internationaux, a été utilisée pour l'établissement de diverses législations et pour la normalisation. Ainsi, la récente réglementation française s'en est largement inspirée. Ces textes sont évidemment destinés à un usage purement national, mais nous pensons que leur présentation dans une réunion internationale peut constituer une information utile, et leur discussion peut ouvrir la voie à des recherches scientifiques que nous espérons fructueuses.

L'un de nous nous a indiqué, aux cours des deux précédents colloques, dans quel esprit cette réglementation était élaborée et quelles étaient les dispositions essentielles des projets alors en cours de préparation (1) (2).



P. NAVELLIER

Il nous incombe aujourd'hui de vous annoncer la publication officielle de ces documents, de vous en donner les références, d'en présenter une analyse très succincte et surtout de vous dire combien les travaux développés dans le cadre de nos colloques ont été utiles pour la préparation des méthodes officielles françaises destinées à la répression des fraudes et au contrôle de la qualité des cafés.

RÉGLEMENTATION FRANÇAISE DU CAFÉ

Le texte de base est le décret du 3 septembre 1965 (3).

Ce document traite d'abord du café vert et le définit d'après son origine botanique et sa préparation. Le décret fixe ensuite la limite du nombre de défauts admissible (pour 300 g, 120 défauts, et provisoirement 180), la granulométrie minimale et la teneur maximale en eau (12,5 p. 100). Les cafés torréfiés, obtenus à partir de cafés verts conformes, doivent demeurer en deçà de valeurs limites pour les défauts, la teneur en eau et l'enrobage ; ce dernier doit être mentionné sur l'étiquette. Une catégorie de cafés dits « supérieurs » a été définie : elle doit satisfaire à des spécifications plus sévères.

Le café décaféiné ne doit pas renfermer plus de 0,1 p. 100 de caféine alors que, précédemment, la limite était de 0,05 p. 100. Cette disposition a pour objet de favoriser la fabrication de cafés décaféinés de bonne qualité gustative, et de préparer sur ce point l'harmonisation avec les autres réglementations européennes. D'autres articles concernent le café boisson, les extraits de café et l'étiquetage.

Ce décret pose les principes généraux de la réglementation française, mais il n'aborde pas les détails, qui sont exposés dans des textes complémentaires.

En premier lieu, une circulaire (4) précise, à l'intention des services d'inspection et des laboratoires de la répression des fraudes, la portée et la signification du décret, afin d'éviter toute interprétation malencontreuse lors de son application.

En second lieu, une série d'arrêtés sont venus apporter diverses précisions, qui ne figuraient pas dans le texte original. En effet, l'établissement d'un décret met en jeu une machine administrative assez lourde, qui fait appel à de nombreux départements ministériels, et la remise à jour d'un décret est généralement lente. Un arrêté, en revanche, est beaucoup plus facilement remanié : c'est donc sous cette forme qu'ont été prises les dispositions dont la modification doit être envisagée.

L'arrêté du 2 décembre 1965 (5) fixe la liste des substances utilisables pour l'enrobage des cafés torréfiés : saccharose, glucose, lactose, maltose, caramels obtenus par chauffage de ces sucres, corps gras comestibles, amidons et leurs dérivés propres aux usages alimentaires, caséine, gomme arabique ou gomme du Sénégal. On voit que cette liste exclut les hydrocarbures (huile de vaseline) naguère fort employés ; de nouvelles suppressions ou adjonctions, si des considérations hygiéniques ou technologiques les justifient, peuvent être décidées selon la même procédure.

L'arrêté du 8 septembre 1966 (6) énumère et définit les défectuosités des cafés verts et torréfiés, et fixe les barèmes correspondants, en vue de l'application du décret. La parution de ce texte a été retardée par la nécessité de concilier, autant que possible, la situation présente du commerce du café et le désir d'obtenir une amélioration de la qualité des cafés commercialisés en France. Les définitions figurant dans cet arrêté ont été inspirées par celles du projet de terminologie du café vert, élaboré par un groupe de travail de la troisième commission de l'Association Scientifique Internationale du Café (chimie dans ses rapports avec la technologie), définitions qui seront discutées au cours du présent colloque. Vous savez que l'A. S. I. C. a été consultée à ce sujet par l'Association Internationale de Normalisation. Or, le groupe de travail « café » de cet organisme (ISO/TC 34/SC 8/GT 2) va se réunir à Moscou dans quelques jours, et des membres de l'A. S. I. C. iront présenter les définitions que vous aurez retenues.

Il est prévisible que ces définitions provoqueront des discussions et le texte final, quand il sera prêt, sera sans doute différent de celui que l'administration française utilise actuellement pour ses propres besoins. A ce moment, une modification de l'arrêté permettrait de mettre celui-ci en harmonie avec les recommandations internationales.

Quant aux défectuosités du café torréfié, elles ont été considérées en fonction des défauts du café vert mis en œuvre, et en tenant compte des modifications apportées par la torréfaction (formation de fèves carbonisées, de coquilles, de brisures, etc...).

En outre, puisque les cafés torréfiés sont souvent constitués par des mélanges de fèves de dimensions variées, il a paru équitable de calculer les défauts selon deux barèmes différents : l'un exprimé en nombre de défauts dans la prise d'essai, comme dans le cas du café vert, et l'autre calculé d'après le pourcentage pondéral de ces défauts. Seul, le résultat le plus favorable au producteur doit être retenu pour la conclusion des analyses.

Enfin, quelques défauts ont été considérés comme rédhibitoires au-delà de certaines limites. Il s'agit des fèves noires, des cerises, des brisures et des fèves piquées ou scolytées.

Un arrêt du 14 septembre 1966 (7) concerne l'inscription de la date limite de vente au consommateur des cafés dits « supérieurs », et un arrêté en préparation fixera la nature et les teneurs résiduelles des solvants admis pour la fabrication du café décaféiné.

MÉTHODES OFFICIELLES FRANÇAISES D'ANALYSE DU CAFÉ

La surveillance des denrées commercialisées en France ressortit d'une part aux services d'inspection de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité, et d'autre part aux laboratoires officiels.

Ces derniers doivent effectuer leurs analyses d'après des méthodes qui sont mises au point par une commission spécialisée, puis promulguées par arrêté.

C'est l'arrêté du 9 décembre 1966 (8) qui a rendu officielles un certain nombre de méthodes d'examen du café, dont voici les dispositions essentielles :

En ce qui concerne le café vert, il y a lieu de procéder à un examen général (olfactif, visuel, granulométrique) dont l'utilité est évidente.

La détermination de la masse de 1.000 grains peut permettre de rapporter à un certain nombre de grains (2.000 par exemple) le nombre de défectuosités comptées sur une prise d'essai de 300 g, et de rectifier ainsi certaines anomalies de l'estimation traditionnelle, puisque cette prise d'essai peut renfermer tantôt 1.500 grains, tantôt 3.000. Un mode opératoire a donc été indiqué.

La détermination des défectuosités du café vert a été élaborée en fonction de l'arrêté (6) que nous avons commenté ci-dessus.

Pour le dosage de l'eau dans le café vert, les méthodes officielles se sont appuyées sur les travaux effectués dans le cadre des colloques de l'A. S. I. C., notamment le rapport de SMITH (9), les publications de GUILBOT, d'ORNANO, HAHN et POUGNEAUD (10)-(11)-(12).

La méthode de référence consiste à pulvériser le café sans échange d'eau avec l'ambiance, et à mettre la poudre obtenue en équilibre avec une atmosphère anhydre, sous pression réduite, à 48° C. Cette méthode, longue et délicate, a servi à mettre au point une méthode pratique. Celle-ci consiste à chauffer les grains entiers, en deux temps, à 130° C ; la perte de poids ainsi déterminée comporte une erreur par excès, en raison de la volatilisation partielle de substances autres que l'eau. Ce chiffre est corrigé d'une valeur empirique déterminée expérimentalement, qui le met en harmonie avec le résultat donné par la méthode de référence.

Signalons en passant que la méthode de référence a été établie en utilisant un tube à dessiccation spécial et l'étuve multicellulaire de Chopin, mais ce matériel particulier peut être remplacé par un pistolet à dessiccation de modèle courant, garni d'un liquide approprié, par exemple le dichloro-difluorométhane, qui bout vers 47,6° C sous la pression atmosphérique normale.

Pendant que s'élaboraient d'après les travaux de l'A. S. I. C., les méthodes officielles françaises pour l'examen du café vert, ces mêmes méthodes étaient examinées par le groupe de travail « café » de l'Association internationale de normalisation, I. S. O, qui les a retenues et soumises à une enquête internationale.

En outre, ces méthodes sont étudiées par la commission « café » de l'Association française de normalisation (A. F. N. O. R), et l'on peut espérer aboutir à une similitude satisfaisante entre les méthodes officielles françaises, les méthodes normalisées en France, et les méthodes internationales recommandées par l'I. S. O. : ce serait là une remarquable confirmation de l'intérêt présenté par les travaux de l'A. S. I. C.

Les cafés torréfiés, en revanche, ne sont pas considérés actuellement par l'I. S. O., car ils sont de minime importance dans le commerce international. Au contraire, ils sont très répandus dans le commerce intérieur français et leur contrôle analytique est pleinement justifié.

Les méthodes officielles d'examen du café torréfié prévoient un examen olfactif, le contrôle pondéral des cafés emballés, la détermination des défectuosités et le dosage de l'eau.

Les méthodes de dosage de l'eau dans le café vert ne conviennent pas pour le café torréfié, beaucoup plus riche en substances volatiles autres que l'eau. C'est pourquoi, en attendant la mise au point d'une méthode scientifiquement satisfaisante, il a paru préférable de s'en tenir au mode opératoire traditionnel qui consiste à chauffer le café, sommairement concassé, dans une étuve à 103° C, pendant une nuit (16 heures). Une définition souligne dans le texte l'aspect conventionnel de la « teneur en eau » ainsi déterminée.

* * *

Permettez-nous, en terminant, d'exprimer le souhait que les méthodes officielles françaises d'analyse du café soient soumises à un examen critique de nos collègues d'autres nationalités.

Nous serons heureux d'enregistrer les suggestions susceptibles d'améliorer ces méthodes, afin de favoriser un contrôle équitable de la qualité des cafés commercialisés en France, mais qui, bien entendu, arrivent chez nous en provenance de quatre autres continents.

BIBLIOGRAPHIE

1. DEHOVE (R. A.). — *Café Cacao Thé*, Paris, vol. VII, nº 4, octobre-décembre 1963, p. 400-404.
2. DEHOVE (R. A.). — Second colloque international sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 3-7 mai 1965, I. F. C. C. éd. (Paris) 1966, p. 78-83.
3. Décret nº 65-763 du 3 septembre 1965, *J. O. R. F.* du 9 septembre 1965, p. 8049-8052.
4. Circulaire du 22 novembre 1965, *J. O. R. F.* du 10 décembre 1965, p. 11123-11126.
5. Arrêté du 2 décembre 1965, *J. O. R. F.* du 23 décembre 1965, p. 11646.
6. Arrêté du 8 septembre 1966, *J. O. R. F.* du 8 octobre 1966, p. 8876-8877.
7. Arrêté du 14 septembre 1966, *J. O. R. F.* du 6 octobre 1966, p. 8776-8777.
8. Arrêté du 9 décembre 1966, *J. O. R. F.* du 31 janvier 1967, p. 1111-1117.
9. SMITH (R. F.). — Second colloque international sur la chimie des cafés verts, torréfiés, et leurs dérivés, Paris 3-7 mai 1965. I. F. C. C. éd. (Paris) 1966, p. 27-38.
10. GUILBOT (A.). — *Café Cacao Thé* (Paris), vol. VII, nº 1, janvier-mars 1963, p. 49-56.
11. ORNANO (M. d'), HAHN (D.), POUGNEAUD (S.). — *Café Cacao Thé*, vol. VIII, nº 2, avril-juin 1964, p. 113-132.
12. ORNANO (M. d'), GUILBOT (A.). — *Café Cacao Thé*. vol. VIII, nº 4, octobre-décembre 1964, p. 293-300.

DEHOVE (R. A.), NAVELLIER (P.). — **Le contrôle de la qualité des cafés commercialisés en France. Réglementation et méthodes officielles d'analyse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 19-23, réf.

Dès le premier colloque, en 1963, le projet de réglementation française des cafés a été exposé. Lors du colloque de 1965, le texte du décret était soumis aux signatures ministérielles : il a été promulgué le 3 septembre 1965. Une analyse succincte de ce décret et des arrêtés qui le complètent est présentée.

En outre, des méthodes d'analyses ont été rendues officielles par l'arrêté du 9 décembre 1966. Ces méthodes concernent l'examen général des cafés, le dosage de l'eau et le dénombrement des défauts. Elles ont pour origine des études faites par les commissions, créées à l'issue du premier colloque, qui poursuivent leur tâche dans le cadre de l'A. S. I. C.. Un effort particulier a été entrepris pour harmoniser les méthodes officielles françaises avec celles étudiées en vue de leur normalisation internationale sous les auspices de l'I. S. O.

DEHOVE (R. A.), NAVELLIER (P.). — **Quality control for commercial coffee in France. Regulations and official methods of analysis.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 19-23, réf.

As from the first symposium in 1963, the French draft regulations for the control of coffee were drawn up. At the 1965 symposium, the text of the regulations was submitted for ministerial approval : it became law the 3rd September 1965. A concise analysis of this law and of the various statutes appertaining to it, are given. In addition, the methods used for analysis have been made official by the decree of the 9th December 1966. These methods are those affecting the general examination of different coffees, moisture determination and the counting of defective beans. They are based on the work done by the committees created after the first symposium, which continue their work in the framework of the A.S.I.C. .A special effort has been made to harmonize the official French methods with those examined with the object of their International standardization under the sponsorship of the I.S.O.

DEHOVE (R. A.), NAVELLIER (P.). — **Die Qualitätskontrolle des Handelskaffees in Frankreich. Gesetzliche Regelung und offizielle Untersuchungsmethoden.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés (Trieste), 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 19-23, réf.

Schon beim ersten Kolloquium im Jahre 1963 wurde das Projekt einer französischen gesetzlichen Regelung des Kaffees entwickelt. Während des Kolloquiums von 1965 wurde das Dekret den Ministern zur Unterzeichnung vorgelegt und am 3. September 1965 verkündet. Dieses Dekret sowie seine Ergänzungsbestimmungen werden hier kurz analysiert.

Ausserdem offizialisierte der Erlass vom 9. Dezember 1966 Untersuchungsmethoden welche sich auf die allgemeine Prüfung des Kaffees, die Bestimmung des Wassers und die Zählung der Fehler beziehen. Sie liegen Untersuchungen durch die Ausschüsse zugrunde, die am Ende des ersten Kolloquiums gebildet wurden und seither ihre Aufgabe im Rahmen der A. S. I. C. erfüllen.

Man war besonders bemüht, die offiziellen französischen Methoden mit den untersuchten Methoden zwecks ihrer internationalen Normalisierung unter der Leitung der I. S. O. in Einklang zu bringen.

DISCUSSION

M. SMITH : I appreciate the fact that my report to the second symposium was so well received and two of the methods examined were adopted in France.

I am sorry that consideration was not given to the third method (two stages, drying at 105°) and that the work of the group was not continued with the examination of a larger number of samples of raw beans.

At the second symposium I criticized the small size of the sample which was taken for these methods : 5 gr of coffee which represent 30 beans possibly ; I think that the method is not representative.

I still prefer the method that we use in England and I understand in East Africa : the two stage method with intermediate grinding and drying at 105° C.

M. NAVELLIER : Nous sommes tout à fait d'accord avec l'objection de M. Smith, comme quoi un échantillon de 5 g n'est pas représentatif de plusieurs tonnes de café. Néanmoins, il y a deux remarques à faire :

— Nous n'avons pas parlé des problèmes d'échantillonnage qui sont très importants. Ces problèmes sont à l'étude pour la normalisation internationale et nous pouvons espérer que dans quelque temps nous recevrons au laboratoire des échantillons de quelques centaines de grammes représentatifs des lots sur lesquels ils ont été prélevés.

— En ce qui concerne la prise d'essai, je ne suis pas entré dans les détails, mais il est évident que l'on ne peut pas se contenter d'un seul dosage sur une seule prise d'essai. Il faut faire deux, si ce n'est trois, dosages sur différentes prises d'essai du même échantillon. M. d'Ornano, qui a fait une étude attentive de la méthode, a soigneusement précisé tous ces points. En opérant comme prescrit, les méthodes indiquent les écarts limites entre la répétabilité des résultats et ainsi on peut éviter de tomber dans l'erreur que M. Smith a signalée.

M. WOOTTON : I should like to point out that analytical methods meant for international use can be influenced by altitude. Methods involving the use of air-ovens, for instance, should take into account that the boiling-point of water at Nairobi is 95° C because of the altitude of 5.500 feet and the normal air pressure of 625 mm Hg. The boiling-point of dichlorodifluoromethane, proposed by M. Navellier for his adaptation of the Guilbot method, is probably about 42 °C in Nairobi and not the desirable temperature of 48 °C.

M. NAVELLIER : Le problème que vient d'évoquer M. Wootton est parfaitement justifié : selon l'altitude du lieu, le point d'ébullition change et il faut trouver un autre solvant. Nous en avons cherché un qui convenait pour l'altitude de Paris, il faudrait en trouver un autre pour l'Afrique orientale, mais je pense que cela est possible. Le solvant n'est donné qu'à titre indicatif et il n'est pas question de l'imposer.

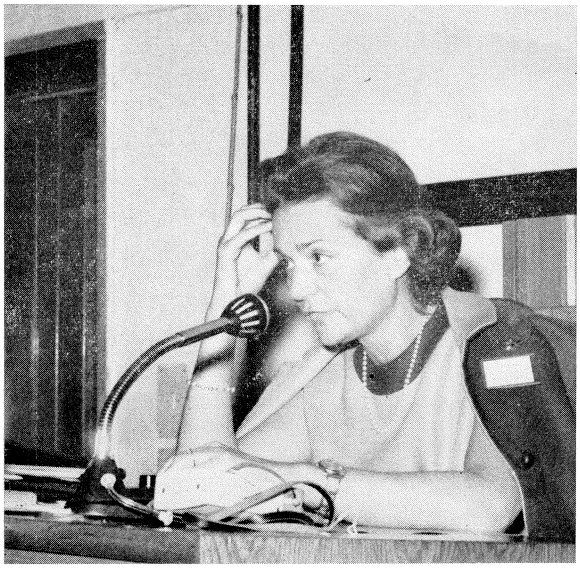
PROPOSITION D'UN NOUVEAU SYSTÈME D'ÉVALUATION GRAVIMÉTRIQUE DES DÉFAUTS DU CAFÉ VERT

E. ILLY, L. RUZZIER
Illycaffè S. P. A., Trieste

Dans le mouvement général de standardisation et d'unification des classifications, qui se développe actuellement dans le domaine international, vient s'insérer la tendance spécifique relative au café qui a pour but précis d'établir des standards minima de qualité du café vert. Ce processus est mis en œuvre actuellement au sein de l'ISO et de l'ICO, tandis qu'à l'ASIC a été confiée la fonction consultative.

Jusqu'à ce jour, le marché du café vert était réglementé par des normes plus ou moins complexes, très différenciées, mais l'application de ces normes était limitée aux planteurs, chargeurs, commerçants, etc., c'est-à-dire à des professionnels qui devenaient nécessairement des experts chevronnés en la matière, capables d'opérer malgré la complexité de ces normes.

L. RUZZIER



Mais comme le problème doit s'étendre maintenant aussi aux laboratoires des Douanes et aux Bureaux sanitaires pour les contrôles obligatoires, on doit penser que la compétence des employés de ces services est d'un niveau beaucoup plus bas et limité : d'où la nécessité — lorsque cela est possible — de simplifier notablement ces normes de façon à les rendre facilement applicables, même par un personnel non spécialisé dans le domaine spécifique du café.

Ce dessein a inspiré la présente étude qui a été effectuée dans notre laboratoire industriel où les exigences quotidiennes de travail nous ont amenés à constater la superposition constante des différents aspects de l'évaluation du café, tout au long de son cycle de production. Du point de vue d'une industrie, le schéma ci-contre résume le problème mentionné ci-dessus.

Comme on peut le présumer, le problème de l'évaluation globale du café se présente de façon extrêmement complexe. Pour l'affronter et pour tenter de le résoudre, nous avons utilisé les deux documents qui, à la lumière de l'expérience et de la connaissance actuelles, sont les plus exhaustifs et les plus à jour : nous voulons parler des normes fixées par la législation française de 1965 et des définitions proposées par l'ISO, relatives à la terminologie d'un dictionnaire du café.

L'application de la loi française et l'interprétation des définitions ISO nous ont hélas semblé très souvent difficiles et problématiques ; de plus les résultats ne nous ont pas toujours donné pleine satisfaction. Nous observons que :

1) les définitions des défauts sont quelquefois incomplètes et trop générales de sorte qu'elles se prêtent facilement à des interprétations personnelles. Prenons l'exemple d'un échantillon d'Arabica du Cameroun

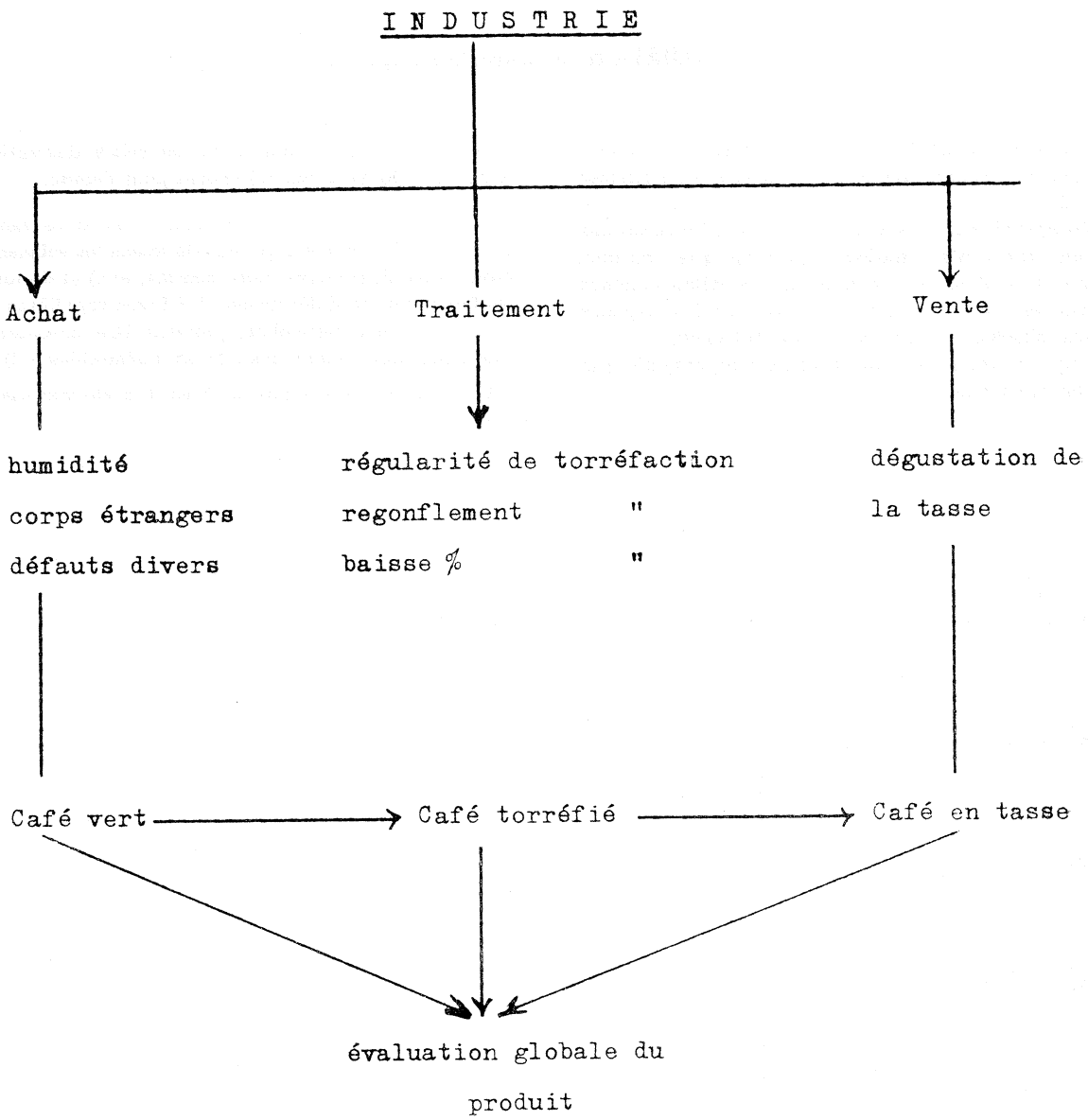


Schéma 1

récemment analysé parallèlement par un laboratoire compétent en France et par nous-mêmes, à titre simplement consultatif : les résultats ont été vraiment démoralisants, car non seulement le nombre, mais aussi le type de défauts ne correspondaient pas entre eux !

2) la législation française soumet l'acceptation d'un lot de café à la condition de l'absence totale de grains « puants ». Nous estimons que la disposition, bien qu'opportune, est inapplicable, plutôt que trop sévère, pour le simple motif qu'il n'existe jusqu'ici ni une définition ni encore moins une technique appropriée qui permettent d'individualiser, parmi les nombreux défauts, les grains « puants ».

3) étant donné que le système de pénaliser un produit en appliquant le « critère du comptage » des grains défectueux comporte un déséquilibre sensible d'évaluation entre lots de café de granulométrie différente, nous sommes amenés à ne pas approuver ce système, même si l'inconvénient qu'il comporte est commun à tous les systèmes actuels d'évaluation.

ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE

Ayant ainsi constaté la difficulté d'appliquer de manière intégrale et à la lettre les dispositions ISO et les normes législatives françaises, **nous avons complété les procédés exposés dans les deux systèmes susmentionnés par un critère d'évaluation organoleptique,** qui tient compte de l'influence négative que les défauts mêmes déterminent, dans chacun des cas, sur les organes visuels, olfactifs, gustatifs, tactiles et trifaciaux.

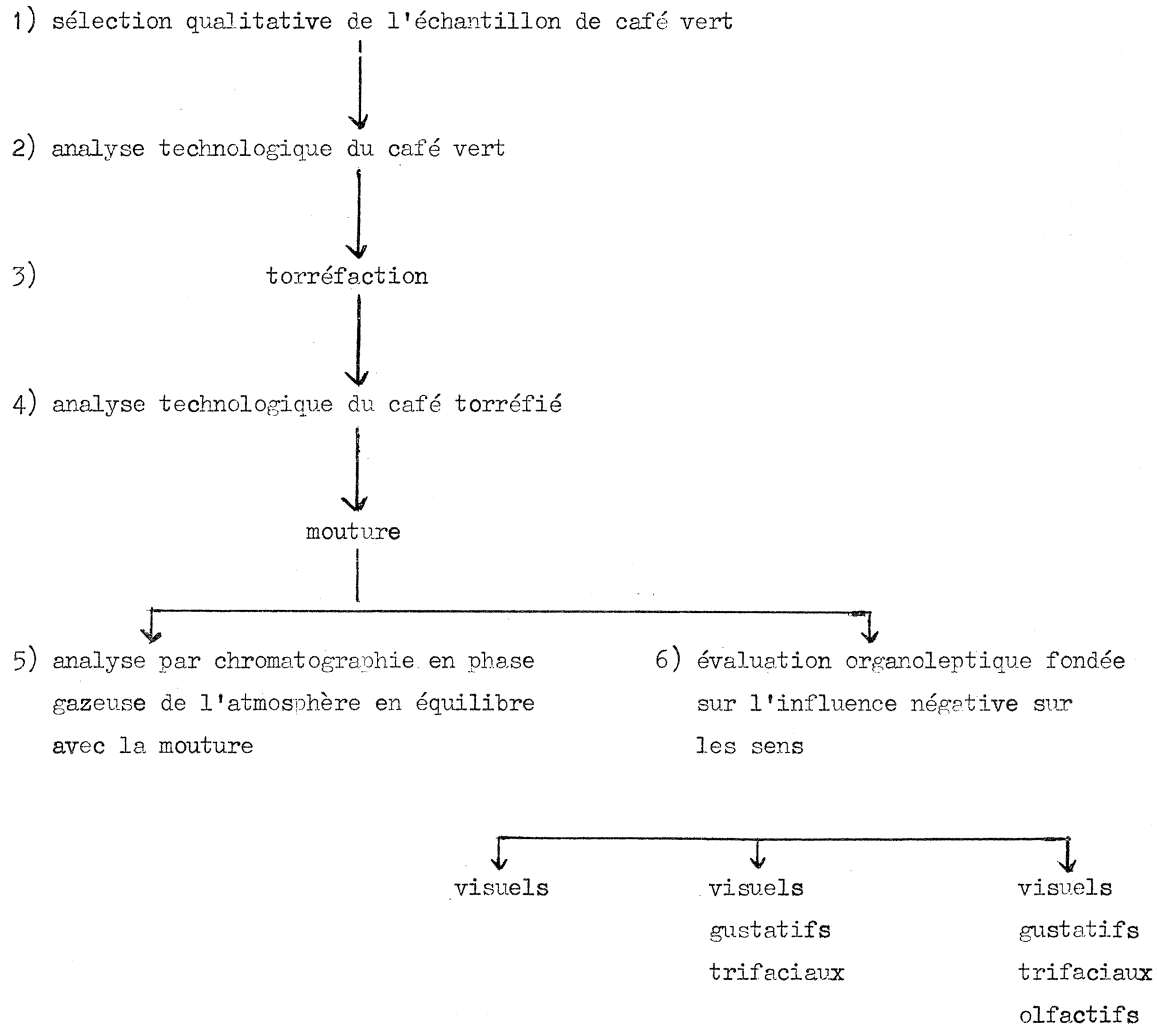
La phase préliminaire du travail est représentée par le schéma suivant :

Des lots de cafés « lavés » et « naturels », des variétés Arabica et Robusta, ont été choisis pour l'étude.

1) Par une sélection préliminaire, les fèves saines, régulières (R) ont été séparées de toutes les substances étrangères (E) (pierres, bois, scories, etc.) et de toutes les fèves qui, se différenciant des fèves régulières par quelque aspect particulier, peuvent être considérées sans distinction comme des « fèves indésirables » (I).

La masse des fèves indésirables (I) a été successive-

Schéma 2



ment divisée en fonction des caractéristiques les plus visibles, de façon à former par exemple des groupes de fèves à l'aspect cireux, de fèves sèches, piquées, décolorées, etc. Ces groupes ont été à leur tour soumis à une nouvelle sélection selon un critère plus rigide : par exemple en fonction de la couleur (fèves cireuses, jaunâtres, vertes, brun-rougeâtre, etc.), en fonction de l'intensité du défaut (fèves piquées avec un, deux trous ou plus), etc.

2) La sélection terminée, on a effectué sur chacun des groupes les analyses normales de caractère technologique telles que la détermination de la granulométrie et également, là où la quantité de grains disponibles l'a permis, la détermination du poids et du volume moyens d'une fève et du poids spécifique de celle-ci.

3) On a ensuite procédé à la torréfaction des diverses parties défectueuses du café vert. Pour ce processus, les conditions opératoires ont été maintenues constantes et égales à celles préalablement choisies pour l'échantillon moyen original, porté à la phase de son second craquement, de façon à atteindre une intensité moyenne de couleur et un pourcentage de perte de poids de l'ordre de 17 %. Le poids en gramme, la température initiale de torréfaction, l'apport de calories/minute, la durée de torréfaction ont été maintenus constants. Evidemment la température finale de torréfaction, la perte de poids en pourcentage et la couleur ont subi des variations continues et souvent sensibles, en fonction des caractéristiques physiques des grains analysés et des défauts respectifs.

4) Après refroidissement dans des conditions de milieu contrôlées (temps, température et autant que possible teneur en humidité également), les produits torréfiés ont été pesés à nouveau (détermination du pourcentage de perte de poids) et contrôlés au « leucomètre » (détermination de l'intensité de torréfaction).

5) Une partie de ces produits a été ensuite moulue et enfermée dans un matras pourvu d'un bouchon particulier avec membrane de caoutchouc. Après 30 minutes, les gaz du dessus ont été prélevés, toujours à température ambiante de 20° C, et injectés dans l'appareil de chromatographie à ionisation de flamme, avec thermostat à 60° C.

Les conditions choisies pour le prélèvement et pour l'analyse relative ne sont évidemment pas idéales pour l'exaltation des arômes, mais elles sont par contre d'application facile et rapide pour un travail de routine, car elles peuvent être répétées de façon sûre et permettent d'avoir des données bien reproductibles.

Il ne serait pas difficile d'enrichir les gaz de dessus du café moulu, en ayant recours à la température ou au vide, comme le proposent de nombreuses techniques de recherche. Il y a des années, nous avons nous aussi tenté d'exploiter ces techniques, mais l'expérience (organoleptique et gazo-chromatographique) nous a résolument dissuadés de les adopter systématiquement pour des usages pratiques. En adoptant, il y a plusieurs années déjà, le système du prélèvement direct des gaz de dessus à température et pression ambiante, nous avons voulu éviter que les modifications nouvelles et imprévisibles causées par l'emploi supplémentaire de la température (chromatogr. B-1-2-3-4) ou du vide ne viennent se superposer de façon incontrôlable aux modifications de caractère qualitatif et quantitatif, qui se produisent spontanément dans la flaveur avec une intensité et un mécanisme déjà différents, par le seul effet du temps (chromatogr. A 1-2-3).

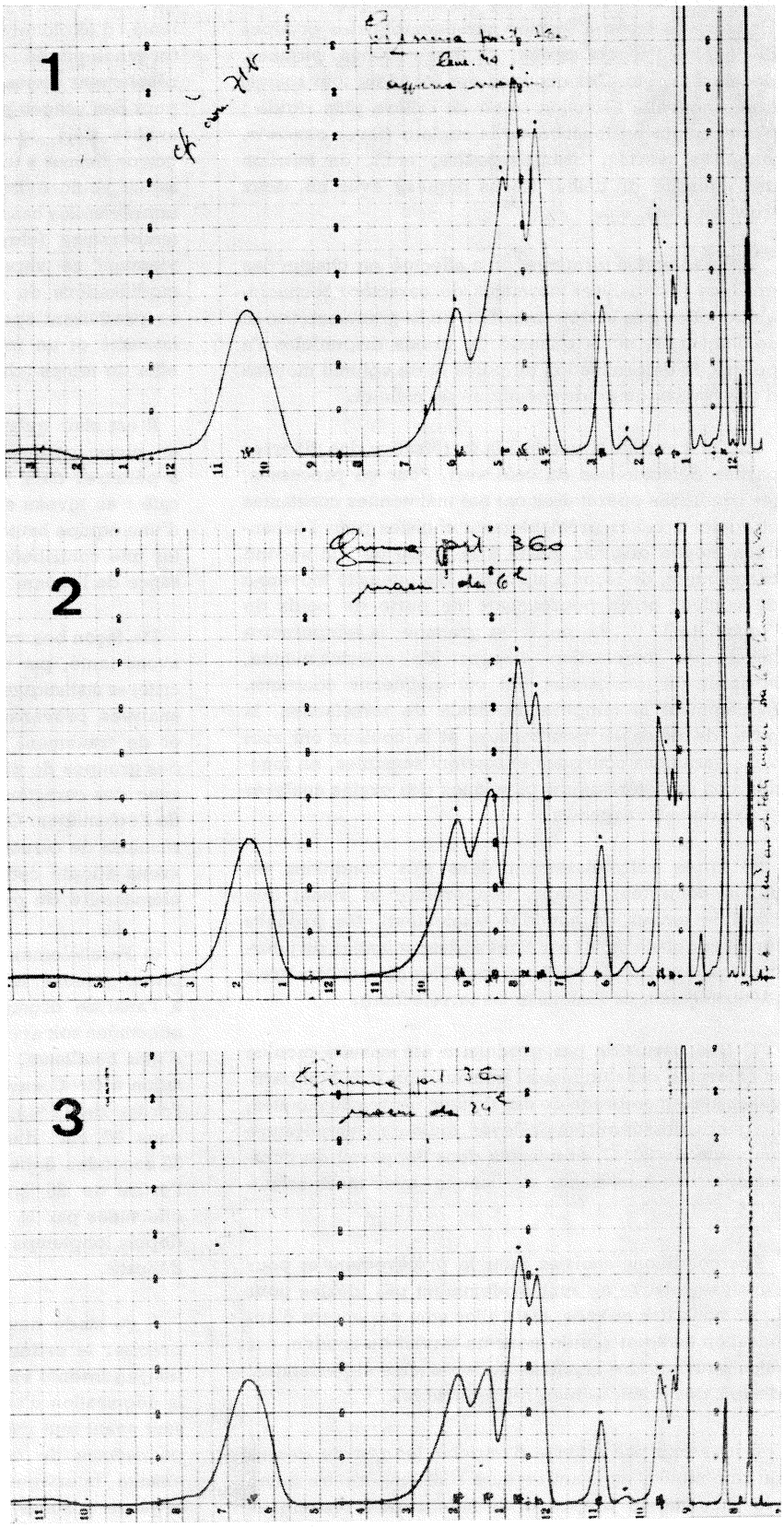
Il est clair qu'avec les analyses chromatographiques en phase gazeuse présentes, nous n'avons pas aspiré à pénétrer dans le monde complexe de la flaveur du café : au niveau actuel de la recherche, seul le travail d'une équipe hautement qualifiée et équipée peut apporter une contribution nouvelle et originale à la connaissance de l'arôme.

De façon beaucoup plus simple et plus modeste nous avons tenté, par nos analyses, de découvrir avec des critères statistiques appliqués à plusieurs reprises à des analyses provenant d'échantillons d'espèce, d'origine et de traitement différents, s'il existe des piques ou des groupes de piques qui puissent être mis en relation avec des caractéristiques organoleptiques particulières de l'échantillon. C'est donc dans l'espoir d'aboutir à des résultats de caractère exclusivement pratique que nous avons adopté cette méthode rapide, directe, presque élémentaire de prélèvement gazeux.

6) Parallèlement à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, les échantillons torréfiés ont été soumis à l'analyse organoleptique. Les dégustations ont été effectuées soit avec un « café infusé » (10 g dans 100 cm^3 d'eau bouillante, filtration après trois minutes, dégustation à 60° C environ, pourcentage de l'extrait sec de l'ordre de 17 %), soit avec un « café espresso » (6,5 g dans 35 cm^3 d'eau environ, temps d'extraction de 35 secondes à peu près, pourcentage d'extrait sec de l'ordre de 25 %). Les dégustations ont toujours été effectuées par le même trio de personnes entraînées depuis longtemps à effectuer ensemble cette opération délicate.

A ce stade nous considérons qu'il est opportun de préciser le **critère avec lequel nous avons exprimé les jugements sur les dégustations.** On sait que dans la dégustation d'un café ce sont les organes visuels qui sont avant tout intéressés (couleur, mousse, quantité et persistance de celle-ci, forme de ses bulles, etc.), ensuite interviennent les organes olfactifs, puis les organes gustatifs (amer, acide et doux ; le caractère

Chromatogramme A

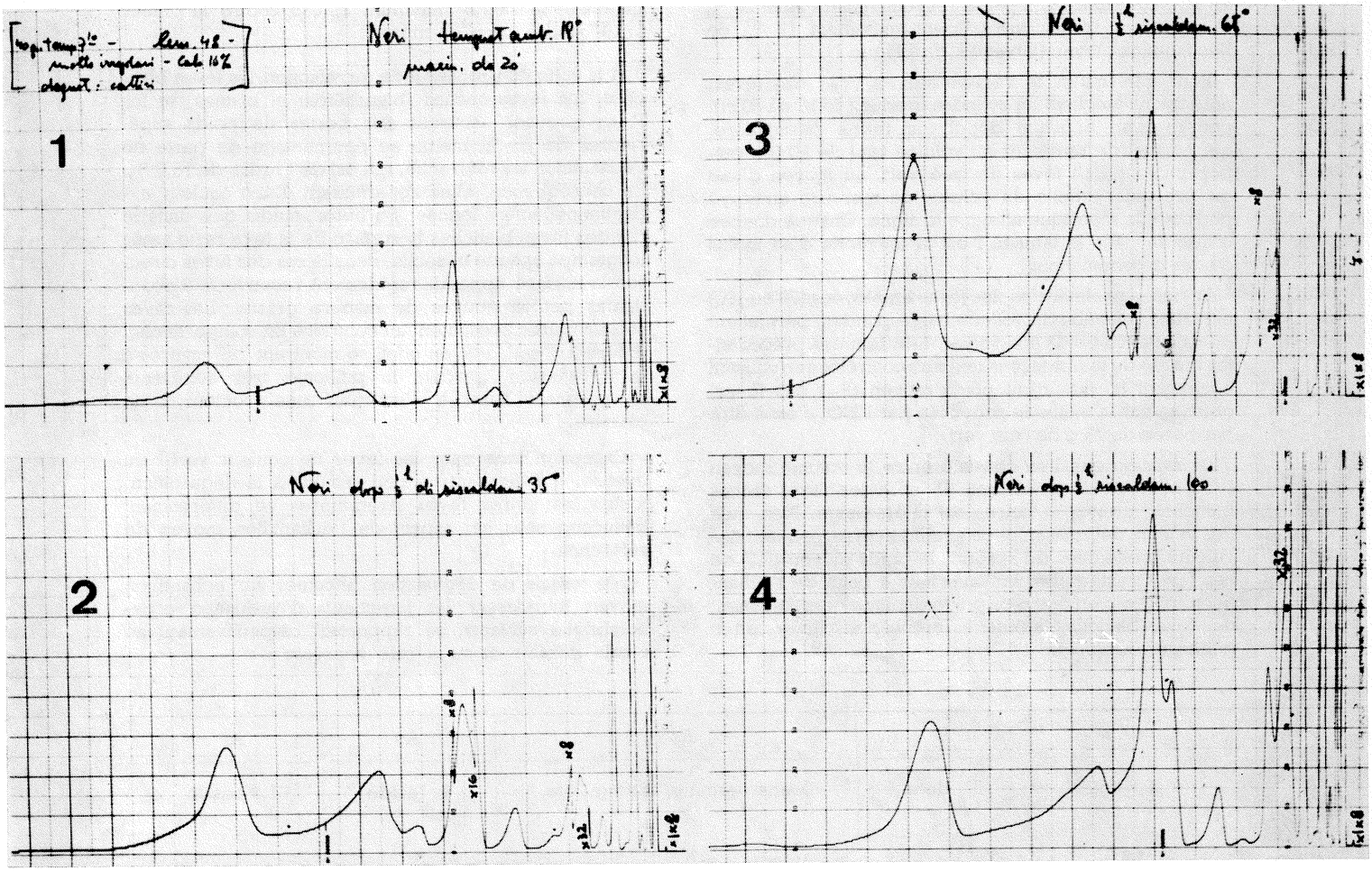


salé n'existe pas dans le café normal, il apparaît seulement dans le cas de produit avarié) et les organes tactiles et trifaciaux (astringence, aigreur, âpreté, corp, etc.).

En pratique, pour un café normal, seuls les organes visuels, olfactifs et gustatifs sont en général intéressés : l'intensité des stimulus respectifs peut être représentée avec une évidence suffisante par des nombres conventionnels. Et même, dans le cas particulier du goût, le rapport numérique des intensités amer-acide-doux définit bien son caractère. Il n'en est pas de même, au contraire, pour l'arôme : en effet, le nombre qui le représente n'indique que son intensité, et non pas aussi sa qualité ; par conséquent, pour représenter l'arôme dans son ensemble, cet indice doit être accompagné d'un ou de plusieurs adjectifs explicatifs. En ce qui concerne les stimulus transmis par les organes trifaciaux, nous pensons qu'ils ont toujours une valeur négative dans le cas spécifique du café, car les sensations d'amertume de quinine, d'âpreté, d'astringence sont étrangères aux sensations normales suggérées par la dégustation d'un café normal.

En suivant le critère d'évaluation organoleptique exposé ci-dessus, ainsi que les indications énumérées précédemment à propos des diverses mesures sur les échantillons de café vert et torréfié, nous avons analysé individuellement tous les défauts en procédant régulièrement à une exposition documentée des données tirées des essais technologiques et organoleptiques relatifs.

Chromatogramme B



Nous donnons ici comme exemple le travail fait pour un lot de Colombie Medellin Excelso :

On a reconnu et séparé dans le lot les **défauts suivants** : oreilles, fèves avec sillon irrégulier, fèves en forme de quartier, fèves abîmées mécaniquement, fèves blanches et fèves d'une couleur vert-bleu intense ; fèves tachées jaune-brun et fèves cireuses de diverses tonalités (jaune, vert pâle, brun-rougeâtre) ; fèves sèches de couleur blanchâtre, brun, noir.

On a trouvé que la parche était présente sous forme de minuscules fragments adhérents au sillon de la fève. Rares sont les fèves brisées et complètement absentes les fèves piquées.

A la fin du tri, la quantité des fèves « triangulaires » (en quartier de mandarine) et celle des fèves à sillon irrégulier se sont révélées très faibles, au point de ne permettre que quelques-unes des déterminations sur le café vert ; sont exclues celles sur le café torréfié et moulu.

En ce qui concerne les soi-disant « oreilles » (photo nº 1 page suivante), il faut préciser que l'on a placé dans le même groupe les parties de fève présentant la cavité caractéristique à oreille, aussi bien que les fèves originelles encore entières, c'est-à-dire ayant les deux parties complémentaires encore accouplées. Pour des raisons pratiques les essais technologiques sur le café vert ont été effectués sur les fèves « entières » seulement, tandis que les essais sur le café torréfié et la dégustation relative ont été faits sur un matériel mixte (fèves entières + parties complémentaires).

En ce qui concerne la **distribution granulométrique** on a observé que les fèves blanches et les soi-disant « oreilles » présentent, comme d'habitude, une granulométrie supérieure à la moyenne, tandis que les autres fèves défectueuses restent plus petites que la normale. Le déplacement de la distribution granulométrique est particulièrement évident pour les fèves sèches qui pré-

sentent une granulométrie décroissante au fur et à mesure que leur couleur passe des nuances claires au noir. En fait, au crible 16, il passe respectivement 26 et 50 % de celles-ci, tandis que passent seulement 12 % de l'échantillon moyen (tableau I, graphique 1).

Pour déterminer le volume moyen (V_m) des fèves, nous avons employé un cylindre gradué (de 25 ou 50 cl), pourvu d'un bouchon dépoli de forme particulière, qui permet de remonter au volume réel de 50 (ou respectivement 100) fèves de café vert, au moyen d'une mesure différentielle du volume de mercure employé pour que le ménisque atteigne le signe. Chaque donnée transcrite dans le tableau I est la moyenne d'au moins quatre déterminations.

La pesée préliminaire des fèves employées (50 ou 100) et la détermination du volume correspondant permettent de calculer le poids spécifique. Les données précédentes ont été de toutes façons toujours contrôlées en utilisant également la valeur du poids moyen (P_m) des fèves, obtenue par la méthode proposée par l'ISO, c'est-à-dire par pesée de 75 g de café vert.

La relation que l'on constate entre le volume moyen (V_m) et le poids spécifique (P. sp.) des fèves sèches blanches, brunes et noires est intéressante. Bien qu'à des valeurs décroissantes du premier correspondent des valeurs croissantes du second, le poids moyen (P_m) de ces fèves reste nettement inférieur à celui de l'échantillon moyen : en outre ce poids diminue graduellement des fèves blanches, aux fèves brunes, aux fèves noires (tableau I, graphique 1).

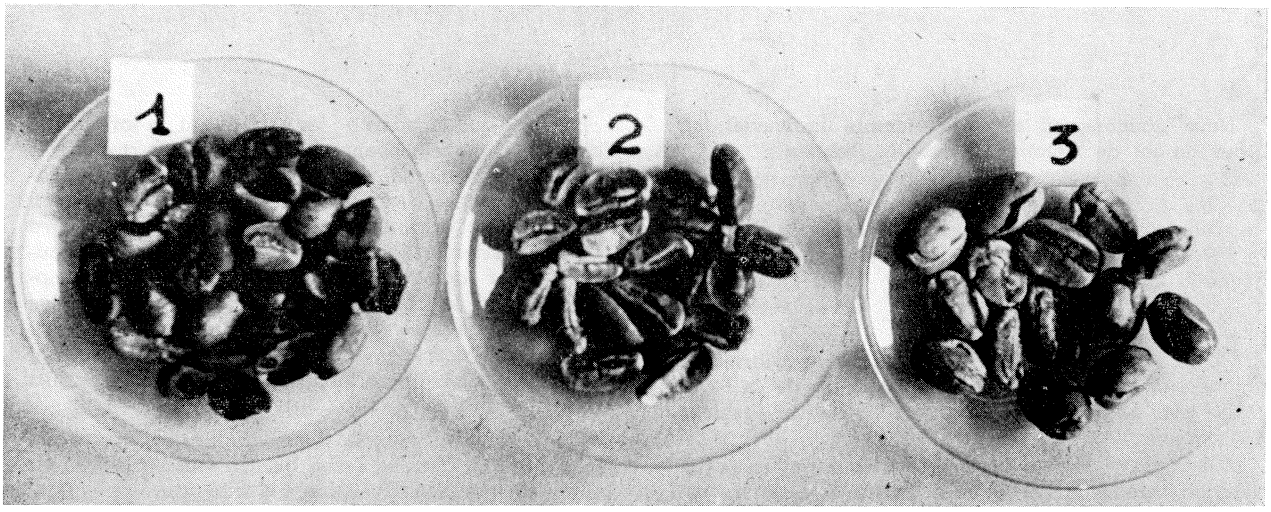
Les fèves « blanches » également se différencient de la masse de l'échantillon par le poids spécifique qu'atteint la valeur minimum 1, 038 contre la valeur 1, 131 de l'échantillon moyen.

A la suite du processus de torréfaction, les fèves blanches, les fèves sèches (blanchâtres et brunes) et les fèves cireuses accusent des pertes de poids supérieures de 20 % même au pourcentage de perte de l'échantillon de référence, qui est de l'ordre de 15,5 %. En conséquence, elles apparaissent d'une couleur exceptionnellement foncée. En outre, tandis que dans le cas des fèves blanches la surface de la fève reste assez longtemps opaque et sèche, dans le cas des fèves cireuses la surface apparaît rapidement recouverte d'abondantes petites gouttes de matière grasse. Les fèves sèches noires présentent au contraire un comportement différent : celles-ci, en effet, se montrent réfractaires à la torréfaction, gardent la pellicule très adhérente et prennent aussi à l'intérieur une couleur brun grisâtre.

Exception faite pour les fèves de couleur vert-bleu intense, qui donnent un bon résultat à la dégustation, toutes les autres fèves irrégulières se différencient beaucoup sous cet aspect de l'échantillon moyen de référence.

Les **essais de dégustation** effectués sur échantillon moyen fournissent les jugements d'évaluation organoleptique suivants, se rapportant respectivement au « café infusé » et au « café espresso » :

Am	D	As	Ac	Ar
0,5 amer	2 doux	0 amer quinine, astring., etc.	1 acide	1,5 odeur
1 —	1,5 —	0 — —	1,5 —	2 —



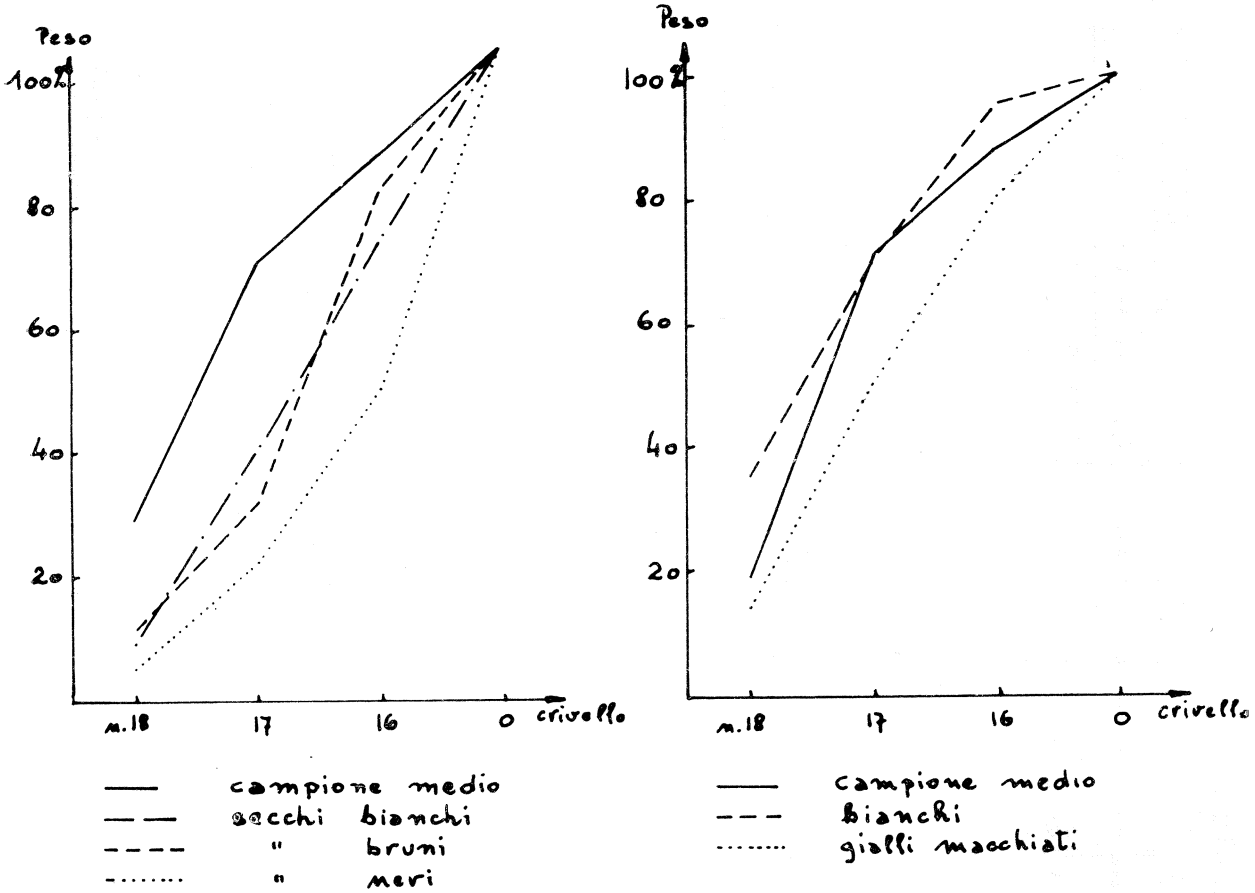
fèves abimées mécaniquement *fèves triangulaires* *« oreilles »*

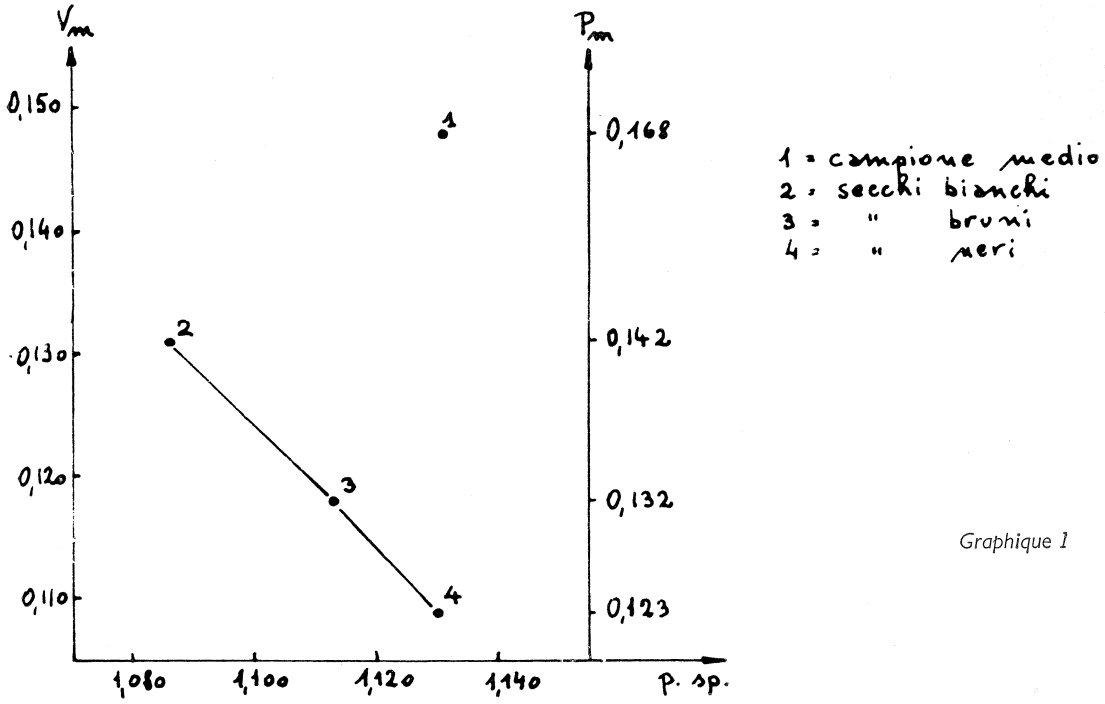
Photo nº 1

COLUMBIA

	C. CRUDO							TOSTATO				INFUSO						ESPRESSO					
	crivello				V_{am}	P_{am}	$P.sp.$	Gr.	t	C%	lenticon.	Am.	D.	As.	Ac.	Ar.	Note	Am.	D.	As.	Ac.	Ar.	Note
	18	17	16	0																			
campione medio	29	42	17	12	0,148	0,168	1,131	30	5'	15	63	0,5	2	0	1	2		1	1,5	0	1	2	
												0,5	2	0	1	1,5		1	1	0	1,5	2	
												0,5	1,5	0	1	2		1	1,5	0	1,5	2	
„con solco irregolare"	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–												
„ triangolari"	6,6	21,6	37,5	34,3	–	0,156	–	–	–	–	–												
„ orecchio"	100	–	–	–	–	0,312	–	30	5'	15,9	48	1	1	0	0,5	1		1	1	0	1	2	
												1	1,5	0	0,5	1,5		1,5	1	0	1,5	2	
												0,5	1	0	0,5	1,5		1,5	1	0	1,5	2	
cerosi rosso-bruni	11,2	38,4	32,7	17,6	–	0,150	–	"	"	17,5	15	1,5	0	0	0	2	rancido	2,5	0	0	0	3	olio rancido
												2		2		2,5	inclassificab.	3		2		3	rancescente
												2				2,5		3				3	inclassificabile
cerosi gialli	25	36	24	15	0,140	0,161	1,151	"	"	16,3	15	1	0	0	0	2	stinker	2	0	0	0,5	2	olio rancido
														2		2,5		2		2		3	imbevibile
																2	stinker	2,5				3	imbevibile
cerosi verdini	30	30	27,5	12,5	0,152	0,167	1,10	"	"	19,6	5	2,5	0	0	0	0,5		2,5	0	0	0	0,5	leggero stoccafisso
												2		2		0		3	0	0,5	0	1	amaro chimico
												2,5				0		2,5	0	0,5	0	1	amaro chimico
secchi bianchi	9	31	34	26	0,131	0,143	1,086	"	"	18,7	28	2	0,5	0	0	0,5		2	0,5	0	0	1	
												2	0	0	0	0,5		3	0	0	0	0,5	
												1,5	0	0	0	0,5		3	0,5	0	0	0,5	
secchi bruni	16,8	21,4	50	11,9	0,118	0,132	1,113	"	"	18,4	17	3	0	0	0	3	nauseabondo	2,5	0	0	0	2,5	imbevibile
												2	0	2		3	stoccafisso rancido			2		3	imbevibile
												2				3	imbevibile					3	imbevibile
secchi neri	4,7	17,2	28,2	50	0,109	0,123	1,13	"	"	13,2	76			2		3	inclassificab.	3	0	0	0	3	rancescente
																3	oleoso rancido	2,5		2		3	sost. org. decomposte
																3	inclassificab.	3				3	imbevibile
bianchi	35	35	25	5	0,142	0,149	1,038	"	"	18,2	29	2	0	0,5	0	0,5		2,5	0	0,5	0	0,5	amaro chimico
												1,5	0	0,5	0	0,5	legnoso	2,5	0	0,5	0	0,5	amaro chimico
												1,5	0	0,5	0	1		3	0	0,5	0	0,5	amaro chimico
verde-blu	33	40	20	7	0,168	0,189	1,126	"	"	14,8	55	0	2	0	0,5	1		1	1,5	0	1,5	2	
												0,5	1,5	0	1	2		1	1,5	0	1	1	
												0,5	1,5	0	1	1,5		1	1,5	0	1,5	1,5	
gialli maculati	14	36	30	20	–	0,155	–	"	"	14,7	41			2		2,5	rancescente	3		2		3	imbevibile
																3	olio bacato					3	inclassificab.
																2,5	rancescente					3	inclassificab.

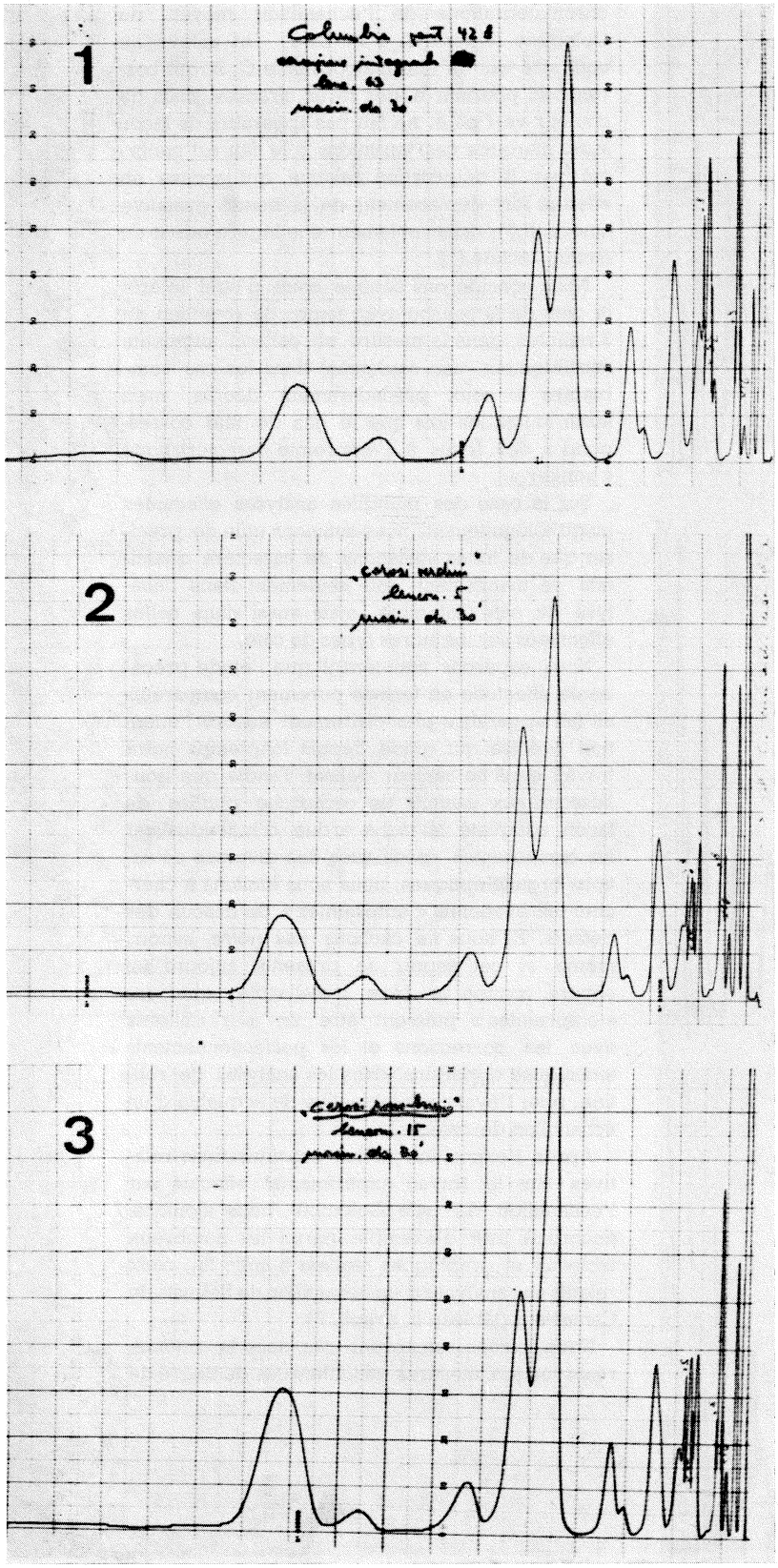
TABLEAU I


Peso
100
80
60
40
20
m.18
17
16
0
crivello
campione medio
secchi bianchi
" bruni
" neri
Peso
100
80
60
40
20
m.18
17
16
0
crivello
campione medio
bianchi
gialli macchiati


Vm
Pm
0,150
0,140
0,130
0,120
0,110
0,168
0,142
0,132
0,123
1,080
1,100
1,120
1,140
p. sp.
1
2
3
4
1 = campione medio
2 = secchi bianchi
3 = " bruni
4 = " neri

Graphique 1

Chromatogramme C



Par rapport à ces valeurs nous avons constaté que toutes les fèves cireuses (indépendamment de la tonalité) augmentent fortement l'intensité de la bande amère jusqu'à atteindre la valeur maximum 3 ; en même temps les sensations d'acide et de doux disparaissent pratiquement, alors que l'odeur prend une intensité 3, mais avec valeur négative, du fait qu'elle stimule des sensations de répulsion (substances organiques en putréfaction, morue séchée, etc.). Les fèves sèches présentent également le même comportement : le résultat le plus mauvais correspond aux fèves sèches noires, absolument imbuvables, tandis que les fèves sèches blanchâtres donnent une tasse très amère (2,5) à l'empreinte ligneuse.

La dégustation des fèves blanches est moins désastreuse ; ces fèves augmentent seulement la bande amère avec un déplacement sensible vers l'amertume de quinine (2,5 amer ; 0,5 quinine), en particulier dans l'« espresso » par effet du refroidissement.

Les fèves abîmées mécaniquement intensifient la bande amère, en y ajoutant quelque chose d'imprécis et de désagréable. Les soi-disant « oreilles » se contentent d'augmenter légèrement la bande amère, en rapport avec le degré de torréfaction plus poussé.

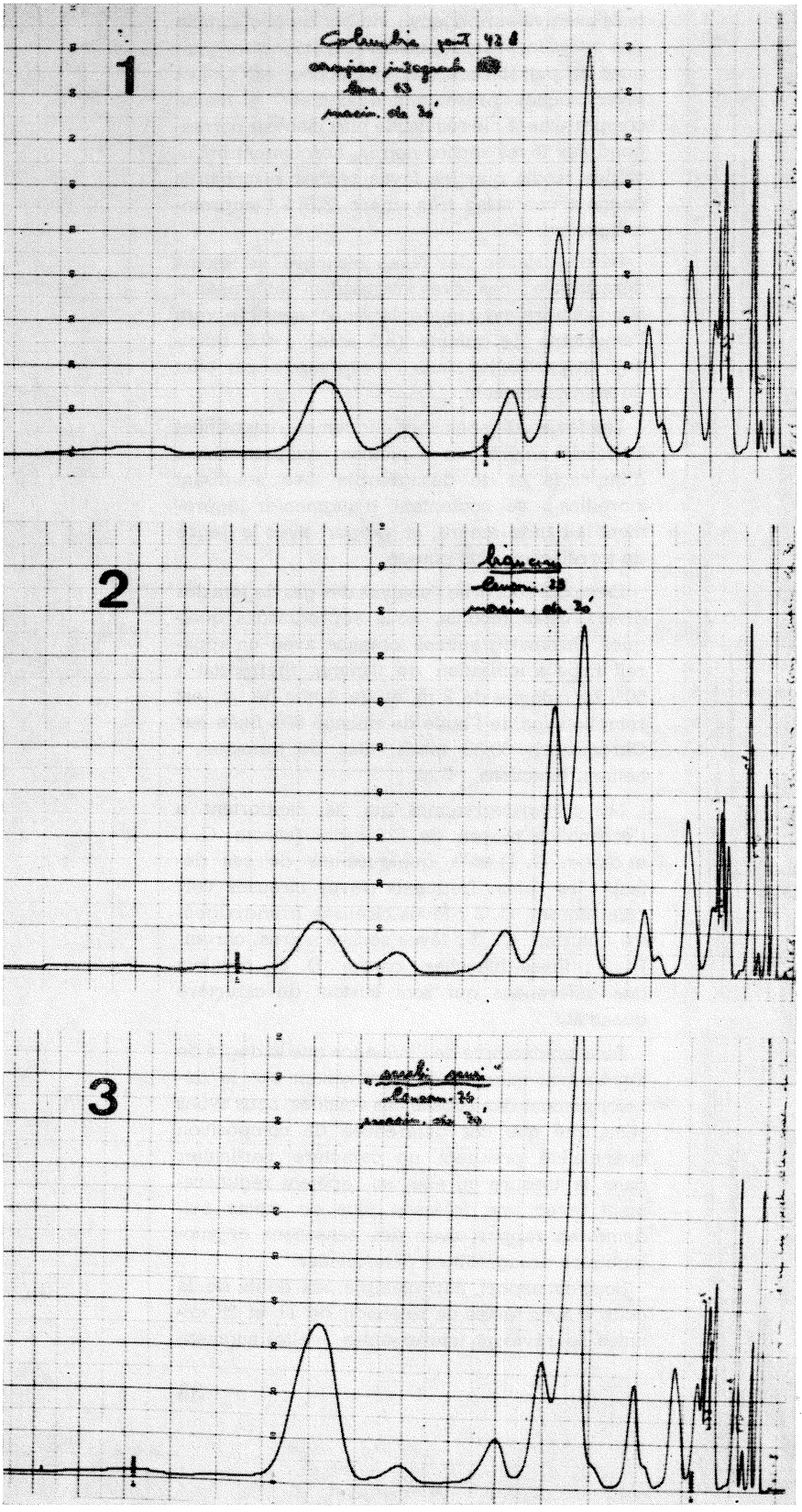
En ce qui concerne l'**analyse des gaz de tête** des divers cafés moulus, nous reproduisons quelques chromatogrammes obtenus avec un appareil Erba à ionisation de flamme, thermostat à 60°. La colonne de 2 m et de 4 mm de ∅, est remplie avec de l'huile de silicone 550 fixée sur Chromosorb 60/80 mesh. Gaz de transport : helium. Injections : 5 cl.

Les chromatogrammes qui se rapportent à l'échantillon moyen de Colombie (chrom. C. 1 et chrom. D. 1) et à quelques-uns de ses défauts les plus fréquents (fèves cireuses vert pâle, chrom. C. 2 ; fèves cireuses brun-rougeâtre, chrom. C. 3 ; fèves sèches noires, chrom. D. 3 ; fèves blanches, chrom. D. 2). révèlent des différences qui sont surtout de caractère quantitatif.

Sans tenir compte de l'influence que le degré de torréfaction exerce indiscutablement sur le développement des substances volatiles, nous avons remarqué que ces différences de composition quantitative prennent un caractère particulier dans la mesure où elles se répètent régulièrement, avec une intensité plus ou moins évidente, en rapport avec des sensations organoleptiques désagréables déterminées.

Sous cet aspect, par exemple, les dents de la courbe avec temps de rétention de 11 et 25 minutes se révèlent intéressantes : elles augmen-

Chromatogramme D



tent en effet fortement toutes les fois que la dégustation réveille en nous des sensations analogues à celles que suggère une huile de poisson rance. Leur comportement particulier est démontré par les chromatogrammes des fèves cireuses brun-rougeâtre (chrom. C. 3) et des fèves sèches noires (chrom. D. 3), par rapport au chromatogramme de l'échantillon moyen du Colombie (chrom. C. 1 et D. 1). On relève au contraire que le chromatogramme C. 2, qui correspond pourtant à des fèves cireuses, mais de couleur vert pâle, ne fait pas apparaître de façon aussi marquée ces variations ; le fait est confirmé par la dégustation relative qui accuse en effet un fort déplacement de la bande gustative amère (2,5), mais seulement une légère odeur de morue séchée (1).

Nous considérons comme étant d'égal intérêt la dent de la courbe avec temps de rétention de 3 minutes, dans la mesure où celle-ci augmente sensiblement, non seulement dans les cas semblables à ceux précédemment décrits, mais aussi toutes les fois que le gaz de tête correspond à des fèves à l'empreinte caractéristique « stinker ».

Sur la base des multiples analyses effectuées jusqu'à maintenant, nous estimons utile de préciser que de telles variations de caractère quantitatif se manifestent non seulement dans l'analyse du café Colombie, mais aussi dans celles effectuées sur les autres types de café.

Nous espérons maintenant que l'étude précédente effectuée en termes purement comparatifs ait fait apparaître plus clairement encore l'intention précise qui guide depuis longtemps notre travail dans ce secteur délicat. Tandis que nous laissons aux instituts de recherche outillés de façon adéquate la tâche ardue d'individualiser les composantes spécifiques des diverses déviations organoleptiques, nous nous limitons à chercher les éventuels « empreintes » de chacun des défauts. Et nous ne cachons pas notre espoir, même si cet espoir se présente aujourd'hui encore comme un rêve irréalisable, que ces « empreintes » puissent être un jour utilisées avec les corrections et les perfectionnements techniques opportuns, dans les analyses de routine, pour l'évaluation objective de la qualité d'un échantillon de café.

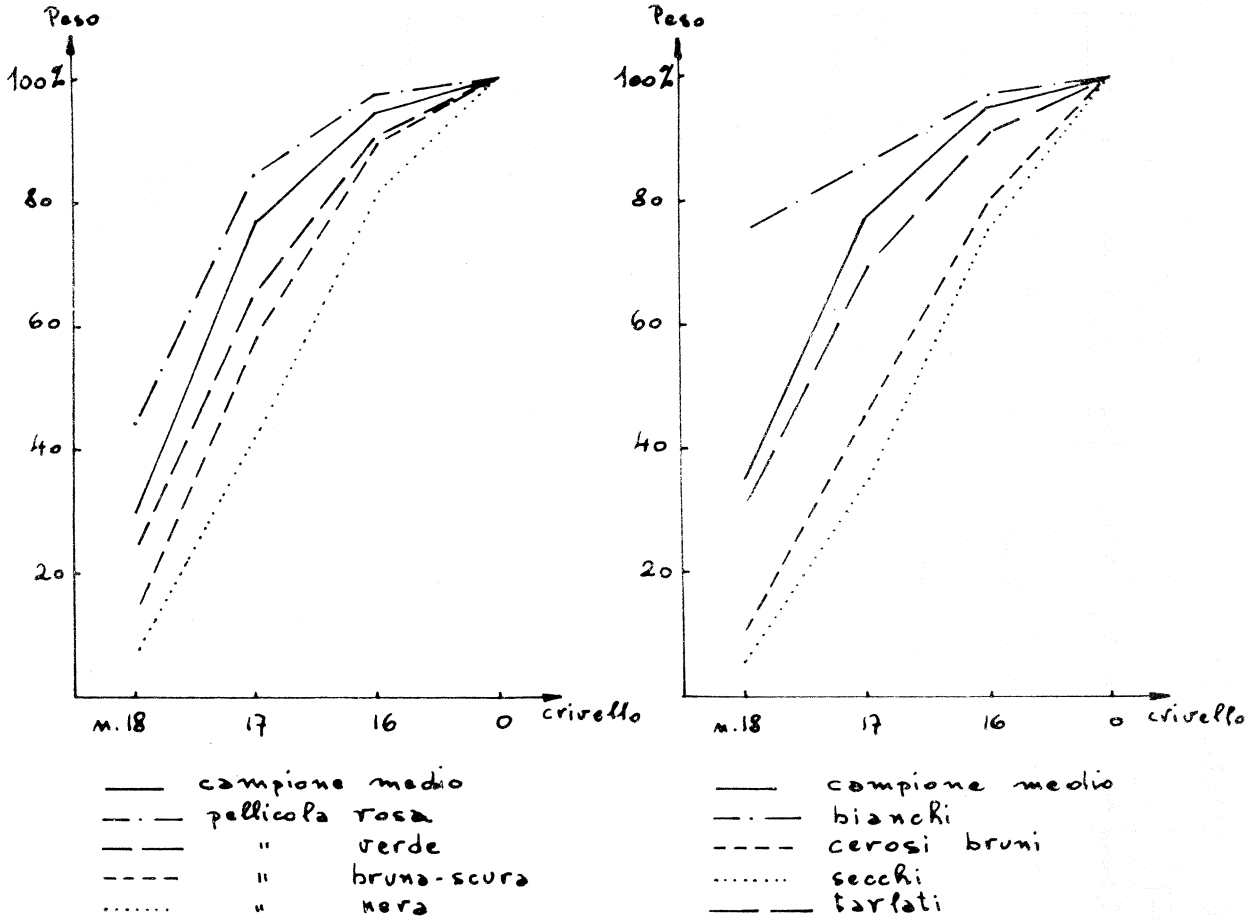
Après l'exposition et les considérations relatives sur le travail expérimental effectué sur l'échantillon de café Colombie, nous ajoutons, encore à titre d'exemple, parmi les nombreux tableaux et graphiques réalisés à cette fin, ceux relatifs aux analyses d'un échantillon de Robusta du Cameroun (tableau II, graph. 2).

Nous faisons remarquer que dans la colonne réservée aux mesures des intensités du degré de

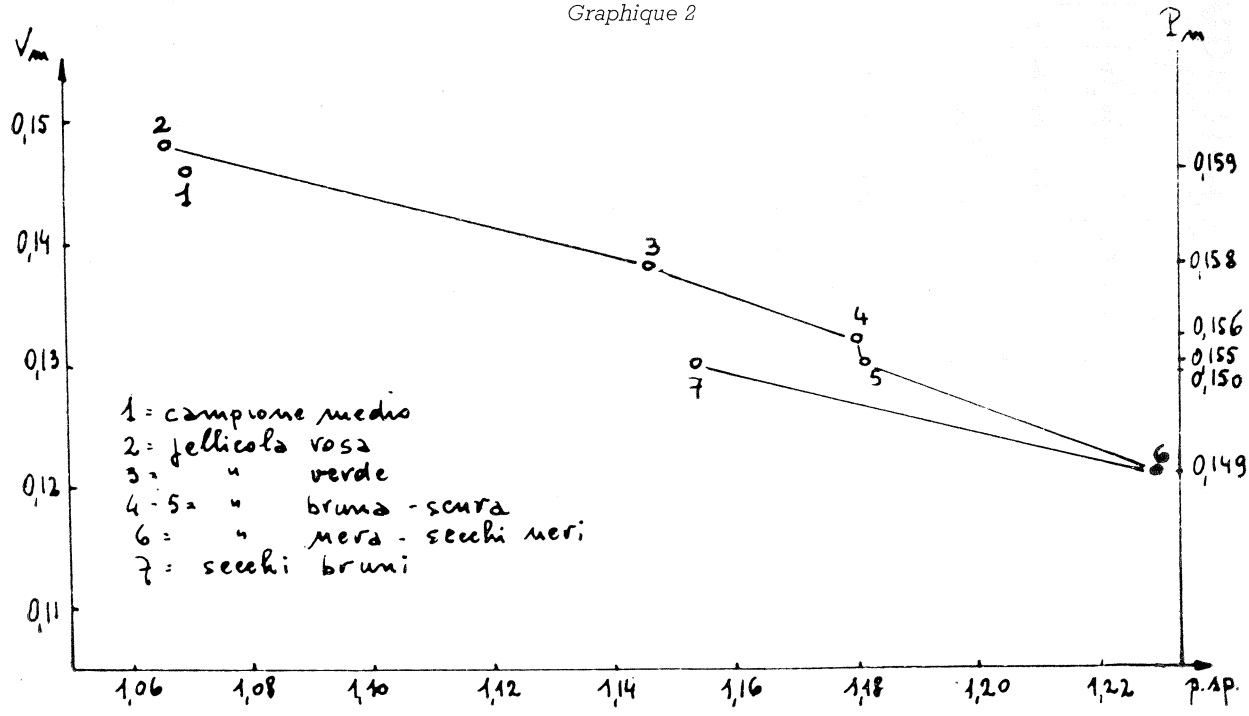
CAMEROUN ROBUSTA

	C CRUDO							TOSTATO				INFUSO						ESPRESSO					
	crivello				V_m	P_m	P_{sp}	Gr	t	C%	Lenticchia	Am.	D	As.	Ac.	Ar	Note	Am.	D.	As.	Ac.	Ar	Note
	18	17	16	0																			
campione medio	35	42	18	5	0,146	0,159	1,09	60	7'	17	63	1·5	1	0·5	0	0		1·5	1	0	1	0	
												1·5	0·5	0	0	0·5		2	0	0·5	0·5	0·5	
												1	0·5	0	0·5	0·5	legnoso	1·5	0	0·5	0	0·5	
bianchi	75	–	22·5	2·5	0,163	0,161	0,991	"	"	20·1	4	2·5	0	0	0	0	catramoso	3	0	1·5	0	0	amaro catramoso
												2	0	0	0	0		3	0	1	0	0	catramoso
												2·5	0	0	0	0	bruciato	2·5	0	1	0	0	bruciato
pellicola rosa	44·3	40·5	12·6	2·5	0,148	0,158	1,067	"	"	17·1	47	1	1	0	0	0		2·5	0	1	0·5	0	amaro astringente
												1	1	0	0	0		2·5	0	0·5	0·5	0	amaro astringente
												1	0·5	0·5	0	0		2	0	0·5	0	0	amaro astringente
pellicola verde	25	41	24·5	9·5	0,138	0,158	1,146	"	"	17·7	38	2·5	0	0·5	0	0	amaro chimico	3	0	1·5	0	0	amaro chimico
												2·5	0	0	0	0		2·5	0	1	0·5	0·5	
												2	0	0·5	0	0	amaro chimico	3	0	1	0	0·5	amaro chimico
pellicola verde-bruna	13	46	31	10	0,132	0,157	1,19	"	"	17·1	57	2	1	1·5	0	1	acido fenico fenolo	2	1	0	1	1	acido fenico fenolo
												1·5	0	0·5	0	1		2·5	0	0·5	0	1	
												1·5	0	0·5	0	1		2	0	0·5	0	1	
pellicola bruna	14	41·5	33·5	11	0,130	0,155	1,191	–	–	–	–												
pellicola nera – – secchi neri	7·5	35	40	17·5	0,121	0,149	1,23	30	5'	12·7	f.sc.(13)	1	1	0	0	2	stinker					3	stinker imbevibile
												1	0·5	0	0	2·5	stinker			2		3	inclassificabile
												1	1	0	0	2·5	stinker					3	stinker
secchi bruni	4·9	29	41·5	24·6	0,130	0,150	1,154	"	"	13·4	f.sc.(112)	2	0·5	0·5	0·5	2	riato - duro	2	1	2	0	3	sost. organ. putrefatte imbevibili
												1·5	0	0·5	0	2·5	squadevole						
												2	0·5	0·5	0	2·5	riato	2	0·5	1	0·5	2	sost. organ. decomposte
tarlati	31	38	22	9		0,142		"	"	17·6	45	2	0·5	0·5	0	0·5	catrame	1·5	0·5	0	1	1	
												1·5	0·5	0·5	0	0·5	legnoso	2·5	0	0·5	0	0	catramoso
												2	0·5	0·5	0	0	amaro catram.	2·5	1	0·5	0	0	catramoso
cerosi verdi	12	38	35	15	0,130	0,149	1,147	"	"	13·0	88	1	0·5	0	1	0·5	petrolio - sacco	1	1	0·5	1	0·5	riato
												1·5	1	0	1	0·5		2	0·5		1	0·5	piselli
												1·5	0·5	0	0·5	0·5	sacco	1	1	0	1	0·5	
cerosi giallo-bruni	11	35·4	33·4	20·2	0,138	0,161	1,175	"	"	12·24	f.sc.(99)	1·5	0·5	0·5	0	2	amine	1	1	1	0	0·5	riato
												1·5	0	0·5	0	1·5	amine	1·5	0·5	0	1	0·5	legnoso
												1	0·5	1	0	1·5		1	1	0·5	1	1	legnoso
campione medio	–	–	–	–	–	–	–	"	"	16·3	70	1·5	1	0·5	0	0		1	1	½	1·5	1	
												1·5	1	0	1	0·5		1·5	1	0·5	0·5	0·5	
												1·5	0·5	0	0·5	0·5		1·5	0·5	0·5	0·5	0·5	

TABLEAU II


Peso
100%
80
60
40
20
m.18
17
16
0
crivello
campione medio
pellicola rosa
" verde
" bruna-scura
" nera
Peso
100%
80
60
40
20
m.18
17
16
0
crivello
campione medio
bianchi
cerosi bruni
secchi
tarlati

Graphique 2


Vm
0,15
0,14
0,13
0,12
0,11
Pm
0,159
0,158
0,156
0,155
0,150
0,149
1,06
1,08
1,10
1,12
1,14
1,16
1,18
1,20
1,22
p.sp.
1 = campione medio
2 = pellicola rosa
3 = " verde
4 - 5 = " bruna - scura
6 = " nera - secchi neri
7 = secchi bruni

torréfaction au moyen du leucomètre, l'abréviation « f. sc. » (fuori scala : hors échelle) signifie que le café moulu était si clair qu'il a donné des mesures supérieures à 100. Le nombre indiqué entre parenthèses se réfère donc à une échelle différente.

Avec le rapprochement de ces valeurs, on constate de toutes façons que pour le Robusta du Cameroun également, les fèves sèches en général, et les noires en particulier, sont torréfiées avec une extrême difficulté ; les pertes de poids en pourcentage sont aussi contenues dans des limites très basses.

Remarquons encore que les graphiques relatifs à la distribution granulométrique et au volume moyen, poids spécifique de quelques-uns des défauts les plus graves du Robusta, présentent une allure caractéristique et très significative, dans la mesure où ils apparaissent semblables à ceux des défauts correspondants du Colombie décrit plus haut et des autres échantillons étudiés.

DESCRIPTION DES DÉFAUTS

De la confrontation parallèle des données précédemment exposées, indépendamment de l'espèce de café, de son origine et de sa transformation, sont apparues les caractéristiques communes les plus significatives et les plus évidentes des défauts mêmes, catalogués avec le même nom et par conséquent caractérisés par le même type d'irrégularité. Ces caractéristiques ont été prises par suite comme éléments fondamentaux pour l'individualisation du défaut même dans le café vert, en vue également de ses répercussions sur les qualités du café torréfié et de la tasse de café.

En tenant compte en même temps des définitions proposées par l'ISO et de celles adoptées par la législation française, nous donnons ici à la suite la **description des défauts les plus significatifs,** tels qu'ils sont ressortis de nos expériences. En général nous pensons qu'il existe une corrélation valable entre les définitions ISO et les noms que nous avons cru bon de donner aux diverses catégories de défauts : quand nous nous sommes trouvés devant des cas d'interprétation douteuse (« fève sûre », « fève rousse », etc.), afin d'éviter toute possibilité d'équivoque, nous avons préféré adopter une terminologie à nous et proposer éventuellement de nouveaux regroupements pour faciliter leur identification.

Fèves avec anomalies botaniques

Il n'est pas rare de trouver des fèves qui présentent un sillon malformé (a TVL) ou même un double sillon : on les trouve dans tous les types de café, avec une plus grande fréquence cependant, d'après ce que nous avons pu constater, dans les Arabica.

Beaucoup plus nombreuses sont les fèves appelées (1) « caracoli » et (2) « éléphant » et les fèves qui ont la forme particulière d'un quartier de mandarine : mais que ce soient celles-ci ou les précédentes, elles se comportent de façon normale durant le procédé de torréfaction et ne donnent aucune empreinte désagréable à l'infusion.

C'est pourquoi nous proposons que toutes les fèves qui présentent des anomalies de caractère botanique soient considérées comme « indésirables » du point de vue esthétique seulement et qu'elles soient par conséquent frappées de la plus petite pénalisation.

Nous estimons que les fèves susdites peuvent être comprises sans hésitation dans le terme (3) « fève mal formée » proposé par l'ISO.

(1) 2.39 « caracoli » (pea-berry) : grain de café arrondi résultant du développement d'une seule graine dans le fruit.

(2) 2.41.6 « éléphant » (elephant) : grains de café mal formés, accolés ou imbriqués par 2 ou plus de 2 et résultant d'une polyembryonie. L'ensemble est d'un volume supérieur à celui d'un grain de café normal.

Fèves brisées

Selon la législation française, on doit entendre par fèves brisées (« brisure ») tous les fragments qui ont un volume inférieur à celui d'un demi-grain. L'ISO propose la même définition (4) et précise en outre que pour le code du café de Haïti de 1952, les « broken beans » ont un volume inférieur à 3/4 de celui d'une fève normale, tandis que le code indien de 1965 prévoit au contraire une différenciation entre les fragments inférieurs à 1/3 de fève (« bits ») et ceux supérieurs à 1/3 de fève (« broken »).

D'après notre expérience, nous jugeons que la distinction signalée par le code indien entre « bits » et « broken » peut être sûrement intéressante : en effet, tandis qu'un « bit » subit, avec la torréfaction, une transformation certainement très poussée et semblable à la carbonisation et qu'il donne par suite à la tasse un goût particulièrement amer et goudronneux, le dommage provoqué par un « broken » n'est pas aussi remarquable,

Notes : dans la norme indienne AFCD 29 (444), octobre 1965, les parties de grain de café d'un volume inférieur à celui d'un tiers de fève sont appelées « bits » et les parties d'un volume supérieur à celui d'un tiers de fève « broken ».

Dans le code de café de Haïti, texte du 26 septembre 1952, les fèves brisées sont celles d'un volume inférieur aux trois quarts de celui d'une fève.

tant dans le café torréfié que dans le café-boisson : il se limite presque exclusivement en effet à une dépréciation sur le plan formel.

Nous pensons par conséquent que la différenciation entre « bits » et « broken » est opportune : elle perdra cependant automatiquement toute signification une fois que l'ISO aura approuvé définitivement la condition proposée par le « Working Group on Coffee Quality Standards » lors de la séance de Londres, le 5 mai dernier, proposition selon laquelle un café vert doit présenter une granulométrie supérieure au calibre 12/64, avec une tolérance de 5 % de fèves ne traversant pas le tamis 10/64. Le même critère restrictif est du reste aussi déjà adopté par la législation française de 1965.

A propos des fèves brisées, nous rappelons que celles-ci sont désignées en portugais par le terme de « garos quebrados », tandis que le même terme est utilisé en espagnol pour indiquer les « oreilles ».

Oreilles

On indique généralement par ce nom les parties de fève qui présentent une grande cavité caractéristique : il en est de même dans la législation française (« coquille », « oreille ») et selon la définition de l'ISO (5).

Nous pensons au contraire qu'une telle appellation doit être étendue aux fèves qui, tout en étant encore entières, présentent une configuration naturelle particulière, en vertu de laquelle, durant la torréfaction, elles se divisent, dans la presque totalité des cas, en deux tronçons, en donnant origine à l'oreille proprement dite et à sa partie complémentaire.

En général ces fèves sont plus claires que la normale et plus grandes ; elles sont facilement repérables, car elles présentent une fente nette et sinueuse sur le dos ou sur son bord.

Avec la torréfaction elles se divisent en deux fragments qui sont évidemment de dimensions réduites et se torréfient par conséquent diversement par rapport à l'échantillon moyen ; elles deviennent ainsi plus foncées.

A la dégustation, elles ne révèlent pas en général de particularités intéressantes, si ce n'est une accentuation légère de la bande amère, conséquence logique de la torréfaction plus poussée.

Dans l'ensemble, nous pensons par conséquent que ce défaut peut être considéré presque exclusivement sous l'aspect esthétique, car il contribue en effet surtout à l'irrégularité extérieure de l'échantillon, que celui-ci soit vert ou torréfié.

Nous observons en outre que la soi-disant « oreille », à cause des mêmes caractéristiques, peut être représentée pour des raisons évidentes aussi bien par le terme (3) « fève mal formée » que par le terme (4) « brisure », mais précisons aussi que cette double possibilité ne comporte aucune variation par rapport au critère général d'évaluation, comme il sera mieux démontré par la suite.

Fèves piquées

Ce sont les fèves qui présentent de petits trous à la superficie et des galeries internes provoquées par le scolyte du café (*Stephanoderes*) ou par d'autres parasites, presque toujours lorsque les cerises sont encore sur l'arbre ; ou bien qui présentent de gros trous produits par une chenille (*Araecerus*), lorsque les fèves sont déjà emmagasinées.

Selon la loi française et selon la proposition ISO également, on ne doit entendre par fèves piquées (6) (« fève piquée ou scolytée ») que les graines qui présentent « au moins » deux petits trous ou un grand trou.

La définition nous semble inspirée d'un critère trop optimiste ; on constate en effet que même les fèves qui ont été frappées une seule fois par la *Stephanoderes* présentent très souvent une pulpe sérieusement abîmée et sont parcourues par de nombreuses galeries.

Avec la torréfaction, les fèves prennent une coloration plus foncée que la normale, mais l'altération de goût que l'on remarque dans l'infusion n'est pas imputable seulement et simplement au degré de torréfaction plus poussé : on distingue en effet dans le goût un amer goudronneux, quelquefois de quinquina, de toute façon toujours désagréable, et l'intensité du goût est proportionnelle, avec une bonne approximation, à l'intensité du dommage subi par la fève.

Nous pensons donc qu'il est juste de frapper indistinctement, même avec une pénalisation diverse, toutes les fèves qui ont subi l'attaque de parasites ou d'insectes.

Nous jugeons utile de souligner que le terme anglais « sting bean » est généralement peu employé : il vaudrait mieux que l'ISO adopte pour le dictionnaire anglais le terme plus approprié « insect damaged » ou même le terme « brocado » utilisé désormais de façon internationale.

(3) 2.40 « fève mal formée » (mal formed bean) : grain de café se différenciant nettement des autres grains du même lot par une anomalie de forme.

(4) 2.36 « brisure » (broken) : partie de grain de café d'un volume inférieur à celui d'une demi-fève.

(5) 2.35 coquille (shell) syn. oreille : partie de grain de café présentant une cavité.

(6) 2.34 « fève piquée ou scolytée » (sting bean) : grain de café attaqué par les insectes et présentant au moins soit deux petits trous ou galeries causés par le scolyte du grain (*Stephanoderes* sp.) ou tout autre parasite, soit un grand trou causé par le bruche (*Araecerus* sp.).

Fèves blanches

Elles se différencient facilement de la masse par leur couleur pâle aussi bien que par leurs dimensions sensiblement supérieures à celles des fèves normales : par rapport à celles-ci, leur poids moyen est supérieur, mais leur poids spécifique est inférieur.

Elles réagissent rapidement au processus de torréfaction en diminuant sensiblement de poids et en prenant une couleur qui tend le plus souvent vers le brun charbonneux.

En conséquence de cela, ces fèves modifient les caractéristiques du café à la tasse : en général l'arôme perd son intensité et l'équilibre du goût est déplacé vers la bande amère qui prend aussi, dans les cas les plus mauvais, un léger goût de quinquina ou devient légèrement astringente. D'autres fois au contraire la tasse se limite à prendre une empreinte légèrement ligneuse.

Considérant par conséquent que ce défaut amène une irrégularité importante du café torréfié et détermine par ailleurs dans les caractéristiques de l'infusion un déplacement sensible des bandes, et tenant compte du fait qu'on le retrouve en général dans tous les cafés avec une assez grande fréquence, nous estimons qu'un critère d'évaluation plutôt sévère doit être adopté pour lui.

Les « fèves blanches » correspondent sans aucun doute possible à la description donnée par l'ISO (7).

Fèves avec pellicule argentée

Dans cette catégorie sont prises en considération les fèves dont la moitié au moins de leur surface est recouverte par la pellicule argentée : la couleur de celle-ci couvre toute la gamme des nuances qui vont du jaune paille au rouge brun, et du vert petit pois au vert brun. En ce qui concerne la granulométrie, les fèves ne présentent pas en général de déplacement significatif de la distribution granulométrique. Leur poids spécifique est un peu supérieur à la moyenne.

Par suite de la torréfaction, elles subissent des baisses de pourcentage plus élevées et elles révèlent au « leucomètre » une intensité de torréfaction plus grande. La pellicule argentée se détache complètement de la fève.

Avec les essais à la tasse, elles révèlent des caractéristiques qui intéressent en général principalement le goût : elles accentuent en effet d'habitude l'intensité de la bande amère et les pointes les plus mauvaises « d'amer quinquina » et « d'amer-astringent » sont atteintes par des fèves recouvertes d'une pellicule verte ou vert-brun.

(7) 2.33 « fève blanche » (white bean) : grain de café de couleur blanche, très léger, de masse volumétrique nettement inférieure à celle d'une fève saine.

L'évaluation de ce type de « fèves indésirables » apparaît quelque peu problématique, car la présence plus ou moins fréquente de celles-ci est en étroite relation avec les cerises : les cafés « lavés » devraient en effet être évidemment privés de pellicule ou au maximum n'en conserver que des fragments très petits. Comme de toutes façons, dans la généralité des cas, ce défaut ne semble pas se répercuter sur la dégustation de la tasse de café, nous estimons que l'on peut adopter pour lui un critère de pénalisation relativement lâche.

Nous pensons que les fèves que nous appelons « fèves recouvertes d'une pellicule » correspondent aux (8) « fèves rousses » de l'ISO, même si la définition proposée par l'ISO lui-même ne fait pas mention de la présence de la pellicule argentée, alors qu'elle parle en détail de la couleur rougeâtre de la fève et pas des autres nuances possibles.

A propos de la couleur de la pellicule, nous pensons même que la soi-disant (9) « fève immature » de l'ISO peut être également incluse dans la catégorie plus vaste des « fèves recouvertes d'une pellicule ».

En proposant de réunir sous un même terme la « fève rousse » et la « fève immature », nous nous rendons parfaitement compte que nous ne prenons nullement en considération les diverses origines du café et que nous ruinons ainsi la terminologie, désormais traditionnelle, du café. Nous osons toutefois avancer cette suggestion risquée, poussés par la conviction que son application pourrait éliminer quelques confusions d'interprétation et réduire ainsi sensiblement les difficultés de la sélection et de l'évaluation consécutive de l'échantillon à effectuer par le personnel technique des laboratoires de contrôle.

Fèves noires

La couleur mise à part, elles sont facilement reconnaissables par leur granulométrie généralement très petite, ou tout au moins plus petite que la moyenne normale. Elles sont aussi très souvent rugueuses et recroquevillées et elles peuvent donc facilement être incluses dans la catégorie des fèves sèches : selon leur aspect, elles correspondent aussi bien à la définition ISO pour la (10) « fève noire » qu'à celle pour la (11) « fève sèche ». Dans certains cas, elles pourraient correspondre égale-

(8) 2.41.5 « fève rousse » (foxy bean) : grain de café de couleur rousse ou rougeâtre.

(9) 2.32 « fève immature » (unripe bean) : grain de café non mûr, de couleur verdâtre ou grisâtre et souvent à surface ridée.

(10) 2.28 « fève noire » (black bean) : grain de café dont la moitié, ou plus, est de couleur noire extérieurement ou intérieurement.

(11) 2.31 « fève sèche » (ragged bean) (syn. : fève ridée ; withered bean, chaye bean, chaie bean) : grain de café ridé et léger, de couleur grisâtre ou noirâtre.

Note : le terme « green bean » est ambigu et ne devrait pas être employé.

ment à la définition donnée pour la (12) « fève avariée sèche » : comme on le verra plus loin cependant, même cette possibilité de triple interprétation n'amènera pas de complications essentielles dans la classification.

Les diverses déterminations technologiques sur le café vert n'ont pas toujours pu être effectuées à cause de la quantité heureusement faible que l'on a pu réunir des divers lots que nous avions à notre disposition. Il est évident qu'on aurait certainement pu résoudre facilement le problème en ayant recours à un résidu de café triage, mais dans ce cas la confrontation organoleptique avec l'échantillon originel moyen aurait automatiquement perdu toute signification.

Les fèves noires réagissent avec peine à la torréfaction et elles restent recroquevillées, avec une couleur qui tend souvent au jaunâtre et avec la pellicule argentée encore très adhérente le plus souvent ; elles n'atteignent presque jamais le second craquement dans le temps prévu pour la torréfaction. Elles se différencient donc notablement des fèves normales.

Elles donnent à la tasse de café des caractéristiques qui n'ont rien de commun avec celles d'un vrai café : et si elles sont moisies en plus d'être noires, elles rendent l'infusion presque imbuvable.

Considérant que les dommages provenant des fèves noires sont parmi les plus graves, nous sommes évidemment d'accord avec les critères sévères de pénalisation adoptés par la législation française.

Fèves sèches

Elles ont la forme particulière d'une nacelle : elles sont en effet généralement étroites, allongées et légèrement arquées. Elles sont recouvertes par la pellicule, dont la couleur varie de la tonalité du jaune pâle à celles du vert, du brun et du noir, plus ou moins intenses. En vertu de leur forme particulière, on les trouve généralement dans les tamis à petites mailles.

Avec la torréfaction elles subissent des pertes de poids très inférieures à la moyenne et restent exceptionnellement claires, comme des petites noix, leur surface étant légèrement ridée.

A la dégustation elles se comportent toutes de façon négative, indépendamment du type de café. Pour les fèves brunes et noires les caractéristiques organoleptiques sont vraiment très mauvaises. La plupart du temps le « stinker » prédomine, mais quand il n'en est pas ainsi, des sensations affleurent, semblables à celles que pourrait suggérer une huile de poisson rance, des substances organiques pourries, etc. Pour les fèves sèches jaunes et vertes, le « stinker » est au contraire moins fréquent : il est cependant substitué par d'autres sensations moins violentes peut-être, mais qui ne sont pas moins désagréables pour autant ; ce sont, par exemple, celles de désinfectant, de rance, de pistache verte, etc.

Nous avons pu remarquer que les fèves appelées « noires » aussi bien que les fèves « sèches » se comportent de façon très semblable en ce qui concerne les essais de torréfaction et de dégustation ; les analogies s'accentuent même sensiblement si la couleur des fèves sèches tend vraiment au brun noir.

Cette constatation nous conduit à considérer les fèves sèches au même niveau que les fèves noires et à proposer par conséquent pour elles le même critère sévère de pénalisation.

Nous pensons que les fèves considérées par nous comme « sèches » correspondent à celles que l'ISO et la législation française entendent par le terme (11) « fève sèche » ; nous suggérons cependant d'inclure dans cette catégorie « toutes » les fèves ridées et de poids léger, indépendamment de la couleur, que celle-ci soit noire, brune, verte ou jaune. Dans cette même catégorie, en relation avec l'aspect particulier du dommage, pourraient être également comprises les fèves correspondant au terme ISO (12) « fève avariée sèche ».

Fèves cireuses

Elles ont d'habitude une granulométrie légèrement supérieure à la moyenne ; elles sont dépourvues de pellicule ou seulement partiellement recouvertes. La surface a l'aspect translucide caractéristique de la cire avec des tonalités qui vont du vert pâle au jaune, au brun rougeâtre, en relation avec le type de café et surtout avec la gravité du défaut. A la coupe, une odeur désagréable émane, qui peut passer de l'empreinte caractéristique de surfermentation à celle vraiment répugnante du « stinker » parmi les composants de laquelle prime l'hydrogène sulfuré.

A la suite de la torréfaction, elles sont marquées par des pertes de poids supérieures à la normale et elles apparaissent par suite très foncées, avec souvent un affleurement de petites gouttes de matière grasse.

A la tasse, les fèves cireuses (jaunes, vertes ou brunes, provenant de cafés Arabica ou Robusta) donnent toutes sans distinction une odeur et un goût dégoûtants, étrangers au café, d'une intensité proportionnelle à l'intensité de la couleur. Il est difficile de donner un nom à ces sensations qui sont extrêmement subjectives, justement parce qu'elles sont si violentes : elles peuvent présenter des analogies avec du matériel organique gâté, du cuir pourri, de la couenne moisie, etc., comme elles peuvent porter aussi l'empreinte bien particulière

(12) 2.26 « fève avariée sèche » (damaged dry bean) : grain de café moussu ou vert-de-gris.

du « stinker » ; elles ont présenté plus souvent cependant des analogies évidentes avec l'huile de poisson rance, nauséabonde et excessivement persistante.

Etant donné notre expérience sur la généralité du dommage provoqué par n'importe quel type de fève cireuse, nous ne sommes pas certains que notre « fève cireuse » corresponde à la (13) « fève sure » de la législation française et de l'ISO et nous n'osons pas d'autre part soutenir que les fèves appelées (14) « fèves puantes » proviennent uniquement des fèves cireuses. Nous sommes cependant profondément convaincus que toutes les fèves cireuses sans distinction doivent être fortement pénalisées : dans la même mesure qu'une fève noire, qu'une cerise, etc.

(13) 2.27 « fève sure » (sour bean) : grain de café dégageant à la coupe une odeur aigre et présentant généralement un aspect cireux, une couleur brun rougeâtre.

(14) 2.37 « fève puante » (stinker bean) : grain de café qui à la coupe récente dégage une odeur très désagréable souvent putride ou rhumée et pouvant être de teinte havane ou brunâtre et présenter quelquefois un aspect cireux.

En conséquence du fait que les fèves cireuses ont un aspect identifiable de façon sûre et qu'elles impliquent des conséquences organoleptiques aussi significatives que variées, nous proposons que l'ISO adopte pour cette catégorie de « fèves indésirables » le terme de « fève cireuse », dans lequel, étant donné qu'il couvrirait une gamme plus vaste de dommages, pourraient être compris le terme actuel de « fève sure », celui encore incertain et discuté de « fève puante » et celui de (15) « fève brune ».

Dans ce cas également, comme dans celui des « fèves recouvertes de la pellicule », nous sommes parfaitement conscients de proposer une solution qui se concilie mal avec la tradition : d'autre part, nous sommes arrivés à celle-ci, poussés par la difficulté de reconnaître avec sûreté les types de défauts susdits sur la base des définitions officiellement proposées.

(15) 2.41.3 « fève brune » syn. « fève marron » (brown bean) : grain de café dont plus de la moitié de la surface est de couleur brune ou marron.

SYSTÈME PROPOSÉ

A la suite des conclusions que nous avons pensé pouvoir tirer de nos expériences menées sur le café vert, le café torréfié et sur l'infusion, et en suivant le critère d'évaluation exposé au début, nous avons **subdivisé les défauts du café vert en trois groupes :**

a) les défauts influencent peu ou nullement les caractéristiques organoleptiques de l'infusion et par suite leur évaluation n'intéresse pratiquement que le côté esthétique.

b) les défauts contribuent à rendre le produit torréfié irrégulier (fèves claires, tachées, carbonisées, etc.), mais ils provoquent surtout un déplacement de l'équilibre entre les bandes amer-acide-doux de l'infusion, avec un glissement préférentiel vers l'amer (de quinquina, astringent) ; l'arôme subit en général des modifications moins prononcées.

c) les défauts non seulement exaltent l'irrégularité du café torréfié, mais, facteur déterminant, altèrent le goût et l'odeur de la tasse de café au point de la rendre imbuvable. C'est là le cas où non seulement l'infusion n'a plus le droit de s'appeler « café », mais où ce même produit doit être exclu de la catégorie des produits alimentaires.

Sur la base du critère exposé ci-dessus, la classification d'un échantillon de café peut être représentée par le schéma page suivante.

DISTRIBUTION DES DÉFAUTS

Dans le groupe (a) sont comprises :

1. « fèves mal formées » :	« fève mal formée »	2.40
	« éléphant »	2.41.6
	« caracoli »	2.39
	« coquille »	2.35
2. « fèves brisées » :	« brisure »	2.36
	« coquille »	2.35
3. « fèves piquées avec 1 trou » :	« fève piquée ou scolytée »	2.34

Dans le groupe (c) sont comprises :

1. « cerises » :	« cerise sèche »	2.24
	« café en coque »	2.10
2. « fèves en parche » :	« fève en parche »	2.25
3. « fèves noires et noires moisies » :	« fève noire »	2.25
	« fève avariée sèche »	2.26
	« fève sèche »	2.31
4. « fèves sèches » :	« fève sèche »	2.31
	« fève avariée sèche »	2.26
5. « fèves cireuses » :	« fève sure »	2.27
	« fève puante »	2.37
	« fève brune »	2.41.3

Dans le groupe (b) sont compris tous les défauts qui ne sont pas prévus dans les groupes (a) et (c).

SELECTION QUALITATIVE DE L'ECHANTILLON.

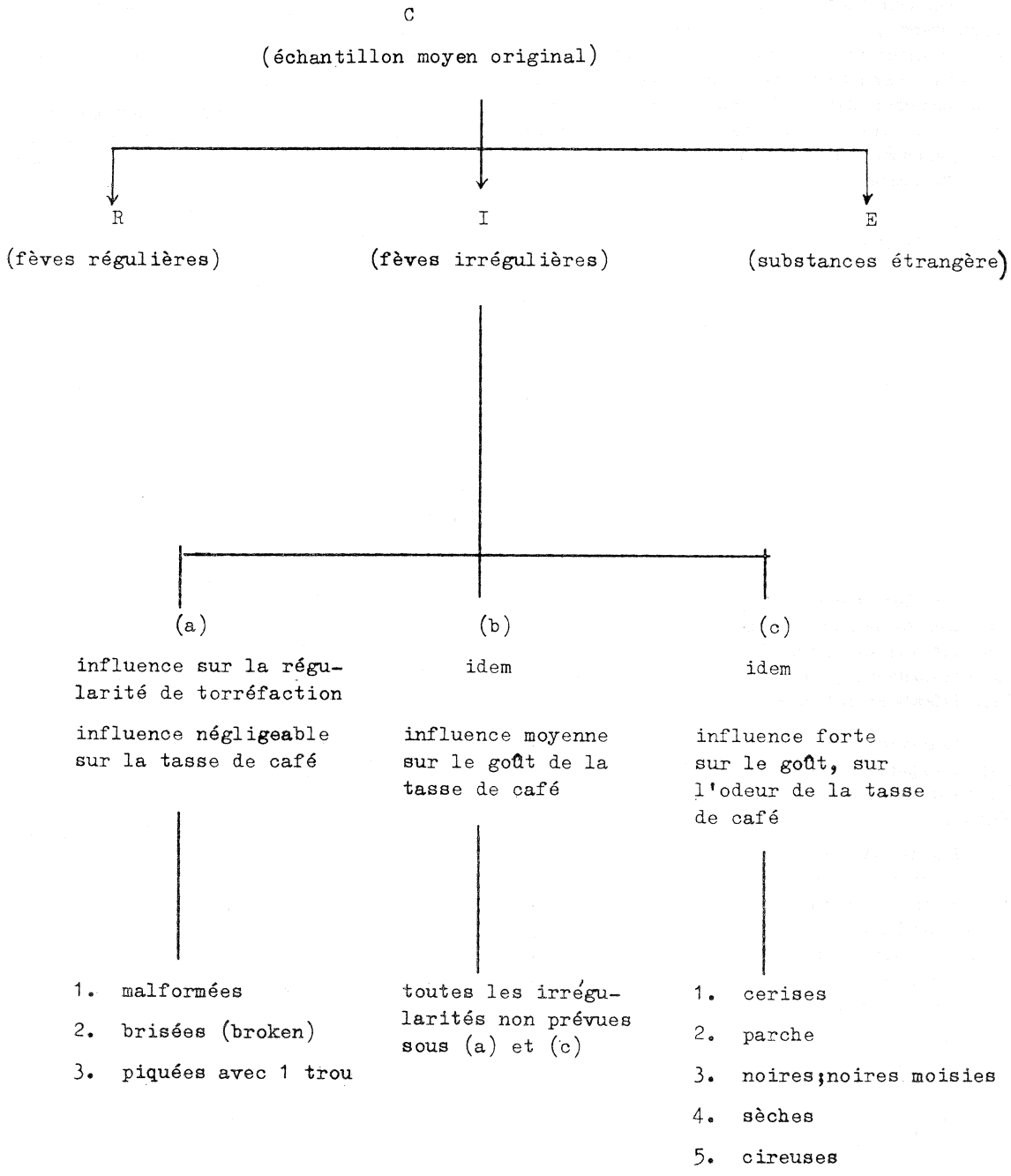


Schéma 3

En suivant le critère exposé ci-dessus, les difficultés qui concernent la reconnaissance des défauts sont réduites au minimum : en effet, tandis que dans le groupe (a) sont portées seulement trois classes de défauts et dans le groupe (c) cinq autres classes, toutes parfaitement identifiables, dans le groupe (b) se retrouvent tous les autres types de défauts ou dommages.

La classification qualitative de l'échantillon C étant ainsi prévue, le problème de son évaluation quantitative se présente maintenant quelque peu simplifié : en effet, en vertu de la position élémentaire de ce problème, nous pensons pouvoir adopter facilement à ce moment-là le « critère gravimétrique », certainement plus cohérent et homogène que le « système de comptage » aujourd'hui partout appliqué.

Pour l'évaluation du produit, sous l'angle de la qualité et des normes hygiénico-sanitaires, nous avons introduit aussi, parallèlement au « critère gravimétrique », des facteurs de correction k', k'', k''' qui tiennent compte de la gravité des dommages produits sur l'échantillon C par le type spécifique de défaut. Cela signifie que si par exemple nous pensons fixer pour le groupe (b) un facteur de correction moyen (k'' = 0,5), nous pouvons donner au groupe (a) la pénalité minimum (k' = 0,1), alors que nous donnerons au groupe (c) pour des raisons évidentes la pénalité maximum (k''' = 1).

Il s'ensuit que si l'ensemble des « fèves indésirables » I est représenté de façon gravimétrique par la somme des fèves **a b c,** l'**indice de défectuosité** D est exprimé de la façon suivante, lorsque sont introduits les facteurs de correction k', k'', k''' :

I) $D = k' a + k'' b + k''' c$

Si l'analyse est effectuée sur un échantillon de Q g, l'indice de défectuosité D', se rapportant à 100 g, est exprimé par :

$$2)\ D' = \left(k' \frac{a.100}{Q}\right) + \left(k'' \frac{b.100}{Q}\right) + \left(k''' \frac{c.100}{Q}\right)$$

Naturellement, la valeur globale de D' ainsi que la valeur partielle des fèves **c**, et éventuellement aussi celle des fèves **b**, doivent être contenues dans des limites plutôt restreintes, si l'on entend sauvegarder la qualité de la tasse de café.

Exemple

Envisageons d'examiner l'échantillon habituel de 300 g et fixons les valeurs suivantes pour les facteurs de correction : $k' = 0,1$; $k'' = 0,5$; $k''' = 1$. L'indice de défectuosité D' se rapportant à 100 g devient :

$$D' = \left(0,1 \frac{a.100}{300}\right) + \left(0,5 \frac{b.100}{300}\right) + \left(1 \frac{c.100}{300}\right)$$

Si nous fixons maintenant les limites suivantes :

$D' \leqslant 7$; $\frac{b.100}{Q} \leqslant 2,5$; $\frac{c.100}{Q} \leqslant 1,5$, et si nous supposons, pour simplifier l'exemple, que ces limites sont atteintes, la classification de l'échantillon se présente ainsi :

$$D' = \left(0,1 \frac{90.100}{300}\right) + \left(0,5 \frac{15.100}{300}\right) + \left(1. \frac{4,5.100}{300}\right)$$

$$7 = 3 + 2,5 + 1,5$$

C'est pourquoi en pratique, en supposant qu'un grain de café vert en moyenne pèse 0,2 g, nous pourrons trouver :

450 fèves défectueuses environ dans le groupe (a) correspondant à 90 g.

75 fèves défectueuses environ dans le groupe (b) correspondant à 15 g.

22 fèves défectueuses environ dans le groupe (c) correspondant à 4,5 g.

Naturellement, si les limites fixées précédemment pour les groupes (b) et (c) ne sont pas atteintes comme on le suppose dans l'exemple présent, le groupe (a) n'est pas avantagé par l'augmentation de poids correspondante : on envisage de cette façon une marge plus grande par exemple pour les « oreilles », ou pour les « caracoli », ou pour les fèves piquées avec un seul trou, etc.

En variant de manière opportune les limites et les coefficients de correction selon ce que pourra suggérer l'expérience spécifique des divers secteurs intéressés au café, et selon ce qu'imposeront de toutes façons les critères d'hygiène et de santé, nous pensons que la méthode d'évaluation pourra faciliter un accord futur entre les pays exportateurs et les pays importateurs, au bénéfice complet de la qualité du produit. Cette méthode offre les avantages suivants :

1) **homogénéité de pénalisation,** indépendamment de la granulométrie de l'échantillon C.

2) **simplicité d'interprétation :** les défauts du groupe (a) comme ceux du groupe (c) sont identifiables avec facilité et de façon sûre. Par exclusion, au groupe (b) appartiennent tous les défauts qui ne rentrent pas dans les deux groupes précédents.

3) **rapidité d'exécution.**

4) **possibilité de limitation des contrôles :** par exemple, le contrôle du groupe (c) est déjà suffisant aux fins strictement hygiénico-sanitaires.

En conséquence de ce qui est ci-dessus exposé, nous sommes amenés à espérer que la présente approche du problème de l'évaluation du café vert selon un « critère gravimétrique » puisse représenter un apport positif pour l'élaboration d'un système d'évaluation d'application universelle.

ILLY (E.), RUZZIER (L.). — **Proposition d'un nouveau système d'évaluation gravimétrique des défauts du café vert.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 24-45, fig. tabl.

Après avoir montré que l'on tend sur le plan international à l'adoption de normes de qualité pour le café et discuté la possibilité de l'application des deux systèmes de normes actuellement les plus complets et à jour (celui établi par la législation française de 1965 et celui proposé par l'ISO), les auteurs présentent un projet d'évaluation des défauts du café vert dans lequel il est tenu compte de l'influence spécifique des différents types de défauts sur les caratères organoleptiques du produit fini.

Dans cette optique quelques-uns des principaux défauts sont décrits et leur regroupement en un plus petit nombre de classes est ensuite suggéré.

Les auteurs discutent enfin l'intérêt d'adopter un « critère gravimétrique » d'évaluation des défauts, corrigé par un coefficient tenant compte de l'influence spécifique de chaque type de défaut sur la qualité de l'ensemble du produit et suggèrent une formule pour calculer un indice absolu des défauts.

ILLY (E.), RUZZIER (L.). — **A proposal for a new gravimetric system for detecting defects in raw coffee beans.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 24-45, fig. tabl.

After having pointed out the tendency at international level to adopt standard for the quality of coffee and having discussed the possibilities of applying the two most up to date and complete systems of standards at the moment (that established by French legislation in 1965 and the one proposed by I S O), the authors propose a scheme for evaluating the defects in green coffee in which account is taken of the specific influences of various kinds of defects on the taste characteristics of the finished product.

With this in view, some of the principal defects are described and later it is suggested that they could be reclassified into a smaller number of groups.

Finally, the authors discuss the advantages of adopting a « gravimetric criterium » for assessing the defects, to be corrected by a coefficient which allows for the specific effect of each type of defect on the quality of the product as a whole, and suggest a formula for working out an absolute index of the defects.

ILLY (E.), RUZZIER (L.). — **Vorschlag für ein neues gewichtsanalytisches System zur Fehlerbewertung beim Kaffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 24-45, fig. tabl.

Es wird zunächst darauf hingewiesen, dass auf internationalem Gebiet auf die Annahme von Qualitätsnormen für den Kaffee hingezielt wird und die Möglichkeit der Anwendung der beiden gegenwärtig am vollständigsten und am meisten zeitgemässen Normensystemen (das durch die französische Gesetzgebung von 1965 geschaffene und das von der I. S. O. vorgeschlagene System) erwogen. Sodann wird ein Projekt zur Fehlerbewertung beim Rohkaffee dargelegt, in welchem der spezifische Einfluss der verschiedenen Fehlertypen auf die organoleptischen Eigenschaften des Fertigprodukts berücksichtigt wird.

Von diesem Gesichtspunkt aus werden die Hauptfehler beschrieben und ihre Umgruppierung in eine kleinere Anzahl von Kategorien angeregt.

Schliesslich wird das Interesse einer Annahme eines gewichtsanalytischen Kriteriums für die Fehlerbewertung erörtert das durch einen den spezifischen Einfluss eines jeden Fehlertyps auf die Gesamtqualität der Ware berücksichtigenden Koeffizienten verbessert wird und eine Formel zur Ausrechnung einer absoluten Kennzahl der Fehler vorgeschlagen.

DISCUSSION

M. CALZOLARI : Esiste la possibilità di adottare delle techniche di arricchimento ricorrendo a una « preparativa » ?

Mlle RUZZIER : C'è questa possibilità, ma è interessante solo per quanto riguarda la ricerca teorica. Il caffè cambia continuamente : quello analizzato al momento della macinazione non presenta le stesse caratteristiche del caffè analizzato dopo mezz'ora, un'ora, ventiquattro ore dalla macinazione. Quindi i dati che noi otterremmo con una « preparativa » avrebbero interesse dal lato teorico di ricerca. Ma dal lato pratico darebbero dei risultati non corrispondenti a quella realtà che interessa l'uomo che vive nell' industria e che ha da sapere se il produtto è « buono » o « cattivo » e deve risolvere il problema rapidamente.

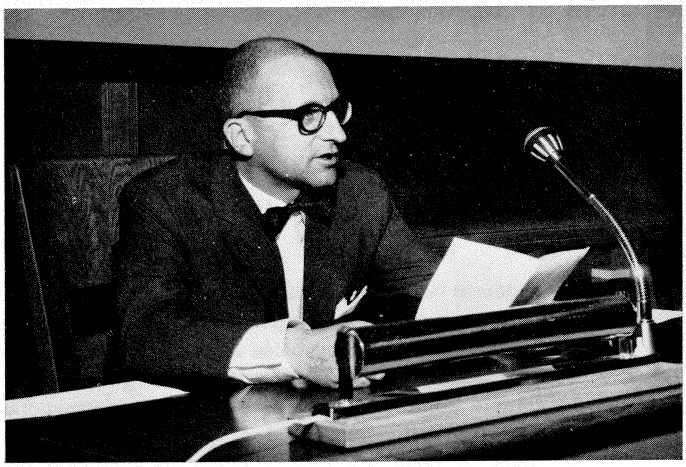
Questo problema posto dal Prof. Calzolari è estremamente interessante perché apre un campo di ricerca vastissimo. A questo proposito ricordiamo che anche il fattore temperatura porta delle modifiche. Noi abbiamo osservato che le analisi fatte su campioni prelevati a temperatura maggiorate di soli 10-15° C presentano, già con i mezzi rudimentali da noi impiegati, risultati molto diversi.

M. TELEGDY-KOVATS : On the basis of the very interesting suggestions made it would be possible to work out ISO recommendations, but first of all, the study should be repeated in different laboratories and in different countries. Then, the gas-chromatography is not yet sensitive enough to give complete or nearly complete information about quality. Therefore, correlations calculated at present time on the basis of gas-chromatographic data can be very hazardous. International collaborative works must be done before some final conclusions can be drawn.

M. ILLY : I want to thank very much Professor Telegdy Kovats for the suggestion he has made to appoint a working group on that subject ; it is exactly what we wanted.

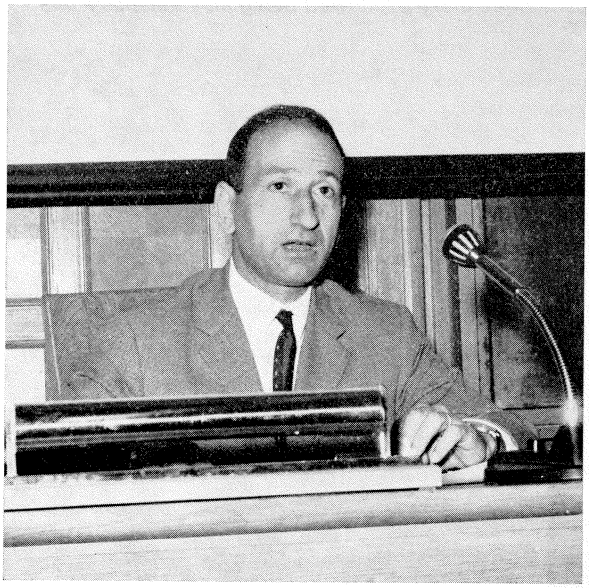
We have tried to get a new approach to the problem : presently 15 or 16 different defects are listed and it is difficult to evaluate them in an homogeneous manner. Defects are probably the result of deteriorations at different intermediate stages. We tried to get rid of those stages and to look simply for the beans which really give a negative contribution to the coffee drink : first the beans which affect olfactory senses and taste ; second those which only affect taste and that are less important as it is always possible to disguise them by blending.

I think that this approach is a great simplification of the problem. Concerning gas-chromatography, we are not really looking for what is under each peak, we are only trying a statistical approach : one of the greatest interest of this technique is its speed. It is possible to make a lot of different analyses, as you get an answer in 25 minutes, which allows a statistical approach of the problem. I think that it is an easy way, the technique that we followed being an elementary one.



E. ILLY

LES CONSOMMATEURS ET LA RÉGLEMENTATION DU CAFÉ



F. CUSTOT

Laboratoire coopératif d'analyses et de recherches, Gennevilliers

Devant une assemblée internationale, il est difficile de parler de réglementation sans courir le risque de commettre des erreurs sérieuses sur les lois en vigueur dans les pays autres que le sien.

C'est pourquoi je pense préférable d'axer mon exposé sur l'**examen critique de la réglementation française,** en soulignant ses avantages et ses lacunes de façon à permettre à tous nos collègues de transposer dans leur pays respectif.

La réglementation française a été récemment rajeunie puisqu'un décret en date du 3 septembre 1965 est venu prendre la place de l'ancien texte qui datait de 1932.

Je ne voudrais pas paraître affecté de chauvinisme ni être considéré comme un défenseur systématique de nos productions nationales, mais je suis néanmoins obligé de dire que cette récente réglementation française est du point de vue du consommateur pleine d'intérêt. Je signalerai ce qui, à mon avis, y est critiquable, mais vous constaterez sans peine que les éléments positifs l'emportent très largement.

Bien que les consommateurs achètent parfois des cafés verts pour les torréfier eux-mêmes, cette pratique est assez peu courante pour que je puisse limiter mon propos aux cafés torréfiés, extraits, boissons, ainsi qu'aux cafés décaféinés.

Défauts et matières étrangères

Le décret de 1965 constitue une tentative qui semble très intéressante pour protéger le consommateur contre la commercialisation des cafés avariés. Cette question est fort ancienne, comme en témoigne par exemple le compte rendu du deuxième congrès international pour la répression des fraudes, qui s'est tenu à Paris en 1909. A cette époque, la chambre syndicale des brûleurs de café demandait énergiquement « l'interdiction de la mise en vente de cafés avariés, dont la sortie des entrepôts ne devrait plus être tolérée ». Elle ajoutait : « Il y a là évidemment une réforme à faire qui ne manquera pas d'opérer une perturbation aux usages établis, mais cette interdiction aurait d'heureux effets au point de vue de la santé publique et contribuerait puissamment à la vulgarisation du café ».

De son côté le représentant de la chambre de commerce du Havre adoptait une formule quelque peu différente : « les sacs ou colis de cafés avariés d'eau douce, d'eau de mer, de buée de cale et faisant généralement l'objet de ventes publiques pour le compte des assureurs maritimes, doivent contribuer comme par le passé à alimenter la consommation française, à condition que les acheteurs soient prévenus de leur état d'avarie. Seuls les cafés dont l'avarie serait de nature à les rendre impropres à la consommation doivent être exclus du commerce ».

Décrire la façon dont la nouvelle réglementation française a essayé de résoudre cette question sortirait du cadre de cet exposé, mais nous pensons qu'elle est de nature à améliorer progressivement la qualité du café vendu en France, sans toutefois exiger des vendeurs et torréfacteurs de café un effort excessif.

Teneur en humidité

La fraude principale consistant à vendre de l'eau au prix du café, il était normal que la réglementation accorde à ce problème une attention particulière. A vrai dire, cette question était déjà réglée de façon satisfaisante en France par le décret de 1932, puisque la teneur maximale en humidité admise était de 5 p. 100, toute reprise d'humidité au-delà de ce taux devant venir en surplus dans le poids du paquet. Le décret de 1965 n'ajoute qu'une exigence supplémentaire : celle de ne dépasser en aucun cas la teneur totale en humidité de 10 p. 100, faute de quoi le café cesserait d'être marchand.

Enrobage

Ce traitement a lui aussi, et depuis très longtemps, fait l'objet d'innombrables discussions quant à son opportunité. Il est certain que l'enrobage permet de vendre au prix du café des substances moins coûteuses, mais cette constatation ne suffit évidemment pas à démontrer que l'enrobage est une fraude. Il faudrait pour cela prouver que cette opération n'a pas véritablement d'utilité technique et je dois honnêtement dire qu'ayant examiné, en me plaçant du point de vue du consommateur, de nombreux documents, je ne suis pas parvenu à me faire une opinion précise sur ce point.

Bien que certains professionnels dignes de foi aient toujours affirmé que l'enrobage présentait dans certains cas une incontestable utilité technique, les consommateurs avaient à l'encontre de cette opération une suspicion évidente. Pourquoi ? Parce que toutes les fois que nous proposions de rendre obligatoire la mention de l'enrobage sur l'étiquette, nous rencontions une opposition dont les causes nous échappaient. Si l'enrobage répond à une nécessité technique, s'il donne un café meilleur ou mieux présenté ou se conservant plus longtemps, pourquoi ne pas le dire à l'acheteur qui sera ravi de le choisir de préférence ?

A notre grande satisfaction, la récente réglementation française a tranché comme nous le souhaitions et l'opération d'enrobage doit maintenant être annoncée sur l'étiquette. Bien entendu, il n'est permis d'enrober qu'avec un nombre limité de substances dont la liste positive est fixée par la loi et la quantité de substances d'enrobage est limitée.

Maintenant que l'enrobage, du fait de sa déclaration obligatoire, exclut toute idée de fraude, nous espérons que nous saurons bientôt à quoi nous en tenir sur son utilité technique : ou bien, les consommateurs le réclamant, il continuera d'être pratiqué, ou ce sera l'inverse et on pourra penser qu'il était inutile.

Cafés « supérieurs »

On sait que dans le commerce des aliments les qualificatifs de supériorité sont trop souvent laissés à la libre appréciation des vendeurs. Parfois ils sont réglementés, mais fort mal. Ce n'est pas le cas du café en France, où, l'emploi du mot « supérieur » ou d'un mot analogue entraîne pour le vendeur toute une série d'obligations plus sévères que pour le café ordinaire (humidité moindre, emballage étanche, pourcentage moindre de fèves défectueuses, indication sur l'étiquette de la date de torréfaction ou de la date limite de vente).

Présentation et étiquetage

Le décret de 1965 normalise les emballages qui peuvent être utilisés. Ainsi prend fin une source de confusions et de tromperies contre laquelle les associations de consommateurs avaient depuis longtemps protesté. On pouvait en effet trouver en France, et il est probable que cela se rencontrait également ailleurs, des paquets de 200 g de café ayant exactement les mêmes dimensions extérieures que des paquets de 250 g. Pour qui connaît la hâte avec laquelle certaines ménagères sont obligées de faire leurs achats, il est clair que la mention du poids sur le paquet ne suffisait pas à empêcher la tromperie. Dorénavant ne peuvent plus être vendus en France que des paquets de café de 125 — 250 — 500 g et multiples de 500 g.

L'étiquette, nous l'avons dit, doit très heureusement porter toute une série d'indications permettant de renseigner l'acheteur et ces exigences sont plus nombreuses en ce qui concerne le café supérieur.

Le nom et l'adresse du fabricant ou du vendeur doivent être indiqués en clair, ce qui est fort utile pour permettre aux consommateurs de réclamer ou d'exprimer leur satisfaction.

Café décaféiné

La réglementation telle qu'elle existait en 1932 n'a été que peu modifiée. D'une part le taux résiduel de caféine du café décaféiné torréfié est passé de 0,05 p. 100 à 0,1 p. 100, ceci pour tenir compte des teneurs en vigueur dans d'autres pays. Bien qu'il s'agisse là d'une diminution de sévérité de la réglementation, il ne nous semble pas que les consommateurs puissent en pâtir, le taux actuellement retenu restant très faible.

La loi continue à exiger que le procédé utilisé pour l'élimination de la caféine ne prive le produit d'aucun autre de ses constituants utiles. Cette exigence est quelque peu théorique, de même que celle qui exige que les solvants employés soient sans action chimique. Néanmoins il n'y a pas là matière, du point de vue du consommateur, à critiques particulières.

Le décret prévoit que les solvants autorisés pour la décaféination seront énumérés sur une liste positive publiée par arrêté ministériel et que ce même texte fixera les teneurs résiduelles tolérables dans les cafés décaféinés et leurs extraits. Cette disposition est excellente, le seul reproche qu'on puisse lui faire étant que près de deux ans après la parution de ce décret, l'arrêté ministériel n'a toujours pas vu le jour. Ceci est d'autant plus regrettable que, nos analyses l'ont montré, on trouve sur le marché français des cafés décaféinés contenant des doses tout à fait excessives de solvants chlorés.

Extraits de cafés liquides et en poudre

Le décret de 1965 oblige les extraits liquides de café à être suffisamment concentrés, ce qui est une chose normale et utile.

Les extraits de café en poudre doivent renfermer exclusivement les principes solubles, sapides et aromatiques du café.

La quantité de café vert mise en œuvre ne doit pas être inférieure à trois fois la quantité d'extrait en poudre soluble obtenu.

Cette dernière phrase a fait l'objet de discussions nombreuses et ne peut pas être considérée comme donnant toute satisfaction aux consommateurs.

Il est en effet connu depuis longtemps (voir en particulier l'article de C. EHLERS, *Deutsche Lebensmittel - Rundschau*, mars 1956, p. 66-67) que la préparation industrielle des extraits de café permet de retirer du grain de café davantage d'extrait que ne le fait la ménagère. Or, toute la publicité des cafés solubles insiste sur l'idée que le consommateur, en reconstituant un café-boisson à partir de café soluble et d'eau, obtient exactement le même produit que s'il avait fabriqué son café lui-même, mais avec beaucoup moins de peine. L'étude de EHLERS montre que cette affirmation n'est pas exacte et c'est pourquoi nous avions insisté pour que les extraits de café en poudre soient soumis à des règles plus strictes. Nous n'avons pas obtenu satisfaction, les fabricants s'abritant derrière les dispositions de l'accord international de 1962 sur le café.

C'est là un point sur lequel nous faisons une critique sérieuse à la réglementation française et nous estimons que le consommateur n'est pas suffisamment défendu. Le moins que l'on eût pu demander était l'indication sur l'étiquette du café en poudre de la quantité de café torréfié mise en œuvre pour aboutir à la quantité d'extrait obtenu dans le récipient.

Cafés boissons

Le décret de 1965 exige pour la préparation du café boisson une quantité d'au moins 5 g de café par dl et d'au moins 7 g s'il s'agit de café filtre, café « express » ou toute autre indication évoquant une supériorité.

L'existence de cette limite minimale représente évidemment un progrès sur la situation antérieure, même si les teneurs adoptées ne sont pas très élevées. Rappelons en effet que les organismes qui font de la publicité pour le café recommandent d'utiliser 10 à 12 g par tasse et que beaucoup de tasses ne font pas plus d'un décilitre.

Mais ce qui est plus grave, c'est que la formulation adoptée ne s'oppose pas à l'utilisation, pour la préparation de cafés-boissons, de mélanges de cafés et de succédanés. Plus précisément, une circulaire en date du 22 novembre 1965 a admis que l'on pouvait ajouter à la quantité de café utilisée (5 g par dl) une quantité de chicorée pouvant atteindre 10 p. 100 du poids de café mis en œuvre, **et cela sans que le consommateur en soit averti.**

Il y a là une disposition extrêmement regrettable dans son principe qui figure d'ailleurs déjà dans l'accord international de 1962 sur le café et que les associations de consommateurs ne sauraient accepter. Il ne s'agit pas de faire le moindre reproche à la chicorée, ni d'ailleurs à aucun autre succédané du café, mais d'exiger que le consommateur soit traité comme un être majeur et non comme un enfant à qui l'on cache la vérité. Déjà, au deuxième congrès de la répression des fraudes en 1909, le débat sur cette question avait été vif. Bornons nous à citer une des interventions qui y furent faites :

« M. M. a dit que si l'on obligeait les débitants à annoncer qu'ils vendent du café mélangé de chicorée, ceux-ci ne pourraient plus vendre un sou de café. Je me demande pourquoi ? Si dans le Nord le public demande de la chicorée, il sera charmé de savoir qu'on lui en donne et les débitants en vendront davantage... Puisque vous prétendez que le public souhaite consommer de la chicorée, s'il le souhaite, il le demandera. Mais s'il ne le demande pas, pourquoi voulez-vous lui en donner ? ».

Force nous est de constater que sur ce point il n'y a eu presque aucun progrès depuis 1909 et les consommateurs ne pourront que le regretter, même si, comme le dit la circulaire, « La France est un des principaux producteurs de chicorée à café ».

Malgré les critiques que nous avons formulées dans la deuxième partie de cet exposé, on voit que le décret français de 1965 sur le café a surtout pour nous été l'occasion de citer des dispositions de nature a donner satisfaction aux consommateurs.

Souhaitons qu'il en soit de même dans de nombreux pays et nous sommes certains que si c'est le cas, les producteurs, commerçants et torréfacteurs de café en bénéficieront autant que les consommateurs eux-mêmes.

CUSTOT (F.). — **Les consommateurs et la réglementation du café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 46-50.

Le point de vue des consommateurs sur la réglementation des cafés est exposé à propos de la présentation de la nouvelle réglementation française.

Celle-ci contient de nombreuses dispositions favorables aux consommateurs, qui sont rappelées, et quelques insuffisances qui sont présentées un peu plus en détail : incorporation non annoncée de la chicorée à certains cafés-boissons, information incomplète à propos des cafés solubles, retard à la promulgation des textes relatifs aux solvants pour cafés décaféinés, etc.

CUSTOT (F.). — **Consumers and coffee regulations.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin, 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 46-50.

The consumers' point of view on the regulations controlling coffee is examined having regard to the publication of the new French regulations.

The numerous clauses favouring the consumer are recalled and some shortcomings are examined in more detail : failure to mention the inclusion of chicory in certain coffee beverages, incomplete information regarding « instant » coffees, delays in publication of the legislation relating to the solvents used in decaffeinated coffees.

CUSTOT (F.). — **Die Verbraucher und die gesetzliche Regelung des Kaffees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 46-50.

Es wird der Gesichtspunkt der Verbraucher über die gesetzliche Regelung des Kaffees aus Anlass der neuen französischen Regelungen dargelegt.

Letztere enthalten zahlreiche für die Verbraucher günstige Verfügungen, auf welche hingewiesen wird, sowie einige Unzulänglichkeiten auf die näher eingegangen wird : nicht angemeldeter Zusatz von Zichorie zu Kaffeegetränken, unvollständige Auskunft über lösliche Kaffees, Verzögerung bei der Promulgierung der Regelungen über die Lösungsmittel für entcoffeinierte Kaffees, usw.

DISCUSSION

M. TELEGDY-KOVATS : I just want to put three short questions :

— What about the marketing of freeze-dried instant coffee ?
— By which method is it possible to find that 5 or 7 g of coffee have been used to prepare a cup of beverage ?
— By which method is it possible to control that 10 % chicory have been added ?

M. NAVELLIER : Je me permettrais de répondre à la place de M. Custot et de dire que l'appréciation analytique de la quantité de café mise en œuvre pour préparer la boisson ou la recherche de la proportion de chicorée utilisée posent des problèmes incomplètement résolus. L'analyse comparative du café mis en œuvre et des marcs épuisés apportent des éléments d'appréciation. Ils peuvent être utilement complétés par une enquête effectuée chez le débitant.

Ce problème analytique justifie avant tout la poursuite des recherches sur la chimie des cafés. C'est précisément là l'objectif de l'ASIC.

M. ILLY : Je voulais signaler qu'il a déjà été suggéré à Londres de modifier les statuts de l'OIC qui actuellement permettent de dénommer « café » du café mélangé à des produits de substitution. Si la suggestion de n'employer le mot café que pour un produit 100 % pur est retenue par le Conseil, l'enrobage et l'adjonction de chicorée feront qu'il ne sera plus possible d'appeler le mélange café. Le problème posé sera alors résolu de lui-même, car si l'OIC prend cette décision, c'est pratiquement une loi qui devra être immédiatement appliquée.

M. LEVENSON : I just want to point out that :

1) The green coffee/instant coffee ratio of the ICO was designated for statistical purposes ; it was not intended as a quality parameter.

2) When the expression « quality » is used it should be defined. « Quality » in coffee is personal and essentially esthetic, it should not be dictated, only the consumer can say what quality is.

M. ILLY : I regret not being completely in agreement with my friend Harold Levenson concerning quality. I think that there are internationally established values : prices of coffee are not equal and I think that there are some original approaches in establishing these different price levels. About quality itself, I am aware of the importance of quality in

consuming countries overwhelmed by a lot of products nowadays. Problem of over production is also a problem of under consumption and people drink coffee only if they find any pleasure doing so.

I agree with M. Levenson that it is very difficult to give a very precise definition of coffee quality : all over the world the different qualities of coffee are tasted as they are sold, but we, as specialists, know what is quality in coffee and we should do our best to improve quality for our consumers according to their tastes.

M. CALZOLARI : La base di commerciabilità del caffè può essere definita come per gli altri alimenti per quanto riguarda i difetti, l'umidità, la caffeina, ecc. Poi per quanto riguarda la valutazione di quel « surplus » che è dato dall' aroma, dalle caratteristiche organolettiche, ovviamente interverrà il consumatore per fare una scelta dalla quale dipende anche il prezzo del caffè.

QUALITY CONTROL IN COFFEE TRADE

REPRESENTATIVITY OF CONVENTIONAL AND STRATIFIED SAMPLING (*)

C. CALZOLARI, A. LOKAR
Istituto di Merceologia, Università di Trieste

THE FRENCH LAW

The exchange, the consumption and the manufacture of coffee have been regulated by a set of French laws, heading on the regulation n. 65-763 of the 3 rd September 1965 containing public administration rules regarding fraud repression (1), and also specifically the sampling control rules for green and roasted coffee beans.

As for green coffee there are the following dispositions :

a) the product must not contain stones or other foreign matter to an extent higher than 0.5 % ;

b) the product must not contain defective beans to an extent higher than 120 defects in a sample of 300 g.

In the part regarding the application of the rules a detailed description of the defective beans and the computation of defects are given. According to this the morphological and organoleptical features of the defects are described as follows :

Dry spoiled bean : bean of mossy look and verdigris colour.

Bean in cherry : dry fruit containing the partial or intact outer hull with or without beans.

Black bean : partially or entirely black bean whether on the outside or inside.

Sour bean : bean of waxy aspect and brown reddish colour, the cut of which has a foxy flavour.

Bean in parchment : bean partially or entirely hulled in its parchment.

Half black bean : bean of black colour over less than half of its volume.

White spongy bean : bean of white or whitish colour, spongy consistence ; it is similar to cork and brittle at nail pressure.

Dry bean : wrinkly, light bean of grayish look.

Unripe bean : not ripe bean of greenish colour and wrinkly surface.

White bean : white bean of low specifical weight.

Undesirable bean : bean of strange, spoiled aspect, not corresponding to any of the above mentioned definitions.

(*) Research carried out with the contribution of C.N.R. - Italy.

A. LOKAR



Scolyted bean : bean attacked by insects. To be considered defective it has to contain at least :

a) little holes or channels determined by berry borers (*Stephanoderes*) or other parasites ;

b) a single large hole determined by coffee weevils (*Araecerus*).

Shell (said Ear) : malformed bean of convex shape.

Broken beans : less than half of a bean.

Large skin or pod : part of cherry.

Small skin or parchment : part of parchment.

Large wood : piece of wood or stick of about 3 cm.

Middle wood : piece of wood or stick of about, 1 cm.

Little wood : piece of wood or stick of about 0.5 cm.

The list of the defects in the sample is the following :

	Defects
1 dry spoiled bean	2
1 bean in cherry	1
1 black bean	1
1 sour bean	1
2 beans in parchment	1
2 half-black beans	1
5 white-spongy beans	1
5 dry beans	1
5 unripe beans	1
5 white beans	1
5 undesirable beans	1
5 shells	1
5 broken beans	1
10 beans holed by scolyte	1
1 large skin or pod	1
3 small skins or parchments	1
1 large wood	2
1 middle wood	1
3 little woods	1

With regard to the beans with more than one defect the dispositions grade and put them in the class of the most defective beans.

The rules are completed by the following norm : independently from the tolerance which admits 120 defects in the sample of 300 g, there is a limiting number of defects for the following defective beans :

5 defects for the black beans,
5 — for the beans in cherry,
15 — for the broken beans,
15 — for the scolyted beans.

Classification of defects

The control technique proposed by the described rules may need first of all a rational scale of defects, as the described grading is mostly founded on business customs. Therefore the principle of « the maximum number of defective beans or other particles allowed in the sample of 300 g » may be used.

The classification according to this principle is shown in table I, while table II summarizes the same scale in four main defective classes, because some defects (black beans, beans in cherry, broken beans and holed beans) are reported twice, first when contributing to the defects ranging to 120 in the sample of 300 g (defects n° 4 in table I, and defects IV in table II) and second when grading with an independent and self tolerance number in the same sample (defects 1, 3 and 5 of table I and defects I, II of table II).

Table I therefore carries a grading of defective beans, whereas table II shows a hierarchy of defects according to the French law (1).

TABLE I

Classification of defective beans according to the maximum number allowed in a 300 g sample of coffee beans (average values)

Types of defective beans	c	p_c	$p_c \times 100\ \%$
	Maximum number of defective beans	Maximum defective fraction	Maximum defective percentage
1. Black beans, beans in cherry, and beans with more defects	5	0.002 8	0.28
2. Dry, spoiled beans, large woods	60	0.030 3	3.03
3. Broken beans	75	0.037 5	3.75
4. Sour beans, pods, large skins and middle woods	120	0.060 3	6.03
5. Holed beans	150	0.075 3	7.53
6. Beans in parchment and half-black beans	240	0.120 3	12.03
7. Small skins or parchments, little woods	360	0.180 3	18.03
8. White spongy beans, dry beans, unripe beans, white beans, undesirable beans, and shells	600	0.300 3	30.03

TABLE II

Classification of defects according to the maximum number allowed in a 300 g sample of coffee beans (average values)

Type of defect	c Maximum number of defects
I. — Black beans, beans in cherry and beans with more defects ..	5
II. — Foreign matter	0.5 % in weight
III. — Broken beans, holed beans	15
IV. — All others	120

Lot and sample of coffee

The described norms bear no clear distinction between coffee lot and sample.

In order to avoid confusion, hereafter the term « lot » will be used to indicate the whole batch of goods to be accepted, and the term « sample » to indicate the fraction on which the control will be carried out.

The sizes of the exchanged lots vary from case to case. SIVETZ and FOOTE (2) report that the uniform quality green coffee lots reaching the United-States are 250 bags and the storage bins are designed to accomodate this ammount of coffee or multiples of it. In Europe the coffee lots are expected to be much smaller. Some coffee dealers exchange limited lots too, which in certain extreme cases can reach one bag only. The weight of the bags varies according to SIVETZ and FOOTE (2) between 60 and 70 kg according to the origin of the lot.

As previously indicated, the sample to be controlled weighs 300 g which corresponds as an average to 2,000 beans, every green coffee bean weighing 0.150 g on average (2).

As to the drawing of the sample the described rule sets forth the following dispositions :

« Draw from the sample a specimen of 300 $\pm$ 0.5 g and weigh it to the precision of 0.1 g. The specimen has to be representative of the sample ».

The subsequent detailed description of the sampling analysis follows :

« Spread the sample totally or in multiple fractions on a smooth surface, preferably of orange colour. Examine the beans one by one on the whole surface.

Divide and collect in different vessels :

— the foreign matters of mineral origin (stones, nails, etc.) ;

— the foreign matters of vegetal origin (palmists, rice, maize, cloves, etc.) ;

— the foreign matters of animal origin (insects, excrements, etc.) ;

— the large woods and sticks of about 3 cm (from 2 to 4 cm) ;

— the medium woods and sticks of about 1 cm (from 0.7 to 2 cm) ;

— the small woods and sticks of about 0.5 cm (less than 0.7 cm) ;

— the large skins or pods (fragments of the pericarp) ;

— the small skins (less than a third of the outer hull) and the parchments (endocarp) ;

— the cherries or dry fruits containing the whole or part of the outer hull with one or more beans inside ;

— the parchment beans completely or partially covered by their parchment (endocarp) ;

— the various classes of defective beans according to the above mentioned definitions.

The results of this sampling analysis are to be computed as follows :

a) weigh separately with a 0.01 g precision the foreign matters of mineral, vegetal and animal origin. The sum of the three classes represents the total foreign matter ;

b) determine the number of defective beans according to the described grading ;

c) determine the number of defects according to French-law rules ;

d) evaluate the redhibitory defects separately.

We may show however that the described dispositions do not specificate in any way either the size of this sample, or the form of the drawing from the lot. Only at point 2) of the norms we can find a reference which regards the opening of the vessel containing the sample to be analyzed. Various interpretations are thus possible. For instance :

1) the sample is one of the bags of the lot ;

2) the sample will be formed by a series of extractions of variable but not precised sizes ;

3) the sample will be obtained by drawing from all the units of the lot.

The present paper deals with the following problem : how may the factors which are influencing the considered sample representativity reflect the real lot composition. The inaccuracy of the text makes the problems more difficult, and so from now on this paper will refer mainly to the representativity of the 300 g sample, the defects of which are pointed out.

SAMPLE REPRESENTATIVITY AND RISKS

The term « representative » may be explained by stating that the sample drawn from the lot must reflect the real lot composition in order to declare the lot « good », when it is really good, or to declare it « bad » when it is really so.

Now, it is necessary to express this problem in probabilistic terms. In fact, what is the probability for a sample to be representative of the lot, and which is the best sampling technique in order to ensure the maximum accuracy in the evaluation of the lot quality in the given conditions ?

As for this the French rules recommend only to « draw a representative sample », but they have not further specifications which may lead the quality inspector to the most suitable sampling procedure in the control of coffee lots. Lacking additional information, the fulfilment of the representativity requirements is left to the subjective opinion of the controller itself. This fact may not lead him to the « best representativity » but rather to « the drawing of a sample which may cause the least trouble » in the given conditions and as last consequence to some danger of not recognizing the real lot composition. Two types of wrong decisions may occur :

a) Errors of first kind : the sample composition is actually worse than the lot composition is. An acceptable lot may be rejected or declared « bad ». Commonly the probability of such an error is called « producer's risk ».

b) Errors of second kind : the sample composition results better than the lot composition. An unacceptable lot may be accepted as good. This probability is commonly called « consumer's risk ».

It may be proven (3) that it is possible to reduce these risks when the elements of the sample are collected at random from the various parts of the lot. In this particular case, however, such a procedure seems somewhat burdensome, as it requires considerable time and application. Actually, it may be preferable to draw the beans in some portions and cumulate them, till the total sample weight prescribed by the norms (e. g. 300 g) is reached.

When the lot is surely homogeneous this procedure may easily satisfy the conditions of representativity. In fact, when homogeneity occurs the defective composition in the lot does not vary between the various parts of it and is the same in every bag. So, in this case, representativity is reached also with a sample drawn in any way e. g. even when it is completely drawn from a single bag. In a homogeneous matter a sample of sufficient size may always reflect the exact composition of the product.

On the contrary, when the lot is heterogeneous as to the number and gravity of defects, the described subjective procedure may not reflect with the same probability the total lot composition and errors are likely to occur, as we have previously shown.

Hence a first rule for the sampling procedure may be stated : when the homogeneity degree is unknown, it is always convenient to carry out the inspection as closely as possible to the simple random sampling scheme, which even permits to submit the procedure in mathematical form, so as to obtain a rational determination of the risks involved in the control operation.

Commonly, the probabilistic model of the BERNOULLI process is used to this purpose. According to it a random sample of n pieces may be drawn from a lot of infinite pieces (3). Actually the latter condition is never thoroughly reached, as the sizes of the lots are always finite. However it is well enough approximated, when the lot size N is at least ten times larger than the sample size n. This condition is verified in the coffee field, where the smallest lot (**1** bag) carries averagely **400,000** beans, against the **2,000** average beans of the sample of **300** g.

Hence, the following equation may be used, which gives the cumulative probability of drawing, according to the BERNOULLI scheme, **c** defective beans in a sample of **n** beans from a lot with a fraction **p** of defective beans :

$$\sum_{i=0}^{c} \binom{n}{i} p^i q^{n-i} = \gamma(p) . \qquad (1)$$

In the above equation **n** is the sample size, **c** the maximum allowable number of defective pieces in the sample of size **n** (see tables I and II), **p** the defective fraction in the lot, γ (**p**) the corresponding acceptance probability, while **q** equals **1-p**.

The computation of formula (1), given the parameters required, is somewhat burdensome, especially when **n** is too large. So it is preferable to calculate it through valid approximations. For values of **p** smaller than **0.1** (**10** % defects in the lot) the WILSON-HILFERTY (4) (5) approximation may be used :

$$Z_{1-\gamma} \simeq 3 \sqrt{1+c} \left[1 - \sqrt[3]{\frac{2np}{2+2c}} - \frac{1}{9(1+c)} \right] \qquad (2)$$

while for larger values of **p** (more than **10** % defects in the lot) the normal approximation is sufficient (3) (5).

$$Z_{1-\gamma} \simeq \frac{\frac{c+0,5}{n} - p}{\sqrt{pq/n}} \qquad (3)$$

When the values of $z_{1-\gamma}$ are known, it is easy to determine the acceptance probability γ **(p)** by means of the standard normal distribution tables (6), namely by the computation of the function :

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{Z_{1-\gamma}} e^{-\frac{1}{2}\xi^2} d\xi = \Phi \left[\frac{\frac{c + 0,5}{n} - p}{\sqrt{pq/n}} \right]. \quad (4)$$

The thus determined acceptance probability values plotted against the lot defective fraction (or simply lot percentage of defects) give rise to the family of curves shown in figures 1 and 2. Each of them represents the plot of the acceptance probability against lot defective fraction **p**, for a random sample of **2,000** beans and independently for any group of defects shown in table I.

The values of the risks involved for every defect type may be deduced by means of the following argumentation : when the sampling is surely representative, the acceptance probability equals **1** (certainty of acceptance) for all defective fractions larger than $\mathbf{p}_c$. The plot of this acceptance probabilities is shown in the figures 1 and 2 by the dotted lines. Instead, when inspection is fulfilled by means of a sample drawn at random from the lot, errors are likely to occur in the evaluation of the lot composition, and the corresponding acceptance probability decreases as shown by the set of continuous curves of the figures 1 and 2. These curves are according to **n**, the size of the sample involved, and to **c** the maximum allowable number of defects in the sample, approximations of the dotted lines, e. g. ideal representativity. At the same time risks are presented as shaded probability areas included between the dotted and the continuous curves in the figures. So the risks may be read directly from the charts.

Nevertheless the examination of the whole set of the calculated curves shows that the risks involved in the random sample of size **2,000**, according to the French law, are moderately large only in a small interval around the lot critical defective percentage (or fraction) $\mathbf{p}_c$, tending quickly to zero for remoter points on the graph. In other words, the discriminatory power between good and bad lots, as proposed by the French rules, may be considered fairly good, when the sample is drawn at random from the lot or, as it has been previously shown, when the lot composition is homogeneous.

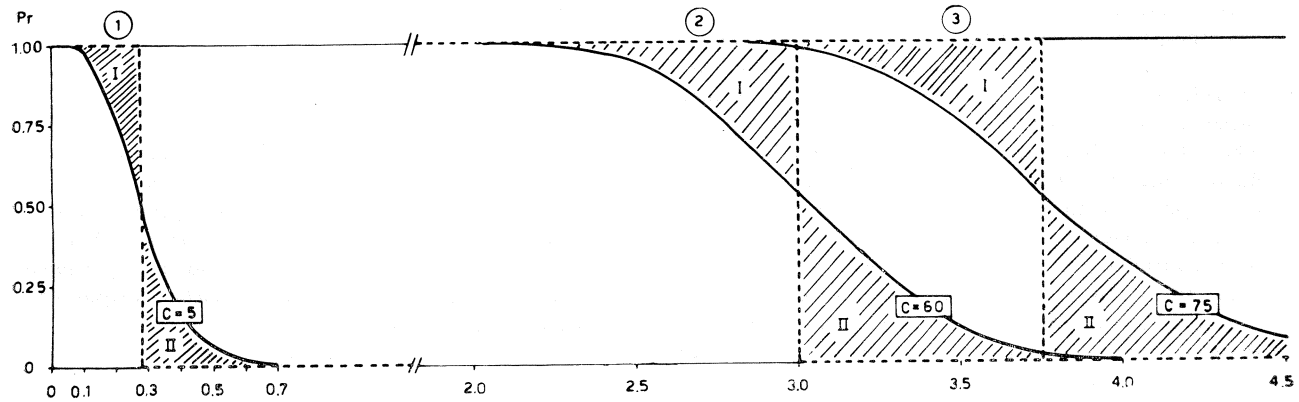


Fig. 1. — *Acceptance probability curves : n = 2,000, defects 1, 2, 3, according to table I*
Dotted lines : perfect representativity. Shaded areas : risks of I and II kinds

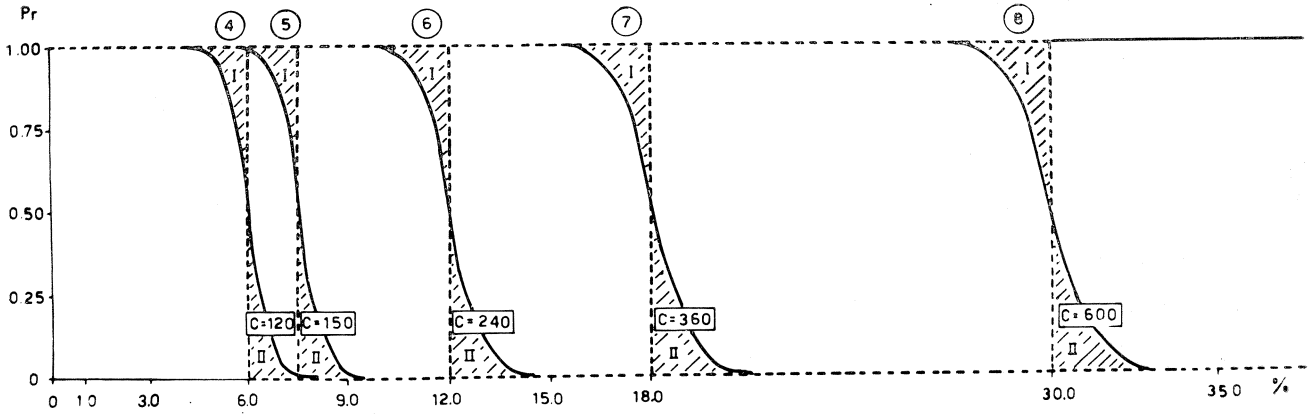


Fig. 2. — *Acceptance probability curves : n = 2,000, defects 4, 5, 6, 7, 8, according to table I*
Dotted lines : perfect representativity. Shaded areas : risks of I and II kinds

But, as we have already emphasized, the first condition is not likely to be realized in the inspection of a product as coffee, while the second cannot be easily generalized. Perhaps it is possible for some exchanged lots to be really and thoroughly homogeneous, but it seems doubtfull whether this may happen in every case.

Therefore, hereafter we propose another inspection technique which may show a better behaviour in the presumption of heterogeneity.

STRATIFIED SAMPLING

When heterogeneity is supposed in the population of a product, the presence of sub-populations is presumed and each of these assumes a different composition value **p**. Calling « strata » the parts of the product which may be considered internally homogeneous, the inspection procedure is said « stratified » when the sample is obtained as a total of partial samples, drawn at random from the various strata.

The maximum advantage of this procedure is reached (7) when stratification really succeeds in isolating the homogeneous zones internally to the strata so that their boundaries coincide with the discontinuity breaks in composition of the product.

Of course this is possible only if the quality inspector has some previous knowledge about lot composition, but unfortunately this cannot be assumed as a general rule. Therefore, it is useful to establish some stratification principle of more general character, to be applied also when there is little or no previous knowledge about the exchanged goods. Such a criterion is actually offered by the pre-existing commercial subdivision of the coffee bulk in a certain number of bags; all the more as the largest discontinuities (when they do happen) are to be found among the bags rather than within them.

When the bag number is large this criterion may be somewhat enlarged with the inclusion of two or more adjacent bags in the single strata and with a random partial sampling from them, but unfortunately also with some loss on the precision of the estimation of the lot composition.

In order to give an analytical form to these ideas we introduce the notation according to COCHRAN (7) :

N_h — number of pieces in a stratum,
N — total number of pieces in the lot,
$W_h = \frac{N_h}{N}$ — stratum weight,
H — number of strata,
p_h — defective fraction in the stratum h,
n_h — partial sample,
n — total sample.

When the strata are simply formed by bags, or bag clusters, of equal size, N_h is equal on average in all the strata, and the total number of pieces in the lot is then given by $N = H N_h$, while the stratum weight becomes :

$$W_h = \frac{1}{H} .$$

The sampling within the strata is considered by the stratification technique as a random one, but it can be seen clearly how the presumption of internal homogeneity makes the actual form of the drawing of little importance. The inspection becomes therefore more rapid and simple, as it does not seem necessary to pick up an average of 2,000 coffee beans at random from the lot. Perhaps this also has the economic advantage of saving time. As a rule, the size of the partial sample to be drawn from the single stratum may be determined (7) by the optimum allocation method, based on the optimization of the sampling costs or else, by the NEYMAN allocation, derived from the former, according to the following formula :

$$n_h = n \frac{W_h S_h}{\Sigma W_h S_h}$$

However in this particular case, these allocations are not easily applicable, as (a) the sampling cost does not burden too much on the coffee inspection procedure and may be neglected and (b) as the variance within the strata is « a priori » unknown. So the « proportional allocation » may be used and the partial sample size determined simply by :

$$n_h = n W_h$$

which in the present case reduces to :

$$n_h = n/H$$

where H is the number of strata.

The precision of the stratified sample

The precision of a sampling estimation for percentages or defective fractions is measured by the variance V (p) ; which in the particular case is given by (7) :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{N^2} \sum_{h=1}^{H} \frac{N_h^2 (N_h - n_h)}{N_h - 1} \frac{p_h q_h}{n_h} \qquad (4)$$

where the sum extends over all strata. If we consider that $N_h > \mathbf{10}\, n_h$ the finite population correction may be ignored, as previously stated. When we further intro-

duce the above described notation and develop formula (4) we obtain for the stratified variance the following simpler equation :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{Hn} \Sigma\, p_h\, q_h \qquad (5)$$

where the sum still extends over all strata.

Now, it is necessary to introduce a systematical criterion of heterogeneity which may be likely to occur in the trade of coffee, in order to determine the risk curves for the case of the stratified procedure.

For this purpose it may be supposed that the exchanged lots are formed by two or more different types of product : some of these are better and some worse than $\mathbf{p_c}$, e. g. the maximum allowable level of defects in the lot. The various types of coffee are then separately put in the bags (for instance because the sources are different) and then the bags mixed in proportions such as to reach the tolerance limit $\mathbf{p_c}$. This situation is likely to occur when the coffee producer is not 100 % trustful. The resulting lot composition after such a procedure, is not suitable to be sampled at random. This is evident from the high risk values of lot defective fraction in every small interval around $\mathbf{p_c}$, as shown in the figures 1 and 2.

Would the stratified sample behave better than the simple random one ?

If $\mathbf{g_i}$ is the fraction of **the lot** with homogeneous composition $\mathbf{p_i}$, the described heterogeneity condition may be shown as :

$$\sum_{i=1}^{l} g_i\, p_i \simeq p_c \qquad (6)$$

where $\sum_{i=1}^{l} g_i \simeq 1$, and l is the number of homogeneous zones or parts in the lot. The various defective fractions $\mathbf{p_i}$ depend on the following relation :

$$0 \leqslant p_1 \leqslant \cdots \leqslant p_{i-1} \leqslant p_c \leqslant p_i \leqslant \cdots \leqslant 1 \qquad (7)$$

If we remember formula (5) the variance is :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{Hn} \sum_{h=1}^{H} p_h\, q_h$$

If we suppose uniformity in every zone of H g_i strata we obtain :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{Hn} \sum_{h=1}^{H} Hg_i\, p_i\, q_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{l} g_i\, p_i\, q_i \qquad (8)$$

Every term of (7) may be then divided by p_c :

$$0 \leqslant \frac{p_1}{p_c} \leqslant \cdots \leqslant \frac{p_i}{p_c} \leqslant 1 \leqslant \frac{p_{i+1}}{p_c} \leqslant \cdots \leqslant \frac{1}{p_c}$$

in order to obtain :

$$0 \leqslant k_1 \leqslant \cdots \leqslant k_i \leqslant 1 \leqslant k_{i+1} \leqslant \cdots \leqslant \frac{1}{p_c}$$

when $p_i = k_i\, p_c$. If we remember that $q_i = 1 - p_i$ the variance (8) becomes :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{l} g_i(p_i - p_i^2)$$

and if we introduce the k_i values in this formula the result is :

$$V(p_{st}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{l} g_i[k_i\, p_c - k_i^2\, p_c^2]$$

$$= \frac{p_c\, q_c}{n} \sum_{i=1}^{l} \frac{g_i[k_i - k_i^2\, p_c]}{1 - p_c}.$$

Lastly if we state :

$$\sum_{i=1}^{l} \frac{g_i[k_i - k_i^2\, p_c]}{1 - p_c} = \omega \qquad (9)$$

we finally have a simple formula for the stratified sampling variance in this case :

$$V(p_{st}) = \frac{p_c\, q_c}{n}\, \omega \qquad (10)$$

The variance of equation (10) is similar to the same statistics in the simple random case. The difference is merely in the factor ω which multiplies (10) and represents the homogeneity degree of the lot.

In fact, when the lot is thoroughly homogeneous, all the $\mathbf{p_i}$ values are equal to $\mathbf{p_c}$, and the constants $\mathbf{k_i}$ are equal to **1**, so that $\omega = \sum_{i=1}^{l} g_c$, which is approximately **1**, according to definition. However when the lot is thoroughly heterogeneous, some values of $\mathbf{p_i}$ are zero, and others are **1**, so that the constants $\mathbf{k_i}$ are either zero or $\frac{1}{\mathbf{p_c}}$ and the sum (9) is always zero.

Therefore in the intermediate heterogeneity cases it will be :

$$0 < \omega < 1$$

and as a consequence of the presence of ω in the formula (10) the variance interval for stratified sampling becomes :

$$0 \leqslant V(p_{st}) \leqslant V(p)$$

This relation shows that the stratified sampling estimation owns a higher degree of precision than the simple random one.

Formula (10) permits also to determine the risk curves in the case of stratified sampling. Remembering for-

mulas (1), (3) and (4), it is sufficient to introduce the new variance value in any of the equations which express the acceptance probability. When $\mathbf{p} > \mathbf{0.1}$ this is a simple matter :

$$\gamma(p) = \Phi\left[\frac{\frac{c + 0{,}5}{n} - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}\,\omega}}\right]$$

but as $\mathbf{p_c} = \frac{\mathbf{c + 0.5}}{\mathbf{n}}$, then it becomes :

$$\gamma(p) = \Phi\left[\frac{p_c - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}\,\omega}}\right]. \qquad (11)$$

If the points on the γ **(p)** curve are already known for the simple random procedure, it is not difficult, given formula (11), to state approximately the same probability points on the stratified sampling curve. If we equal the acceptance probabilities in both cases this may be written :

$$\frac{p_c - p}{\sqrt{pq/n}} = \frac{p_c - p'}{\sqrt{p'\,q'/n\omega}}$$

where $\mathbf{p'}$ is the lot defective fraction in the stratified case while $\mathbf{p}$ is the same value in the simple random one.

But $\mathbf{p} > \mathbf{0.1}$ as we have already stated, and $\mathbf{p'}$ is close to $\mathbf{p}$; then we have also :

$$\sqrt{\frac{pq/n}{p'\,q'/n}} \simeq 1$$

so that :

$$p' \simeq p_c - [p_c - p]\,\sqrt{\omega}$$

which is a simple formula to calculate $\mathbf{p'}$ when $\mathbf{p'_c}$ and ω are known, and when a point $\mathbf{p}$ with same acceptance probability γ **(p)** is known.

The above ideas are exemplified in figure 3, where the acceptance probability curves obtained from the points of curve number 6 in figure 2 (beans in parchment and half-black beans, or defects IV, tab. I and II) by the simple principle exposed, at different homogeneity degrees in the lot are traced. It may be clearly seen that the shape of this curve becomes steeper and the risk area compressed closer to the full representativity lines, and perhaps it can be seen that the accuracy of inspection increases with increasing heterogeneity when stratified sampling is adopted.

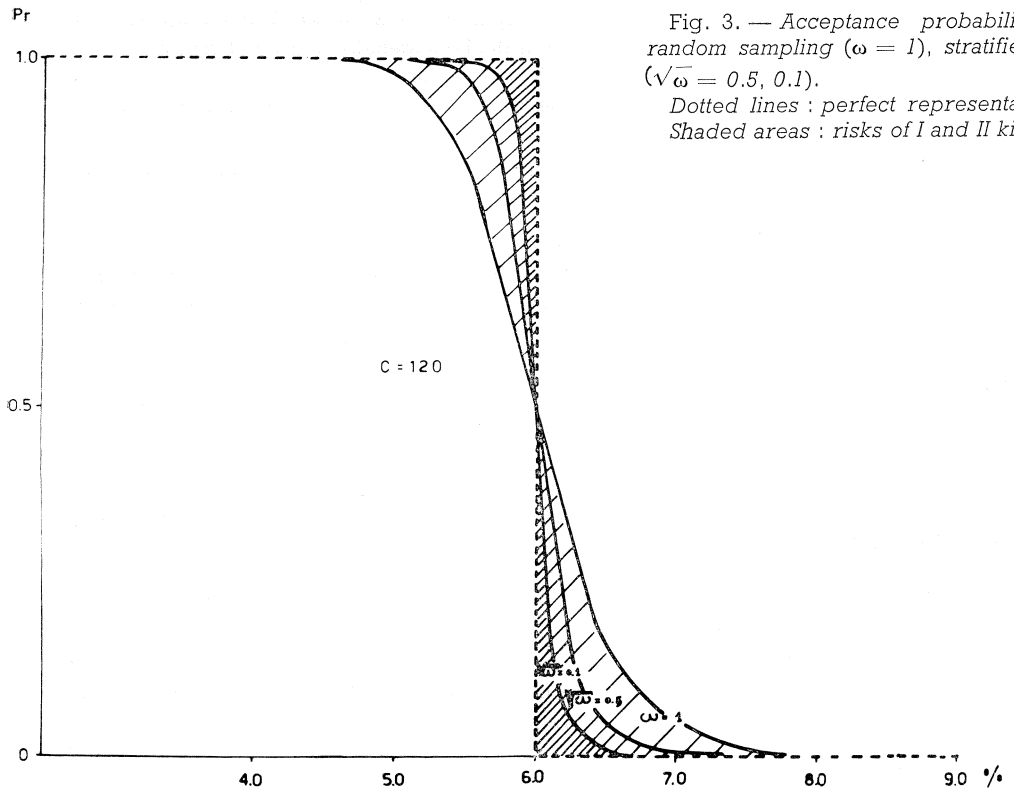


Fig. 3. — *Acceptance probability curves : simple random sampling* ($\omega = 1$), *stratified random sampling* ($\sqrt{\omega} = 0.5, 0.1$).
Dotted lines : perfect representativity
Shaded areas : risks of I and II kinds

Conclusions and rules of the stratified sampling procedure

The major objection which is commonly directed against the stratified procedure is of economic order, as in some cases this type of inspection may involve higher costs than the simple random one.

In the case treated in the present paper however, it seems that a stratified sample may not burden the business operator substantially.

Moreover the proposed technique shows some psychological advantages over the conventional one, especially if we consider the lack of information in the sampling procedure stated by the French laws. In fact, we think that the more detailed specification required to carry out the stratified inspection may prove itself particularly valuable in the business field, where simple rules are prefered ; rules which leave no space to subjective interpretations, disagreements and diatribes regarding the propriety of the decisions taken.

For the carrying out of the stratified procedure it is necessary only :

1) To subdivide the lot which must be controlled into strata of equal size.

a) if an aprioristic criterion of stratification is given, this principle may be used (for instance, when the lot can be divided in two or more parts according to different origins) ;

b) in general the strata may coincide with the single bag,

c) when the number of bags is very large, cumulate in every stratum an equal number of adjacent bags.

2) When H, the number of strata is known, draw at random from every stratum a portion of beans equal to :

$$\frac{\text{Size of the total sample (e. g. 300 g)}}{H}$$

combine the partial samples and carry out the inspection on the total, as described in the first paragraphs of the paper.

REFERENCES

1. JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE.
   — Décret nº 65-763 du 3 septembre 1965 portant règlement d'administration publique pour l'application de la loi du 1er août 1905 modifiée sur la répression des fraudes dans la vente des marchandises et des falsifications des denrées alimentaires en ce qui concerne le café.
   — Arrêté d'application du décret nº 65-673 du 3 septembre 1965 relatif au café et établissant la description des fèves défectueuses et le barème de calcul des défauts des cafés verts et torréfiés.
2. M. SIVETZ, H. E. FOOTE. — Coffee Processing Technology, ed. : The Avi Publishing Company Inc., Westport, Conn., 1963.
3. C. CALZOLARI, A. LOKAR. — Controllo statistico di Qualità dei materiali di confezionamento. Atti del III Convegno sulla Qualità, Perugia 1964.
4. E. B. WILSON, M. M. HILFERTY. — The Distribution of Chi Square, Proc. Nat. Acad. Sci., Washington 17, 1931, 684-688.
5. A. LOKAR. — Sul controllo campionario all'accettazione di lotti di articoli e sulla valutazione della sua utilità. *Rass. Chimica*, 5, 1965.
6. A. HALD. — Statistical tables and formulas. Ed. Wiley & Son inc., 1952.
7. W. G. COCHRAN. — Sampling techniques. II ed., Wiley & Son inc.

CALZOLARI (C.), LOKAR (A.). — **Le contrôle de la qualité dans le commerce du café : représentativité des échantillons traditionnel et stratifié.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 51-60, fig., tabl., réf.

Dans le commerce du café, il est important de définir les caractéristiques de qualité des lots faisant l'objet de trac-

CALZOLARI (C.), LOKAR (A.). — **Quality control in coffee trade : representativity of conventional and stratified sampling.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 51-60, fig., tabl., réf.

In coffee trade it is important to define the quality characteristics of the exchanged lots by means of a sampling

CALZOLARI (C.), LOKAR (A.). — **Qualitätskontrolle im Kaffeehandel : die Repräsentativität der herkömmlichen und der Schichtstichproben.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 51-60, fig., tabl., réf.

Im Kaffeehandel ist es wichtig, die Qualitätskennzeichnung der Handelslose durch Prüfung von Stichproben

tations par l'examen d'échantillons. En France, cette question est régie par la loi nº 65-763 du 3 septembre 1965.

On expose dans la présente étude les risques qu'entraîne le choix de la méthode d'inspection en prenant en considération les différents facteurs entrant en jeu et on envisage la possibilité de substituer à l'échantillon conventionnel un échantillon stratifié de même importance.

Les calculs de probabilité prouvent qu'il n'y a pas de risques de différence entre les caractéristiques de l'échantillon et celles du lot si le lot examiné est homogène, mais si le lot est hétérogène, les risques sont moindres lorsque l'on effectue un échantillonnage stratifié, car dans ce cas l'évaluation de la fraction défectueuse est plus exacte.

C'est pourquoi, l'homogénéité d'un lot ne pouvant être présumée à priori dans le cas de lots de café du commerce, il semble préférable d'exécuter l'échantillonnage sous la forme stratifiée.

technique. In France the question has been regulated by law nº 65-763 of 3rd September 1965.

The paper deals with the risks which arise from the choice of this inspection method considering the various factors involved and the possibility of substituting the conventional sample with a stratified one of the same size.

From a probabilistic standpoint it is possible to prove, that there are no risk differences if the inspected lot is homogeneous, while for a heterogeneous one, the risks prove to be lower for stratified sampling as the estimation of the lot defective fraction is more accurate in this second case.

Hence, as homogeneity cannot be presumed *a priori* for the traded lots, it seems more convenient to execute the inspection in stratified form.

zu bestimmen. In Frankreich unterlieg diese Frage dem Gesetz nº 65-763 vom 3. September 1965.

In dieser Arbeit wird das Risiko der Wahl einer Untersuchungsmethode, welche die verschiedenen in Frage kommenden Faktoren in Betracht zieht, geprüft und die Möglichkeit erwogen, die herkömmliche Stichprobe durch eine Schichtstichprobe des selben Umfangs zu ersetzen.

Die Wahrscheinlichkeitsrechnungen beweisen, dass ein Unterschied zwischen den Kennzeichen der Stichprobe und denen des Loses nicht zu befürchten ist, wenn das geprüfte Los homogen ist ; im Falle eines heterogenen Loses jedoch ist das Risiko kleiner, wenn eine Schichtstichprobeentnahme vorgenommen wird, denn die Einschätzung des Fehlbruchs ist dann genauer.

Da die Homogeneität eines Loses des handelsüblichen Kaffees *a priori* nicht vermutet werden kann, ist es daher vorzuziehen, die Stichprobeentnahme unter der Schichtform durchzuführen.

DISCUSSION

M. CASTAN : En ma qualité de représentant de l'ISO, je voudrais insister sur l'importance du problème de l'échantillonnage afin de permettre au laboratoire de recevoir un échantillon représentatif et de considérer que les résultats analytiques correspondent bien aux caractéristiques du lot examiné.

Un avant-projet sur l'échantillonnage du café en sacs a été proposé à l'ISO par l'Argentine ; dans le cadre de la liaison existant entre l'ISO et l'ASIC, il serait souhaitable que l'ASIC puisse participer à l'élaboration de la future Recommandation ISO sur l'échantillonnage du café.

LA NORMALISATION INTERNATIONALE DU CAFÉ

entreprise par l'Organisation Internationale de Normalisation en liaison avec l'A. S. I. C.

G. CASTAN
Association Française de Normalisation, Paris

L'ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Lors du premier colloque sur la chimie du café, j'ai eu le plaisir de présenter aux participants l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), et de leur préciser son objet et ses projets en ce qui concerne le café qui, en raison de la place importante qu'il occupe dans le commerce international, ne pouvait pas laisser indifférente la normalisation internationale.

Je voudrais rappeler ici brièvement que l'Organisation Internationale de Normalisation est une fédération des organismes nationaux de normalisation représentant aujourd'hui soixante et un pays :

Albanie, Allemagne, Argentine, Australie, Autriche, Belgique, Brésil, Bulgarie, Canada, Ceylan, Chili, Colombie, Corée Nord et Sud, Cuba, Danemark, Espagne, Etats-Unis, Finlande, France, Ghana, Grèce, Hongrie, ICAITI (*), Inde, Indonésie, Iran, Irak, Irlande, Israël, Italie, Japon, Liban, Maroc, Mexique, Norvège, Nouvelle-Zélande, Pakistan, Paraguay, Pays-Bas, Pérou, Pologne, République Arabe Unie, Portugal, République d'Afrique du Sud, Roumanie, Royaume-Uni, Singapour, Suède, Suisse, Thaïlande, Tchécoslovaquie, Turquie, URSS, Venezuela, Yougoslavie.

En outre, sept pays sont actuellement membres correspondants : Barbade, Chypre, Hong-Kong, Koweit, Madagascar, Malte et Syrie, et des organismes nationaux de normalisation sont en voie de constitution dans d'autres pays francophones d'Afrique.

L'ISO est donc une organisation non gouvernementale qui jouit du statut consultatif auprès des Nations-Unies pour tout ce qui concerne la normalisation.

Son objet est de favoriser le développement de la normalisation dans le monde, afin de faciliter les échanges entre les nations, grâce à l'établissement d'un langage commun et à la fixation de spécifications d'aptitude à l'emploi des produits.

Parmi les cent vingt-deux comités techniques constitués pour discuter des divers domaines d'activité, un comité s'occupe des produits agricoles alimentaires, le comité ISO/TC 34, dont le secrétariat est assuré par la Hongrie, et dont le Président est le Professeur TELEGDY-KOWATS.

Ce comité a constitué huit sous-comités dont un, le n° 8, s'occupe des stimulants.

LE GROUPE DE TRAVAIL ISO/TC 34/SC 8/GT 2 SUR LE CAFÉ

Ce sous-comité ISO/TC 34/SC 8 sur les stimulants fut constitué lors d'une séance tenue à la Nouvelle-Delhi le 12 novembre 1964, et M. DUVAL, directeur général technique de l'AFNOR, put l'annoncer lors du second colloque.

Ce sous-comité vit son secrétariat attribué à l'Inde, et lors de cette réunion constitutive, il fut décidé de créer un groupe de travail spécial pour étudier le café, le GT 2. Son secrétariat fut confié à l'Argentine en sa

(*) Regroupant Costa-Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panama.

qualité de secrétaire général du Comité Panaméricain de Normalisation.

Le groupe de travail « café », comprend actuellement dix membres participants : Argentine, Belgique, Etats-Unis, France, Hongrie, Inde, Pakistan, République Arabe Unie, Royaume-Uni, U. R. S. S., et onze membres observateurs : Allemagne, Colombie, Cuba, Espagne, Iran, Israël, Madagascar, Pays-Bas, Pérou, Pologne, Tchécoslovaquie.

Tout est fait cependant pour associer à ces travaux les principaux pays producteurs en attendant leur participation active, afin que les décisions qui sont prises représentent à la fois les intérêts des producteurs et des utilisateurs.

Par ailleurs, le groupe de travail assure une liaison étroite avec trois organisations internationales, l'ASIC, l'Organisation Internationale du Café (ICO), ainsi que la FAO et par celle-ci la commission FAO/OMS du Codex Alimentarius.

Je voudrais insister particulièrement sur cette liaison avec l'ASIC, décidée lors de la première réunion du groupe de travail ISO à Ankara en mai 1966, et à laquelle assistait le bureau complet de l'ASIC.

Cette liaison a été depuis officialisée et ces liens confiants ont montré très vite leur efficacité, comme nous le verrons plus loin.

Le groupe de travail ISO doit tenir sa seconde réunion à Moscou le 14 juin 1967.

LES TRAVAUX RÉALISÉS ET EN COURS

Malgré la jeunesse de ce groupe de travail ISO, il est possible d'établir dès maintenant un bilan positif.

Terminologie

La fixation d'un langage commun étant la source première de compréhension dans le commerce international, il était normal que, lors de sa première réunion, le groupe de travail inscrive cette question à son programme de travail ; il décida de l'étudier en liaison avec l'ASIC.

L'établissement d'un tel vocabulaire doit cependant être un travail d'équipe auquel doit s'associer également l'ICO. Toutefois, l'Organisation Internationale de Normalisation, et par suite son groupe de travail « café », semble l'organe le plus approprié pour prendre la responsabilité de l'étude, en raison de la grande expérience de cette organisation en matière d'établissement de vocabulaires techniques dans tous les domaines, expérience guidée par le comité technique ISO/TC 37 chargé spécialement des principes et de la coordination en matière de terminologie.

Une première liste de termes et de définitions fut alors préparée en France par des experts participant à la fois aux travaux de l'ISO et de l'ASIC, et soumis au groupe de travail ISO, ainsi qu'aux organisations internationales (ISO/TC 34/SC 8/GT 2 (France-4) 9).

Un vocabulaire est une liste de termes et de définitions. Son objet est de définir des notions et d'indiquer les termes corrects et les équivalents dans les trois langues officielles de l'ISO : anglais, français, russe, et éventuellement dans d'autres langues. Il y a lieu de bien distinguer le vocabulaire de la spécification, et à ce sujet la définition des différents défauts du café ne serait pas en opposition avec certaines propositions constructives formulées par M. ILLY et Mlle RUZZIER ; il est en effet possible de définir toutes les défectuosités et de grouper ensuite certaines d'entre elles lors de l'établissement d'une classification des cafés, et ceci dans un souci louable de simplification.

D'autre part, un vocabulaire peut difficilement être établi en une seule fois, et il est préférable de travailler par étapes, c'est ce qui a guidé les experts français.

Cette première liste comprend deux groupes de définitions. Le premier concerne les termes généraux du commerce, le second vise plus particulièrement les défectuosités. Elle ne constitue donc qu'une première étape dans l'établissement de ce vocabulaire.

Cet avant-projet doit être discuté à Moscou, et le groupe de travail sera très intéressé de connaître les remarques éventuelles de l'ASIC, afin d'arriver à un vocabulaire commun ISO-ASIC.

Echantillonnage

MM. CALZOLARI et LOKAR ont déjà insisté sur l'importance de la représentativité de l'échantillon pour laboratoire. Cet intérêt est aussi manifesté par l'ISO, c'est pourquoi l'échantillonnage du café vert fut inscrit au programme de travail lors de la première réunion du groupe ; l'Argentine fut chargée de faire une proposition. Celle-ci (ISO/TC 34/SC 8/GT 2 (Secrétariat-5) 10) ne concerne actuellement que les lots de café vert en sacs, les lots en vrac devant être étudiés ultérieurement. Il serait là aussi très utile que l'ASIC puisse se joindre à ce travail ISO.

Méthodes d'essais

Le travail réalisé dès le premier colloque sur la chimie du café, permit au groupe de travail ISO de discuter lors de sa première réunion de méthodes d'examen du café vert en grains.

Trois avant-projets purent ainsi être présentés :

— le premier concernant l'examen olfactif, l'examen visuel, la détermination de la masse moyenne de 1 000 grains, l'examen granulométrique et l'examen macroscopique pour la détermination des défectuosités.

— le second concernant une méthode de référence pour le dosage de l'eau.

— le troisième concernant une méthode pratique pour le dosage de l'eau.

Ils furent acceptés et ont depuis été soumis au vote des membres participants du comité ISO/TC 34.

Si ce vote confirme la décision du groupe de travail, ils seront soumis comme « projets de recommandations » à l'accord des cinquante-six comités membres de l'ISO.

Le dosage de la caféine qui intéresse au premier chef le groupe « café », était aussi au programme du groupe de travail « thé » constitué également au sein du sous-comité ISO/TC 34/SC 8 « stimulants ». Aussi a-t-il été décidé d'examiner cette question sur un plan plus général et l'aide que pourra apporter l'ASIC pour arriver à résoudre ce problème sera très appréciée.

CONCLUSION

La normalisation internationale du café est donc en bonne voie et l'on peut espérer voir se concrétiser prochainement les premiers résultats.

Seul cependant, un travail d'équipe auquel participeront des organismes à caractère scientifique, professionnel, intergouvernemental ou même général comme à l'ISO, où toutes les branches d'activité précitées se trouvent réunies et confrontées, permettra de résoudre les difficultés rencontrées et de rendre ainsi le service attendu par tous ceux qui s'intéressent au café.

CASTAN (G.). — **La normalisation internationale du café entreprise par l'organisation internationale de normalisation en liaison avec l'A. S. I. C.** — Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 61-63.

Lors du premier colloque sur la chimie du café, les projets de l'organisation internationale de normalisation (ISO) en matière de café furent présentés.

La création du groupe de travail ISO/TC34/SC8/GT2 « café » à secrétariat argentin fut annoncée lors du second colloque au cours duquel les grandes lignes du programme de travail furent précisées.

Il est possible maintenant de faire un premier bilan des réalisations acquises et des travaux en cours en matière de terminologie, d'échantillonnage et de méthodes d'essais.

Tous ces résultats et ceux qui s'annoncent ne sont possibles que grâce au travail d'équipe réalisé par l'ISO et l'ASIC à la suite de la décision de liaison officielle qui est entrée en pratique de manière efficace et confiante.

CASTAN (G.). — **The International standardization of coffee undertaken by the International organization for standardization in co-operation with A. S. I. C.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 61-63.

At the time of the first conference on the chemistry of coffee, the plans of the international organization for standardization affecting coffee were proposed.

The setting up of a study group ISO/TC34/SC8/WG2 « coffee » the secretariat of which has been entrusted to Argentine was announced at the second conference during which the broad outlines of the work programme were laid down.

It is now possible to draw up a preliminary report on the results achieved and the work in hand, on terminology, sampling and experimental methods.

All these results and those still to come, were only made possible by the team work of the ISO and the ASIC following the decision to officially link up these two bodies, a liaison which now functions with efficiency and assurance.

CASTAN (G.). — **Die internationale Normalisierung des Kaffees durch die internationale Normalisierungsorganisation in Verbindung mit der A. S. I. C.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 61-63.

Anlässlich des ersten Kolloquiums über Chemie wurden die Pläne der Internationalen Normalisierungsorganisation (ISO) in Bezug auf den Kaffee dargelegt.

Die Schaffung der Arbeitsgruppe ISO/TC34/SC8/GT2 « Kaffee » mit argentinischem Sekretariat wurde beim zweiten Kolloquium in dessen Verlauf die grossen Züge des Arbeitsprogramms erläutert wurden, bekannt gegeben.

Man kann nun eine erste Bilanz der Verwirklichungen und der laufenden Arbeiten auf dem Gebiet der Fachausdrücke, der Stichprobenentnahme und der Versuchsmethoden ziehen.

Alle diese Ergebnisse und diejenigen die noch zu erwarten sind konnten nur dank der auf Grund des auf wirksame und vertrauensvolle Weise in die Praxis umgesetzten Beschlusses einer offiziellen Verbindung durch ISO und ASIC geleisteten Arbeit zustande kommen.

IMPRESSIONI SULLA RECENTE LEGGE FRANCESE SUL CAFFÈ DEL 3 SETTEMBRE 1965 N. 65-763 RITRATTE DA UN CHIMICO DELLA VIGILANZA IGIENICO-SANITARIA

B. DORO
Laboratorio Chimico Provinciale, Trieste

Invitato dal Dott. Ernesto Illy ad esprimere un parere sulla recente legge francese sul caffè del 3 settembre 1965 n. 65/763, espongo nei seguenti termini una mia personale prima impressione. Essa è limitata ai soli punti di maggiore interesse, secondo un profilo non giuridico ma analitico, in conformità alla mia professione.

Dalla lettura di questa legge, due fattori emergono per la loro importanza : l'aver escluso dal commercio i sottoprodotti del « triages », nonchè l'aver fissato una classifica dei difetti cui può andar soggetto il caffè, quale tentativo per indagare sulle cause che possono rendere cattivo il caffè.

Questi due principi, ritengo, hanno formato l'oggetto preminente nella stesura di questa legge.

Mi sembra senz'altro una legge molto interessante, moderna, forse troppo particolareggiata, perciò eludibile in qualche settore, ma certamente una legge, se non completa, utile non solo per quel Paese ma anche per noi italiani.

Indubbiamente rispetto alla legislazione italiana essa segna un valido e sostanzioso progresso.

Non dico che questa legge possa venire *sic et simpliciter* adottata dal nostro legislatore, ma molti principi e criteri hanno un'importanza basilare per colmare le nostre numerose lacune legislative sul caffè e per raggiungere, anche in Italia, un miglioramento della qualità del caffè, presupposto principale di questa legge cui, in ultima analisi, si prefigge ogni norma igienico-sanitaria.

Come detto, assume particolare importanza **il divieto della vendita del « triages »**, quale premessa fondamentale per un miglioramento di massa della qualità del caffè. Sarebbe bene specificare che questi residui provengono dalla cernita del caffè e sono costituiti da chicchi difettosi, da scorie e da frammenti di caffè.

In Italia il commercio del « triages » come sopra inteso, assume purtroppo vaste proporzioni a scapito dell'onesto commercio del caffè e soprattutto della qualità dello stesso. Chi vi parla ha dovuto più volte subire l'affronto di tale merce, per mancanza di norme giuridiche in merito.

Il legislatore francese a tale riguardo è stato molto esplicito in merito ed ha posto il divieto di usare la denominazione di caffè ai residui provenienti dal « triages ».

Questi devono portare il loro specifico nome e non quello di caffè ; ne segue che tutte le disposizioni che riguardano il caffè non possono in nessun modo venire estese a questi prodotti. Essi inoltre non possono venire introdotti in Francia nè posti in commercio.

Queste disposizioni assumono, secondo me, una fondamentale importanza merceologica ed igienico-sanitaria che mi auguro possano venir accolti anche dal nostro Legislatore.

La denominazione del caffé verde, limitata ai grani sani ed interi della pianta del genere *Coffea*, comprese le varie sottospeci, completerebbe un'altra lacuna della nostra legislazione e meglio definirebbe questo prodotto dal lato botanico.

N. B. : cet exposé n'a pu être présenté au cours du colloque.

L'esclusione del caffè alterato e contaminato, specie per putredine e muffa, prevede con tale generica dizione, tutti gli inconvenienti cui può andare soggetto il caffè, anche durante il trasporto, come la marinatura e l'ammoniacatura ecc.

Queste norme potrebbero, ritengo, trovare piena applicazione, anche nel nostro Paese, per raggiungere un miglioramento generale del caffè verde e quindi del caffè tostato.

Il caffè inoltre secondo tale Legge non deve emettere **odore cattivo ed estraneo**, specie per la presenza di fave maleodoranti.

Questa è la parte più delicata e nuova della legge.

Significativa è la definizione di questi grani, cioè quelli che al taglio recente emettono odore sgradevole, spesso putrido o rancido e che possono venire individuati per il colore avana o brunastro, talvolta di aspetto ceroso.

Secondo quanto fu indicato, una sola fava maleodorante può contaminare nell'odore e sapore una notevole quantità di caffè. Emerge evidente l'importanza che assumono queste fave dal lato commerciale, nonchè da quello del controllo per la loro individuazione.

Sarebbe utile, secondo me, data la grande rilevanza che il legislatore francese ha attribuito a questo tipo di fava, avere delle norme chiare per la sua ricerca definendo il campione tipo di caffè da esaminare e le condizioni « standard » per il suo prelevamento.

Mi auguro che dallo studio gas-cromatografico delle fave maleodoranti, responsabili di contaminare il caffè, si possa riscontrare quel composto chimico, la cui presenza impartisce l' « odore cattivo » ed estraneo al caffè, termini cruciali di questa legge, il chè aprirebbe nuovi orizzonti nella chimica del caffè.

L'aver caratterizzato ed individuato nelle fave maleodoranti una causa dell'odore cattivo del caffè, è certamente un fattore positivo ed interessante di questa legge.

Ritengo però, che non è solo questa, la causa che rende cattivo un caffè. Quali altre cause esistono ancora ? Quando è cattivo un caffè ? La legge non lo dice, ma cerca per eliminazione, di ricercarne le cause. Fino a quando non si potrà meglio definire il concetto di odore cattivo ed estraneo al caffè ed esprimerlo con un indice analitico, cioè con un'espressione meno soggettiva, il problema della vigilanza rimane aperto così come quello dei rapporti economici.

Tuttavia le norme di applicazione della legge, che fanno parte integrante della stessa, appaiono come una bella pagina di merceologia e di bromatologia, non solo, ma danno una interessante elencazione di quei fattori che possono rendere cattivo un caffè.

E' superfluo ricordare l'importanza di queste norme per il controllo analitico del caffè.

Nell'ampia suddivisione delle fave difettose e della valutazione dei loro difetti e nella loro entità, si ricava una reale visione di ciò che può contribuire a rendere difettoso un caffè al punto da renderlo incommestibile.

Nella **classifica dei difetti**, è incluso anche il problema del caffè cosiddetto « Brocado », cioè dei chicchi tarlati o colpiti da parassiti. Nel calcolo dei difetti, l'incremento delle fave punte o bacate è notevole se non preminente. Ritengo pertanto che questo principio, che riesce del tutto nuovo nel commercio italiano del caffè, merita particolare attenzione, perchè in ultima analisi viene a colmare una lacuna delle vigenti norme sanitarie. Difatti per il caffè più o meno bacato dagli insetti, ma privo di parassiti allo stato vivente nè insudiciato dai medesimi, non è possibile invocare la legge 30 aprile 1962 n. 283, nè quella del 26 febbraio 1963 n. 441, in quanto questi estremi di alterazione non sono contemplati dalle predette norme di carattere sanitario e pertanto ogni strumento giuridico viene a cadere.

D'altronde il caffè « brocado » essendo stato attaccato in forma più o meno marcata da insetti, ha logicamente subito una qual perdita dei suoi principi alimentari, perciò può considerarsi spogliato in parte delle proprie materie nutrienti. Pertanto per tale contaminazione potrebbe venir invocato l'art. 108 del R. D. 3 febbraio 1901 n. 45, che peraltro non vieta la vendita di un prodotto così depauperato, ma esige che di ciò sia informato il compratore.

La lacuna della nostra legislatura, in questo caso, è evidente e solo considerando il caffè brocado un difetto, può venir disciplinato questo problema in analogia alla legge francese.

L'aver fissato un limite di 180 difetti su un campione di 300 gr. di caffè verde, rispettivamente di 40 difetti su un campione di 100 gr., oppure difetti espressi in peso, nel limite di 8 grammi per cento per il caffè tostato, consente un'articolazione più duttile della legge, sì da consentire di tenere presente sia la proporzione ponderale dei difetti, sia la loro gravità, permettendo di applicare la formula più vantaggiosa all'interessato.

Con tale elencazione e classificazione dei difetti, gli Organi di controllo hanno finalmente la possibilità di valutare il caffè non solo dal lato igienico-sanitario, ma anche merceologico ed aprire così una nuova via al controllo di questo importante alimento.

Dalla non semplice interpretazione di queste norme, così come sono articolate, ho l'impressione che gli Organi di controllo, qualora abbiano la convinzione che la partita di caffè debba venire eccepita, possano comunque trovare nella legge e nelle norme di attuazione gli argomenti giuridici che ne giustifichino il loro operato. Questa mi sembra la parte moderna e viva di questa legge.

Con ciò il legislatore francese ha attribuito all'analista una responsabilità, forse troppo rilevante, ma che se usata con prudenza, può essere preziosa per risolvere molti problemi analitici in un settore così delicato come quello del caffè.

Io auspico che tale responsabilità sia concessa anche agli Organi di controllo italiani che, nell'ambito della vigilanza igienico sanitaria, hanno dato prova di meritata competenza.

Meno importante e utile mi sembra la norma di aver fissato la **grandezza dei chicchi** con l'ausilio di crivelli, in quanto questo criterio è già implicito in altre espressioni della legge stessa ed ha, ritengo, una minore importanza commerciale.

Mentre concordo nella formulazione di alcuni limiti interessanti il caffè verde, mi permetto di dissentire in merito alla concessione di usare materie per il rivestimento del caffè tostato.

Su tale provvedimento vorrei esprimere una mia personale riserva, in quanto il legislatore italiano è ormai orientato a non concedere alcun abbellimento, sia perchè non lo ritiene praticamente necessario, sia perchè qualsiasi concessione ne renderebbe difficile il controllo.

Qualunque abbellimento è un'adulterazione perchè modifica la vera qualità del caffè, facendolo apparire più bello, conserva l'acuqa più a lungo ed è di dubbio effetto sulla conservazione dell'aroma.

Inoltre si possono avere in commercio delle lacche provenienti da euforbiacee, che possono produrre disturbi, se non proprio avvelenamenti, e lacche minerali che possono essere tossiche. Il voler limitare l'impiego a determinate sostanze di rivestimento considerandole coadiuvanti tecnologici o additivi, già ammessi per certi alimenti della legge italiana, significherebbe aprire la porta al capriccio, alla fantasia, all'interesse del torrefattore e, mancando i mezzi di controllo, ogni illusione di onestà o di autodisciplina risulterebbe problematico.

Ho rilevato con piacere che il legislatore francese ha previsto la vendita di **caffè cosidetto « superiore »** subordinatamente a precise condizioni di qualità e di caratteristiche merceologiche, quindi non lasciata all'arbitrio del commerciante.

Questo criterio vedrei volentieri riportato nella nostra legislazione.

Il problema del **caffè decaffeinizzato** sia crudo che tostato è stato ampiamente puntualizzato in questa legge che non lascia in merito alcuna lacuna.

Per il consumatore italiano l'**estratto di caffè liquido** assume poca importanza però ritengo bene venga disciplinato.

La definizione della sua composizione riferita al caffè vergine d'origine, mi sembra però poco chiara e di difficile controllo mancando un limite analitico ben determinato. Il riferire la composizione di un **caffè solubile** od in polvere ad una quantità di caffè verde, mi sembra un artificio che lascia adito a diverse interpretazioni ed evasioni.

Per quanto riguarda il « **caffè bevanda** » ed in particolare il caffè all'italiana cosiddetto « espresso », il rapporto indicato di 7 grammi di polvere di caffè per decilitro di liquido che corrisponderebbe a 2.8 grammi per tazzina di caffè, mi sembra troppo diluito per la tradizione del consumatore italiano.

Concludendo mi sembra una legge molto interessante, nuova sotto certi aspetti, completa nel suo insieme, severa nella sua entità, mirante a migliorare la qualità del caffè indagando sulle cause che rendono scadenti o cattivo il caffè.

Essa è certamente un'arma preziosa in mano del controllore che, se munito di saggezza, di prudenza e di onestà, può nell'applicazione di questa legge, rendere un'utile servigio all'onesto commercio ed al consumatore.

Auspico che il legislatore italiano possa trovare in questa legge elementi giuridici preziosi per la stesura della nuova legge italiana sul caffè che sebbene non debba calcare quello francese, possa colmare le sue numerose lacune.

DORO (B.). — **Réflexions d'un chimiste des services d'hygiène sur le récent décret français n° 65-763 du 3 septembre 1965, sur le café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 64-66.

L'auteur fait un rapide commentaire sur la récente loi française sur le café, d'un point de vue analytique, autant que pratique, en particulier pour les organismes de contrôle. Il met en évidence les points les plus importants de ce texte, en espérant qu'il servira de base pour l'établissement de la nouvelle législation italienne sur le café.

DORO (B.). — **Some reflections by a Health Service chemist on the recent French regulations on coffee n° 65-763 of the 3rd September 1965.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 64-66.

The writer makes a rapid commentary on the recent French law on coffee, as much from the analytical point of view as from the practical, and in particular as it concerns the controlling Services. He stresses the most important points of the text in the hope that they may serve as a basis for the setting up of the new Italian legislation on coffee.

DORO (B.). — **Betrachtungen eines Chemikers des Hygien- und Gesundheitsamtstellen zum französischen Dekret n° 65-763 vom 3. September 1965 über den Kaffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Triestes, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 64-66.

Der Autor bringt einen kurzen Kommentar zum französischen Gesetz über den Kaffee und zwar vom analytischen wie vom praktischen Standpunkt, insbesonders in Bezug auf die Kontrollorganisationen. Er unterstreicht die wichtigsten Punkte dieses Gesetzes und gibt der Hoffnung Ausdruck, dass letzteres die Grundlage zur Festsetzung der neuen italienischen Gesetzgebung bilden werde.

THE CHEMISTRY OF COFFEE AROMA

A SURVEY OF PRESENT KNOWLEDGE

F. GAUTSCHI, M. WINTER, I. FLAMENT, B. WILLHALM, M. STOLL

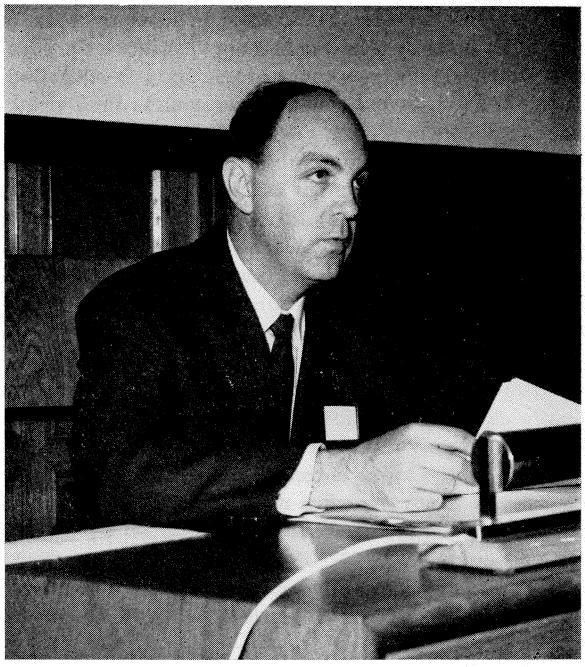
Firmenich et cie, Genève

Our coffee research group is very much honoured by the invitation to one of its members to deliver a lecture in front of such a distinguished audience of coffee specialists. I shall try to give you a general review of what is known up to now about coffee aroma with respect to its chemistry, giving emphasis to its more volatile constituents. Earlier work on this subject has been published (1) and will be considered together with new results.

The chemistry of coffee aroma has intrigued the chemist for a long time, which is no wonder in view of the unique role played by this delicious beverage ever since its discovery. The first work on this subject dates back as far as 1831 (2). The beginning of this century marked the start of a series of more thorough investigations, made possible by improvements in analytical techniques. In those early days of coffee chemistry, hopes were high that the essential character of coffee aroma would be produced by a typical constituent, called « coffeol » (3), as is the case to some extent with certain other natural flavors. You all know that this hypothesis unfortunately does not work with coffee : the classical investigation of REICHSTEIN and STAUDINGER (2) in the years 1921-1930 demonstrated clearly that this aroma is composed of a large number of chemicals blended together in very specific manner. There is no doubt that there are certain constituents which are of particular importance. Especially, much hope was placed on furfuryl-mercaptan, this unique sulfur compound which has not been found to occur in any other related aroma. Although this substance will recall the smell of roasted coffee upon high dilution, it is only in combination with other constituents that some coffee-like effects will be obtained.

It is well known that the aroma of coffee is developed during roasting of the green bean for a short period in a temperature range of 180-220°. Time of roasting, temperature, equipment as well as origin and quality of the starting material will affect the aroma of the final product. It is obvious that these facts do not facilitate the analytical work and that quantitative information is very hard to obtain. Most of the work, including ours, has

F. GAUTSCHI



N.B. : Cet exposé a été fait au cours de la séance inaugurale.

given emphasis to the more volatile part of coffee aroma, since it is generally believed that the substances which are primarily responsible for it are not of high molecular weight. It is undoubtedly true that those substances which cause the feelings of astringency, acidity, bitterness and smoothness in the final beverage, cannot be neglected when speaking of coffee flavor and taste. On the other hand, it has been demonstrated many times that a volatile aroma complex prepared in different manners from freshly roasted and ground coffee will produce a typical coffee flavor upon incorporation into a bland base.

Research of coffee aroma has been very active in the past ten years. There are two main reasons which prompted new work to be done : instant coffee has undergone a spectacular growth since the end of world war II and the producing companies are very much interested to learn more about the chemistry of coffee aroma in order to be able eventually to correct for losses occuring during the different steps of manufacture, and to produce instant coffees yielding a flavorful beverage comparable to the one prepared from freshly roasted and ground beans. Quality control of roasted coffee is another important aspect.

Secondly, with the advent of gas chromatography coupled with such powerful methods as mass spectrometry and other spectrometric methods, there has been a significant progress in connection with analytical work on flavors, enabling a more promising attack to be made on coffee aroma.

Basically, there are two ways which offer themselves for tackling this problem : a) direct analytical work with the volatile aroma complex obtained by one of the available methods ; b) research on the composition of the green bean by trying to find out the different precursors which will produce coffee aroma upon roasting. Both methods have their advantages as well as their drawbacks : a volatile aroma of coffee can be prepared in different ways of which I would like to mention distillation and extraction, entrainment by inert gas, direct solvent extraction, molecular distillation of expelled coffee oil or condensation of grinder gas. The choice of which extract to take is a somewhat arbitrary one, and is guided by convenience as well as foreseeable application by the flavorists. It should be kept in mind that the results which will come out of such analyses will be mostly qualitative and by no means directly applicable. I should like to call your attention to the difficulties which arise from the entirely different response of the human nose as compared to a gas chromatograph, as well as to the changes of vapor pressure occuring in changing environment. These points have been stressed by WEURMAN (4) as well as GIANTURCO (5) in earlier meetings of the International Coffee Association. On the other hand, the study of aroma precursors is a very difficult task as well.

NAVELLIER (6) has resumed in 1960 knowledge existing as to changes in the chemical constituents of the green bean during roasting. Some recent work has been done on this and related subjects in the meantime — let me mention in particular the fine work concerning pyrolitic cleavage and browning reactions of carbohydrates by HEYNS (7) — but much information is still lacking. We should know more about the exact composition of the green bean by undertaking systematic studies of the behaviour of its components — taken alone or in combination — under roasting conditions. It may well be that this approach will prove to be very rewarding with respect to practical applications.

Most of the recent work on coffee aroma which I would like to discuss was concerned with direct chemical analysis of a volatile aroma complex. Some of the newer findings in this field have been presented by GIANTURCO, as well as by MERRITT, at the second international meeting on coffee chemistry in Paris in 1965. In the meantime, GIANTURCO and coll. have published further results (8) and knowledge has been enlarged by additional work of the Nestlé group (9) as well as ours (10). Before entering into a discussion on the chemical constituents identified, **I should like to comment briefly on the analytical techniques used as well as on identification methods.**

The volatile aroma complex which is obtained by molecular distillation of expelled coffee oil or by steam distillation of roasted and ground coffee is a tremendous mixture of which some 300 constituents are known to-day. It is highly unstable ; exposed to air and room temperature, the product which originally forms a light yellow oil will darken and partly polymerize within a few hours. As has been demonstrated by GIANTURCO (5), instability is fortunately confined to certain components of this material. Selective analysis of interesting subfractions is therefore feasible provided that care is taken in all separation steps to avoid artefact fromation. The very nature of such a concentrate, however, containing a large number of reactive compounds — even some free radicals are possibly present as demonstrated by O'MEARA and coll. (11) — will lend itself to some secondary changes which are almost inevitable. The only means of preventing this is rapid and complete separation of reactive species. Another difficulty of the analytical work is given by the fact that relatively few main constituents account for some 90 % of such an extract (5). The remaining 10 % represent a host of minor and trace constituents, many of which contribute significantly to the organoleptic character. Attempts to analyze such compounds in detail therefore lead necessarily to enrichment procedures. In order to give you an idea of the work involved, I should like to explain this with an example of our recent work (10), illustrated by the opposite diagram.

You will easily realize that the isolation of the minor constituents involves an impressive amount of analytical work and will require rather large quantities of starting material. In the case cited, the extract used represents some eight tons of roasted coffee ! With the help of such

Coffee Extract
(1750 g)

partition (water-pentane)

water phase

pentane extract
(290 g)
(285,5 g)

insoluble residue
(46,5 g)

fractional distillation

volatile part (A + B)
(78,5 g)

less volatile part (C)
(204,8 g)

column chromatography (KIB)

fraction C_1
(18,2 g)
(10,03 g)

C_2 C_3 C_4 C_5 C_6 C_7

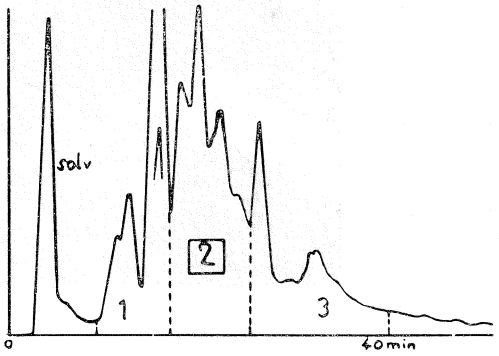
partition (methanol/pentane) (or: repeated (2x) col. chrom)

V_1 V_2 V_3 V_4 V_5 V_6 V_7 V_8 V_9 V_{10} V_{11}

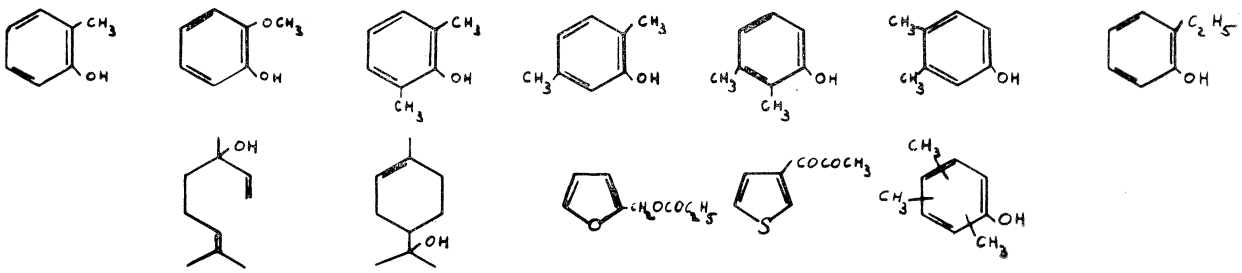
fraction V12
(339 mg)

Fraction V12
(339 mg)

Gaschromatographic separation



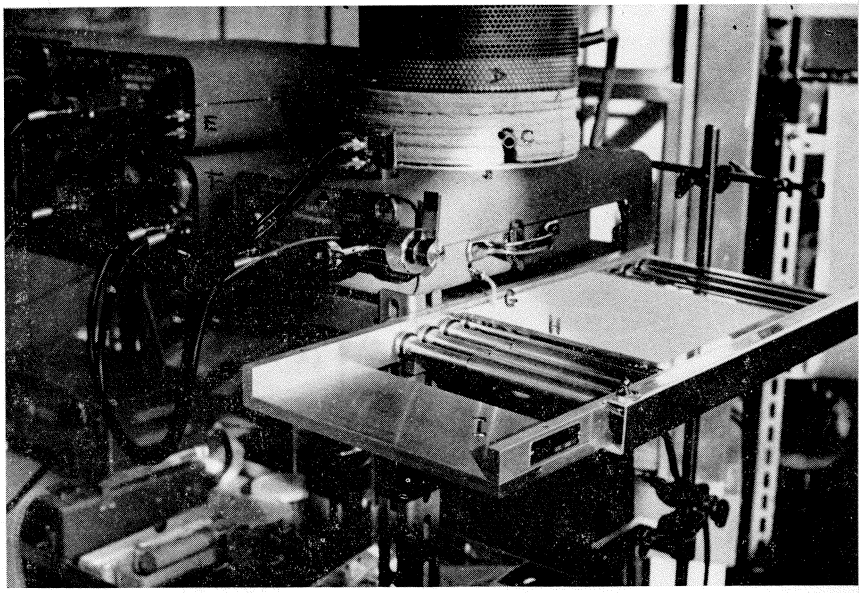
2-3 fold repeated GC-separation, trapping identification (MS, IR, UV)



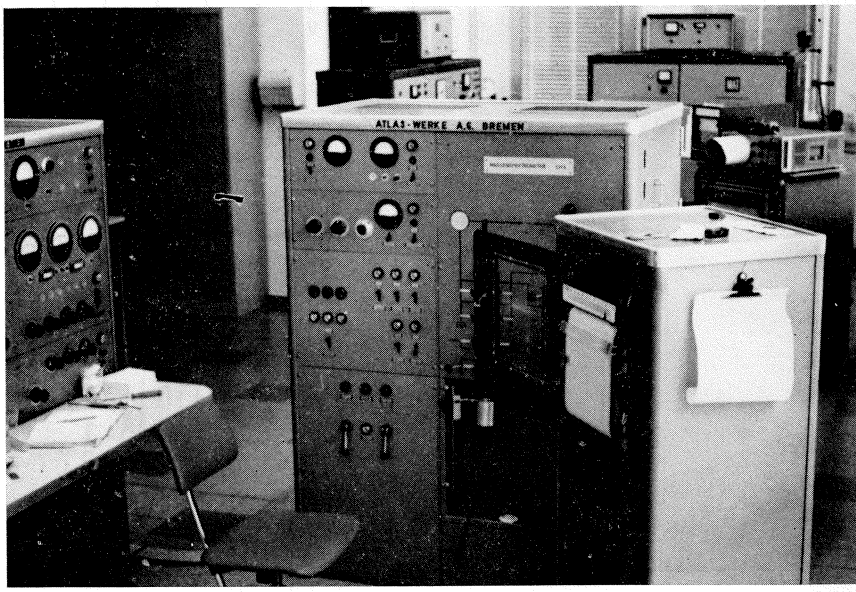
plus 4 minor, non identified constituents

concentration techniques, it has been possible to identify constituents being present in the range of less than 1 ppb in roasted coffee. As has been pointed out (5, 10), care has to be taken in order to avoid changes during all separation work. Thanks to the recent developments in gas chromatography — I should like to mention programmed temperature runs, on column injection, and deactivated stationary phases as examples — much progress has been possible.

Another difficult task is the identification work involved. Final gas chromatographic separation of individual constituents will yield no more than fractions of a mg in most cases. Mass spectrometry, together with UV and IR spectroscopy, in favorable cases are the methods of choice to cope with such small amounts of material. Most of the work published up to now has involved using one or more of these methods in a discontinuous manner ; there is no doubt, however, that combined instruments will be used more and more in the future. MERRITT and coll. have given you a fine example of these possibilities at the last Paris meeting. NMR spectrometry will undoubtedly play a major role in the future as well : instruments completed by a computer repeating many times a weak spectrum in order to enhance signals are already able to furnish a reasonably good spectrum on as little as some 50 γ of substance. Another method, which has been very helpful in our work (12), is direct combination of gas chromatography with thin-layer chromatography. Tentative identification of unknowns is greatly improved by having the GC retention index (usually converted to Kovats' index) in addition to the R_f value on the plate. Compounds which are difficult to separate on GC will often be differentiated by TLC behaviour. Identification of unknown constituents by GC and MS alone is frequently quite tedious, and much synthetic work will sometimes be necessary in order to secure the correct structure. Aspects of this have been published recently by several authors (13). Examples of identification work using combined spectral information will also be presented by my colleague, Dr. FLAMENT, in his communication. I should like to end with this side of the work by showing you some of the equipment used by our group.



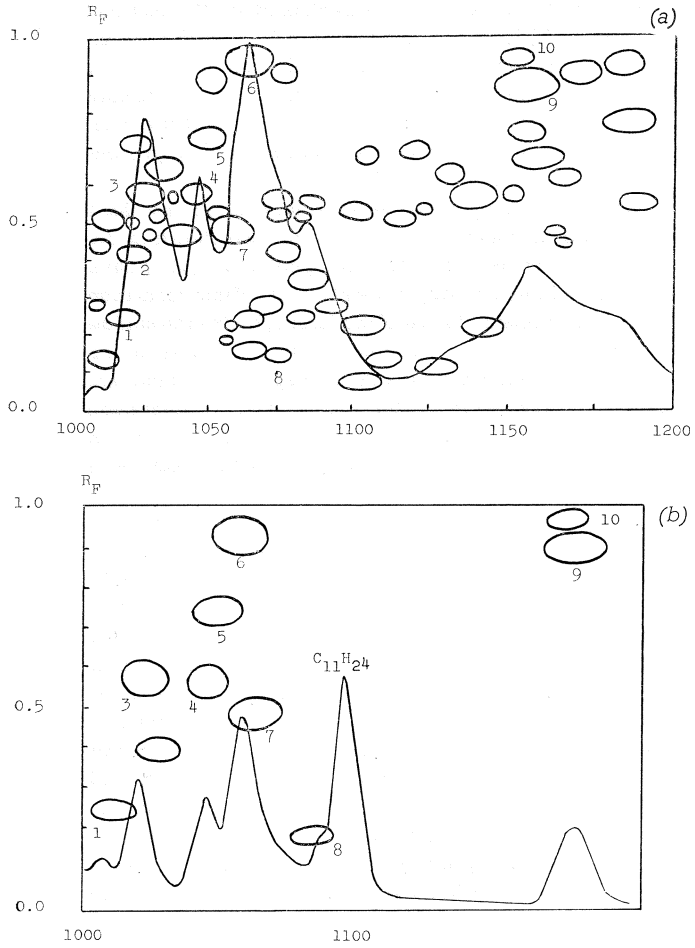
1



2

Fig. 1. — A combined apparatus for gas chromatography and thin-layer chromatography : A. gaschromatograph, B. capillary injector, C. column injector, D. F & M. oven, E. electrometer, F. thermistor, G. exit tube, H. chromatoplate, I. chromato conveyor

Fig. 2. — Mass spectrophotometry



An application of combined gas and thin-layer chromatography :

(a) natural coffee fraction ; (b) synthetic mixture of identified major products.

Let us now consider the information which has been gained with respect to the composition of coffee aroma by summarizing the present knowledge.

A survey of the table shows that there are some 300 substances known up to now to occur in coffee aroma. The detailed chemistry of the constituents has recently been discussed (14). It is amazing to see this large variety of different chemical classes being united in just one « natural » aroma. We know, of course, that the possibilities of reaction among the different chemicals of the green bean under pyrolytic conditions are virtually unlimited. Nevertheless, some selectivity as expressed by the greatly varying numbers of substances in one or the other of the found chemical classes is obvious. I should like to discuss some of the interesting points. You will see from the table that the largest group of constituents is represented by aliphatic and alicyclic substances. This is quite reasonable in view of the fact that long-chain compounds like carbohydrates, proteins and glycerides are forming the bulk of the constituents of the green bean. Fragments would therefore split off in some way from these during roasting. Combined oxydation — reduction processes may form diketones and acids as well as hydrocarbons of varying carbon number. Reactions of the Maillard type, i. e. non enzymatic browning, will certainly be involved too, leading eventually to aldehydes by Strecker degradation (15). Ketones as well as aldehydes have also been shown to

Chemical constituents of volatile coffee aroma

	Hydro-carbons	Alcohols Ethers	Alde-hydes	Ketones	Ke-tols	Dike-tones	Acids, Anhy-drides	Esters, Lactones	Sulphur com-pounds	Phenols	Miscell.	Total
Aliphatic, alicyclic...	17	14	12	19	5	16	12	10	8		7	120
Aromatic ..	20 (+ 6)	1	4	1		1		4	2	17		50 (+ 6)
Heterocyclic											8	8
Furans	13	4	3	11		4		9	7		1	52
Thiophenes	5	1	2	5		2		3				18
Pyrroles ...	8		8	4		1						21
Thiazoles ..				2								2
Pyridines ..	4											4
Pyrazines ..	21											21
Total	88	20	29	42	5	24	12	26	17	17	16	296 (+6)

form by pyrolysis of sugars (7) including unsaturated types, and oxydative decarboxylation of fatty acids could possibly occur to some extent too. Again, reduction would lead to alcohols. Among the esters, acetates and formates are particularly frequent, which is in line with the abundance of acetic acid observed, whereas free formic acid is not found in great amount, due probably to its reactivity and thermal instability. Noteworthy among the carbonyl compounds are the cyclic diketones found by GIANTURCO, who has shown that they are clearly of carbohydrate origin (1). Another interesting feature is the presence of compounds like myrcene, p-menthadiene and sylvestrene among hydrocarbons, linalool, α-terpineol in the alcohol group as well as methylheptenone, hexahydro-pseudoionone and 6, 10, 14-trimethylpentadecan-2-one among the ketones. They are very likely derived from the higher terpenes of the green bean, a field which has been studied particularly by KAUFMANN and coll. (16).

The next important group comprises the aromatic substances : hydrocarbons and phenols are most important in this class. The presence of aromatic hydrocarbons in coffee aroma is rather surprising, but again HEYNS (7) has shown that pyrolysis of glucose — although conducted at temperatures higher than those of coffee roasting — will yield substituted benzenes among other hydrocarbons. Such reactions may nevertheless be possible during roasting of coffee, taking into account catalytic as well as pressure effects. The problem whether the rather large number of naphthalenes is derived again by degradation and dehydrogenation of diterpenes, is open to question. Phenols, on the other hand, undoubtedly stem partly from tannins and lignin-substances, like chlorogenic acid, but amino acids such as tyrosine may also be involved.

The third line of the table contains some miscellaneous heterocyclic compounds, such as methyl tetrahydrofuranone and -thiophenone, maltol and two oxides derived from linalool. The formation of these compounds is similar to that of the constituents of the other groups, no special additional comments are necessary on this point.

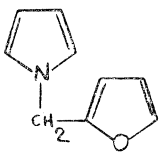
The fourth large group of constituents is formed by furanic compounds. There is little doubt that such substances are generated by cyclisation processes of the aforementioned aliphatic fragments, recombination of reactive species being implied presumably as well. Their great number may be explained by the fact that sucrose, which is present to about 7 % in the green bean, disappears almost completely during roasting, and that the hemicellulose composition is significantly changing at the same time. Further aspects of the amazing variety to be found within this group will be presented to you by Dr. FLAMENT.

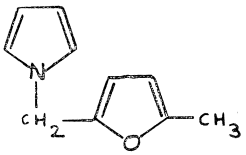
Thiophene compounds representing about one third in number as compared to the furans, are shown in the fifth row. With the exception of thiophene itself, they have all been identified only recently (10). Their formation is obviously related to that of the furans, hydrogen sulfide or some other source of sulfur being involved in the cyclization step. Cystine and perhaps methionine are probably participating in these reactions. No thiophene sulfide or mercaptan has yet been found among this group, but the presence of traces of such substances is likely to exist.

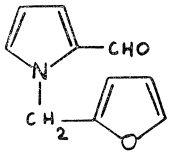
The sixth class of constituents is formed by the pyrroles. What has been said about furans and thiophenes with respect to formation applies to pyrroles as well, ammonia or amino compounds being needed in their formation. It may be of interest in this connection that MERRITT (17) has examined very recently the behaviour of several amino acids upon pyrolysis. He found for instance that methyl-thiophene was formed from cystine, N-methylpyrrole from hydroxyproline, and pyrazine from serine. I should like to add that THALER and GAIGL (18) have demonstrated that among the amino acids obtained by hydrolysis of green coffee protein, arginine, cystine, lysine, serine and threonine decrease most markedly during roasting. This furnishes ample supply of reactive nitrogen intermediates which may be concerned in the formation of heterocyclic compounds. Among the members of the pyrroles found, I should like to mention N-furfurylpyrrole, a homologue of it possessing an additional methyl group in the a position of the furan ring, as well as 2-formyl- and 2-acetyl-N-furfurylpyrrole (6) (cf. figure).

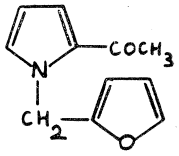
These compounds illustrate nicely that reaction has taken place between proteins and carbohydrates during roasting, leading to such compounds containing two heterocycles ; similar pathways will certainly be observed in the formation of other N-substituted pyrroles identified. Results of a model system of such a kind concerning pyrolysis of hydroxyproline in the presence of sugars have been reported (19).

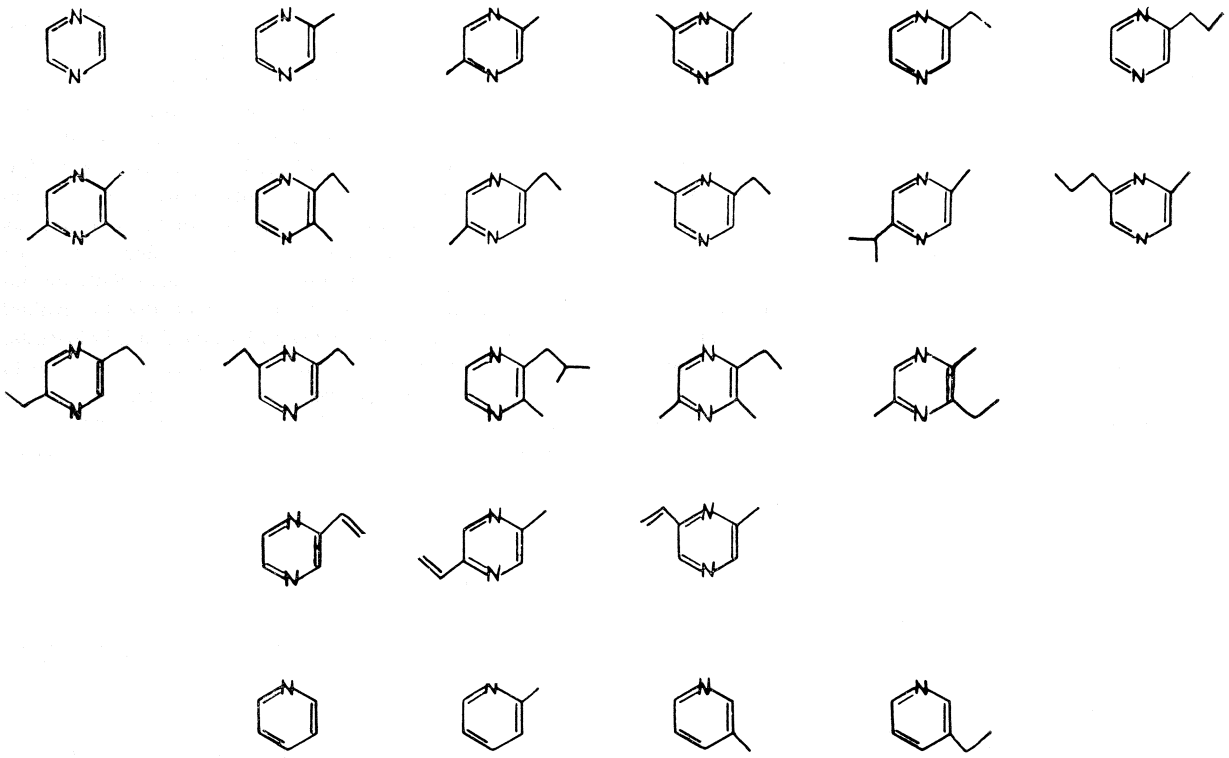
Pyrroles identified in coffee aroma











Pyrazines and pyridines isolated from coffee (cf. ref.10)

The next row is occupied by just two compounds, namely two thiazol-carbonyl compounds. Speculation as to their origin is open to question, but it is conceivable that they are derived from a cystine fragment. In fact, MIZUTANI (20) and coll. have shown in their studies on protein decomposition that cysteine will form thiazolidine compounds very easily by reaction with aldehydes. Subsequent decarboxylation and dehydrogenation should be possible under roasting conditions. It is of interest to note that these authors have demonstrated also that the compounds formed initially will be partly pyrolized to form hydrogen sulfide and ammonia. Hydrogen sulfide is also produced from cysteine mercaptals which are formed along with the thiazolidines mentioned.

The last two groups of the table finally concern the pyridines and pyrazines found in coffee aroma. Although a few representatives of these were known for a long time, most of these substances have again only been identified recently. It is surprising that no functional derivatives of these bases have been found up to now. One hypothesis, which can be put forward to explain this, is based on relative thermal instability of such substances. A good example of this is furnished by pyridine, which is known to be formed in coffee — at least partly — by decarboxylation of nicotinic acid which, in turn, is produced by pyrolysis of trigonelline (21). Pyridine, as well as the pyrazines, however, may well be generated by the other pathway already discussed repeatedly, i. e. interaction of carbohydrates and proteins or ammonia respectively. Such reactions have been studied by GRIMMETT (22), by DAWES and EDWARDS (23), as well as by our group (24). The first author cites also the formation of hydroxymethyl-pyrazines, which are the probable source of the vinylpyrazines found in this group.

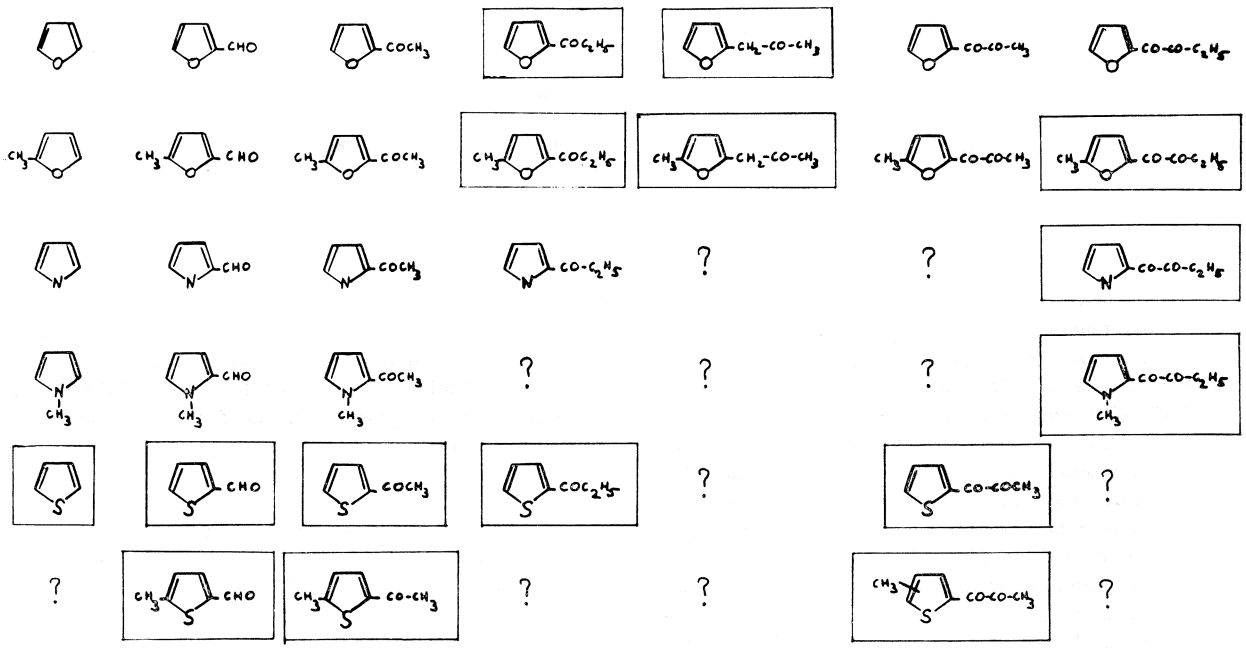
You will certainly realize that all these considerations are still very incomplete. Using defined precursors as well as techniques of isotopic labelling, much work could be done in this field, which would be highly interesting from a theoretical as well as a practical point of view. I should like to end this discussion by showing you the structures of the pyridines and pyrazines found in coffee as an example, in order to illustrate the variety existing in this very class.

Coming back to the chemistry of the constituents actually found in coffee aroma up to now, there is another interesting aspect which I should like to discuss briefly. By grouping the results into chemical classes as has been done, you will have noticed that a certain systematicity of the findings is evident. This aspect has been explained to you to some extent by GIANTURCO at the Paris meeting. It is very tempting to see whether predictions made at that time proved to be valid. You will see from the next figure that this is indeed the case.

As it is evident from the diagram, quite a few of the « gaps » could be filled in by the recent findings. Further relationships of this kind can easily be found within other series. By adding new classes, however, new question marks will appear. It is nevertheless interesting to follow these reasonings, and we have actually been able to identify in some cases products in coffee aroma, the existence of which could be predicted by such speculations.

I hope that these considerations have given you some idea as to the present status of coffee aroma research. As you have seen, the mystery of coffee aroma is still but partly solved, despite the fact that more than 300 constituents are now known to be present in it. Future work using modern analytical equipment will certainly add more products to this list, but the task to find more of those partly unstable or trace constituents will not be easy. More quantitative information will have to be gained in order to determine the relative importance of all these compounds to coffee flavor. Steps in this direction are being taken : I would like to recall the use of « aromagrams » by REYMOND, as well as GIANTURCO's concept of following quantitatively the appearance or disappearance of typical volatile constituents as roasting time increases, discussed during the last meeting. I am confident that an effort, especially on the side of applied research, will eventually be fruitful in allowing still better quality coffee, particularly instants, to be produced. The knowledge acquired will help to control many of the different steps which are involved in making a reproducible highly acceptable product, starting from such a variable source as natural green coffee.

Systematicity of heterocyclic compounds isolated from coffee



(Structures framed : new results, c.f. ref. (5))

LITERATURE

1. M. SIVETZ. — Coffee Processing Technology, Vol. II, The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Conn., 1963 ; M. A. GIANTURCO, The Volatile Constituents of Coffee, Flavor Symposium University of Oregon, Sept. 1965, in press.
2. cf. T. REICHSTEIN and H. STAUDINGER. — *Ciba Zeitschrift* vol. II, nº 127, 4692 (1951) ; reprinted in *Perfumery and Essential Oil Record*, **46**, 86 (1955).
3. O. BERNHEIMER. — *Monatshefte f. Chem.*, I, 456 (1880) ; cf. *Chem. Centralbl.*, **1880**, 549.
4. C. WEURMAN. — *Café, Cacao Thé*, vol. VII, nº 4, 341 (1963).
5. M. A. GIANTURCO and A. S. GIAMMARINO. — I.F.C.C. Second Interntl. Meeting on Coffee Chemistry, p. 169 (1965).
6. P. NAVELLIER. — *Acta Chim. Hung.*, **23**, 303 (1960).

7. K. HEYNS, R. STUTE and H. PAULSEN. — *Carbohydrate Res.*, **2**, 132 (1966) ; K. HEYNS, U. SAGE and H. PAULSEN. — *Carbohydrate Res.*, **2**, 328 (1966).
8. M. A. GIANTURCO, A. S. GIAMMARINO and P. FRIEDEL. — *Nature*, **210**, 1358 (1966).
9. R. VIANI, F. MUGGLER-CHAVAN, D. REYMOND and R. H. EGLI. — *Helv. Chim. Acta*, **48**, 1809 (1965) ; D. REYMOND, F. MUGGLER-CHAVAN R. VIANI, L. VUATAZ and R. H. EGLI, *J. Gas, Chromatog.*, **4**, 28 (1966).
10. M. STOLL, M. WINTER, F. GAUTSCHI, I. FLAMENT and B. WILLHALM. — *Helv. Chim. Acta*, **50**, 628 (1967) ; I. M. GOLDMAN, J. SEIBL, I. FLAMENT, F. GAUTSCHI, M. WINTER, B. WILLHALM and M. STOLL. — *Helv. Chim. Acta*, **50**, 694 (1967).
11. J. P. O'MEARA, F. K. TRUY and Th. M. SHAW. — Coffee Brewing Institute, Publ. n° 18, March 1957.
12. I. FLAMENT, M. WINTER, F. GAUTSCHI, B. WILLHALM, and M. STOLL. — 4e Symposium International de Chromatographie et Electrophorèse, Bruxelles, Sept. 1966 ; cf. *Chimia*, **21**, 39 (1967).
13. M. A. GIANTURCO, P. FRIEDEL and A. S. GIAMMARINO. — *Tetrahedron*, **20**, 1763 (1964) ; M. A. GIANTURCO, A. S. GIAMMARINO, P. FRIEDEL and V. FLANAGAN, *Tetrahedron*, **20**, 2951 (1964) ; F. GAUTSCHI, M. WINTER, I. FLAMENT B. WILLHALM and M. STOLL, *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 15 (1967) ; cf. also (9).
14. M. WINTER, F. GAUTSCHI, I. FLAMENT, B. WILLHALM and M. STOLL. — « Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln », Fortbildungskurs, Agrikulturchem. Institut ETH, Zürich, 4.-5.4. 1967.
15. cf. M. ROTHE and I. VOIGT. — *Nahrung*, **7**, (1), 50 (1963).
16. H. P. KAUFMANN and A. K. SEN GUPTA. — *Chem. Ber.*, **96**, 2489 (1963) ; **97**, 2652 (1964) ; *Fette Seifen, Anstrichmittel*, **66**, 461 (1964).
17. Ch. MERRITT and D. H. ROBERTSON. — *J. of Gaschromatog.*, **5**, 96 (1967).
18. H. THALER and R. GAIGL. — *Z. Lebensmittelunters. Forschg.*, **120**, 357 (1963).
19. cf. N. KOBAYASHI & M. FUJIMAKI. — *Agr. Biol. Chem.* (Japan), **29**, (11), 1059 (1965).
20. J. MIZUTANI, Y. OBATA and Y. ISHIKAWA. — *Bull. Agr. Chem. Soc.* (Japan), **24** (4), Suppl. p. 382 (1960) ; **24** (6), 562 (1960).
21. J. ADRIAN. — *Café, Cacao, Thé*, vol. VII, n° 4, 359 (1963).
22. M. R. GRIMMETT. — *Rev. Pure and Applied Chem.*, **15**, 101 (1965).
23. I. W. DAVES and R. A. EDWARDS. — *Chem. & Ind.*, **1966**, 2203.
24. Firmenich & Cie, Geneva, unpublished work.

GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), FLAMENT (I.), WILLHALM (B.), STOLL (M.). — **La chimie de l'arôme du café : revue des connaissances actuelles.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 67-76, fig., tabl., réf.

Après une revue des récents travaux sur l'arôme du café, le choix du matériel de départ et les buts du travail sont rapidement discutés. Des concentrations sont nécessaires, pour pouvoir analyser les constituants mineurs. Les procédés de séparation sont présentés et comparés en ce qui concerne leur efficacité et leurs inconvénients propres. L'identification de produits à l'aide de méthodes spectrométriques est expliqué en détail, l'accent étant particulièrement mis sur la spectrométrie de masse ; des exemples illustrent ce procédé. On a trouvé de nombreux produits analogues et homologues appartenant à différentes classes chimiques. Jusqu'à maintenant, 300 substances ont été trouvées dans 'arôme du café.

GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), FLAMENT (I.), WILLHALM (B.), STOLL (M.). — **The chemistry of coffee aroma, a survey of present knowledge.** — Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 67-76, fig., tabl., réf.

After a survey of the recent research on coffee aroma, the choice of the starting material and the aims of the work are briefly discussed. Concentration steps are necessary in order to enable analysis of minor constituents. Separation procedures are outlined and compared as to their usefulness and inherent disadvantages. The identification of products using spectrometric methods is explained in some detail, special emphasis being placed upon mass spectrometry. Examples to illustrate the procedure are given ; many analogues and homologues of different chemical classes were found to be present.

There are some 300 substances known up to know to occur in coffee aroma.

GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), FLAMENT (I.), WILLHALM (B.), STOLL (M.). — **Die Chemie des Kaffeearomas : Überblick über die gegenwärtigen Kenntnisse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 67-76, fig., tabl., réf.

Nach einem Überblick über die neuzeitlichen Arbeiten über das Kaffeearoma werden Wahl des Ausgangsmaterials und Ziel der Arbeit kurz erörtert. Um die geringeren Komponenten analysieren zu können sind Konzentrationen notwendig. Es werden die Trennungsverfahren erläutert und in Bezug auf ihren Wirkungsgrad und ihre eigenen Vorteile verglichen. Die Kennzeichnung der Produkte durch spektrometrische Methoden wird ausführlich erklärt, wobei die Bedeutung der Massenspektrometrie namentlich unterstrichen wird. Beispiele veranschaulichen dieses Verfahren. Zahlreiche analoge und homologe Produkte die verschiedenen chemischen Klassen angehörten wurden festgestellt. Bisher wurden 300 Stoffe im Kaffeearoma gefunden.

DISCUSSION

M. SMITH : To what extent have you followed up these tests by organoleptic tests ? What effect have these coffee compounds on coffee flavour ?

M. GAUTSCHI : We have not done much work on this yet and of course it is our flavour people who are concerned with this side of the problem. Their study is only at the starting stage.

M. REYMOND : Je tiens d'abord à féliciter le Dr Gautschi pour la présentation de ses derniers résultats de recherche. Puisqu'il a mentionné plusieurs réactions de pyrolyse des constituants du café vert, il serait intéressant de savoir quels pourraient être les produits de dégradation de l'acide chlorogénique. Peut-on envisager certains phénols ?

M. GAUTSCHI : Nous n'avons pas travaillé personnellement dans ce domaine, mais il serait très intéressant de continuer les recherches déjà entreprises.

RAPPORT SUR LES RECHERCHES EN COLLABORATION RELATIVES AUX MÉTHODES DE DOSAGE DE L'EXTRAIT SOLUBLE DANS L'EAU DU CAFÉ TORRÉFIÉ

R. WILBAUX
Institut Français du Café et du Cacao, Paris

Lors du deuxième colloque sur la chimie du café tenu à Paris en 1965, il fut décidé de créer un groupe de travail qui examinerait diverses méthodes de dosage de l'extrait soluble dans l'eau.

Pour éviter les variantes de torréfaction et de mouture, l'I. F. C. C. s'est chargé de préparer des poudres qui furent expédiées aux laboratoires qui ont consenti à participer à cette chaîne d'analyse, ce dont je les remercie très sincèrement.

Les méthodes à essayer:

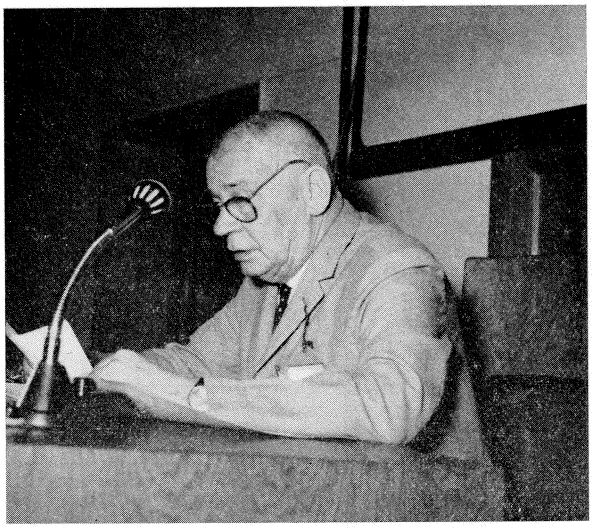
1) Méthode AOAC (1960),

2) Méthode NAVELLIER (1960) légèrement modifiée,

3) Méthode JAKOBER et STAUB (1963) légèrement modifiée,

4) Méthode d'Essai proposée par le Brésil et décrite dans le document ISO TC/34/SC8/GT2 Doc. 402/1 F d'août 1965. Malheureusement certaines imprécisions quant au mode opératoire diminuait la valeur de ce document et le croquis exact de l'appareil d'extraction ne nous fut pas communiqué en son temps. Il en est résulté que certains opérateurs ont employé un Soxhlet, d'autres un B.B.S. ou un Kumagawa. Un opérateur n'indique pas de quel extracteur il fit usage. En outre la durée d'extraction varia également selon les opérateurs, on peut même considérer que la méthode peut être scindée en cinq variantes :

Méthode 4/A : extraction de 3 heures au B. B. S.,
4/B : extraction de plus de 3 heures au B.B.S.,
4/C : extraction de 3 heures au Soxhlet ou Kumagawa,



4/D : extraction de plus de 3 heures au Soxhlet,
4/E : durée et appareil d'extraction non spécifiés.

5) En outre, onze laboratoires ont envoyé des résultats obtenus par la méthode suisse, que nous avons appelée méthode 5, où la teneur en matière sèche de la solution aqueuse est déterminée par densimétrie et qui dérive de la technique de TAÜFEL.

6) Enfin trois laboratoires ont utilisé la méthode à chaud de la Mission d'Etudes d'Outre-Mer à Lisbonne, qui sera décrite en annexe.

Tableau général des résultats

1966 Chaine d'analyse Extrait aqueux	ARABICA										ROBUSTA									
Laboratoire	Méthode 1 AOAC	Méthode 2 Navellier	Méthode 3 Jacobert	Méthode 4 A Bresil (BBS 34)	Méthode 4 B (BBS > 34)	Méthode 4 C (Soxhlet 34)	Méthode 4 B (Soxhlet > 34)	Méthode 4 E (indéterminé)	Méthode 5 Suisse	Méthode 6 Portugal	Méthode 1 AOAC	Méthode 2 Navellier	Méthode 3 Jacobert	Méthode 4 A Bresil BBS 34	Méthode 4 B Bresil BBS > 34	Méthode 4 C Bresil Soxhlet 34	Méthode 4 B Bresil Soxhlet > 34	Méthode 4 E Bresil indéterminé	Méthode 5 Suisse	Méthode 6 Portugal
1	24,17 24,13 24,53	29,35 28,83 28,75	27,34 27,05 27,25			26,59 23,67			16,51 17,03 17,54 17,03		26,93 26,92 27,73	31,88 31,68 32,50	30,75 30,35 30,74			32,00 29,77			18,06 18,05 17,54 18,06	
2	23,60 23,58	28,56 28,82	28,13 28,13			28,59 27,51			29,90 29,90		26,25 26,17	32,32 32,24	31,82 31,82			34,13 33,46			32,90 33,50	
3	23,70 24,60	28,80 28,80	27,10 27,30					25,20 26,00			26,90 27,40	33,20 33,40	30,03 30,07					31,70 28,90		
4	26,24 25,92 26,01	28,90 27,85 28,53	29,72 30,34 29,93		29,39 28,89		27,07 29,66 31,26		29,87 28,95 29,08		28,57 28,60 28,55	31,91 31,85 32,20	33,60 33,90 33,58		27,83 28,16		36,21 34,54 36,43		31,95 30,85 31,48	
5	25,55 25,37 25,00	29,54 29,30 29,22	27,83 27,64 27,90	28,32 28,33 28,81					29,12 27,78 29,88	27,45 27,35 27,02	27,78 27,78 27,42	32,56 32,45 32,37	31,30 31,53 30,99	33,36 33,23 32,91					30,94 31,88 32,23	27,81 27,84 27,65
6	24,60 24,50	28,39 28,22	28,65 28,69				28,31 28,29	30,42 30,50			27,27 27,28	32,18 32,12	31,68 31,68				32,18 32,46			
7	23,71	28,35	27,01					30,10	27,8		26,48	31,58	31,76					34,96	29,81	
8	23,95 23,88 24,92	28,33 29,52 28,20	27,07 27,19 28,07					29,85 28,92 29,65			26,67 26,56 27,70	31,83 32,64 31,32	30,84 31,21 31,29					35,82 25,08 36,40		
9	24,00 24,04	30,44 30,05	27,86 28,11			27,25 27,26				27,26 27,47	26,26 26,58	33,06 33,10	31,33 31,39			33,57 30,46				30,58 30,12
10	24,55 24,25 24,45 24,15	28,78 28,98 28,38 28,38	26,46 27,33 27,53 27,33	25,46 31,75 31,65 30,29							26,60 26,50 26,40 26,60	33,05 33,05 33,25 32,84	31,43 31,35 31,60 31,35	30,17 29,32 29,32 32,79						
11	24,56 24,54 24,50 24,53	29,16 28,86 29,41 29,51	27,55 27,83 29,08 27,96			30,23 29,94 28,53 29,89					27,57 27,68 27,35 27,28	32,60 32,59 32,28 32,43	31,48 31,35 31,37 31,56			33,52 33,50 33,69				
12	24,03 24,06	29,57 29,73	27,74 27,65					.	29,78 29,61		27,06 27,08	33,22 32,98	30,89 30,84						31,62 31,78	
13	23,88 23,58 24,05 23,61	28,96 28,86 28,67 28,58	27,28 26,80 27,52 27,54					20,50 20,93 17,92 17,82			27,01 27,04 27,07 26,59	32,83 31,61 33,12 32,74	30,40 30,68 30,98 30,93					25,06 24,86 16,84 22,67	30,81 30,30 30,53 30,23	

| | | |

Le tableau pages précédentes reproduit tous les résultats qui nous furent adressés par les divers laboratoires. Les écarts entre les résultats les plus extrêmes (range) pour chaque méthode sont :

Méthode \ Café	Arabica		Robusta	
1	23,40 - 26,60	= 3,20	25,99 - 30,26	= 4,27
2	27,66 - 31,54	= 3,88	31,21 - 35,50	= 4,29
3	26,44 - 30,34	= 3,90	30,17 - 36,92	= 6,75
4	17,92 - 31,26	= 13,34	16,84 - 36,21	= 19,37
5	16,51 - 34,45	= 17,94	17,54 - 36,90	= 19,36
6	26,63 - 27,83	= 1,20	29,65 - 30,64	= 0,99

Certains laboratoires ont malheureusement envoyé leurs résultats tardivement, alors que l'interprétation statistique était déjà terminée.

* * *

L'**étude statistique** des résultats fut effectuée par M. LOTODÉ, statisticien de l'I. F. C. C. Comme le nombre d'analyses par laboratoire est variable et que tous les laboratoires n'ont pas effectué le dosage par toutes les méthodes, seule pouvait être appliquée une analyse statistique du type « plan entièrement randomisé ». Certains résultats statistiquement aberrants furent bien entendu éliminés.

Les méthodes 1/ - 2/ - 3/ furent utilisées par vingt-sept laboratoires d'où la possibilité de comparaisons assez précises.

Il fut exécuté une étude séparée pour la méthode 5 et pour les variantes de la méthode 4. Pour la méthode 6, il n'a pas été fait d'étude spéciale. L'exposé complet de l'analyse statistique est trop long pour être repris dans le rapport de ce groupe de travail. Mais nous avons quelques exemplaires à la disposition de ceux qui voudraient examiner le détail des calculs.

La répétibilité est l'intervalle de confiance de la différence entre deux mesures dans un même laboratoire, par un même opérateur :

$$t_f \sqrt{2\,\sigma_e^2}$$

où : σ_e^2 est la variance estimée par la racine carrée de carré moyen résiduel CMR,

t_f = Table de Student.

La reproductibilité est l'intervalle de confiance de la différence entre deux mesures obtenues dans différents laboratoires, par différents opérateurs ne faisant qu'une opération :

$$t_f \sqrt{2\,(\sigma_e^2 + \sigma_t^2)}$$

où : σ_t^2 est la variance estimée par la racine carrée de

$$(CML - CMR)\,\frac{V - 1}{\Sigma n_i - \frac{\Sigma n_i^2}{\Sigma n_i}}$$

V est le nombre de laboratoires,

n_i est le nombre de déterminations,

CML est le carré moyen entre laboratoires.

Ces définitions sont celles données par SMITH (*Journ. of Inst. of Petroleum*, vol. 49, n° 474, juin 1963).

La répétibilité selon SMITH est :

Café Arabica

Méthode	Répétibilité	Degré de liberté
1	0,59	38
2	0,87	36
3	0,83	37

La répétibilité est la meilleure pour la méthode 1.

Répétibilité : Méthode 1 > Méthode 3 > Méthode 2.

Il n'y a pas de différence significative entre les méthodes 1 et 3, ni entre les méthodes 3 et 2.

La répétibilité de la méthode 1 est significativement supérieure à celle de la méthode 2, mais le rapport des variances F est pratiquement égal à F_T limite (2,04 contre 2,03).

Café Robusta

Méthode	Répétibilité	Degré de liberté
1	0,69	38
2	0,53	37
3	0,42	37

La répétibilité est ici meilleure pour la méthode 3.

Répétibilité : Méthode 3 > Méthode 2 > Méthode 1.

Il n'y a pas de différence significative entre la méthode 3 et la méthode 2, ni entre la méthode 2 et la méthode 1.

Mais entre la répétibilité des méthodes 1 et 3 la différence est significative (F = 2,75 contre F_T limite = 2,03).

Les résultats, pour les deux échantillons sont donc contradictoires pour la méthode 1 (AOAC).

La reproductibilité selon SMITH est :

Café Arabica

Méthode	Reproductibilité	Degré de liberté
1	1,80	22
2	1,69	27
3	2,35	22,5

La reproductibilité est la meilleure pour la méthode 2, ces reproductibilités se classent :

Méthode 2 > Méthode 1 > Méthode 3.

Il n'y a pas de différence significative entre la méthode 2 et la méthode 1, ni entre la méthode 1 et la méthode 3.

La différence n'est même pas significative entre les méthodes 2 et 3 (F = 1,90 pour F_T limite = 2,21).

Café Robusta

Méthode	Reproductibilité	Degré de liberté
1	1,71	24
2	1,50	22,5
3	2,09	20

La reproductibilité est comme dans le cas de l'Arabica :
Méthode 2 > Méthode 1 > Méthode 3.

Les différences entre les méthodes ne sont pas significatives entre les méthodes 2 et 1 ni entre les méthodes 1 et 3.

La différence n'est d'ailleurs pas significative entre la méthode 2 et la méthode 3, bien que les variances varient environ du simple au double.

Si on fait les **rapports des répétibilités** estimées par σ_e^2, on obtient :

Méthode 1/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 1{,}37$ non significatif

Méthode 2/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 2{,}65$ significatif à 1 %

Méthode 3/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 3{,}90$ significatif à 1 %

On devrait en conclure soit que les laboratoires ont mieux opéré avec les échantillons de Robusta qu'avec ceux d'Arabica, soit que l'échantillon de Robusta est moins sensible aux petites variations dans le mode opératoire. Les différences sont surtout sensibles avec la méthode 3.

Les **rapports des reproductibilités** estimées par σ_t^2 donnent :

Méthode 1/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 1{,}10$ non significatif

Méthode 2/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 1{,}28$ non significatif

Méthode 3/ $\frac{\text{Robusta}}{\text{Arabica}} = 1{,}18$ non significatif

La comparaison des moyennes générales donne :

Café Arabica

Méthode	Moyenne générale $\bar{x}$	Variance de cette moyenne	Degré de liberté	Valeur relative
1	24,307	0,017 61	19	100
2	29,045	0,013 98	19	119,49
3	27,797	0,029 56	19	114,36

Café Robusta

Méthode	Moyenne générale $\bar{x}$	Variance de la moyenne	Degré de liberté	Valeur relative
1	27,131	0,015 37	19	100
2	32,825	0,012 18	19	120,99
3	31,29	0,026 46	19	115,33

Les différences entre méthodes sont :

Café Arabica

$\bar{x}_2 - \bar{x}_1 = 29{,}045 - 24{,}307 = 4{,}738$
hautement significative.

Intervalle de confiance de la différence des moyennes des méthodes 2 et 1 :

$\bar{x}_2 - \bar{x}_1 = 4{,}74 \pm 0{,}49$ au risque 5 %
$= 4{,}74 \pm 0{,}61$ au risque 1 %

$\bar{x}_3 - \bar{x}_1 = 27{,}797 - 24{,}307 = 3{,}49$
hautement significative

Intervalles de confiance de la différence :

$\bar{x}_3 - \bar{x}_1 = 3{,}49 \pm 0{,}40$ au risque 5 %
$= 3{,}49 \pm 0{,}54$ au risque 1 %

$\bar{x}_2 - \bar{x}_3 = 29{,}045 - 27{,}797 = 1{,}248$
hautement significative

Intervalles de confiance de la différence :

$\bar{x}_2 - \bar{x}_3 = 1{,}25 \pm 0{,}40$ au risque 5 %
$= 1{,}25 \pm 0{,}54$ au risque 1 %

Café Robusta

$\bar{x}_2 - \bar{x}_1 = 32{,}825 - 27{,}131 = 5{,}69$
hautement significative

Intervalles de confiance de la différence :

$\bar{x}_2 - \bar{x}_1 = 5{,}69 \pm 0{,}46$ au risque 5 %
$5{,}69 \pm 0{,}58$ au risque 1 %

$\bar{x}_3 - \bar{x}_1 = 31{,}29 - 27{,}13 = 4{,}16$
hautement significative

Intervalles de confiance de la différence :

$\bar{x}_3 - \bar{x}_1 = 4{,}16 \pm 0{,}38$ au risque 5 %
$4{,}16 \pm 0{,}51$ au risque 1 %

$\bar{x}_2 - \bar{x}_3 = 32{,}825 - 31{,}29 = 1{,}53$
hautement significative

Intervalles de confiance de la différence :

$\bar{x}_2 - \bar{x}_3 = 1{,}53 \pm 0{,}38$ au risque 5 %
$= 1{,}53 \pm 0{,}51$ au risque 1 %

On peut donc estimer que les méthodes 2 et 3 donneront des résultats proportionnels à 120 et 115, par rapport à 100 par la méthode 1 (AOAC).

Etude statistique des cinq variantes de la méthode 4 et de la méthode 5.

L'examen statistique des résultats a été conduit comme pour les trois premières méthodes, avec élimination des résultats aberrants :

1° la répétibilité des méthodes 1, 2 et 3 est très large-

ment supérieure à celle des variantes de la méthode 4 (méthode suisse).

Mais en ce qui concerne la méthode 5, sa répétibilité n'offre pas de différence significative avec la méthode 2 pour l'échantillon d'Arabica, mais présente une différence hautement significative pour l'échantillon de Robusta.

2° la reproductibilité inter laboratoires n'a pu être effectuée, car le nombre de degrés de liberté (1, 5 à 7) est insuffisant pour faire la comparaison. Mais les variances correspondant à la reproductibilité varient de 3,39 à 35,92 alors que la variance maximum obtenue par les méthodes 1 - 2 et 3 est de 0,572 (19 ddl).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° La méthode 2 (NAVELLIER) est la plus reproductible et pourrait être utilisée comme « méthode de base » (c'est à dessein que nous n'utilisons pas le terme « méthode fondamentale »).

2° La méthode 3 (JAKOBER) est celle qui a la meilleure répétibilité, mais elle semble plus sensible à de petites variantes opératoires (telles que température de la plaque chauffante, surchauffe du verre du ballon par exemple) ce qui lui donne une reproductibilité assez faible (intervalles de confiance du résultat d'un opérateur d'un laboratoire de 2,09 à 2,35), quoique pas significativement différente de celle des méthodes 1 et 2.

Nous pensons que cette méthode 3, très rapide, est cependant utilisable pour établir des comparaisons au sein d'un même laboratoire, pour les besoins de la sélection par exemple.

3° La méthode 1 (AOAC) est satisfaisante, mais en opérant à environ 20° C, la teneur en extrait est inférieure à celle obtenue lors de la préparation d'une boisson et de ce fait, cette technique n'est pas réaliste.

4° Les valeurs relatives des résultats sont respectivement de l'ordre de : 100 - 120 et 115 selon qu'on utilise la méthode 1, 2 ou 3.

Les différences entre les trois premières méthodes sont hautement significatives.

5° Les variantes de la méthode brésilienne ne sont pas à recommander pour les raisons suivantes :

a) une durée d'extraction de 3 heures ne constitue pas une spécification suffisante. Selon le mode de chauffage le nombre de siphonages peut varier largement au cours des 3 heures. Divers opérateurs ont dépassé les 3 heures, car les liquides d'extraction étaient encore colorés après ce laps de temps. Le degré d'hydrolyse varie certainement.

b) Les laboratoires devraient tous avoir le même extracteur et une allure de chauffe identique. L'appareillage est moins simple que dans le cas des méthodes 1, 2 et 3.

c) Les objections formulées aux paragraphes 5 *a*) et 5 *b*) sont la cause des mauvaises répétibilité et reproductibilité constatées.

6° La méthode 5 (TAÜFEL modifiée) est moins répétible et reproductible que les trois premières méthodes, mais meilleure que la méthode proposée par le Brésil. Notons qu'une faible variation de 0,0001 de poids spécifique provoque une variation de teneur en extrait de l'ordre de 0,5 %.

L'application de cette méthode demande donc une très grande minutie et est d'un usage moins aisé que les précédentes.

7° La méthode 6 (Mission d'Etudes d'Outre-Mer, Lisbonne-MEAU) n'a pas fait l'objet d'une étude statistique, car le nombre de résultats est trop faible. Mais la méthode semble à première vue répétible et reproductible, car les chiffres de trois laboratoires concordent bien.

La technique de la MEAU se rapproche de celle de JAKOBER.

* * *

La deuxième commission aura à se prononcer sur cette question de méthodes de dosage de l'extrait soluble dans l'eau et à décider s'il y a lieu de poursuivre les recherches. Dans ce cas, un meilleur plan statistique serait proposé.

Je me rends compte que les divers laboratoires ont eu à fournir une importante somme de travail et je tiens encore une fois à remercier vivement tous ceux qui ont eu la grande obligeance de participer à cette chaîne d'analyse, ainsi que M. LOTODÉ qui s'est chargé de l'interprétation statistique.

ANNEXE

Description des méthodes

1) Méthode AOAC (1960) :

Cette méthode est basée sur une macération à environ 20° C. Elle s'éloigne donc fort des techniques de préparation du café-boisson et des extraits liquides destinés à l'atomisation ou à la lyophilisation.

Cependant, comme cette méthode est officielle aux Etats-Unis, qui sont les plus importants consommateurs de café dans le monde, elle doit être prise en considération.

La poudre de café torréfié doit passer au tamis 30 mesh.

Ce tamis 30 mesh correspond à 0,61 mm d'ouverture et à :

Tamis Tyler standard Screen Scale - n° 28.
» B. S. A. 410 - n° 25.
» Schedule G. P. I. - n° 500.
» D. I. N. 1171 - n° 0,600
» français N. F. X. 11-501 et P. 18 304 - n° 29 (ouverture 0,62 mm).

On introduit 4 g dans un flacon jaugé de 200 ml. On porte au volume et laisse macérer 8 heures avec agitation occasionnelle, puis on laisse 16 heures en repos. On filtre, prélève et évapore à siccité 50 ml du filtrat dans un récipient à fond plat. On sèche à 100° C, refroidit et pèse. Exprimer les résultats en p. 100 sur matière sèche.

2) Méthode NAVELLIER et coll. à 80° C, modifiée (1960) :

Introduire 2 g de café moulu dans un flacon jaugé de 200 ml. Ajouter 150 ml d'eau à 80° C. Placer pendant 6 heures dans un bain thermostatique à 80° C ± 1° C et agiter par rotation, toutes les heures. Refroidir rapidement, porter au volume et filtrer. Prélever 50 cm^3 du filtrat, évaporer à sec dans un récipient à fond plat. Sécher à poids constant à 100-102° C. Après refroidissement sous dessiccateur, peser et exprimer les résultats en p. 100 sur matière sèche.

Cette méthode avait montré une bonne répétibilité, qui est d'ailleurs encore augmentée par l'agitation horaire.

3) Méthode JAKOBER et STAUB modifiée (1963) :

Peser 10 g de poudre et introduire dans un ballon jaugé de 300 ml.

Ajouter 150 ml d'eau à environ 90° C, porter à l'ébullition sur une plaque chauffante suffisamment puissante pour que l'ébullition soit atteinte en moins de 5 minutes. Maintenir exactement 5 minutes à l'ébullition, en agitant quatre à cinq fois, par rotation.

Refroidir rapidement, porter au volume et filtrer sur filtre plissé. Prélever 50 ml de filtrat, évaporer à sec dans un récipient à fond plat. Sécher à poids constant à 100-102° C.

Exprimer le résultat en p. 100 sur matière sèche.

Cette méthode conventionnelle est simple et rapide et de plus reproductible à basse altitude. Mais si on opère dans un laboratoire situé en haute altitude, le point d'ébullition de l'eau s'abaisse et il pourrait y avoir là une cause d'erreur. Le cas échéant, il serait utile d'indiquer le point d'ébullition normal ou l'altitude du laboratoire.

4) Méthode d'essai proposée par le Brésil (document ISO/TC/34/SC8/GT 2/Dco 402/1 F) - Août 1965 :

a) On place 2 g d'échantillon dans le tube siphon d'un appareil d'extraction, enveloppés dans du papier filtre ou dans une cartouche d'extraction en cellulose, en prenant soin de mettre un bouchon de coton afin d'éviter l'entraînement du matériel. L'échantillon doit être additionné avec deux fois son poids de sable lavé. Prendre les précautions nécessaires pour éviter une décharge continue.

b) On met 100 ml d'eau dans l'Erlenmeyer de l'appareil d'extraction. Monter l'appareil en faisant bouillir 3 heures au moins après la première décharge. Laisser refroidir à la température ordinaire. Transférer le liquide contenant l'extrait dans une fiole jaugée de 100 ml. Rincer l'Erlenmeyer et compléter au volume de 100 ml avec les eaux de rinçage. Pipeter 50 ml de solution et introduire dans une fiole à peser de 70 mm de diamètre et 15 mm de hauteur, préalablement tarée. Evaporer jusqu'à siccité, au bain-marie. Sécher la fiole à peser pendant 3 heures à l'étuve à 105° C. Refroidir sous dessiccateur à chlorure de calcium. Noter la masse trouvée. Remettre 30 minutes au moins à l'étuve, laisser refroidir sous dessiccateur et peser. Répéter ces opérations jusqu'à ce que les résultats donnent une différence de 0,1 mg au plus.

Calculer l'extrait et exprimer en p. 100 de matière sèche.

Puisqu'elle est proposée par le Brésil qui est le plus grand pays producteur, nous avons inclu cette technique dans la chaîne d'analyse, mais il nous semble que certains commentaires soient nécessaires :

1° l'appareil d'extraction n'est pas spécifié (Soxhlet-Kumagawa-B. B. S. ou autre). Comme les résultats peuvent varier selon le type d'extracteur, il serait bon d'indiquer quel appareil fut employé.

2° si l'extraction doit durer 3 heures au moins, il n'est pas fixé de temps maximum (ou de nombre maximum de décharges). Comme l'hydrolyse continue, il serait bon d'indiquer le temps écoulé entre le premier passage et la fin de l'extraction.

3° un récipient de 70 mm de diamètre et 15 mm de haut contient *théoriquement* 57,7 ml. Le liquide *froid* occuperait une hauteur de plus de 13 mm. Nous pensons que mieux vaut utiliser un récipient de plus grandes dimensions.

4° la pesée à poids constant, à 0,1 mg près, correspond à 0,01 p. 100 d'extrait alors que la marge d'erreur de la méthode sera probablement beaucoup plus élevée.

5° le chlorure de calcium n'est probablement pas le meilleur déshydratant pour dessiccateur. Il serait utile de veiller à ce qu'il soit réellement anhydre pour ces analyses.

* * *

Certains participants au deuxième colloque international sur la chimie du café souhaitent que d'autres méthodes soient utilisées également.

Méthode suisse PRITZER et JUNKUNZ dérivée de la méthode TAÜFEL (Z. U. N. G. 21-p. 150-1921).

La poudre de café doit passer au tamis IV (env. 0,5 mm ⌀).

On place 10 g de poudre dans un Erlenmeyer de 300 à 400 ml et on verse 200 ml d'eau. On ajoute un peu de pierre ponce pour régulariser l'ébullition et on pèse le ballon. On porte à ébullition et laisse bouillir lentement pendant 5 mn. Après refroidissement, on sèche le ballon extérieurement, on le pèse et on ajoute de l'eau jusqu'à ramener le poids au poids initial. On mélange, filtre sur filtre plissé de 15 mm ⌀, et on détermine la densité du filtrat à 20° C.

La teneur en extrait soluble dans l'eau, en p. 100, est égale à :

$$\text{Extrait p. 100} : 5160 \left(d_{20}^{20} - 1{,}0000\right).$$

Cette méthode élimine une cause d'erreur par rétention d'eau par le marc, mais une variation de 0,0001 de poids spécifique provoque une variation de teneur en extrait de 0,4 à 0,6 %.

Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec ceux qu'on aurait en remplaçant la mesure picnométrique par une mesure gravimétrique sur une partie aliquote du filtrat.

Méthode portugaise de la M. E. A. U.

La méthode à chaud de la Missão de Estudos Agronomicos do Ultramar de Lisbonne nous fut décrite par notre collègue, M. A. BAIÃO ESTEVES :

On pèse 5 g de café, que l'on introduit dans un ballon de 250 ml, puis on ajoute 100 ml d'eau distillée. On pèse alors les ballons sur une balance technique (donc à 0,1 g près, probablement). On chauffe jusqu'à début d'ébullition puis on laisse bouillir 5 mn, en réglant la chaleur pour éviter le grimpage de mousse dans le goulot. Laisser refroidir. Ajuster au poids initial par addition d'eau distillée froide. Filtrer sous vide sur Büchner. Prélever 20 ml du filtrat et évaporer au bain-marie en capsule de quartz tarée. Sécher pendant deux heures à l'étuve à 100-102° et peser à la balance de précision. Exprimer le résultat en p. 100.

WILBAUX (R.). — **Rapport sur les recherches en collaboration, relatives aux méthodes de dosage de l'extrait soluble dans l'eau du café torréfié.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 77-85, tabl.

Le groupe de travail a examiné diverses méthodes de dosage de l'extrait soluble dans l'eau, en utilisant des poudres préparées par l'I. F. C. C.

Les méthodes essayées ont été : 1) AOAC (1960), 2) Navellier (1960) légèrement modifiée, 3) Jakober et Staub (1963) légèrement modifiée, 4) Brésil (1965) avec cinq variantes, 5) Suisse (dérivée de celle de Taüfel), 6) MEAU (Lisbonne).

L'étude statistique des résultats, faite lorsque le nombre de ceux-ci était suffisant, montre que :

— la méthode (2) est la plus reproductible et pourrait servir de méthode

WILBAUX (R.). — **Report on collaborative research on methods for measuring the water soluble extract of roasted coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 77-85, tabl.

The study group had examined various methods for measuring the water soluble extract using powders prepared by the I. F. C. C.

The methods tried out were :

1) AOAC (1960) ; 2) Navellier (1960) slightly modified, 3) Jakober and Staub (1963) slightly modified, 4) Brazil (1965) with five variants, 5) Switzerland (a version of Taüfel's), 6) MEAU (Lisbon).

A statistical study of the results made when the latter were sufficiently numerous, show that : the method (2) is the most reproducible and could serve as

WILBAUX (R.). — **Bericht über gemeinsame Forschungen bezüglich der Bestimmungsmethoden für den wasserlöslichen Röstkaffee-extrakt.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 77-85, tabl.

Die Arbeitsgruppe prüfte verschiedene Bestimmungsmethoden für den wasserlöslichen Extrakt wobei sie verschiedene vom I F. C. C. zubereitete Pulver verwendete.

Folgende Methoden wurden ausprobiert : 1)AOAC (1960) ; 2) NAVELLIER (1960) leicht abgeändert ; 3) JAKOBER und STAUB (1963) leicht abgeändert ; 4) BRASILIEN (1965) mit fünf Varianten ; 5) Schweizer Methode (abgeleitet von der Methode TAUFEL) ; 6) MEAU (Lissabon).

Die statistiche Untersuchung der Ergebnisse bei genügender Anzahl derselben zeigt, dass die Methode (2) am meisten reproduzierbar ist und

de base ; (3) a la meilleure répétibilité, mais est sensible à de petites variantes opératoires ; (1) est satisfaisante, mais peu réaliste ; les variantes de la méthode (4) ne sont pas à recommander ; (5) est moins répétible et reproductible que les trois premières méthodes ; (6) n'a pu être étudiée statistiquement.

Les différences entre les trois premières méthodes sont hautement significatives.

L'étude sera reprise en diminuant le nombre de méthodes et en suivant un plan de travail statistique plus rigoureux.

a basic method ; (3) is the most easily repeated but is susceptible to small operational changes ; (1) is satisfactory, but hardly realistic ; the variants of method (4) are not to be recommended ; (5) is less easily repeated or reproduced than the three first methods, (6) could not be statistically studied.

The differences between the three first methods are highly significant.

The study will be resumed using a smaller number of methods and in adhering to a more rigorous statistical work plan.

als Grundmethode dienen könnte ; (3) die beste Wiederholbarkeit besitzt jedoch kleineren Verfahrensvarianten gegenüber empfindlich ist ; (1) zufriedenstellend aber unrealistisch ist ; die Varianten der Methode (4) nicht empfohlen werden können ; (5) weniger wiederholbar und reproduzierbar ist als die drei ersten Methoden ; (6) statistisch nicht geprüft werden konnte.

Die Unterschiede zwischen den drei ersten Methoden sind sehr bedeutsam.

Die Untersuchung wird fortgesetzt, wobei die Zahl der Methoden verringert und ein strengerer statistischer Plan befolgt werden wird.



THE PREPARATION OF GREEN COFFEE FOR CHEMICAL ANALYSIS

J. F. MENCHÚ
Asociación Nacional del Café de Guatemala

INTRODUCTION

When a bibliographic review on the chemical composition of green coffee is prepared, the lack of consistency in available data becomes evident, and it is particularly notorious with respect to content of fatty substances. SLOTTA and SZYSKA (11), working with Brazilian Arabica coffee, found variations oscillating between 4 and 14.7 %, although they admitted that the most common values were generally close to 7 %. Authors like ECKEY (5) and JAMIESON (7) quote figures ranging between 10 and 15 % for the fat content of green coffee. LEGGIERI, cited by WILBAUX (13) for Arabica coffee from Santos, found values from 13 to 14.5 % in the extract obtained with ethyl ether. This last author obtained similar values for Arabica coffees from the Belgian Congo. CALLE (4) has found figures ranging from 12.73 % for green coffee from Zetaquitá (Boyacá), to 16.50 % for a sample of coffee from Inza (Cauca) in Colombia. BRESSANI et al.(2), for thirty-two varieties of coffee from I. I. A. S. in Turrialba, Costa Rica, found an average of 10.61 %, with 11.80 % as a maximum and 9.31 as a minimum. In this case it is necessary to note the fact that Turrialba is situated in a very humid zone, at an altitude of 2000 feet. During 1958, BRESSANI and NAVARRETE (3) found, for three types of Guatemalan coffee, contents in an ether extract which varied between 6.56 and 7.75 % for green coffee on a humid basis. In a recent Gordian publication (6), Congo coffee appears among Arabica coffees with a maximum of 17.00 % and Haití coffee has a minimum of 13.00 % on a dry basis. TANGO and CARVALHO (12) found that the ratio of a petroleum ether extract changed according to variety, collection and treatment, the maximum was found for Arabica coffee of the « mucronata » variety being 16.7 % and the minimum being 12.2 % for Arabica coffee of the « murta » variety.

As the author has shown (9), altitude and climate definitely affect the content of fatty substances in coffee. However, in many cases differences among authors are undoubtedly the result, as a general rule, of the form in which the material is prepared for extraction. When the coffee is directly ground in a Micro Wiley mill with a nº 40 sieve, U. S. S. series, with a mesh opening of 0,42 mm., the waxes apparently separate from the material and cover the sieves and the knives, as a consequence of the action of heat and the nature of the material. In reality, it could be ground slowly if the operation is suspended at certain intervals to allow the material and the machine to cool, and if, at the end of the operation, the material that has remained on the mesh and knives is incorporated into the ground mass that must be homogenized. The problem is more obvious when high grown coffees are ground, as they contain a higher percentage of fatty substances, which means that it is easier to grind coffees produced at less than 900 m above sea level. On the other hand, a dry coffee with less than 10 % of moisture content can be ground with greater ease.

The problem of grinding green coffee has been solved

by two ways : drying the material, or else cooling it to such a degree that it becomes friable. In the first procedure, which is simpler, drying must be slow and it must take place at low temperatures, in order to avoid inaccurate results in certain determinations. The second procedure, which has been employed in some laboratories, such as those in the General Foods Corporation (8), is complicated up to a certain point, as it entails the cooling of both the mill and the material with dry ice, grinding once in an ordinary manner, and then a second time in order to achieve more fineness in the final end product. This firm has chosen the Hobart Mill as the most adequate for this operation.

It is relatively easy to grind the coffee bean to the fineness of the sieve with a n° 20 mesh, 0.82 mm, in the Micro Wiley mill. However, when sieves with a finer mesh are used, the operation becomes more difficult, with the above mentioned results. When quantities of more than 100 g are ground in the n° 3 Wiley Mill, using the sheet sieve that has round perforations with a diameter of 1 mm, fractions with various degrees of fineness are separated and, at the end, a considerable amount of roughly powdered material, which has not passed through the sieve, remains over it. Thus, an integral grinding of the bean is impossible with that mill. For this reason, a simple way was sought, whereby the coffee particles previously ground in the Micro Wiley mill with a n° 20 mesh sieve, could be conditioned.

MATERIALS AND METHODS

A) During the first part of the work, the green samples were ground wholly in the Micro Wiley mill, and the n° 20 mesh sieve was used first (1). One part of this material was re-ground in the same mill, with the n° 40 mesh sieve (II), and the other part was run through a mill with agate rollers, 50 mm diameter and 100 mm long, separated by 0.1 mm (III), the result was flaked material. The samples were taken from the four principal types of qualities of the country called : « Good washed », « Prime », « Hard bean » and « Strictly hard bean ».

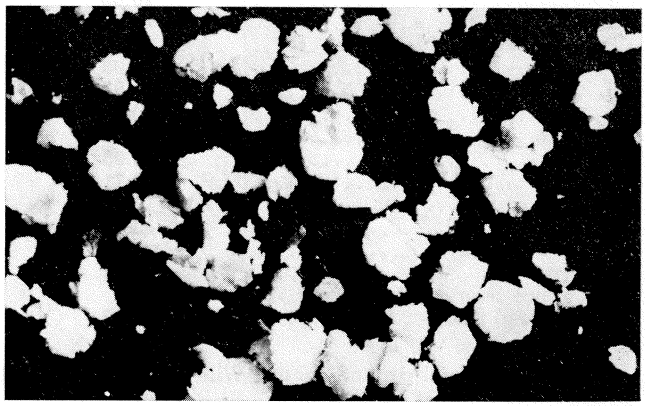
B) One sample of a « Prime » coffee was ground in a n° 3 Wiley standard model mill, with a one mm sieve, the remainder having been discarded from its surface. The ground material was ground once more in the same mill through the sieve with round openings with a 0.5 mm diameter, and part of the material was left on the sieve. A part of each powdered material was flaked in the mill with rollers separated by 0.1 mm.

C) For the determinations of fatty substances (ethyl ether extract), crude fiber and ashes, the official methods of the A. O. A. C. (1) were followed.

(*a*)



(*b*)



Ground material passed through the U. S. S. series. 20 mesh sieve, before (a) *and after* (*b*) *flaked. Both pictures with the same magnification*

RESULTS

TABLE 1

Green coffee : four types of coffee and three ways of preparation

(Percentage on the dry basis)

Type	Ether extract	Crude fiber	Total nitrogen	Ash
Good washed				
I no. 20 USS series	6.95	29.93	2.09	3.59
II no. 40 USS series	10.85	25.05	2.25	3.58
III no. 20 USS series (flaked)	13.50	23.52	2.01	3.57
Prime				
I no. 20 USS series	7.17	30.35	2.13	3.58
II no. 40 USS series	10.80	25.17	1.98	3.45
III no. 20 USS series (flaked)	13.64	24.38	2.36	3.69
Hard bean				
I no. 20 USS series	9.19	28.81	2.17	3.70
II no. 40 USS series	12.32	25.64	2.20	3.47
III no. 20 USS series (flaked)	15.42	23.24	2.07	3.58
Strictly hard bean				
I no. 20 USS series	9.98	28.14	2.10	3.36
II no. 30 USS series	14.89	23.06	2.05	3.36
III no. 20 USS series (flaked)	18.08	20.87	1.92	3.58

TABLE 2

Ether extract (« Prime » green coffee)

(Percentage on the dry basis)

Sample	Ground 1 mm	Ground and flaked 1 mm	Ground 0.50 mm	Ground and flaked 0.50 mm
1	10.85	14.63	13.38	14.42
2	10.73	14.60	13.58	14.63
3	10.84	14.74	13.36	14.65
4	10.95	14.87	13.23	14.63
5	10.61	14.54	13.25	14.63
6	10.82	14.74	13.17	14.52
7	10.82	14.65	13.26	14.42
8	10.95	14.20	13.25	14.63
9	10.71	14.43	12.90	14.61
10	10.91	14.42	13.11	14.73
Average %	10.82	**14.59**	13.25	**14.59**
Standard deviation	0.099	0.189	0.171	0.096
C. V.	0.92	1.29	1.29	0.66
Confidence interval (P = 0.05 %) of an isolated result	± 0.22	± 0.42	± 0.39	± 0.22

Note : Material ground in the Wiley standard model n° 3.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The results obtained indicate that the size and form of the green coffee particle radically affect the results of the chemical analyses, particularly in the case of determinations based on operations such as the extraction with solvents. STREULI et al (12) partially confirmed this when they compared three different methods, the A. O. A. C. 1960 edition, the German method known as D. G. P. from 1952 to 1959, and the L m B Swiss method, 1963, for the determination of fatty substances. The American method yielded consistently low data, while the German method yielded high data. According to these authors, the Swiss method yielded the best results, even when this method is based on a pre-treatment by acid hydrolysis of the finely ground material, with a subsequent extraction with petroleum ether.

In table 1 it is possible to observe that, in the ether extract, while the difference between the data obtained from the material ground in a nº 40 sieve and the flaked material amounts to 2.65 % in the « Good washed » type ; in the « Prime » coffee it is 2.85 % ; in the « Hard bean » coffee it goes up to 3.10 % and in the « Strictly hard bean » it attains the 3.19 % level. In the determinations of crude fiber, the differences are less marked. However, a difference of 2.4 % was obtained for « Hard bean » coffee. The differences in the content of ether extract are greater in the finer types, as their content of fatty substances is higher, and their content of crude fiber is lower. As could be expected, no definite differences were found in the determinations of ash and total nitrogen.

In table 2 the differences between form of preparation were less marked, probably because the milling of green coffee with a normal moisture content is never complete in a mill like the nº 3 Wiley. Extraction is definitely greater in the flaked material in comparison with the material which was simply ground, and the deviations found may be considered normal. The system of flaking the ground material has already been employed by authors like MOORES and GREINIGER (10) in the determinations of trigonelline and chlorogenic acid in green coffee. Finally, it is interesting to note that the flaked materials, both the one initially ground through a nº 20 sieve and the one ground through a nº 40 sieve, yielded similar averages in fatty substance content, which means that it is not worthwhile to grind the material more finely than a nº 20 sieve, if the rolling or flaking operation is carried out.

BIBLIOGRAPHY

1. A. O. A. C. — Methods of Analysis, 9th Edition, 1960.
2. BRESSANI, R. et al. — Effect of processing method and variety of niacin and ether extract content of green and roasted coffee. *Food Technol.*, 15, 305, 1961.
3. BRESSANI R. and D. A. NAVARRETE. — Niacin content of coffee of Central America. *Food Research*, 24, 344, 1959.
4. CALLE H. — Personal communication, September 1961. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Chinchiná Colombia.
5. ECKEY. E. W. — Vegetable fats and oils. American Chemical Society. Monograph series nº 123, pp. 758-60. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1954.
6. Gordian Publishing House. — Green and roasted coffee tests, 1963.
7. JAMIESON, G. S. — Vegetable fats and oils. American Chemical Society. Monograph series, nº 58, p. 58. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1945.
8. LEVENSON, H. S. — Personal communication, November 1961.
9. MENCHU, J. F., IBARRA, E. — The chemical composition and The quality of Guatemalan coffee — 3e colloque international sur la chimie des cafés, p. 144-154.
10. MOORES, R. G. and GREINIGER, O. M. — Determination of trigonelline in coffee. *Analytical Chemistry*, vol. 23, nº 2, p. 327, 1951.
11. SLOTTA, E., SZYSKA, G. — Uso do café no preparo do sabão ou oleo comestivel. Memorias do Instituto Butantan, vol. XI, pp. 55-60, São Paulo, Brazil, 1937.
12. STREULI, H. et al. — Determination of fat in green and roasted coffee, *Mitt. Ge. Lebensmittelunters Hyg.*, 57 (2), 142-6. 1966.
13. TANGO, J. S. and CARVALHO, A. — *Bragantia*, 22 (2), 793-8. 1963.
14. WILBAUX, R. — Les caféiers du Congo Belge. Technologie du Café Arabica et Robusta. Direction de l'Agriculture, des Forêts et de l'Elevage, Bruxelles, 1956.

MENCHU (J. F.). — **La préparation du café vert en vue de l'analyse chimique.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 86-91, fig., tabl., réf.

Lors de l'étude de la composition chimique du café du Guatemala, l'auteur a remarqué, en préparant un grand nombre d'échantillons, que dans le broyeur de laboratoire Wiley (à lames d'acier, ouverture de maille # 40-U. S. S.) une partie du grain, vraisemblablement la cire, se déposait sur le tamis, l'obstruant et entravant le broyage. Ceci se produisait surtout pour les cafés cultivés en altitude, tandis que les cafés de basse altitude, les Robusta et les cafés trop secs (teneur en eau inférieure à 10 %) étaient assez bien broyés. C'est pourquoi l'auteur a recherché une méthode de préparation des échantillons qui ne causerait aucune dissociation et aucune altération due à des températures élevées :

L'échantillon est d'abord broyé dans le même appareil, mais avec un tamis d'ouverture de maille # 20, ce qui se fait rapidement et sans échauffement du café. Le produit moulu passe entre deux rouleaux d'agate distants de 0,1 mm l'un de l'autre, afin d'obtenir des particules en forme de paillettes.

La teneur en matière grasse des échantillons ainsi préparés est toujours supérieure à celle obtenue pour les échantillons seulement broyés au travers du tamis # 40. La différence, rapportée à la matière sèche, est de l'ordre de 2,65 % pour les cafés de basse altitude et de 3,19 % pour ceux de haute altitude. La détermination de la matière sèche a donné des résultats inférieurs pour les échantillons préparés par la nouvelle méthode, la différence atteignant 2,40 % par rapport aux échantillons préparés de façon traditionnelle. On n'a pas trouvé de différence notable dans la détermination de l'azote total et des cendres.

MENCHU (J. F.). — **The preparation of green coffee for chemical analysis.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 86-91, fig., tabl., réf.

When making a study of the chemical composition of the Guatemalan coffee bean, we had to prepare a large number of samples, we noticed then that when the Wiley laboratory mill was used (a steel blade mill, using the sieve mesh # 40-U. S. S.), a part of it, apparently the wax, separated itself on the sieve obstructing and delaying the grinding. This happened particularly with high grown coffee. Low grown coffee, Robusta or coffee that had been overdried to less than 10 % humidity, were rather well milled. For this reason, we looked for a preparation of the sample in which no material could separate and where no risk could be in alterating it, due to high temperatures of the milling. We found a solution by initially grinding the material in the same mill with sieve # 20, which is done rather quickly and without heating up the coffee. Ground material is then put through a couple of agate rolls, with a separation of 0.1 mm, between them, to obtain flaked particles.

The fat contents obtained with the material thus prepared is always higher than the one obtained with the ground material only through sieve # 40.

The difference obtained was on a dry basis of 2.65 % for low grown coffee ; up to 3.19 % in high grown coffee.

The determinations of crude fiber done over the prepared material gave lower results since differences of up to 2.40 % were found with relation to the ones prepared in the traditional manner.

On determining total nitrogen and ashes, no definite differences were found.

MENCHU (J. F.). — **Die Aufbereitung des Rohkaffees im Hinblick auf die chemische Analyse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 86-91, fig., tabl., réf.

Anlässlich der Untersuchung der chemischen Zusammensetzung des Kaffees von Guatemala stellte der Autor bei der Aufbereitung einer grossen Anzahl von Muster fest, dass sich in der Labormühle Wiley (mit Stahlplatten, Maschengrösse # 40-U. S. S.) ein Teil der Bohnen, vermutlich das Wachs, auf dem Sieb absetzte, letzeres verstopfte und die Mahloperation verhinderte. Dies wurde besonders bei solchen Kaffees festgestellt die in einer gewissen Höhe gepflanzt worden waren, während die Kaffees die in niedriger Höhe wuchsen, die Robusta und die allzu trockenen Kaffees (Wassergehalt unter 10 %) ziemlich gut gemahlen waren. Der Autor suchte daher nach einer Aufbereitungsmethode der Proben die keine auf hohe Temperaturen beruhende Zersetzung und Veränderung verursachen würde.

Die Probe wird zuerst im selben Apparat gemahlen jedoch unter Verwendung eines Siebs mit einer Maschengrösse von # 20, was schnell und ohne Erhitzung des Kaffees vor sich geht. Das Mahlgut gelangt sodann zwischen 0,1 mm von einander entfernte aus Achat Rollen zwecks Erhaltung von Partikeln in Form von Pailletten.

Der Fettgehalt der auf diese Art aufbereiteten Proben ist stets grösser als der der Proben welche nur durch ein Sieb # 40 gingen. Der auf Trockensubstanz bezogene Unterschied beläuft sich auf 2,65 % für die Kaffees niedriger Höhenlage und auf 3,19 % für die aus höherer Lage. Die Bestimmung der Trockensubstanz führte zu geringeren Resultaten bei den mit der neuen Methode aufbereiteten Proben wobei der Unterschied 2,40 % im Vergleich zu den auf herkömmliche Weise aufbereiteten Proben erreichte. Bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffes und der Asche wurde kein nennenswerter Unterschied gefunden.

DISCUSSION
relative aux exposés de M. WILBAUX et de M. MENCHU

M. NAVELLIER : Après l'exposé de M. Wilbaux, je me permets d'insister sur la nécessité de nous mettre d'accord sur une méthode de base pour la détermination de l'extrait soluble du café torréfié, car cet extrait représente la partie effectivement consommée. Cette méthode de base serait choisie quand on voudrait comparer des résultats d'analyse de différents cafés.

M. LEVENSON : Mr. Menchu's work demonstrates clearly the fact that it is necessary to take extreme care in order to get analytical results with a meaning. I am sure that many of you have experienced the problem of finding the litterature full of analytical data which have little meaning because the preparation of the sample has not been made with care and nor has been explained in the paper.

M. NAVELLIER : M. Menchu a évoqué une question fondamentale pour l'analyse, comme l'a souligné le Président Levenson, et son exposé m'a extrêmement intéressé. Je voudrais simplement rappeler que parmi les techniques qui permettent de broyer le café vert, il y en a une que nous utilisons habituellement en France, c'est le broyeur à billes de Dangoumeau. Cet appareil est étanche, utilisable pour de petits échantillons, ne provoque pas d'échauffement. Un refroidissement est possible si cela est nécessaire, grâce à la circulation d'un liquide froid dans une gaine.

M. LOCKHART : In view of the fact that it is impossible for any method of analysis to be duplicated exactly in all laboratories, it is necessary that methods wherever carried out be tested according to a strict statistical design which will demonstrate the precision and reproducibility of the methods. Then a free interchange of samples will show the effects of differences and permit better communication among laboratories. The Association should concentrate a part of its effort on providing methods of experimental design and statistical analysis to further this objective which applies to all methods of analysis.

M. WILBAUX : C'est justement ce que, dans le cadre de la deuxième commission, nous avons essayé de faire en ce qui concerne l'extrait aqueux du café torréfié : établir d'une part la répétabilité intra-laboratoire et d'autre part la reproductibilité inter-laboratoires.

A COMPARISON OF METHODS FOR THE MEASUREMEMT OF MOISTURE CONTENT IN PARCHMENT AND GREEN COFFEES

A. E. WOOTTON
East African Industrial Research Organization, Nairobi

INTRODUCTION

The quality of arabica coffee is intimately associated with the drying system employed in the field and upon its moisture content during storage. Since both drying and storage problems are receiving renewed interest in East Africa, it was considered desirable to re-appraise the methods used there for moisture content measurement.

In the field and at the mills, two commercially available moisture meters are now fairly widely used as a result of the recommendations of the coffee research authorities. A number of individual meters, including those at the Coffee Research Stations in Kenya and Tanzania, have been calibrated at the East African Industrial Research Organization using a two-stage oven procedure similar in many respects to accepted methods of moisture content measurement applied to a variety of plant products. This basic method is a development from that proposed by J. B. D. ROBINSON, then of the Coffee Research Station, Kenya, and reported by D. A. B. LLEWELYN in 1955 (1). At that time it was felt that moisture content determinations entirely based upon air-oven procedures were not directly applicable in Nairobi, for example, since the normal air pressure is 625 mm Hg as a result of the relatively high altitude and the boiling point of water is thus reduced to 95° C. It seemed desirable to select a method that was independent of ambient pressure and that could therefore be reproduced anywhere. Following accepted analytical procedures, ROBINSON first subjected whole coffee beans to a preliminary drying stage in an air oven at 95-100° C. After one hour, the beans were usually sufficiently dry for grinding by means of a mill working upon the rotating knives principle, whatever the initial moisture content. After the grinding, sub-samples were then dried under vacuum at 70° C for eight hours. The method now employed at the EAIRO involves doubling the preliminary drying time and changing the conditions for the vacuum drying stage. ROBINSON reported a pressure of 540 mm Hg for this part of the analysis but was probably influenced in his choice by the equipment he had to hand. At the EAIRO, the pressure is maintained at less than 30 mm by means of a rotary oil pump and a continuous small flow of air is allowed to pass through the vacuum oven after first being dried by passage through concentrated sulphuric acid. The time during which ROBINSON



subjected the ground coffee to 70° C under vacuum has also been increased from eight to twenty-two hours. In both cases the choice has been arbitrary. It is known that a loss in weight is still continuing at eight hours and it is thought likely that samples are still losing weight at 22 hours, although at a very low rate. A period of 22 hours is favoured since it fits in well with an overall 24-hour routine for moisture content analysis.

After the approval of the GUILBOT fundamental reference method for the measurement of moisture content in green coffee (2) by the « Association Scientifique Internationale du Café » at the second Chemistry of Coffee conference in Paris, 1965 (3), it was evident that the two-stage oven method employed in East Africa ought to be compared with the GUILBOT procedure, particulary now that the moisture content of coffee might achieve increasing significance in international trade. Although none of the special apparatus described in detail by GUILBOT was available, it was possible to devise essentially similar equipment. A Wiley mill (rotating knives) was available in place of the Dangoumau ball mill to grind the partially dried coffee beans with no concomitant moisture loss. The heating of samples at 50° C under vacuum was achieved by use of a Scheibler type of desiccator, the lower half of which was immersed in a waterbath at 57 $\pm$ 0.1° C and the upper half of which contained a phosphorus pentoxide reservoir supported towards the top of the desiccator ; initial temperature measurements showed that under working conditions the coffee samples placed in the bottom of the vessel were at 50° C and the desiccant at less than 30° C. A pressure of less than 30 mm was maintained continuously by the same rotary oil pump as was used for the EAIRO method. Using two desiccators in this way, it was possible to accommodate six weighing bottles containing coffee sub-samples at the same time. Preliminary trials showed that ground coffee samples attained constant weight conditions within 100 hours using this apparatus.

The sampling and sub-sampling procedure used for these two reference methods is clearly of considerable importance, an issue which has received close attention elsewhere (4). To avoid the complications of differing sampling errors, the sampling and sub-sampling procedure used for the EAIRO method was also selected for the GUILBOT method.

Simultaneously, it was possible to assess in a more exacting way than hitherto the precision of the two moisture meters recommended for application to coffee in East Africa. An arbitrary scale reading is obtained from both meters which indirectly reflects the variation of a capacitance, the dielectric of which is composed of a weighed amount of coffee under test. The electronic circuitry is designed to provide a linear relationship of scale reading to percentage moisture content (wet basis) as far as it is possible to do so. Two models of one meter were available, one from the EAIRO and the other from the Coffee Research Station, Kenya ; these will be referred to as meters A_1 and A_2 respectively. A relatively new transistorised version of the other meter was loaned by the local agents for the purposes of this study and will be called meter B.

It should be emphasized that the work discussed below is concerned entirely with stored parchment and green coffee. It is appreciated that meter readings taken from a coffee sample immediately after collection from a drying table or conditioning bin, for example, are often different from readings taken after storage in a sealed container for a day or more, although identical moisture contents would have been determined by the reference methods. This very important practical issue warrants a separate investigation.

EXPERIMENTAL

From a batch of arabica coffee cherry picked and fermented in the normal way at the Coffee Research Station, Kenya, a series of samples was collected during the sun-drying stage in order to provide a range of moisture contents between 6 and 20 %. A part of each sample was hulled using a McGill huller and the hulled coffee was then placed in a canvas bag and sealed in the 18-litre tin containing the remainder of the parchment sample. The twelve tins were stored in an air-conditioned room at a temperature of 20° C. After the elapse of at least two months, the hulled and parchment samples were examined in sequence for moisture content using the three meters and the EAIRO oven method. At the same time, sub-samples of approximately 500 cm^3 in volume were transferred to glass jars fitted with air-tight lids. All the jars were kept in the same air-conditioned room until the sub-samples were required for the GUILBOT fundamental reference procedure for the determination of moisture content. The long time required for this method and the limited capacity of the apparatus used led to the elapse of over three months before completion of the programme.

Both reference methods are described in full in the appendix. It will be observed that the procedures are similar, in each case involving a preliminary drying in the whole bean state followed by a grinding stage prior to a final vacuum drying at moderate temperatures.

The recommended procedures for each of the meters involved the examination of an arbitrarily selected weight of material. After the initial « setting up » procedure

required for meters A_1 and A_2, 900 g of coffee, whether parchment or green, was weighed to within 0.25 g and transferred to the meter cell. Before placing the cell in the meter it was shaken lightly six times in the vertical plane in order to provide a uniform packing of the coffee. After taking a reading, the coffee was poured into a beaker and then returned to the cell ; in this way, five readings were obtained for the same 900 g of coffee. A similar procedure was used for meter B although in this case the chosen weights were 80 g of parchment or 100 g of green coffee.

All possible practicable steps were taken to avoid errors arising from the possible moisture content changes during the course of the meter reading procedure. The readings from all three meters were taken as rapidly as possible consistent with accuracy and parallel samples for the oven procedure were weighed out simultaneously.

It was appreciated that the meter readings are dependent upon sample temperature. For meters A_1 and A_2, no temperature readings were taken ; since the coffees were stored at 20° C, however, it is unlikely that the temperature at the time of reading had changed by more than a degree or two even though the meters were in a room not fitted with air-conditioning. The temperature of this room rarely exceeds 25° c. From earlier investigations it is known that temperature changes of this magnitude have a negligible effect upon meter reading. Meter B is fitted with a thermometer marked off in corrections to be added to or substracted from the meter reading. These corrections were nearly always quite small and the subsequent analysis of results demonstrated that the uncorrected figures correlated more closely with the data obtained from the oven methods. The temperature corrections for meter B were therefore ignored.

RESULTS

The meter readings recorded in tables 1 and 2 are the mean values of the five separate readings taken for each sample. The figures for percentage moisture content (wet basis) reported for the two reference methods represent the average values of the three parallel determinations carried out on each coffee sample. Duplication was normally excellent ; in two cases, however, one of the three determinations was rejected because of evidence of error and the reported figures for these samples are the means of the two accepted determinations.

TABLE 1

Percentage moisture content as determined by two reference methods and scale readings for three moisture meters for twelve samples of stored parchment coffee

Sample	Moisture content %		Scale reading		
	GUILBOT reference method	EAIRO reference method	Meter A_1 range 2	Meter A_2	Meter B
1	N. D.	6.56	14.6	243	N. R.
2	7.76	7.47	17.8	256	N. R.
3	9.36	9.21	26.1	273	5.50
4	9.85	9.84	28.0	283	5.81
5	11.06	10.66	35.5	297	N. D.
6	12.11	12.31	39.4	313	7.11
7	13.09	13.25	45.3	325	7.72
8	13.77	13.98	50.7	341	7.92
9	15.28	15.34	54.8	354	N. D.
10	17.40	17.48	63.2	379	9.36
11	17.77	17.81	63.5	387	9.60
12	19.03	19.06	69.2	395	9.95

N. D. = not determined. N. R. = no reading.

TABLE 2

Percentage moisture content as determined by two reference methods and scale readings for three moisture meters for twelve samples of stored green coffee

Sample	Moisture content %		Scale reading			
	GUILBOT reference method	EAIRO reference method	Meter A_1		Meter A_2	Meter B
			range 2	range 3		
1	N. D.	6.83	27.4	—	276	N. R.
2	7.91	7.65	30.0	—	289	8.40
3	9.31	9.21	38.9	—	313	9.40
4	9.85	9.79	41.3	—	320	9.70
5	11.37	10.88	51.4	—	370	N. D.
6	12.51	12.48	58.6	—	369	12.25
7	13.59	13.39	64.0	—	388	13.26
8	14.30	14.30	69.3	0.8	412	14.30
9	15.79	16.15	—	13.2	446	N. D.
10	17.67	17.87	—	25.7	477	17.56
11	18.26	18.30	—	30.0	486	18.27
12	19.31	19.77	—	37.7	512	19.51

DISCUSSION

Parchment coffee

The agreement between the results of the two reference methods is very close. For as many as five of the eleven possible comparisons, the difference is less than 0.1 % moisture content. It can be concluded, therefore, that the EAIRO two-stage oven method provides as good a measure of moisture content as the accepted international reference method within the range from 6 to 20 %.

However, there is a consistent tendency for the EAIRO method to produce slightly lower values of moisture content at the lower end of the range (all samples 2 to 5) and to produce slightly higher values at the upper end (all samples 6 to 12), although the slope of the regression of the EAIRO method on the GUILBOT method does not differ significantly from 1.0.

This result may arise from differences between the methods. Alternatively, the sub-samples retained for the GUILBOT procedure following completion of all the other analyses may have lost or gained moisture during their wait prior to examination, in spite of being kept in « air-tight » containers. The differences would fit fairly well with this possibility since the optimum moisture content for parchment coffee under the storage conditions used is about 13 %.

Correlation coefficients (r) have been derived between pairs of methods and are listed in table 3. In the same table, values of $(1 - r^2) \times 100$ are included and also the standard errors of the deviations from regressions of reference method on meter reading. The derivation of these values is justified by the preliminary observation that the readings from meters A_1 and A_2 adhere to a simple straight line relationship to the percentage moisture content obtained from the reference methods. This issue may be confirmed by reference to figure 1 (next page) which shows the relationship between meter A_2 and the EAIRO oven method.

It is evident that all five methods for measuring the moisture content of stored parchment coffee correlate closely with each other. From the five sets of figures listed in table 1, there are ten possible comparisons of two sets at a time. Of these, the correlation between the two reference methods provides the highest correlation coefficient of all, 0.99900, a result which is not unexpected. This result confirms the ability of both these basic methods to give accurate results. Since the correlations between the three meters and the EAIRO method are all closer than those between the meters and the GUILBOT method, it is apparent that the former provided more accurate results than the latter, although this may merely be a measure of an experienced operator using familiar techniques as against a less experienced operator using unusual and by no means ideal equipment. The sampling procedure used for both oven methods are identical and cannot, therefore, account for differences of accuracy.

It is also apparent that meter A_2 provides more accurate results than the similar A_1 since its scale readings

are correlated to both reference methods appreciably more closely. Again, this is an expected result as A_2 is a more recent model than A_1 and was found easier to operate.

For stored parchment coffee, meter B is off-scale below about 9 % moisture content (an acceptable limit in practice) and is evidently less precise than A_1 and A_2 above this level. A close examination of the rather limited data, however, shows that it is probable that the relationships between meter B readings and either of the moisture content values determined by the oven methods are not best described by a straight line and therefore the calculation of a correlation coefficient without an initial transformation of the data is not strictly applicable. If the relationships are defined by the best possible curve, it is likely that the precision of the instrument can be shown to be better than is indicated by a standard error equal to 0.29 or 0.38 % moisture content, the values recorded in table 3. It should be stressed that this meter is not specifically recommended for parchment coffee ; it is claimed that more precise results can be obtained by first hulling a parchment sample and taking readings for the equivalent green coffee. It will be seen in the next section that this meter is certainly more precise when used for green coffee.

The calculated values for the term $(1 - r^2) \times 100$ reported in table 3 provide an estimate of the percentage of a reading which is accounted for by uncontrolled variables which bear no relation to moisture content, such as, for example, sampling errors and electronic variations.

For the relationship of the meter A_2 readings to the EAIRO oven procedure $(1 - r^2) \times 100 = 0.23$; 0.28 % of the reading is therefore due to uncontrolled variables, a figure which may be compared with the value of 1.21 % for the meter readings of B in relation to the GUILBOT procedure.

The calculated standard errors included in table 3 all fall within the range 0.21 to 0.38 moisture content. For the closest relationship, that between meter A_2 and the

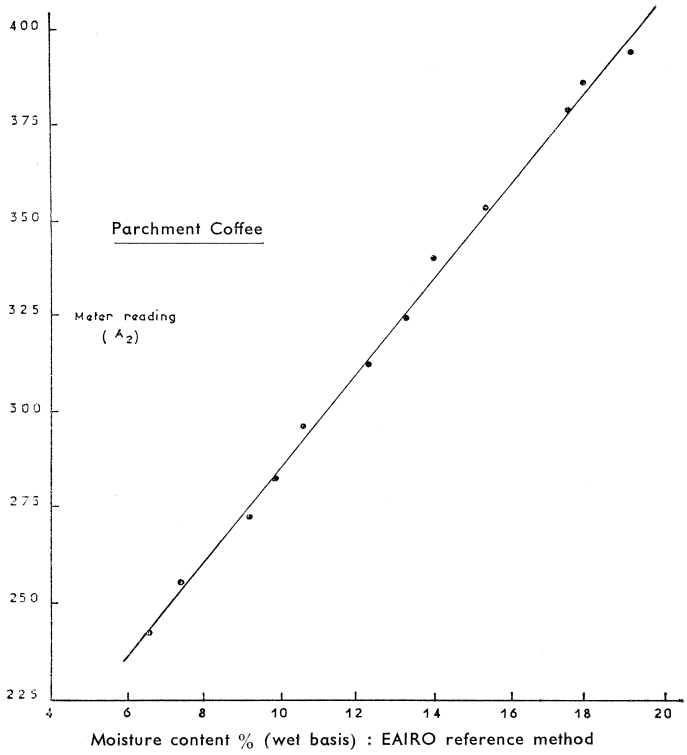


Fig. 1. — Relationship between meter A_2 readings and % moisture content by E. A. I. R. O. reference method

EAIRO oven method (and which represents the accepted calibration for that particular meter), it is evident that two-thirds of the results obtained from the meter should fall within ± 0.21 % moisture content of the true value, on condition, of course, that the same procedure for using the meter is adhered to. Results should fall within ± 0.42 % moisture content for 95 % of all tests. In the poorest case, meter B, calibrated against the GUILBOT method, should provide results to within ± 0.38 %

TABLE 3

Statistical information derived from the data of table 1

Methods	Correlation coefficient r	$(1 - r^2)$ 100	Standard error % moisture content
EAIRO V GUILBOT	0.999 00	0.20	—
Meter A_1 V GUILBOT	0.995 04	0.99	0.35
Meter A_2 V GUILBOT	0.997 41	0.52	0.26
Meter B V GUILBOT	0.993 92	1.21	0.38
Meter A_1 V EAIRO	0.996 85	0.63	0.31
Meter A_2 V EAIRO	0.998 58	0.28	0.21
Meter B V EAIRO	0.996 48	0.70	0.29
Meter A_2 V Meter A_1	0.997 81	0.44	—

of the true percentage moisture content for two tests out of three and within ± 0.76 % in 19 out of 20.

As the correlation coefficient for the relationships of meters A_1 to A_2 is of the same order as for the relationships of the individual meters to both oven methods, there is no incidental evidence that the meters are appreciably sensitive to any variable other than moisture content itself.

Green coffee

As for parchment coffee, the agreement between the results of the two oven methods is very close, as many as five of the eleven possible comparisons showing differences equal to or less than 0.1 % moisture content. The appropriate correlation coefficients for the parchment and green coffees, 0.99900 (table 3) and 0.99895 (table 4) respectively, are very similar. It can be concluded therefore that the EAIRO two-stage oven method provides as good a measure of moisture content as the accepted international reference method within the range of 6 to 20 %.

A tendency for the EAIRO method to produce slightly lower values of moisture content at the lower end of the range (all samples 2 to 7) and to produce slightly higher values at the upper end (all samples 9 to 12) is evident for green coffee in the same way as for parchment. Here, in contrast to the results for parchment coffee, the slope of the regression of the EAIRO method on the GUILBOT method differs significantly from 1.0 at just about the 1 % level.

Correlation coefficients have been derived for the values obtained from pairs of methods and are listed in table 4 along with calculated values of the term $(1 - r_2) \times 100$ and standard errors of the deviations from regressions of reference method on meter reading. Straight line relationships are again demonstrable for meter A_1 and A_2 against moisture content as determined by either reference method. For green coffee, in contrast to parchment, it is evident that meter B readings also bear an essentially linear relationship to moisture content.

When using meter A_1 for the green coffee samples it was necessary to change from range 2 to range 3 for moisture contents above 14.30 %. Because of this break in continuity of readings, correlations involving range 2 readings only have been considered. In table 4, the bracketed figures relate to samples 2 to 8 (v. GUILBOT method) and to sample 1 to 8 (v. EAIRO method) only. These correlation coefficients are relatively high but are to be regarded with caution because of the limitation to the data.

In contrast to the results for parchment coffee, no clear-cut conclusion can be drawn as to whether either of the two reference procedures provided the more accurate results for green coffee moisture content.

The limited value to be attached to the available correlation coefficients for the relationships of meter A_1 to the oven procedures makes it impossible to compare properly the precisions of meters A_1 and A_2, although the data suggest that, for green coffee, A_1 provided the more accurate result, the reverse of the conclusion reached for the parchment samples.

Meter A_2 clearly performed better for parchment than for green coffee, although this may merely be a result of adhering to the same test sample weight. Whereas the 900 g of parchment occupies approximately 70 - 75 % of the volume contained below the maximum recommended cell filling, the same weight of green coffee takes up only 45 - 50 % of this volume. It is quite likely that an improved accuracy for green coffee could be obtained by selecting a greater sample size.

It is evident that meter B achieves a markedly superior order of precision when used for green coffee, the correlation coefficients in relation to the GUILBOT and EAIRO oven methods being as high as 0.99821 and

TABLE 4

Statistical information derived from the data of table 2

Methods	Correlation coefficient	$(1 - r^2)\ 100$	Standard error % moisture content
EAIRO V GUILBOT	0.998 95	0.21	—
Meter A_1 V GUILBOT	(0.999 48) (1)	—	—
Meter A_2 V GUILBOT	0.995 82	0.83	0.34
Meter B V GUILBOT	0.998 21	0.36	0.23
Meter A_1 V EAIRO	(0.997 16) (2)	—	—
Meter A_2 V EAIRO	0.995 09	0.98	0.41
Meter B V EAIRO	0.998 36	0.33	0.23

(1) Derived for seven samples only. (2) Derived for eight samples only.

0.99836 respectively. Furthermore, a scale reading is obtained even at moisture contents as low as 7.5 % as compared with a lower limit of about 9 % in the case of parchment coffee. The values of the term $(1 - r^2) \times 100$ improve from 1.21 and 0.70 in the case of parchment coffee to 0.36 and 0.33 respectively for the green coffee samples. The standard error is 0.23 in relation to both oven methods, very nearly the best value obtained for the whole investigation. It is very important to note, however, that the sample size required for meter B is 100 g only as against 900 g for the other meters. For this reason, measurements by meter B for samples taken from a bulk possessing an uneven moisture distribution are bound to include a much higher sampling error than for meters A_1 and A_2. The investigation under discussion dealt with coffee samples that must have attained a high degree of homogeneity during their relatively long storage time before analysis.

The scale of meter B was calibrated by the manufacturers in « percentage moisture content » for green coffee. It is evident that the reference method that had been employed for the calibration provided results very close to the GUILBOT and EAIRO reference methods. The evidence for a substantial deviation at the low end of the range considered is too slender to justify any firm conclusion.

CONCLUSIONS

The EAIRO and GUILBOT two-stage oven methods for the determination of moisture content provide nearly identical results for both parchment and green coffee within the range 6 - 20 % (wet basis).

Meters of the type A_1 and A_2 are satisfactory for the measurement of moisture content in both parchment and green coffee and are capable of providing values accurate to $\pm$ 0.4 % moisture content for 95 % of all tests on parchment and to $\pm$ 0.7 % moisture content for 95 % of all tests on green coffee. The precision of the instrument for green coffee could possibly be improved by selection of a larger sample size.

Meters of the type B may be employed for parchment coffee but are limited to measurements above 9 % and by an accuracy no better than $\pm$ 0.7 % moisture content for 95 % of all tests. Since this meter requires only a small test sample it is suggested that an adequate quantity of parchment coffee should be hulled before examination in order to take full advantage of the instrument's capabilities. This meter is greatly superior when used for green coffee, having a limiting moisture content below 7.5 % and an accuracy better than $\pm$ 0.5 % moisture content for 95 % of all tests.

Acknowledgements

This report was made possible by the careful work of J. K. PATEL and D. K. WAWERU of the East African Industrial Research Organization.

APPENDIX

Reference methods for the determination of moisture content in parchment and green coffees

EAST AFRICAN INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION METHOD

Triplicate 20 - 40 g samples of whole coffee beans are accurately weighed into tared aluminium dishes. The samples are placed in an air-oven with a forced draught and dried for two hours at 95° C. The samples are then transferred to a desiccator containing concentrated sulphuric acid. When cool, the samples are weighed and the loss in weight is recorded. The samples are now ground in a Wiley mill (rotating knives) until they pass through a 20-mesh screen directly into glass bottles. The sample bottles are closed by screw-top lids immediately at the end of grinding. As soon as possible, aliquot portions of about 5 g from each of the three ground samples are accurately weighed into tared weighing bottles which are then placed in a vacuum oven and the lids removed. They are now heated for 22 hours at 70° C and a pressure of less than 30 mm Hg maintained continuously by a rotary oil pump. Throughout, a small flow of air which has been pre-dried by passage over concentrated sulphuric acid is allowed to pass through the oven. The vacuum is then gradually released, the incoming air first passing over the concentrated sulphuric acid. The lids are replaced at once and the bottles and samples transferred to a desiccator again containing concentrated sulphuric acid. The samples are weighed as soon as cool and the loss in weight recorded. From the two losses in weight the moisture content of the coffee can be calculated. This is expressed as percentage wet basis.

GUILBOT METHOD (ADAPTED)

Triplicate 20 - 40 g samples of whole coffee beans are accurately weighed into tared aluminium dishes. The samples are placed in an air-oven with a forced draught and dried for two hours at 95° C. The samples are then transferred to a desiccator containing concentrated sulphuric acid. When cool, the samples are weighed and the loss in weight is recorded. The samples are now ground in a Wiley mill (rotating knives) until they pass through a 20-mesh screen directly into glass bottles. The sample bottles are closed by screw-top lids immediately at the end of grinding. As soon as possible, aliquot portions of about 5 g from each of the three ground samples are accurately weighed into tared weighing bottles which are then placed in the bottom of a Scheibler type desiccator which has its lower portion immersed in a water-bath at 57 ± 0.1° C thus ensuring a sample temperature of 50° C. The lids are removed, a glass dish containing phosphorus pentoxide is placed in a cradle supporting it towards the top of the desiccator and the desiccator lid replaced. Drying is continued for 150 hours at a pressure of less than 30 mm Hg maintained continuously by a rotary oil pump. The samples are weighed at 100 and 150 hours, on each occasion the vacuum being released using air first passed over concentrated sulphuric acid. The phosphorus pentoxide is replaced at 100 hours. From the loss in weight incurred during the air-oven stage and the loss in weight during the vacuum drying stage up to 150 hours, the moisture content of the coffee can be calculated. This is expressed as percentage wet basis.

REFERENCES

1. LLEWELYN, D. A. B. — « Coffee Drying ; Preliminary report to the Coffee Board of Kenya », E. A. Industrial Research Organization, Nairobi, Kenya (1955).
2. GUILBOT, A. — « Détermination de la teneur en eau des cafés », Premier Colloque International sur la Chimie des Cafés, Paris, May, 1963.
3. SMITH, R. F. — « A Report on the Determination of Moisture in Raw Coffee Beans ». Second Colloque International sur la Chimie des Cafés ; Paris, May, 1965.
4. d'ORNANO, M., HAHN, D. and POUGNEAUD, S. — « La détermination de la teneur en eau du café vert ». *Café, Cacao, Thé* (Paris), **8**, 2, 113 (1964).

WOOTTON (A. E.). — **Comparaison de méthodes de détermination de la teneur en eau du café en parche et du café vert.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 92-100, fig., tabl., réf.

Une série d'échantillons de café en parche a été prélevée sur un lot de café Arabica préparé par voie humide et séché au soleil. Les teneurs en eau de ces échantillons et celles du café vert préparé à partir de ces échantillons s'échelonnaient de 6 % à 20 % environ.

La méthode de référence utilisée pour la mesure de la teneur en eau au laboratoire de l'Afrique Orientale (étuvage en deux stades) a été comparée à la méthode de Guilbot ; les résultats sont tout à fait similaires. Les échantillons ont simultanément été examinés avec trois doseurs d'humidité.

Les cinq séries de résultats sont comparées, les coefficients de corrélation et les erreurs standards déduits ; les méthodes de laboratoire et les doseurs sont présentés de façon critique.

WOOTTON (A. E.) **A comparison of methods for the measurement of moisture content in parchment and green coffees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Tieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 92-100, fig., tabl., réf.

A series of parchment coffee samples were collected from one batch of sun-drying, wet-processed, arabica coffee. The moisture contents of the samples, and the green coffee samples prepared from them, ranged from about 6 to 20 %. The East African laboratory reference method for moisture content (a two-stage oven procedure) was compared with the Guilbot method and is shown to produce closely similar results. Simultaneously the samples were examined using three moisture meters. All five sets of results are compared, correlation coefficients and standard errors are derived and the laboratory procedures and meters critically assessed.

WOOTTON (A. E.). — **Vergleich der Bestimmungsmethoden des Wassergehalts des Hülsenkaffees und des Rohkaffees.** Troisième Colloque International, sur la Chimie des Cafés Verts, Torfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C, (Paris), 1968, p. 92-100, fig., tabl., réf.

Einem Los Kaffee Arabica, der nass aufbereitet und sonnengetrocknet worden war wurde eine Reihe von Hülsenkaffeeproben entnommen. Der Wassergehalt dieser Proben und derjenige des aus diesen Stichproben aufbereiteten Rohkaffees lag ungefähr zwischen 6 % und 20 %.

Die für die Bestimmung des Wassergehalts im Laboratorium Ostafrikas angewandte Bezugsmethode (Zweistufentrocknung im Heizschrank) wurde mit der Methode von Guilbot verglichen ; die Ergebnisse waren völlig ähnlich. Die Stichproben wurden zugleicher Zeit mit drei Feuchtigkeitsmesser untersucht.

Die fünf Reihen Resultate wurden verglichen, die Korrelationskoeffizienten und die Standardfehler abgezogen ; die Labormethoden und die Feuchtigkeitsmesser werden einer Kritik unterzogen.

DISCUSSION

M. d'ORNANO : Quelle est l'influence du volume apparent et du gonflement du café vert à la reprise d'humidité, avec hystérésis au reséchage, sur les mesures diélectriques de l'humidité du café vert en grains ?

M. WOOTTON : We appreciate the probabilities of dielectric meter readings being influenced by coffee which has been re-wetted. In addition to the swelling of the beans, it is known that re-wetted coffee is in equilibrium with a humidity somewhat higher than coffee dried down to exactly the same moisture content. This effect can also be expected to alter the meter readings.

M. NAVELLIER : M. Wootton a montré très clairement que la méthode de référence de Guilbot est en accord satisfaisant avec la méthode en usage dans l'Est Africain et que certains appareils de mesure rapide ont également donné des résultats en bonne corrélation. Par ailleurs, M. Illy a précisé que l'ICO entend rapporter les études sur le dosage de l'eau aux résultats obtenus au moyen de la méthode pratique, c'est-à-dire la méthode de chauffage en deux temps à 130 °C.

Cette méthode pratique est présentée à l'ISO et nous allons être amenés à prendre position d'ici à la fin du mois, aussi voudrais-je demander à M. Wootton ce qu'il pense de cette méthode et des résultats qu'elle donne par rapport à ceux qu'il nous a exposés.

M. WOOTTON : The two-part practical method for the determination of moisture content using a temperature of 130 °C appears to be satisfactory in principle. We have not used it in East Africa, however since our requirements are met by the meters commonly in use and the EAIRO reference method. Using the latter, about six samples can be examined daily quite readily.

COMPOSITION ET CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DE *COFFEA* SAUVAGES DE MADAGASCAR (*)



M. d'ORNANO

II. — Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés

III. — Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages

M. d'ORNANO, F. CHASSEVENT, S. POUGNEAUD
Institut Français du Café et du Cacao, Paris

II. — RECHERCHE DE LA CAFÉINE ET D'AUTRES MÉTHYLXANTHINES DANS LES FEUILLES ET LES GRAINES DE CAFÉIERS SAUVAGES ET CULTIVÉS

INTRODUCTION

Dans une communication faite au Deuxième Colloque sur la Chimie des Cafés en mai 1965, nous avions montré (1) que l'étude entreprise sur la composition chimique des graines d'un certain nombre de *Coffea* sauvages de Madagascar amenait à conclure à l'absence, dans les graines étudiées, de caféine en quantité appréciable. Ceci ouvrait des perspectives intéressantes pour la connaissance du caféier en général et pour l'utilisation pratique future de ces *Coffea*. Il fallait d'abord s'assurer, par des méthodes plus fines, de l'absence totale de caféine dans ces cafés sauvages, et ensuite étudier si la chaîne normale de synthèse de la caféine subsistait quand même dans le caféier, malgré un défaut du stade ultime représenté par la caféine, ou si cette chaîne était remplacée en totalité par une autre chaîne biochimique. Selon que l'on pencherait vers l'une ou l'autre de ces deux possibilités, les conséquences, notamment sur le plan de la systématique, en seraient très importantes. Cette recherche déplaçait donc son centre d'intérêt des graines vers les feuilles, siège du métabolisme de la caféine, et nous amenait de ce fait à situer nos travaux dans le contexte de la biosynthèse de la caféine, actuellement encore peu connue.

(*) 1ère partie de cette étude : I. — Recherches préliminaires sur leur teneur en caféine et isolement de la cafamarine. Second Col. Int. Chimie Cafés, Paris, 3-7 mai 1965. I. F. C. C. (Paris) 1966, p. 131-144.

LA BIOSYNTHÈSE DE LA CAFÉINE

Des études faites jusqu'à présent sur la présence de caféine dans les feuilles de caféiers et sur le métabolisme de cette substance, on peut retenir les principaux points suivants :

— On a depuis longtemps trouvé de la caféine dans les feuilles de caféiers. La plupart des auteurs ont également mis en évidence la différence de teneur entre la feuille jeune, de 0,5 à 1 %, et la feuille agée, qui peut en être totalement dépourvue. Citons WEHMER (2), RAOUL (3), VAN ROMBURGH et LOHMANN cités par COOLHAS et coll. (4), DE WILDEMAN (5), HERNDLHOFER (6).

— La présence de bases azotées autres que la caféine dans les feuilles a été signalée par WEHMER (2), DE WILDEMAN (5), MICHL et HABERLER (7), les uns citant les autres. Ainsi ces auteurs mentionnent la xanthine, l'adénine, l'hypoxanthine, la guanine et la trigonelline, en plus de la caféine, dans les feuilles de *C. arabica*. NEUBAUER (8), plus récemment, ne met en évidence que la caféine.

— D'autres bases azotées seraient également présentes dans les graines à côté de la caféine, selon WEHMER (2) et DE WILDEMAN (5), qui y signalent l'adénine, la xanthine et l'hypoxanthine, mais seulement dans les fruits non mûrs, et d'après semble-t-il d'autres auteurs (VAN ROMBURGH et LOHMANN). En 1965, LEHMAN et MARTINOD (9) montrent qu'il y a dans les grains de café de la caféine et de la théobromine dans le rapport 10.000 à 1 ; ceci confirme l'hypothèse faite au début de leurs travaux sur la présence possible des termes intermédiaires de la méthylation entre xanthine et caféine ; par méthylation synthétique de la xanthine par le diméthylsulfate, ils retrouvent la théobromine et la caféine, mais ni la monométhylxanthine, ni la théophylline.

— La teneur en caféine des feuilles diminue avec l'âge de l'arbre, selon HERNDLHOFER, cité par COOLHAS (4).

— En 1965, POISSON (10) fait le point des connaissances acquises sur la biosynthèse de la caféine. Il traite de certains des travaux cités plus loin.

— Chez le théier comme chez le caféier, la biosynthèse de la caféine est étudiée à l'aide de précurseurs marqués (acides aminés, etc.), avec dégradation ménagée de la molécule de caféine aboutissant à des dérivés représentant des fragments de cette molécule, par ZAPROMETOV (11), PROJSER et SERENKOV (12), ANDERSON et GIBBS (13).

— En 1954, KREMERS (14) étudie la diphosphopyridine nucléotide (DPN) comme précurseur de la trigonelline et de la caféine chez le caféier.

— Cette hypothèse est reprise par WANNER et BLAIM (15-16), et KENDE (17), qui cernent le problème de façon systématique. Ils précisent que le DNP est plus à l'origine de la trigonelline que de la caféine. Ils confirment que la teneur en caféine des feuilles diminue avec l'âge de la feuille, mais, ce qui est très important, ils mettent en évidence que cette teneur, rapportée à la teneur en eau de la feuille, reste constante, ce qui montre l'importance de la quantité de caféine à peu près constante contenue dans l'eau de transport. Il n'y a pas, par contre, de caféine ni dans les racines, ni dans la sève venant des racines. Le parenchyme des feuilles est plus riche que les nervures latérales, elles-mêmes plus riches que la nervure centrale, de telle sorte que la teneur en caféine diminue à mesure que l'on s'éloigne du parenchyme. A l'aide de traceurs radioactifs, ces auteurs montrent que l'activité spécifique de la caféine croît asymptotiquement, puis reste constante, bien que l'on ait cessé d'alimenter la plante en précurseurs radio-actifs, ce qui suppose que la caféine n'est plus incluse dans une suite de transformations ultérieures (si la caféine était ensuite transformée, l'activité spécifique diminuerait), mais qu'elle est synthétisée et stockée au fur et à mesure de la croissance de la feuille, puis transportée ou dégradée au moment du vieillissement de la feuille. La constance de sa teneur dans l'eau de la feuille est à rapprocher de ces constatations.

— On peut trouver confirmation de ces résultats dans les travaux de SPEDDING et WILSON (18), qui ont déterminé le pourcentage de carbone 14 dans la caféine extraite de feuilles de thé, et dans ces mêmes feuilles réduites en poudre : la radio-activité due au carbone 14 de la caféine est inférieure à celle des feuilles, ce qui montre que la caféine a été synthétisée antérieurement et stockée.

— Pour mémoire, citons KALBERER (19), qui décrit chez les feuilles de caféier âgées la dégradation de la caféine en allantoïne, puis en urée et enfin en gaz carbonique.

MATÉRIEL VÉGÉTAL

On peut donc valablement supposer que la caféine est élaborée, puis mise en réserve dans les feuilles de caféier, et que l'étude de sa présence éventuelle chez les feuilles de caféiers sauvages de Madagascar doit nous permettre de savoir si elle se forme ou non dans les feuilles. Il y a à cette manière d'aborder le problème un autre avantage : les caféiers sauvages que nous étudions sont plantés en collection dans les stations de Madagascar de l'Institut Français du Café et du Cacao, et des essais de greffes à partir de caféiers sauvages sur caféiers cultivés, et réciproquement, ont été entrepris pour étudier la possibilité d'obtenir des cafés possé-

dant les qualités traditionnelles des cafés cultivés tout en restant naturellement exempts de caféine. Or les plants ainsi réunis ou greffés ne donnent pas de graines dès la première année, et l'étude des feuilles permet de gagner un temps précieux.

Nous avons dans le présent travail commencé par étudier les feuilles des caféiers sauvages et cultivés provenant des plants mêmes utilisés pour les greffes, dont l'étude sera faite plus tard. Les feuilles, broyées et séchées à poids constant, provenaient des plants suivants :

— deux plants d'Arabica (Arabica B et Arabica S),

— deux plants de Congusta, hybride Congensis-Robusta (Congusta HA et Congusta HB),

— un plant d'Excelsa,

— sept plants de caféiers sauvages : Millottii 219, Millottii 222, Vatovavyensis, Farafanganensis, Lancifolia, Buxifolia, Mangoroensis.

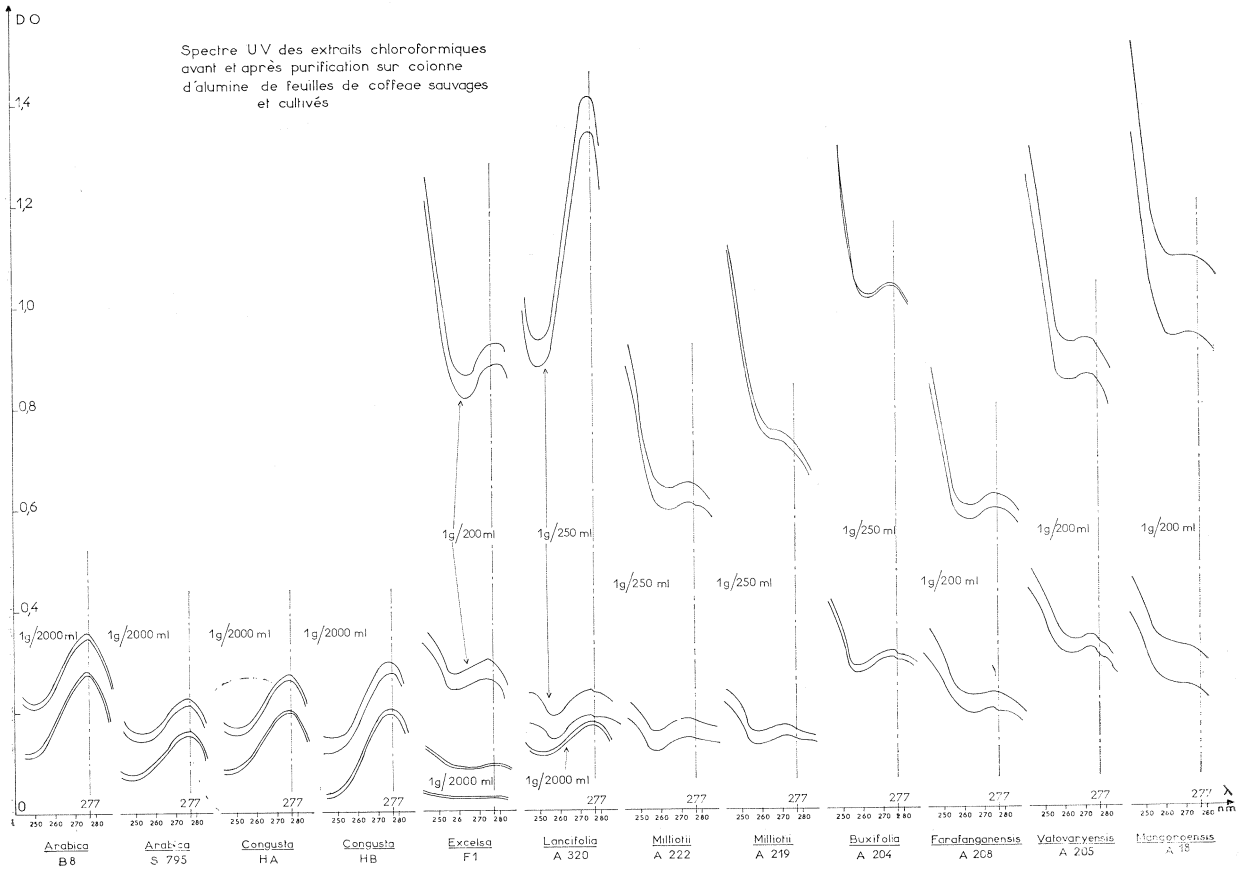
SPECTRES D'ABSORPTION U. V. DES EXTRAITS CHLOROFORMIQUES DE FEUILLES

La poudre de feuilles a été extraite par le chloroforme à chaud, après traitement à l'ammoniaque à 10 %, selon la méthode de dosage de la caféine de KUM-TATT-LEE (20). La caféine et éventuellement les autres méthylxanthines furent solubilisées dans un extrait chloroformique brut, dont une partie aliquote, toujours selon la même méthode, fut passée à travers une colonne d'alumine activée, donnant un extrait chloroformique purifié : l'alumine laisse passer la caféine, mais retient les impuretés.

Deux prises d'essai différentes ont été utilisées pour chaque échantillon, chacune d'entre elles donnant un extrait brut et un extrait purifié après passage sur alumine. Les spectres d'absorption U. V. de ces extraits, ramenés à des concentrations simples exprimées en g de poudre de feuille par ml d'extrait, sont représentés sur le graphique 1. On peut noter que :

— Les deux Arabica et les deux Congusta ont des feuilles présentant une forte teneur en caféine : spectres nets, maximum à 277 nm, reproductibilité des deux

Fig. 1. — *Spectres U. V. des extraits chloroformiques de 1 g de feuilles séchées de caféiers sauvages et cultivés.* Extraits ammoniaque-chloroforme, deux essais par type de feuille, spectres des extraits bruts (en haut) et des extraits purifiés par passage sur colonne d'alumine (en bas). Pour Excelsa et Lancifolia, spectres présentés à deux concentrations différentes.



déterminations. Les teneurs moyennes, sur feuilles séchées, en poudre sont les suivantes :

	Arabica B	Arabica S	Congusta HA	Congusta HB
Avant purification sur Al_2O_3	0,97	0,56	0,74	0,89
Après purification sur Al_2O_3	0,95	0,54	0,69	0,82

— L'Excelsa présente un spectre anormal. Très faible à la concentration de 1 g/2.000 ml retenue pour les autres caféiers cultivés, celui-ci s'apparente, si on le trace à la concentration de 1 g/200 ml, aux spectres des extraits de feuilles de caféiers sauvages ; on s'aperçoit alors que ce spectre est déformé au voisinage de 277 nm et qu'on ne peut conclure à la présence de caféine. Même si on l'assimile à celui de la caféine, ce qui est sans doute faux, la teneur de la feuille d'Excelsa serait inférieure à 0,1 %.

— Les extraits des autres caféiers sauvages présentent, en dépit d'une concentration importante, des spectres faibles et, malgré la présence plus ou moins générale d'un maximum ou d'un épaulement au voisinage de 277 nm, trop différents de celui de la caféine pour que l'on puisse conclure même à la présence de ce corps.

— L'extrait de Lancifolia diffère nettement des autres : le spectre de l'extrait brut possède un pic très important avec maximum à 277 nm qui, même ramené à la concentration de 1 g/2.000 ml, pourrait être comparé à celui des caféiers cultivés. Mais, après passage sur Al_2O_3, le spectre de l'extrait purifié est très atténué et son maximum se trouve déplacé. Il semble donc que les feuilles de ce caféier sauvage contiennent en quantité importante un corps proche de la caféine, mais qui, contrairement à celle-ci, est retenu sur l'alumine.

Les feuilles de caféiers sauvages (y compris celles de Lancifolia) ne semblent pas apparemment contenir de caféine, du moins en quantité appréciable, ce qui est déjà un résultat important. Cependant cette purification sur colonne d'alumine, justifiée sur le plan strictement analytique, retient un certain nombre de composants proches de la caféine, telles les méthylxanthines, qu'il pourrait être fort intéressant d'identifier éventuellement dans l'extrait brut. De plus, une certaine quantité de caféine est également toujours retenue ; cette quantité est négligeable dans le cas d'une détermination courante sur des grains de café vert de caféiers cultivés, mais d'éventuelles traces de ce produit sont totalement éliminées. Aussi, dans notre cas, convient-il d'abandonner les extraits purifiés et d'étudier les extraits chloroformiques bruts.

L'ANALYSE DES EXTRAITS DE FEUILLES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier est un moyen commode d'étudier les méthylxanthines. Nous avons commencé par les extraits bruts de feuilles de caféiers cultivés, car la présence de caféine dans ces extraits pourrait nous fournir un utile repère pour roder le procédé. De plus, il n'était pas exclu que l'on puisse mettre en évidence d'autres éléments de cette chaîne de biosynthèse de la caféine. Nous avons pour ces deux raisons évité d'inclure aussitôt l'Excelsa dans l'analyse. Les extraits bruts des deux Arabica et des deux Congusta ont été évaporés et repris par l'acide acétique à 10 % pour se débarrasser des impuretés lipidiques, déposés sur une feuille avec témoins, et chromatographiés. La figure 2 montre le résultat obtenu après développement, et mentionne les détails analytiques essentiels. La photo a été obtenue en interposant le chromatogramme sec entre une plaque photo et une source d'U. V. courts (lampe germicide et filtre Schott UG5). On repère très bien les témoins, dont on n'a déposé que quelques microgrammes, à l'exception de la xanthine pour laquelle le dépôt a été par erreur très faible. Pour les extraits de feuilles, les dépôts correspondent en (1) à 2,5 mg et en (2) à 1 mg de feuilles ; on remarque en (3), dans le cas de l'Arabica B, que la caféine est nettement plus faible, alors que la détermination précédente par spectrophotométrie du même extrait lui attribuait la teneur en caféine la plus élevée. La chromatographie sur papier, principalement sans doute à cause des aléas des reprises d'un solvant dans un autre, peut, on le voit, difficilement

Ci-contre :

Fig. 2. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts, repris par l'acide acétique à 10 %, de feuilles de caféiers cultivés.*

Chromato 2, ascend., But. 100/acide acétique 20/H_2O sat.

Dépôts des extraits : en (1), 5 µl représentant l'équivalent de 2,5 mg de feuille ; en (2), 2 µl représentant l'équivalent de 1 mg de feuille.

Témoins : X = xanthine, TP = théophylline, TB = théobromine ; C = caféine ; dépôts en µg sauf pour X.

Fig. 3. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts des feuilles de caféiers cultivés.*

Mêmes extraits que pour la figure 2, déposés tels quels, dépôts plus importants. Chromato 3, ascend., But. 100/acide acétique 20/H_2O sat.

T = trigonelline.

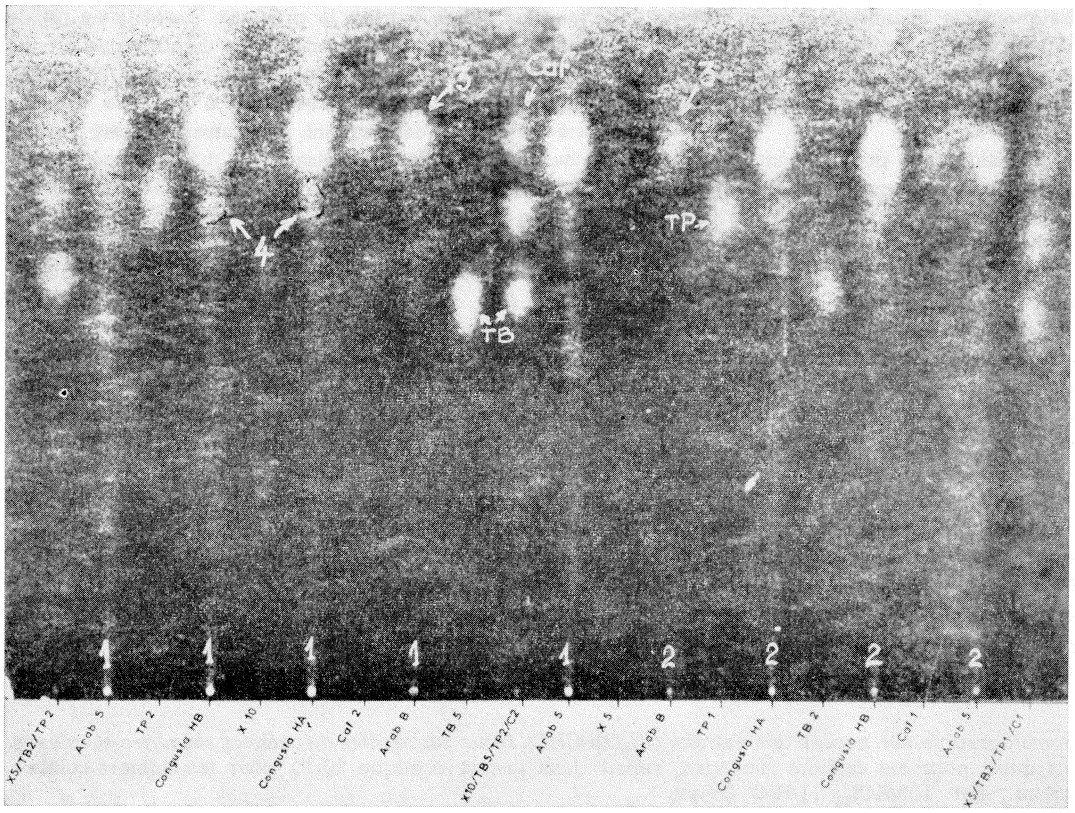

Cal
TP
TB
X5/TB2/TP2
Arab S
TP2
Conguia HB
X 10
Conguia HA
Cal 2
Arab B
TB 5
X10/TB5/TP2/C2
Arab 5
X 5
Arab B
TP1
Conguia HA
TB 2
Conguia HB
Cal 1
Arab 5
X5/TB2/TP1/C1

Fig. 2

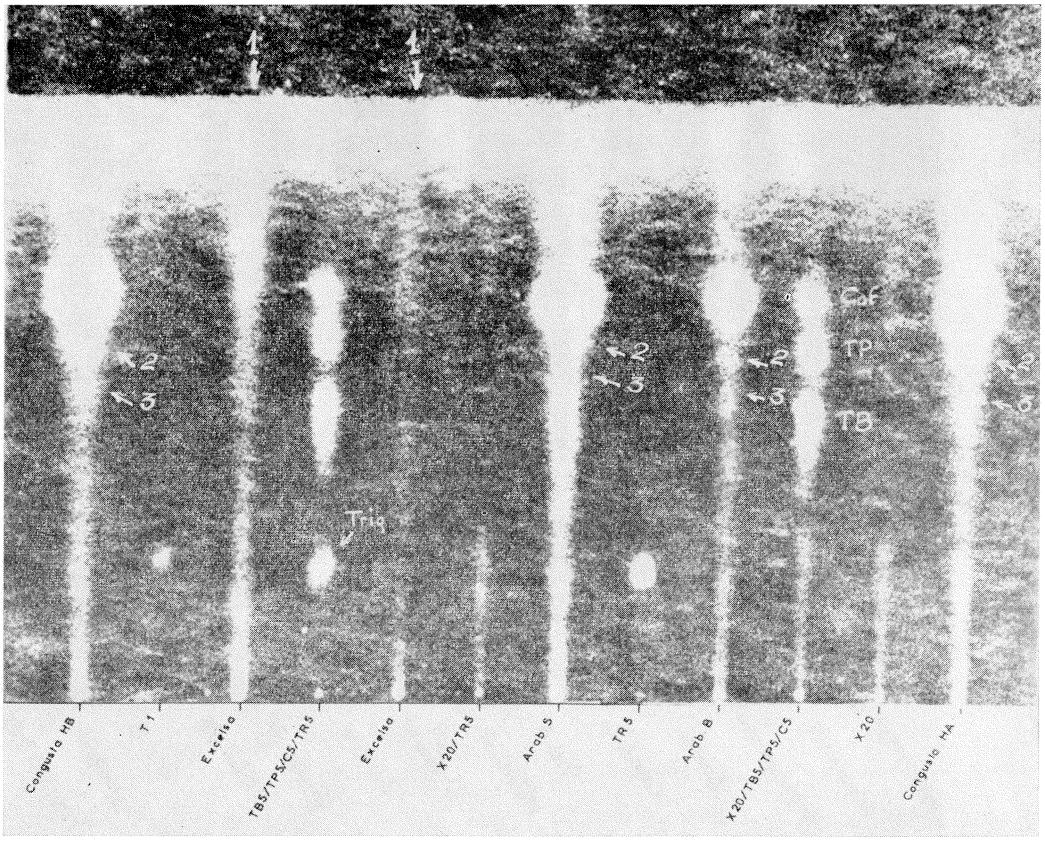

Cal
TP
TB
Trig
Conguia HB
T 1
Excelsa
TB5/TP5/C5/TR5
Excelsa
X20/TR5
Arab S
TR 5
Arab B
X20/TB5/TP5/C5
X20
Conguia HA

Fig. 3

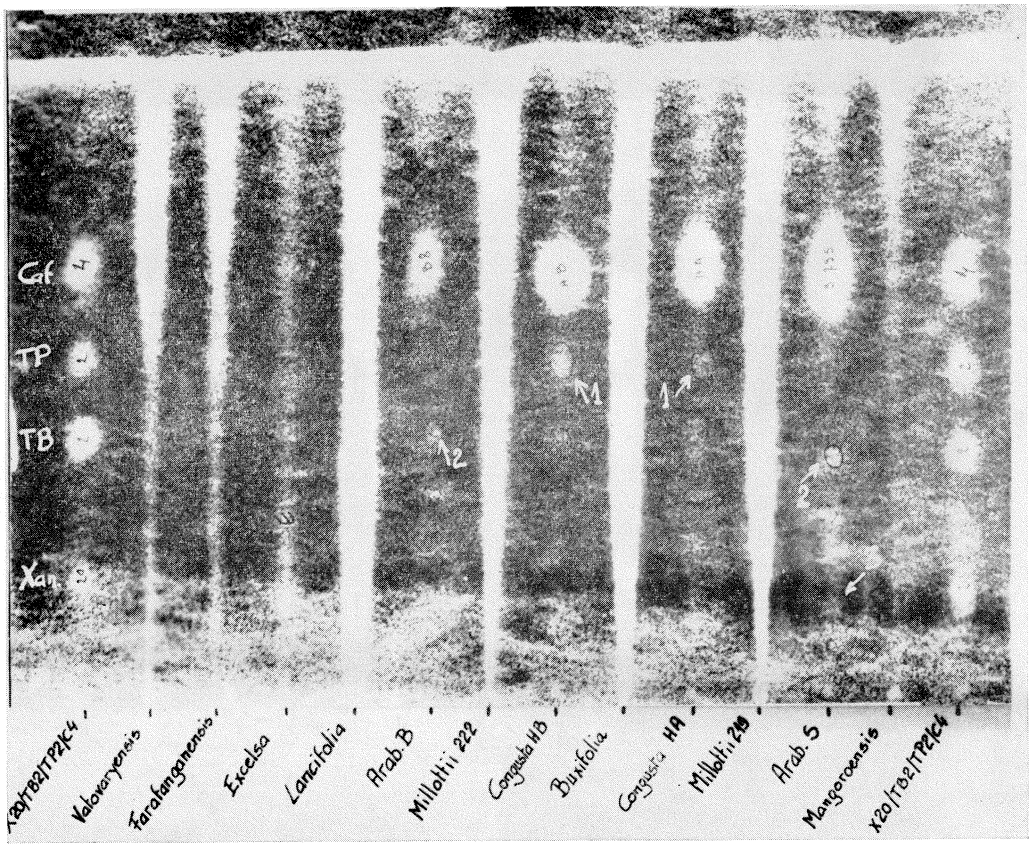
fournir des renseignements quantitatifs exacts. Toutes les feuilles contiennent de la caféine en quantités importantes. Quant aux autres composants, il faut noter, en (4), la possibilité pour les Congusta de contenir de la théophylline.

Néanmoins, les dépôts étaient peut-être un peu trop faibles pour que ces autres composants éventuels apparaissent clairement. De plus, la reprise dans l'acide acétique pouvait nous avoir fait négliger des substances insolubles dans ce solvant. Aussi avons-nous répété la chromatographie précédente, mais en partant des extraits bruts tels quels et en augmentant la quantité déposée. La figure 3 en montre les résultats. La trigonelline fait accessoirement partie des témoins, afin de connaître son comportement avec ce type de solvant. L'utilisation d'extraits bruts a pour conséquence l'apparition de traînées qui gênent considérablement l'interprétation. On peut noter qu'en (1) l'extrait d'Excelsa, cette fois mis lui aussi en œuvre sous forme de deux dépôts, dont l'un est dix fois plus important que l'autre, ne donne aucun spot, pas même au niveau de la caféine, ce qui confirme l'absence presque totale de ce corps déjà suggérée par l'examen du spectre U. V. de l'extrait. Malgré les traînées, on peut déceler dans tous les autres extraits la présence possible en (2) de théophylline, et même en (3) de théobromine ; cette possibilité apparaît surtout dans le cas de l'Arabica B. La xanthine est encore indécelable à cause de la même erreur que précédemment. Les autres témoins n'ont ni une migration très satisfaisante (la théobromine traîne), ni une séparation très nette (Rf trop forts et trop proches les uns des autres).

Aussi les essais ont-ils été poursuivis avec un autre système solvant, préconisé par MUNIER et MACHEBŒUF (21), où l'acide acétique est remplacé par l'acide chlorhydrique dans une proportion telle que les témoins sont échelonnés de façon plus régulière.

Les extraits de feuilles furent déposés après reprise par l'acide acétique à 10 % pour les caféiers cultivés, tels quels pour les caféiers sauvages, dans l'essai représenté sur la figure 4. Si les traînées interdisent toute interprétation dans le cas des caféiers sauvages, la séparation des extraits de caféiers cultivés révèle ou confirme quelques points intéressants : dans les feuilles d'Excelsa, apparemment aucune trace décelable de caféine ou d'autres méthylxanthines ; dans celles de Congusta, en (1), confirmation de taches correspondant à la théophylline ; dans celles d'Arabica, apparition de taches

Fig. 4. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts des feuilles de caféiers sauvages et cultivés.* Extraits bruts tels quels pour les caféiers sauvages, repris dans l'acide acétique 10 % pour les caféiers cultivés. Chromato 7, ascend., But. 100/HCl_{22} 11/H_2O 28 sat.



correspondant à la théobromine, en (2), et à la xanthine, en (3).

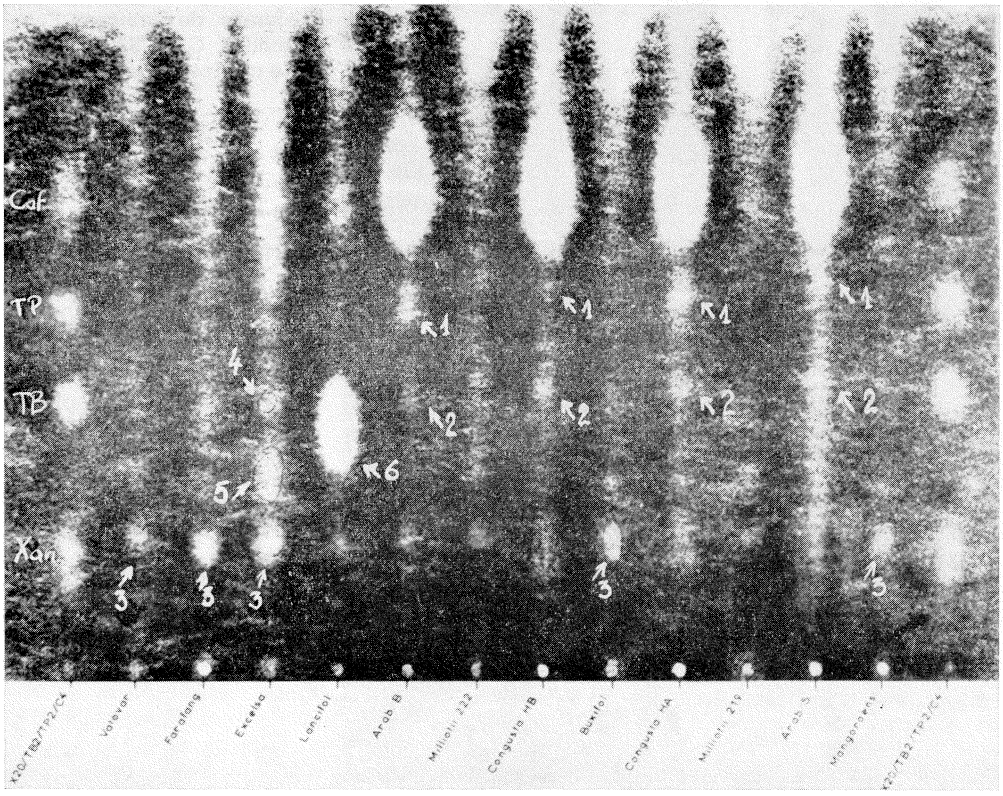
L'essai fut recommencé dans les mêmes conditions, mais en reprenant tous les extraits bruts par l'acide acétique et en renforçant les dépôts (fig. 5).

Si la caféine devient de ce fait très abondante, d'autres spots apparaissent clairement. Chez les caféiers cultivés, la présence de théophylline (1) et de théobromine (2) semble assurée. Chez les caféiers sauvages, on distingue plus (Farafanganensis, Buxifolia) ou moins (Millottii) nettement un spot de Rf légèrement plus fort que celui de la xanthine (en 3), ainsi d'ailleurs que chez l'Excelsa, sans qu'il soit prouvé qu'il s'agisse du même corps. L'extrait d'Excelsa présente également deux autres taches, l'une en (4) de même Rf que la théobromine, l'autre en (5) intermédiaire entre celle-ci et la xanthine (monométhylxanthine ?). Quant à Lancifolia, dont on avait noté au début l'allure particulière du spectre de son extrait brut, il confirme ici cette caractéristique par un spot (6) quantitativement aussi important que la caféine des feuilles de caféiers cultivés, et de Rf équivalent à celui de la théobromine, sans que ceci puisse évidemment laisser préjuger de l'identité de cet important constituant.

Pour tous ces essais, on avait utilisé l'un des deux extraits obtenus de la façon décrite au début de cette communication. Dans l'essai représenté sur la figure 6, on a utilisé le second extrait obtenu parallèlement à celui précédemment utilisé ; les dépôts ont été renforcés. On a également déposé des extraits chloroformiques de graines de caféiers cultivés, obtenus et repris dans les mêmes conditions que les extraits de feuilles, afin de voir si les substances annexes accompagnant la caféine dans les feuilles de ces caféiers passaient aussi dans les graines. Le chromatogramme, très clair, est dominé par l'importance des taches de caféine. Dans les feuilles de caféiers cultivés, la tache (1) équivalente à la théobromine est très nette, ainsi qu'une autre tache, marquée (2), de même Rf que la xanthine. Cette dernière semble se retrouver, très atténuée, dans les graines de caféiers cultivés. Par contre, on ne retrouve plus rien à la hauteur de la théophylline. Quant au dépôt correspondant à une solution saturée de caféine pure du commerce, il n'est pas exclu qu'il contienne également des traces de théophylline (en 3), comme peut le laisser présager l'origine de cette caféine, extraite habituellement de feuilles de thé avariées.

Pour mieux préciser la position de la tache de Rf proche de celui de la xanthine, la même séparation a été effectuée, mais en chromatographie descendante (fig. 7). La disposition des dépôts, grains à gauche et feuilles à droites, est la même. On retrouve, très

Fig. 5. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts de feuilles de caféiers sauvages et cultivés.* Extraits bruts repris dans l'acide acétique 10 %. Dépôts quantitativement importants. Chromato 8, ascend., But. $100/HCl_{22}$ $11/H_2O$ 25 sat.



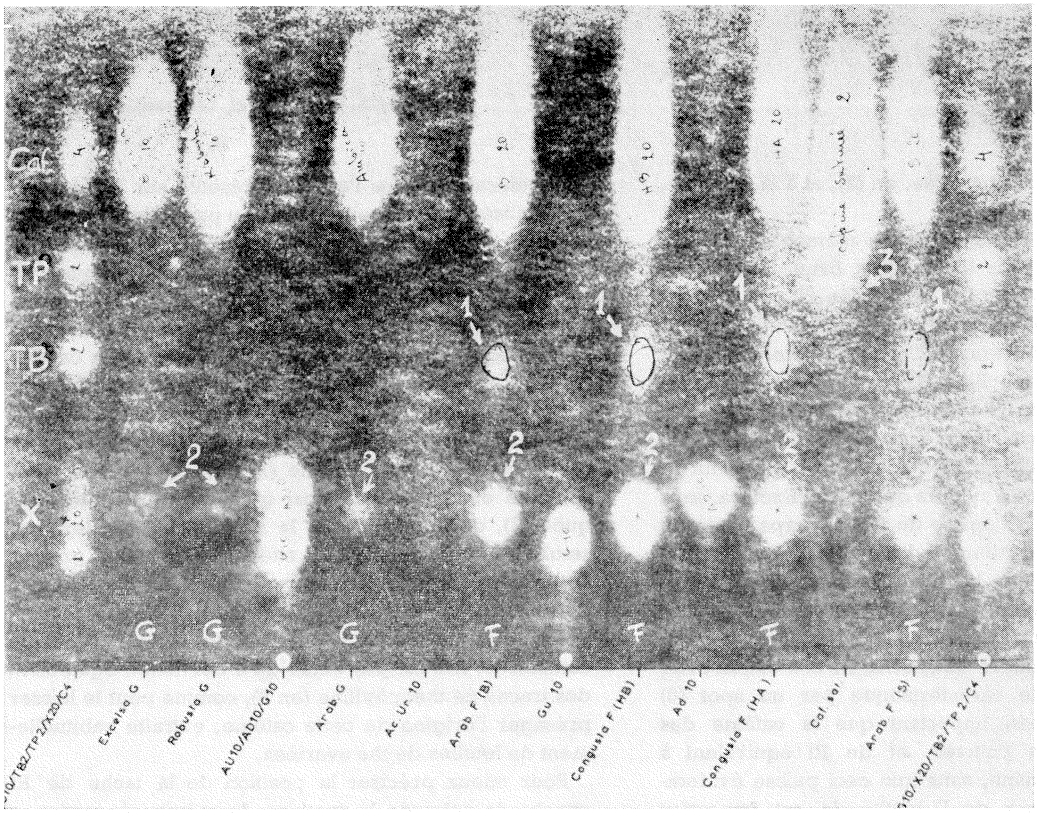


Fig. 6. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts de feuilles et de graines de caféiers cultivés*, repris par acide acétique 10 %. Dépôts massifs. Chromato 11, ascend., But. 100/HCl_{22} 12/H_2O 30 sat. Témoins : AU = acide urique, AD = adénine, G = guanine. Dépôts marqués : G = extraits de graines, F = extraits de feuilles, CAF. SAT. = solution saturée de caféine pure.

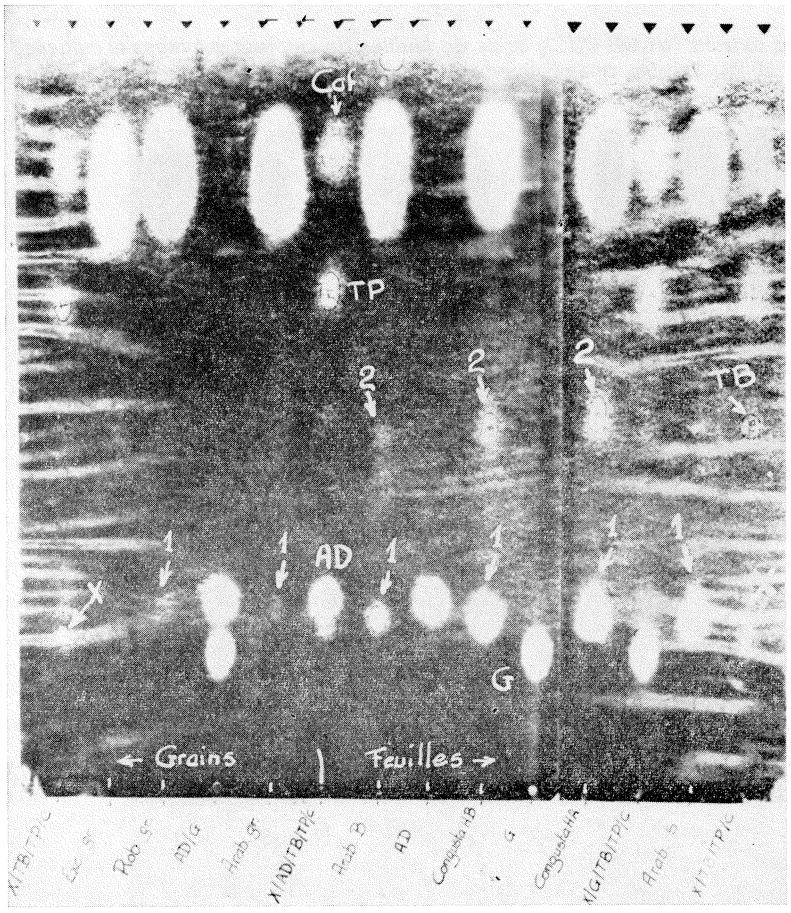


Fig. 7. — *Chromatographie sur papier des extraits NH_4OH-$CHCl_3$ bruts de feuilles et de graines de caféiers cultivés*, repris par acide acétique 10 %. Chromato 12 *bis*, descend., mêmes paramètres que pour la chromato 11 (fig. 6).

importante pour les feuilles, tout juste visible pour les grains, une tache en (1) de Rf équivalent à celui de la xanthine, sans que l'on puisse conclure à la présence effective de ce corps. Il ne semble pas en tous cas que ce corps soit de l'adénine ou de la guanine. On retrouve en (2) la théobromine dans les feuilles, mais non dans les graines, alors que la théophylline n'apparaît nulle part.

CONCLUSIONS

On peut donc conclure que :

— les feuilles de caféiers cultivés semblent posséder une chaîne de biosynthèse de la caféine comportant xanthine, théobromine et théophylline ;

— les feuilles de *Coffea excelsa* se distinguent des précédentes par une absence totale de caféine, et par la présence de substances voisines différentes de celles repérées dans les feuilles des autres caféiers cultivés ; il y a là un fait intéressant, mais qui demande à être confirmé sur un autre échantillonnage de feuilles du même arbre ou d'autres arbres, avant que l'on puisse en tirer une conclusion générale ;

— les graines de caféiers cultivés ne contiendraient que de la caféine, avec peut-être des traces de xanthine ;

— les feuilles de caféiers sauvages ne contiendraient pas de quantités décelables de caféine, mais par contre un corps de Rf équivalent à celui de la xanthine, et, pour Lancifolia, un corps très abondant de Rf un peu inférieur à celui de la théobromine ; cette absence apparente de la chaîne de biosynthèse de la caféine ne doit absolument pas être tenue pour définitive, et de nouveaux essais sont nécessaires ;

— la présence ou l'absence selon les essais de tels corps (théobromine, théophylline) dans un même échantillon, quand on connaît la solubilité faible de ces substances, doit nous inciter à différer toute conclusion définitive comme toute estimation quantitative de teneurs ;

— cependant l'absence de caféine en quantités notables dans les graines de caféiers sauvages est bien provoquée par un défaut de caféinogenèse au niveau des feuilles, que ce défaut soit total ou que la chaîne très affaiblie soit néanmoins existante.

La suite de ces essais, pour confirmer ce fait et en exploiter les possibilités matérielles, consistera à étudier en même temps et de façon plus approfondie les feuilles de caféiers sauvages ainsi que celles de plants de ces caféiers greffés sur des plants normaux et vice-versa.

Mais, dans l'immédiat, la composition de certaines des graines de ces caféiers sauvages avait retenu notre attention, et c'est cette étude que l'on trouve dans la partie suivante.

III. — CAFAMARINE ET TRIGONELLINE CONTENUES DANS LES GRAINES DE TROIS CAFÉIERS SAUVAGES

INTRODUCTION

Après avoir étudié les termes de la caféinogenèse dans les feuilles des caféiers sauvages et cultivés, nous nous sommes intéressés au contenu en méthylxanthines, en trigonelline et en cafamarine des graines de caféiers sauvages. Sachant que, l'hypothèse de la présence de la caféine n'étant pas exclue, celle-ci serait en très faible quantité, nous avons adopté une technique similaire de chromatographie sur papier.

MÉTHODES

Cette fois pour solubiliser non seulement toutes les méthylxanthines, mais également les corps qui pourraient remplacer celles-ci, nous sommes partis d'un extrait aqueux de 3 g de grains de *C. buxifolia*. Cet extrait, clarifié et centrifugé, a été passé sur une colonne de résine cationique Amberlite* IR 120-H, afin que les méthylxanthines et les substances basiques voisines s'y fixent. En effet, connaissant la solubilité très aléatoire de ces corps dans le chloroforme, il nous fallait trouver un autre moyen de les séparer de l'importante masse

* Marque déposée

d'impuretés extraites également par l'eau des grains de *C. buxifolia*. Or les substances que nous étudions ont, pour la plupart, un caractère basique plus ou moins nettement marqué, et nous avions vérifié que, dans le cas des principales méthylxanthines, le coefficient de partage par rapport à une solution aqueuse est tel que le procédé, sans être quantitatif, peut être retenu. Ce coefficient de partage est d'ailleurs d'autant plus favorable à la phase résine que la xanthine est plus méthylée.

Nous procédâmes donc ainsi :

L'extrait aqueux, après clarification et décantation, était concentré à un faible volume, passé sur une petite colonne de résine cationique (5 × 200), et la colonne éluée par de l'acide chlorhydrique 4N. Cet éluat, concentré sous vide, était déposé sur un chromatogramme et développé par un solvant, où la phase acide était volontairement réduite pour favoriser une augmentation des Rf, donc une meilleure différenciation des spots.

Analyse de *C. buxifolia*

Sur la figure 1, on s'aperçoit que ce solvant a pour inconvénient de faire traîner la xanthine. L'éluat, déposé en quantité importante, donne en (1) une grosse tache qui est en fait, même si la photo n'en témoigne pas, constituée de deux taches accolées. Partant de cette tache et allant vers le front, on rencontre en (2) un spot de Rf à peu près équivalent à celui de la théobromine, et en (3), contre le front, un spot de Rf proche de l'unité, comme pour la caféine. Bien que cette hypothèse ne puisse être exclue *a priori*, il ne semble pas que ce spot soit celui de la caféine ; une identité de Rf au voisinage immédiat du front n'est pas très probante, et le spot en question est également fluorescent sous U. V. longs (lampe de Wood), ce qui n'est pas, bien sûr, le cas de la caféine.

L'essai a été répété, mais cette fois en partant d'un extrait aqueux acidulé de 5 g de graines de *C. buxifolia*.

Fig. 1. — *Chromatographie sur papier de l'éluat cationique (Eluat cat. 1) d'extrait aqueux de graines de* C. buxifolia.

Chromato 12, ascendum, But. 100/HCl_{22} 6/H_2O 30 sat. Dépôts témoins (en µg) : Caf = Caféine, TP = Théophylline, TB = Théobromine, TR = Trigonelline, MX = 1-méthylxanthine, HX = Hypoxanthine, X = Xanthine. Le spot « Eluat cat. 2 » correspond à un essai indépendant de cette étude.

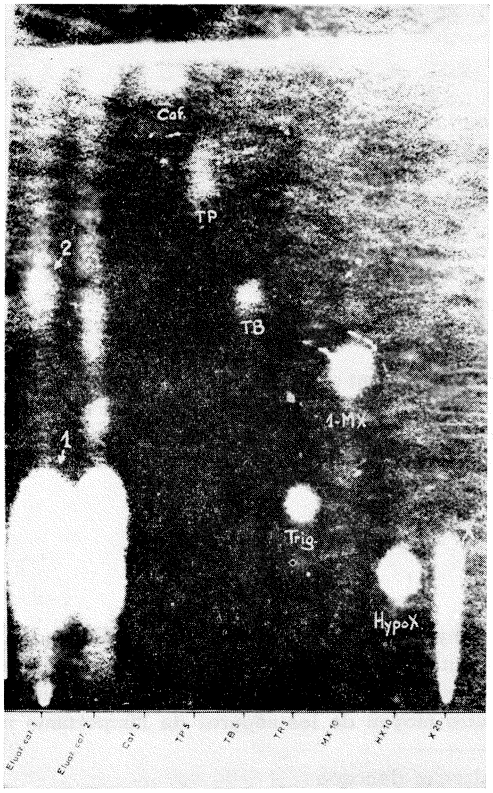
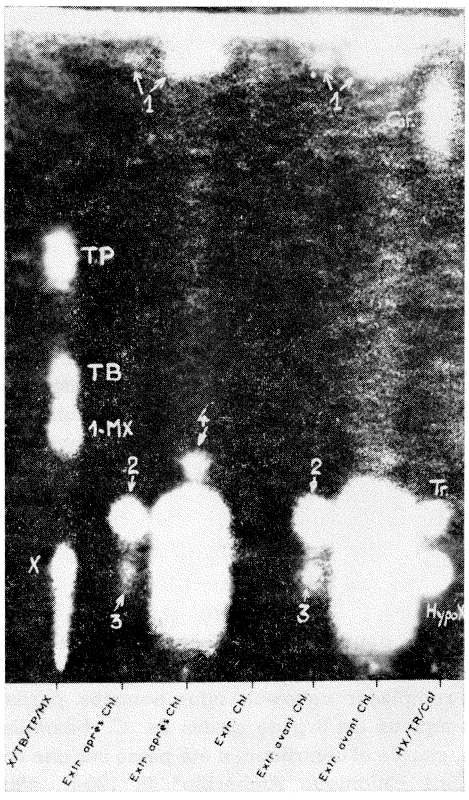


Fig. 2. — *Chromatographie sur papier de l'éluat cationique d'un extrait aqueux acide de graines de* C. buxifolia.

Chromato 14, ascendum, But. 100/HCl_{22} 6/H_2O 30 sat. Dépôts : ext. avant $CHCl_3$ = éluat tel quel, deux dépôts contigus, l'un 100 fois plus important environ que l'autre
— ext. Chl. = extrait par $CHCl_3$ de l'éluat ;
— ext. après $CHCl_3$ = éluat après extraction $CHCl_3$, deux dépôts contigus dans le même rapport 100.

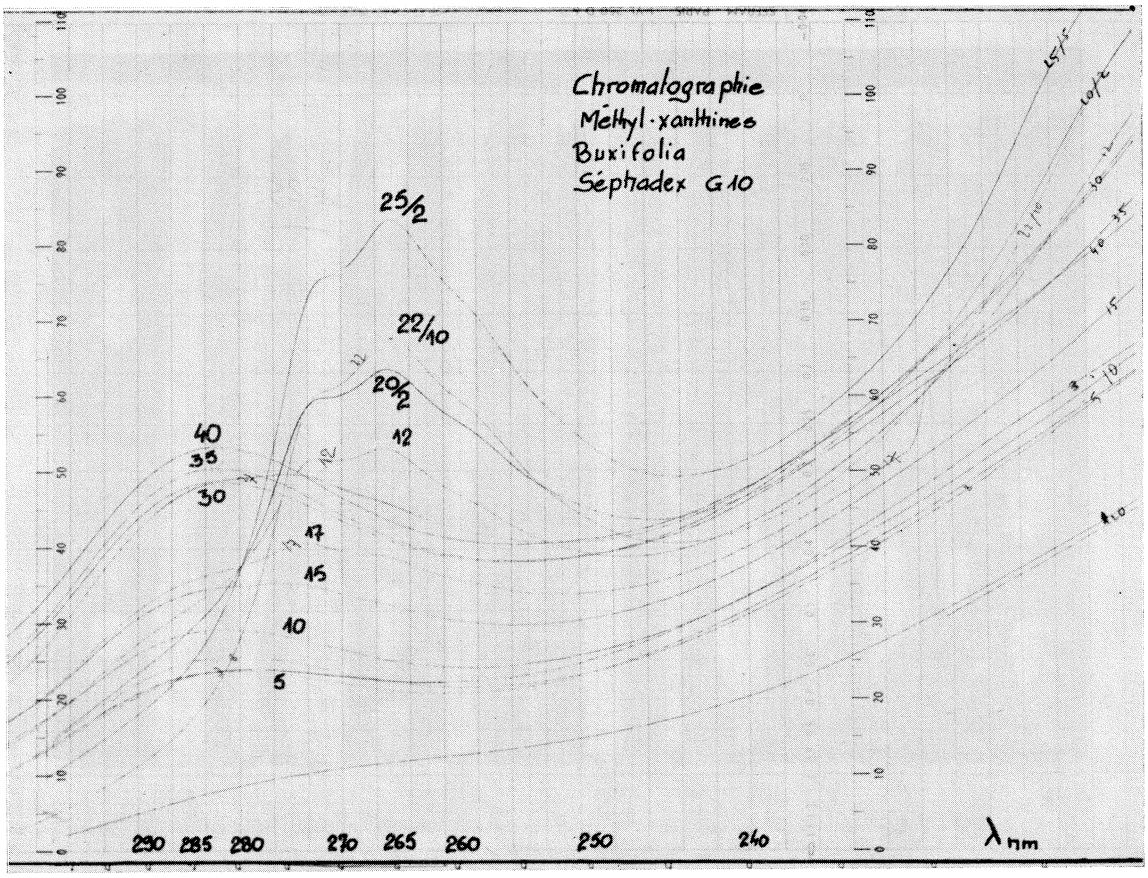


L'éluat cationique, réduit à moins d'un ml, fut déposé à deux emplacements contigus, dans le rapport 1 à 100. Cet extrait, évaporé, fut repris par le chloroforme pour y solubiliser caféine et autres substances solubles éventuellement présentes, et la solution chloroformique décantée fut également déposée. L'insoluble chloroformique fut repris dans l'eau acidulée et déposé également à deux emplacements dans le rapport 1 à 100. La chromatographie est représentée sur la figure 2. Les taches de Rf proches de l'unité figurent en (1) dans l'éluat avant et après extraction par le chloroforme, mais elles n'ont plus le même Rf que le témoin caféine ; elles n'apparaissent pas dans la partie soluble dans le chloroforme de l'éluat, mais au contraire dans la partie insoluble, après reprise en phase aqueuse. Il ne peut donc s'agir de caféine. Le plus faible des deux dépôts, avant comme après extraction chloroformique, fait nettement apparaître que l'éluat contient deux substances insolubles dans le chloroforme, l'une, en (2), étant présente dans l'éluat en quantité supérieure à l'autre, en (3). La tache supérieure a un Rf équivalent à celui de la trigonelline, la tache inférieure à celui de l'hypoxanthine. Enfin, au-dessus de ces deux taches, en (4), et n'apparaissant nettement qu'après extraction chloroformique se situe une tache dont il convient de confirmer la réalité.

Pour identifier les deux corps principaux ainsi décelés, nous avons soumis l'éluat à une chromatographie sur colonne de gel de Sephadex* G 10. Les spectres de certains des tubes séparés, ainsi que les conditions de l'analyse, sont présentés sur la figure 3. On retrouve bien deux corps, l'un élué au niveau des tubes 20-25, l'autre au niveau des tubes 30-40. Le spectre du premier corps, avec son maximum à 265 nm et son épaulement à 273 nm, est semblable à celui de la trigonelline ; le volume de rétention concorde également avec celui de la trigonelline pure, repéré lors d'une séparation sur témoins ; l'équivalence des Rf dans la chromato-

* Marque déposée

Fig. 3. — *Enregistrement des spectres U. V. de certains tubes d'élution d'une chromatographie sur colonne de SEPHADEX G 10 de l'éluat cationique de l'extrait aqueux de graines de* C. buxifolia. Colonne 25 × 400, éluant = eau, vol. des tubes = 4,5 ml, abscisse = longueur d'onde, ordonnée = densité optique. Chaque spectre est repéré par le numéro du tube d'élution, avec en dénominateur la dilution éventuelle : ainsi 22/10 signifie : spectre du contenu du tube n° 22 dilué dix fois.

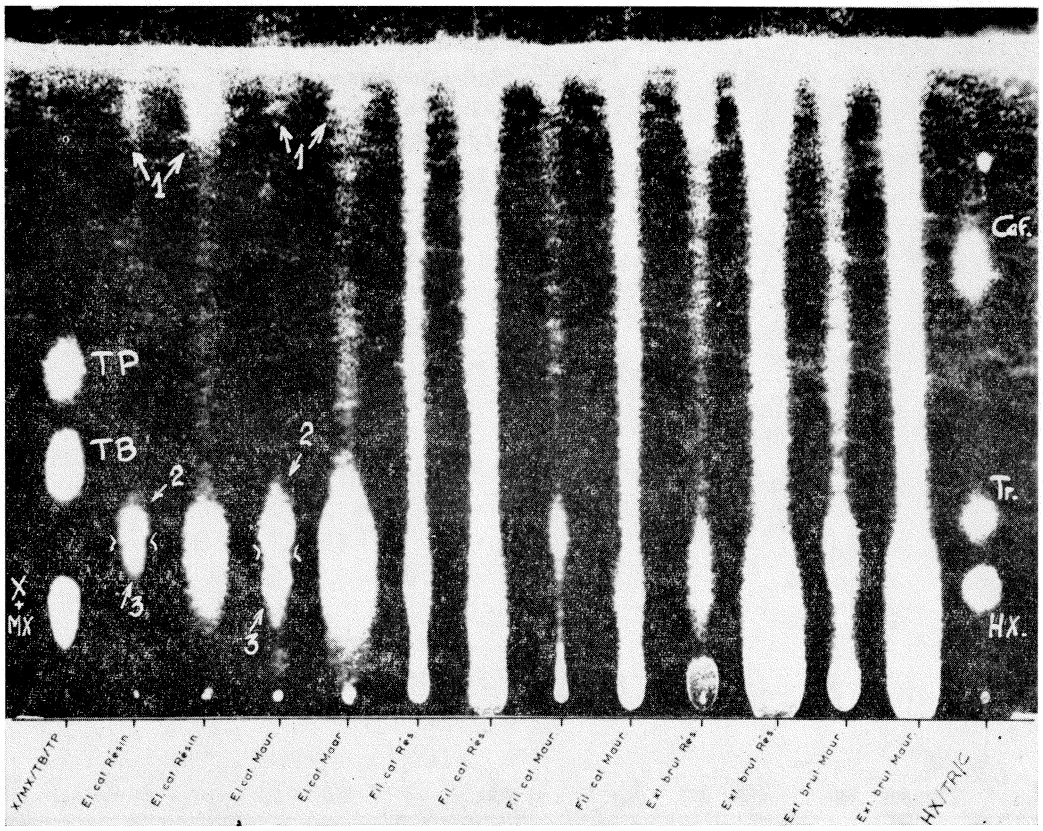


graphie sur papier précédente avait été notée. On peut donc dire qu'il s'agit de la trigonelline. Le spectre du deuxième corps (maximum = 282,5 nm) et le volume de rétention sont ceux de la cafamarine, déjà isolée dans les graines de *C. buxifolia* lors d'une étude présentée par ailleurs (22).

Analyse de *C. resinosa* et de *C. mauritiana*

Nous avons répété cet essai sur deux autres types de graines, *C. resinosa* et *C. mauritiana*, dans les mêmes conditions, sauf que, pour la chromatographie sur papier présentée sur la figure 4, on a déposé les extraits aqueux acides bruts avant passage sur résine cationique, les filtrats après passage et les éluats, chaque dépôt étant double, dans le rapport quantitatif 1 à 10. Les extraits bruts et les filtrats sont trop impurs, mais les éluats sont formés principalement de trois composants. L'un, en (1), de Rf proche de l'unité, présent dans les deux types de graines, est fluorescent et s'apparente au composant déjà signalé chez *C. buxifolia* et que l'on avait pu un moment rapprocher de la caféine ; on voit qu'il n'en est rien, la caféine ayant un Rf nettement inférieur. Le second, en (2), apparemment commun également aux deux cafés, a le même Rf que la trigonelline. Des séparations de ces mêmes éluats sur gel de Sephadex, semblables à celle décrite précédemment, permettent d'avancer, sur la foi des spectres d'absorption U. V. et des volumes de rétention, qu'il s'agit bien dans les deux cas de trigonelline. Le troisième corps repéré sur le chromatogramme, en (3), a un comportement semblable à celui de la cafamarine dans la figure 2. Néanmoins, le Rf de ce composant chez *C. resinosa* est légèrement plus fort que chez *C. mauritiana*. Les séparations sur Sephadex citées plus haut montrent que, si dans les deux corps le spectre de ce composant présente un maximum à 282,5 nm, son volume de rétention diffère d'un café à l'autre. Le composant de *C. resinosa* a le même volume de rétention que celui de la cafamarine de *C. buxifolia*, alors que celui du composant correspondant de *C. mauritiana* est plus faible. Or il a été prouvé, après torréfaction et dégustation, que *C. resinosa*

Fig. 4. — *Chromatographie sur papier de l'extrait aqueux acide, du filtrat et de l'éluat cationique de cet extrait, provenant de 5 g de graines de* C. mauritiana *et de* C. resinosa. Chromato 15, ascendum, But. 100/HCl_{22} 11/Eau 26 sat. Dépôts doubles = 1 et 10 µl. RES = Resinosa, MAUR = Mauritiana, EXT. BRUT = extrait brut aqueux acide, FIL. CAT. = filtrat après passage sur résine cationique, EL. CAT. = éluat.



contient, comme *C. buxifolia*, un principe amer, alors que *C. mauritiana* semble en être dépourvu. On peut donc penser que les deux premiers contiennent de la cafamarine, alors que *C. mauritiana* contient un corps très proche de la cafamarine mais non amer, et peut-être d'un poids moléculaire plus fort.

CONCLUSIONS

Sans préjuger des résultats de l'analyse (actuellement en cours) des graines d'autres caféiers sauvages, on ne peut s'empêcher de considérer l'importance que revêt la présence de cafamarine ou d'une substance très proche, dans trois types de graines différents. Cette caractéristique, si elle se révélait commune à toutes les graines de caféiers sauvages, fournirait un premier élément d'unité positif (l'absence de caféine n'étant qu'un caractère négatif) à cet ensemble de caféiers par ailleurs si différents.

BIBLIOGRAPHIE

1. ORNANO (M. d'), CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. 1) Recherches préliminaires sur leur teneur en caféine et isolement de la cafamarine. Second Colloque Inter. Chimie Cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 3-7 mai 1965. I. F. C. C. (Paris), 1966, p. 131-144.
2. WEHMER (C.). — Die Pflanzenstoffe. Gustav Fischer Verlag (Jena), 1931, p. 1169-1173.
3. RAOUL (E.). — Culture du caféier. Challamel (Paris), 1897, p. 51.
4. COOLHAS (C.), DE FLUITER (H. J.), KOENIG (H. P.). — Tropische und subtropische Weltwirtschaftspflanzen. Ferdinand Euke Verlag (Stuttgart), 1960, p. 214-215.
5. DE WILDEMAN (E.). — Etudes sur le genre *Coffea* L. Palais des Académies (Bruxelles), 1941, p. 290-292, 308-309.
6. HERNDLHOFER (E.). — Menge und Verteilung von Protein, Coffein, Mono- und Diaminosäuren in der Kaffeepflanze und deren monatliche Schwankungen während einer Vegetationsperiode. *Der Tropenpflanzen*, 1933, vol. 36, nº 7, p. 279-308.
7. MICHL (H.), HABERLER (F.). — Über die Bestimmung von Purinen in coffeinhaltigen Drogen. *Monatshefte für Chemie*, 1954, vol. 85, p. 779-95.
8. NEUBAUER (H. F.), LOA GIOK BENG. — Über die Verwendung, die pharmakognostische Diagnose und den Koffeingehalt des Kaffeeblattes. *Österr. Apoth. Zeit.*, 1959, vol. 13, nº 46, p. 647-650.
9. LEHMANN (G.), MARTINOD (P.). — Über das Vorkommen von Theobromin im Kaffee. *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1965, vol. 341, p. 155-156.
10. POISSON (J.). — Méthodes d'étude de la caféinogenèse. Second Colloque Inter. Chimie Cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 3-7 mai 1965. I. F. C. C. (Paris), p. 121-130.
11. ZAPROMETOV (M. N.). — Formation de la caféine dans les pousses de théier (en russe). *Biokhimia*, 1962, vol. 27, nº 4, p. 679-684.
12. PROJSER (E.), SERENKOV (G. P.). — Sur la biosynthèse de la caféine dans les feuilles de thé (en russe). *Biokhimia*, 1963, vol. 28, nº 5, p. 857-861.
13. ANDERSON (L.), GIBBS (M.). — The biosynthesis of caffeine in coffee plant. *J. Biolog. Chem.*, 1962, 237, p. 1941-4.
14. KREMERS (R. E.). — Speculation on diphosphopyridine nucleotide (DPN) as a biochemical precursor of caffeine and trigonelline in coffee. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1954, vol. 43, p. 423-4.
15. WANNER (H.). — Über die Verteilung von Koffein und Trigonellin in den vegetativen Teilen von *Coffea arabica*. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wissensch. zu Berlin. Klasse f. Chemie, Geol. u. Biol., 1963, nº 4, p. 65-79.
16. WANNER (H.), BLAIM (K.). — Ein Beitrag zur Biosynthese und Physiologie von Koffein und Trigonellin bei *Coffea arabica*. *Planta*, 1961, vol. 56, p. 499-510.
17. KENDE (H.). — Untersuchungen über die Biosynthese und Bedeutung von Trigonellin in *Coffea arabica*. Ber. Schweiz. Botan. Gesellsch., 1960, vol. 70, p. 232-67.
18. SPEDDING (D. J.), WILSON (A. T.). — Coffein metabolism. *Nature*, 1964, vol. 204, nº 4953, p. 73.
19. KALBERER (P.). — Breakdown of caffeine in the leaves of *Coffea arabica* L. *Nature*, 1965, vol. 205, nº 4971, p. 597-598.
20. KUM-TATT (L.). — A routine method for determining caffeine in coffee and coffee mixtures. *The Analyst*, 1961, vol. 86, nº 1029, p. 825-828.
21. MUNIER (R.), MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques. I) Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, vol. 31, nº 3-5, p. 1144-62. II) Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, vol. 32, nº 3-4, p. 192-212.
22. CHASSEVENT (F.), ORNANO (M. d') POUGNEAUD (S.). — Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. IV) Isolement et étude de la structure de la cafamarine, substance amère de *C. buxifolia*. Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, 2-9 juin 1967, Trieste. A.S.I.C. (Paris), 1968, p. 175-182.

ORNANO (M. d'), CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — **Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. II. — Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés. III. — Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 101-114, fig., tabl., 22 réf.

II. Si on a déjà montré dans une étude antérieure que les principaux caféiers sauvages de Madagascar ne contiennent pas de quantités appréciables de caféine dans leurs graines, il était important de chercher dans les feuilles de ces caféiers, siège habituel de la caféinogenèse chez les caféiers cultivés, la présence éventuelle d'un cycle normal de biosynthèse de la caféine, pour lequel seul le stade représenté par la caféine serait différent, ou au contraire un cycle totalement différent. Pour cela, des extraits ammoniaque-chloroforme de feuilles de caféiers cultivés (Arabica, Congusta, Excelsa) et de caféiers sauvages (Farafanganensis, Vatovavyensis, Millottii, Buxifolia, Mangoroensis, Lancifolia) sont analysés par spectrophotométrie et chromatographie sur papier dans différentes conditions, ainsi que des extraits de graines de caféiers cultivés (Arabica, Robusta, Excelsa). On montre que les feuilles de caféiers cultivés semblent contenir une chaîne normale de caféinogenèse (xanthine, théobromine, théophylline, caféine) alors que les feuilles de caféiers sauvages ne possèdent apparemment ni caféine ni méthylxanthines. Il en est de même de *C. excelsa*, dont les feuilles s'apparentent sur ce plan à celles des cafés sauvages, alors que ses graines, comme celles des autres caféiers cultivés, semblent, en plus de la caféine, contenir de la xanthine.

III. Les éluats cationiques des extraits aqueux de graines de trois caféiers sauvages (Buxifolia, Resinosa, Mauritiana) sont analysés par chromatographie sur papier et sur colonne : elles contiennent toutes trois de la trigonelline, deux d'entre elles (Buxifolia et Resinosa) de la cafamarine, et la troisième (Mauritiana) un principe proche de la cafamarine, mais vraisemblablement dénué d'amertume.

ORNANO (M. d'), CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — **Composition and chemical characteristics of the wild *Coffea* of Madagascar. II. An analytical research for caffeine and other methylxanthines in the leaves and seeds of wild and cultivated coffee trees. III. The cafamarine and trigonelline contained in the seeds of three wild coffee trees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 101-114, fig., tabl., 22 réf.

II. Although a previous study showed that the main wild coffee trees of Madagascar did not contain appreciable amounts of caffeine in their seeds, it was important to look for in the leaves of the coffee trees, the usual place for caffeine production in cultivated coffee trees, the possible existence of a normal cycle of caffeine biosynthesis, for which only the final stage, represented by the caffeine, would be different, or, on the contrary a totally different cycle. For this purpose, ammonia - chloroform extracts of the leaves of the cultivated coffee trees (Arabica, Congusta, Excelsa) and the wild coffee trees (Farafanganensis, Vatovavyensis, Millottii, Buxifolia, Mangoroensis, Lancifolia) are analysed by spectrophotometry and paper chromatography under various conditions, as well as extracts from the seeds of cultivated coffee trees (Arabica, Robusta, Excelsa). It is shown that the leaves of cultivated coffee trees seem to embody a normal sequence of caffeine elaboration (xanthine, theobromine, theophylline, caffeine) while the leaves of wild coffee trees do not apparently contain either caffeine or methylxanthines. The same applies to *C. excelsa*, whose leaves are in this respect allied to those of wild coffee trees, while its seeds, like those of other cultivated coffee trees seem to contain xanthine as well as caffeine.

III. The cation eluates of the water extracts of three wild coffee trees (Buxifolia, Resinosa, Mauritiana) are analysed by paper and column chromatography ; all three contain some trigonellin, two of them (Buxifolia and Resinosa), some cafamarine, and the third (Mauritiana) a substance very like cafamarine but seemingly free of bitterness.

ORNANO (M. d'), CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — **Zusammensetzung und chemische Eigenschaften der wildwachsenden *Coffea* aus Madagaskar. II. Bestimmung des Koffeins und anderer Methylxanthine in Blättern und Bohnen wildwachsender und gezüchteter Kaffeebäume. III. Das in den Bohnen von drei wildwachsenden Kaffeebäumen enthaltene Kafamarin und Trigonellin.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 101-114, fig., tabl., 22 réf.

II. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass die Bohnen der hauptsächlichen wildwachsenden Kaffeebäume von Madagaskar keine wesentliche Menge an Koffein enthalten. Es war daher wichtig, in den Blättern dieser Kaffeebäume, wo gewöhnlich das Koffein bei den gezüchteten Kaffeebäumen entsteht, die eventuelle Anwesenheit eines normalen Zyklus der Biosynthese des Koffeins bei dem allein das durch das Koffein gekennzeichnete Endstadium verschieden wäre, oder im Gegenteil einen total verschiedenen Zyklus zu suchen. Deshalb wurden Ammoniak-Chloroform Extrakte aus Blättern gezüchteter (Arabica, Congusta, Excelsa) und wildwachsender Kaffeebäume (Farafanganensis, Vatovavyensis, Millottii, Buxifolia, Mangoroensis, Lancifolia) unter verschiedenen Bedingungen sowie Extrakte aus Bohnen gezüchteter Kaffeebäume (Arabica, Robusta, Excelsa) spektralphotometrisch und papierchromatographisch untersucht. Es wird gezeigt, dass in den Blättern gezüchteter Kaffeebäume eine normale Kette der Koffeinentstehung (Xanthin, Theobromin, Theophyllin, Koffein) aufzuweisen zu sein scheint, während die Blätter wildwachsender Kaffeebäume anscheinend weder Koffein noch Methylxanthin enthalten. Das selbe gilt für *C. excelsa*, dessen Blätter in dieser Hinsicht denen der wildwachsenden ähnlich sind, während ihre Bohnen wie die der übrigen gezüchteten Kaffeebäume ausser dem Koffein noch Xanthin zu enthalten scheinen.

III. Die kationische Eluate der wässerigen Extrakte der Bohnen von drei wilden Kaffeebäumen (Buxifolia, Resinosa, Mauritiana) werden mittels Papier- und Säulenchromatographie untersucht : sie enthalten alle drei Trigonellin ; zwei von ihnen (Buxifolia und Resinosa) enthalten Kafamarin und der dritte (Mauritiana) ein dem Kafamarin nahestehender Grundstoff, vermutlich jedoch ohne Bitterstoff.

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER CHLOROGENSÄURE UND DES TRIGONELLINS

G. LEHMANN, H. G. HAHN

Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

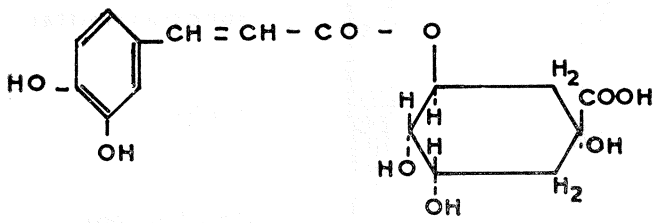
Die Chlorogensäure und das Trigonellin gehören neben dem Coffein zu den interessantesten Inhaltsstoffen der Kaffeebohne ; sie sind in relativ grosser Menge vorhanden : Tabelle 1.

TABELLE 1

Gehalt des Rohkaffees an :

Chlorogensäure	5,5 - 7,5 %
Trigonellin	0,7 - 1,1 %
Coffein	1,2 - 1,9 %

Die Chlorogensäure und ihre Isomeren gehören zu den wertbegrenzenden Kaffeeinhaltsstoffen, ihr wird bisweilen ein nachteiliger Einfluss auf den Geschmack des Kaffeegetränkes und dessen Bekömmlichkeit zugeschrieben.



Chlorogensäure

Es wäre noch zu bemerken, dass das Vergrauen vom Kaffeegetränk bei Zugabe von Kondensmilch, Milch oder Sahne auf einer Reaktion der im Kaffee enthaltenen Pflanzenphenole, zu denen auch die Chlorogensäure gezählt wird, mit Eisen beruht, das in den Milchprodukten infolge schlechter Lagerung mitunter vorhanden ist (1).

Für die halbquantitative Analytik auf dem Kaffeegebiet wird die Chlorogensäure zur Bestimmung des Bohnenkaffeegehaltes in Kaffeemischungen benutzt (2) und dient auch zur Feststellung, ob Lebensmittel, aus deren Bezeichnung auf einen Zusatz von Kaffee zu schliessen ist, auch unter Verwendung desselben hergestellt worden sind (3). Ferner wird aus den im Kaffee-Extraktpulver aufgefundenen Mengen an Chlorogensäure, Coffein und Mineralbestandteilen die Qualität im Hinblick auf eine Extraktausbeute beurteilt (4).

Unsere Bemühungen, ein Verfahren aufzufinden, das gestattet, die Chlorogensäure einfacher und schneller zu bestimmen, als die bisher beschriebenen Methoden das ermöglichen, wird also durch die Bedeutung der Chlorogensäure in der Kaffeeanalytik gerechtfertigt.

Früher wurde zur Bestimmung der Chlorogensäure im rohen und gerösteten Kaffee meist die Methode von MOORES und Mitarb. (5) verwendet, bei welcher die UV-Absorption des Kaffee-Extraktes vor und nach der Ausfällung der Chlorogensäure als Bleisalz gemessen wird. Diese Methode, die naturgemäss die Gesamtchlorogensäuren erfasst, ist relativ schnell durchführbar, jedoch fallen die Ergebnisse leicht etwas zu hoch aus, da durch die Bleifällung auch andere Stoffe des betrachteten Absorptionsgebietes mitgerissen werden können. In neuerer Zeit werden zunehmend Verfahren bevorzugt, die chlorogensäurehaltige Lösungen papierchromatographisch trennen und dadurch die Chlorogensäure von den störenden Begleitstoffen befreien. Im Verlaufe der Chromatographie kommt es auch zur Trennung der im Kaffee vorhandenen verschiedenen Chlorogensäuren, die nach Lokalisierung und Elution aus dem Papier optisch gemessen werden können.

Wir unterlagen dem Eindruck, dass die zeitraubende Papierchromatographie eine Weiterentwicklung der

damit verknüpften Verfahren nicht mehr gestattet. Da auch unsere Versuche, die Chlorogensäure nach einem von uns entwickelten Verfahren dünnschichtchromatographisch quantitativ zu bestimmen, nicht die erwünschten Ergebnisse brachten, entwickelten wir eine säulenchromatographische Methode an Polyamidpulver (6). Es ist bekannt, dass sich Verbindungen mit phenolischen Hydroxylgruppen besonders leicht an Polyamid adsorbieren lassen. Aus diesem Grunde wird Polyamidpulver in der Säulenchromatographie und zur Dünnschichtchromatographie als Sorptionsmittel in der Phytochemie häufig herangezogen.

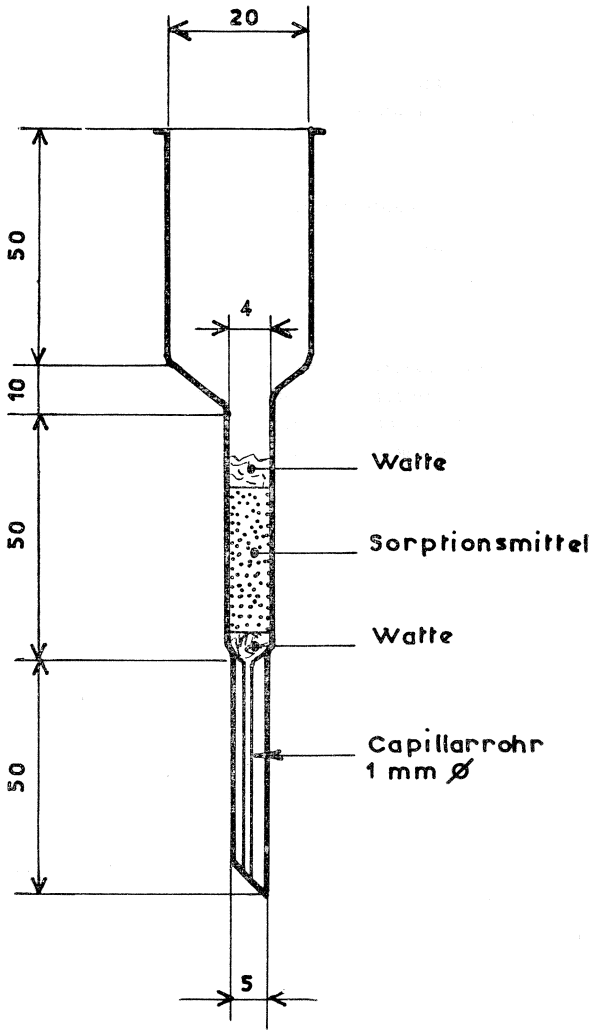
Über die Beobachtung, dass die Chlorogensäure vom Polyamid festgehalten wird, berichtete zuerst KRÖPLIEN (7) in seiner Dissertation. Während unserere experimentellen Arbeiten erschien eine Veröffentlichung von DIEMAIR und GANSSMANN (8) über die Abtrennung der Chlorogensäure von den braun gefärbten Stoffen des Röstkaffee-Extraktes durch Filtration über eine Polyamidsäule, wobei die Chlorogensäure vom Polyamid festgehalten wird. Von dem Polyamidpulver liess sich diese mit den adsorbierten Phenolen und Polyphenolen bei einem anderen pH-Wert ablösen. Über eine quantitative Bestimmung der Chlorogensäure mit Hilfe des Polyamides ist in beiden Arbeiten nichts erwähnt.

Für die chromatographischen Eigenschaften des Polyamids ist in erster Linie die Fähigkeit des Materials-Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, verantwortlich zu machen. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten des Polymeren bedingen die Festigkeit, sowie die grosse Beständigkeit des Polyamids gegen die meisten Lösungsmittel. Das zur Chromatographie geeignete Material wird aus dem durch orientierte Makromolekülketten aufgebauten Polyamid durch Auflösen in Ameisensäure und Ausfällen mit Wasser hergestellt. Dabei werden die Wasserstoffbrücken weitgehend aufgehoben, die Ketten desorientieren sich und es entsteht ein pulverförmiges Produkt mit vielen freien N-H- und C=O-Gruppen im Makromolekül. Beim Behandeln mit Wasser werden in diesen Makromolekülen weitere zwischenmolekulare Wasserstoffbrücken zerstört und das Material quillt auf. In diesem Zustand besitzt das Polyamidpulver die besten chromatographischen Eigenschaften und verfügt über eine genügende Beladungskapazität. Die Carbonylgruppen des gequollenen und dadurch in der Molekularstruktur aufgeweiteten Polyamidpulvers, können nun mit phenolischen Hydroxylgruppen von Substanzen, die in das aufgeweitete Gitter der Makromoleküle eingedrungen sind, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Der gleiche Vorgang, der sich auch an der Oberfläche eines orientierten Polyamids vollzieht, spielt zum Beispiel in der Färbung der Synthesefaser eine grosse technische Rolle.

Die Kapazität des Polyamidpulvers im Vergleich zu anderen Sorptionsmitteln ist ausserordentlich gross. Wir führen diese darauf zurück, dass die Substanzen eben nicht nur an der Oberfläche durch normale Adsorption, sondern auch noch im Innern der gequollenen Makromoleküle durch die Wasserstoffbrücken festgehalten werden können.

Zum Zwecke der quantitativen Bestimmung der Chlorogensäure wurden Mikrochromatographierrohre, wie wir sie für die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen entwickelt haben (9), mit gequollenem Polyamidpulver gefüllt, von monomeren Anteilen durch Auswaschen mit verdünntem Methylalkohol befreit und mit der chlorogensäurehaltigen Lösung versetzt. Nach der Passage dieser Lösung durch die Säule wurde das Polyamidpulver von evtl. vorhandenen Begleitstoffen durch nochmaliges Auswaschen befreit, die adsorbierte Chlorogensäure mit einer alkalischen Methylalkohollösung eluiert und in vorgelegter Säule im Messkolben aufgefangen. Die Ermittlung

Abb. I. : Mikrochromatographiersäule



der Konzentration an Chlorogensäure erfolgt durch Messung der Lichtabsorption bei 324 nm gegen einen entsprechend bereiteten Blindwertextrakt.

Es ist bekannt, dass sich die Chlorogensäure in alkalischer Lösung in Gegenwart von Luftsauerstoff sehr leicht zersetzt. Versuche mit Chlorogensäurestandardlösungen zeigten nun, dass während der Desorption mit der alkalischen Methylalkohollösung in der Säule keine Zersetzung eintritt, sondern erst dann, wenn die alkalische Lösung im Auffanggefäss mit dem Luftsauerstoff in Berührung kommt. Diese Zersetzung lässt sich vermeiden, wenn in dem als Auffanggefäss dienenden Messkolben verdünnte Essigsäure vorgelegt wird, die ausreicht, ein genügend saures Medium zu schaffen, in dem die Chlorogensäure stabil ist.

Da allgemein bei säulenchromatographischen Arbeiten mit Verlusten oder auch Veränderungen der Substanz zu rechnen ist, wurde reine Chlorogensäure in verschiedenen Versuchsansätzen der Polyamidchromatographie unterworfen und nach der angegebenen Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

TABELLE 2

Chlorogensäure - Standard

a) *Direktmessung*

Eingesetzte Menge Chlorogensäure	Extinktion bei 324 nm	Eingesetzte Menge Chlorogensäure	Extinktion bei 324 nm
—	—	—	—
29,2 µg	0,150	58,4 µg	0,298
	0,151		0,298
	0,148		0,300
	0,148		0,296
	0,146		0,302
	$\bar{E}$ 0,148 ± 0,03		$\bar{E}$ 0,299 ± 0,03

b) *Messung nach Adsorption an Polyamid und Elution*

Eingesetzte Menge Chlorogensäure	Extinktion bei 324 nm	Eingesetzte Menge Chlorogensäure	Extinktion bei 324 nm
—	—	—	—
29,2 µg	0,140	58,4 µg	0,286
	0,141		0,290
	0,150		0,296
	0,140		0,286
	0,142		0,298
	0,148		0,292
	0,136		0,292
	0,144		0,285
	0,142		0,292
	$\bar{E}$ 0,142 ± 0,08		$\bar{E}$ 0,291 ± 0,07

Die zu 96 bzw. 97,5 % wiedergefundene Chlorogensäuremenge erlaubt uns die Aussage, dass die Säure während des Bestimmungsprozesses keinerlei unsystematischen Verlust erleidet und sich ohne chemische Veränderung von dem Polyamidpulver wieder ablösen lässt.

Der unvermeidbare geringfügige Verlust wird bei unserer Methode dadurch eliminiert, dass bei der Bestimmung der Chlorogensäure in einer Probelösung stets zwei Lösungen mit der bekannten Standardlösung gleichzeitig mit angefertigt werden, um evtl. Fehlermöglichkeiten weitgehend auszuschalten. Die ermittelte Extinktion der Standardlösung dient zur Berechnung der Chlorogensäurekonzentration nach der Formel :

$$X = St \frac{E_x}{E_{st}}$$

wobei X = Menge der zu bestimmenden Chlorogensäure
St = eingewogene Menge Standardchlorogensäure
E_{st} = gemessene Extinktion des Standards
E_x = gemessene Extinktion der zu bestimmenden Probelösung

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die quantitative Bestimmung der Chlorogensäure im pflanzlichen Material (10) stellten wir fest, dass sich im Röstkaffee und Kaffee-Extraktpulver die Chlorogensäure mit Hilfe von Polyamidpulver besonders elegant bestimmen lässt. Die Abbildung II zeigt den Verlauf der Chlorogensäurespektrogramme, die aus den Kaffeeprodukten mit Hilfe des Polyamids isoliert wurden. Der Kurvenverlauf ist mit dem der Standardchlorogensäure identisch. Allerdings kann mit dieser Methode der Isolierung nur die in den zu untersuchenden Produkten vorkommende Gesamtchlorogensäure erfasst werden, da eine Trennung in die Isochlorogensäuren unter diesen Bedingungen nicht erfolgt. In der Regel ist für vergleichende Untersuchungen die Bestimmung der Gesamtchlorogensäure zweckmässig, zumal noch nicht einmal Änderungen im Anteil der verschiedenen Isomeren im Verlaufe der Lagerung der Kaffees ausgeschlossen werden können.

Da die Kaffeesäure ebenfalls vom Polyamid adsorbiert und unter den gleichen Bedingungen, wie die Chlorogensäure auch eluiert wird, ist zur Bestimmung der Chlorogensäure die zu untersuchende Probe papier- oder dünnschichtchromatographisch auf das Vorhandensein von Kaffeesäure zu prüfen. Im Verlaufe unserer Untersuchungen stellten wir genau wie andere Autoren (11) vor uns fest, dass im Röstkaffee sowie im Kaffee-Extraktpulver nur äusserst geringe Mengen Kaffeesäure vorhanden sind. In der von uns zur Bestimmung gelangenden Menge Extraktlösung ist die Kaffeesäure überhaupt nicht mehr bestimmbar, da kaum Spuren in dieser Verdünnung vorhanden sind.

Wir haben Röstkaffee und Kaffee-Extraktpulver mit 70 % igem Methylalkohol bei Raumtemperatur extrahiert, indem 1 g des Materials im Messkolben mit verdünntem

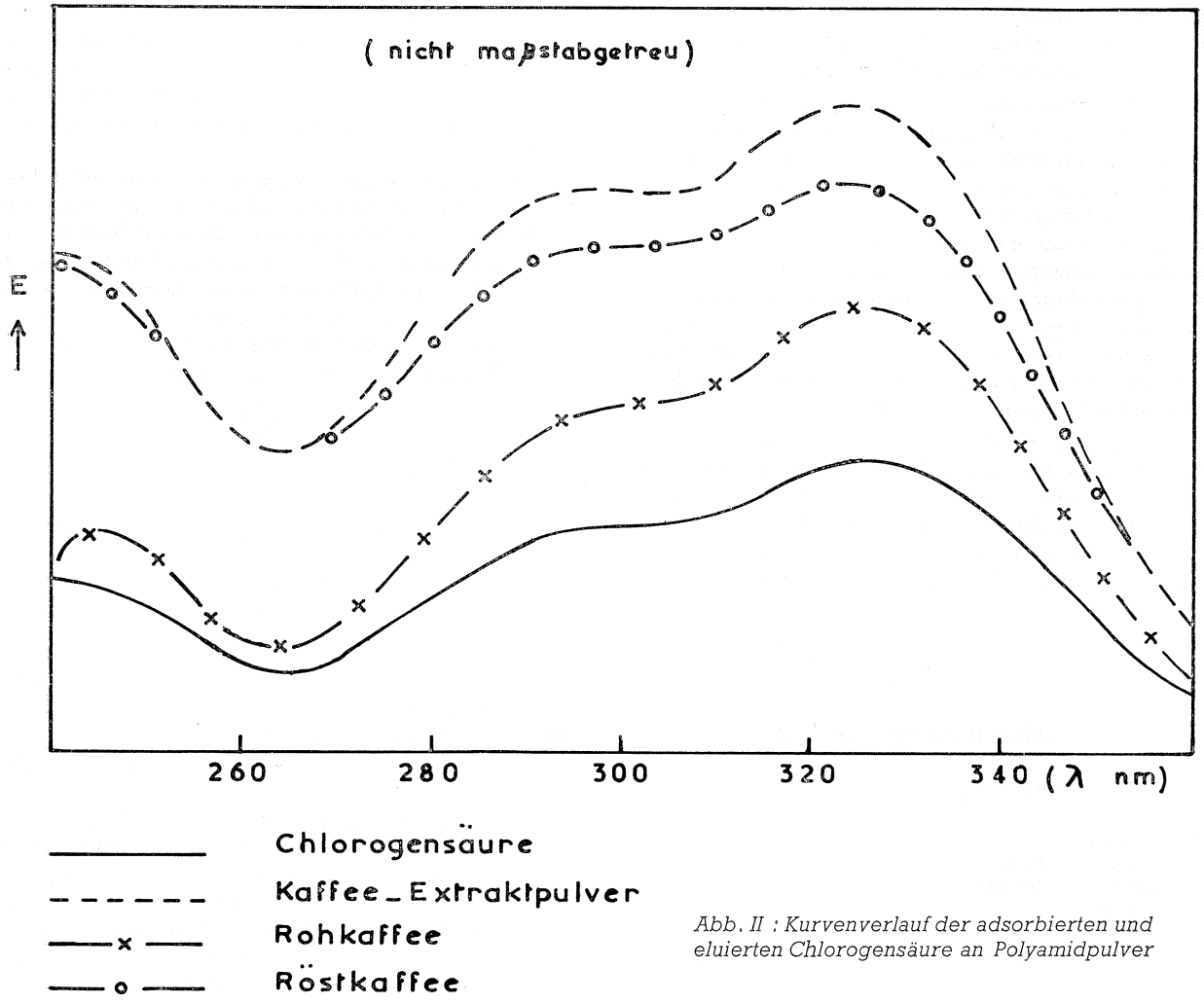


Abb. II : Kurvenverlauf der adsorbierten und eluierten Chlorogensäure an Polyamidpulver

Methylalkohol auf 100 ml aufgefüllt und über Nacht stehen gelassen wurde.

Auch die beim Röstkaffee (Tabelle 3) erzielten Ergebnisse stimmen mit den von HERRMANN (12) und WURZIGER (4) angegebenen Werten von 3,6-4,5 % Chlorogensäure überein.

TABELLE 3

Gefundene Chlorogensäurewerte im Röstkaffee

Normale Röstung	3,71 %
Normale Röstung, coffeinfrei	3,84 %
Französische Röstung	3,08 %

Die im Kaffee-Extraktpulver von uns festgestellten Mengen Chlorogensäure (Tabelle 4) sind von den bisher in der Literatur angegebenen Werten sehr verschieden (Tabelle 5).

TABELLE 4

Gefundene Chlorogensäurewerte im Kaffee-Extraktpulver

BRD Nr.	1	10,74 %	BRD Nr. 15	9,18 %	
	2	9,25 %	16	8,82 %	
	3	8,39 %	17	10,71 %	
	4	9,82 %	18	10,74 %	
	5	8,62 %	19	8,40 %	
	6	7,40 %	20	7,54 %	coffeinfrei
	7	9,82 %	21	8,19 %	—
	8	11,42 %	22	9,23 %	—
	9	6,17 %	23	9,49 %	—
	10	11,82 %	24	8,45 %	—
	11	11,20 %	Ecuador	3,15 %	
	12	11,32 %	Frankreich	5,97 %	
	13	11,81 %	Frankreich	6,75 %	
	14	11,42 %	Israel	9,20 %	

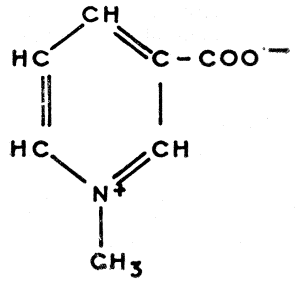
TABELLE 5

Bisher in der Literatur angegebenen Chlorogensourewerte des Kaffee-Extraktpulvers

WEISS (1957)	13,5 - 15,6 %
GNAGY (1962)	2,4 - 2,7 %
JAKOBER and STAUB (1963)	0,72 - 1,76 %
WURZIGER (1966)	4,2 - 8,9 %

Obwohl sich auch in den von uns untersuchten Proben grössere Abweichungen im Chlorogensäuregehalt ergaben, fanden wir jedoch nur in einem Falle eine derartig niedrige Konzentration, wie JAKOBER und STAUB angeben. Es ist bekannt, dass der Gehalt an Chlorogensäure im Röstkaffee vom Röstgrad abhängig ist, da die Säure temperaturempfindlich ist (16). Wir sind aus diesem Grund im Gegensatz zu den Autoren nicht der Meinung, dass sich allein durch eine Extraktion des Kaffees unter Druck bei erhöhter Temperatur die niedrigen Chlorogensäurewerte erklären lassen. Wenn Kaffee-Extraktpulver aus stark gerösteten Kaffeebohnen gewonnen werden, kann der Chlorogensäuregehalt entsprechend der Röstung niedriger sein ; das ist in dem von uns aufgeführten Beispiel eines ecuadorianischen Kaffee-Extraktpulvers der Fall. Allerdings finden sich unter den von uns untersuchten Proben einige Kaffeepulver, die einen relativ niedrigen Gehalt an Chlorogensäure im Verhältnis zu den anderen Mustern aufweisen. Es handelt sich um die Muster 6 und 9.

Die Eluate der Polyamidabtrennung wurden eingedampft und dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Trigonellin quantitativ die Säule passiert. Das Trigonellin ist das Methylbetain der Nicotinsäure, dem die abgebildete Struktur zugeschrieben wird. Es macht nahezu 5 % des wasserlöslichen Anteils vom Röstkaffee aus, schmeckt bitter und wird aus diesem Grund am Geschmack des Kaffeegetränkes beteiligt sein.



Trigonellin

Die Eigenschaft des Trigonellins, beim Erhitzen teilweise in Nicotinsäure überzugehen, dem Pellagraschutzstoff des Menschen, macht es zu einem wichtigen Kaffeeinhaltsstoff.

Zur quantitativen Bestimmung des Trigonellins sind mehrere ältere Methoden bekannt, die auf der Herstellung von Niederschlägen oder farbigen Reaktionsprodukten beruhen. MOORES und Mitarb. (17) haben die Konzentration des Trigonellins im Roh- und Röstkaffee nach Extraktion mit 50 % igem Äthylalkohol, Adsorption an FILTROL und Elution mit Ammoniak optisch bestimmt. KOGAN und Mitarb. (18) trennen dagegen störende Begleitstoffe aus dem Kaffee-Extrakt mit Hilfe der Papierchromatographie ab und messen die Konzentration des Trigonellins spektralphotometrisch nach der Elution der lokalisierten Stellen des Papyrogramms.

Dieses Verfahren scheint uns auch der später beschriebenen Methoden von ADAMO (19) und WALL und Mitarb. (20) überlegen und wurde von ALBANESE (21) zur Bestimmung des Trigonellins im behandelten und unbehandelten Bohnenkaffee herangezogen.

Genau wie bei der Bestimmung der Chlorogensäure in Kaffee-Extrakten ist auch bei einer Erfassung des Trigonellins die Hauptschwierigkeit in der Abtrennung von störenden Begleitstoffen zu sehen. Auf Grund der von uns gemachten Beobachtung, dass die Kaffeeauszüge nach der Passage der Polyamidsäule von störenden Begleitstoffen frei sind, haben wir ein Verfahren zur Bestimmung des Trigonellins ausgearbeitet. Unsere Methode beruht darauf, das die spektralphotometrische Bestimmung des Trigonellins störende Coffein zuerst weitgehend mit Chloroform dem Untersuchungsmaterial zu entziehen, den mit 70 % igem Methylalkohol angefertigten Kaffeeauszug durch eine Polyamidsäule laufen zu lassen und nach dem Auswaschen des Polyamidpulvers der Säule die vereinigten Filtrate gegen ein entsprechend bereitetes Blindwertfiltrat spektralphotometrisch bei 264 nm zu messen. Wenn es bei der Extraktion mit Chloroform nicht gelang, das Coffein restlos zu entfernen, so wird das Filtrat weitgehend eingedampft, zu 5 ml aufgefüllt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen. Die dem Trigonellin zugeordneten Stellen des Chromatogramms werden von der Platte verlustlos entfernt, eluiert und danach optisch gemessen. Über die Ergebnisse der nach diesem Verfahren durchgeführten Bestimmungen des Trigonellingehaltes von Kaffeeauszügen wird demnächst berichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. HERRMANN, K. — Z. *Lebensmittel-Untersuch. u. -Forsch.*, **133**, 158-177 (1967).

2. GÁL, I. — *Mitt. Lebensmitt.-Untersuch. Hyg.* (Bern), **50**, 57-76 (1959).

3. WURZIGER, J. — *Mitt. Bl. GdCh.-Fachgr. Lebensm. Chem. gerichtl. Chem.*, **9**, 151 (1955).

4. WURZIGER, J. — *Mitt. Bl. GdCh.-Fachgr. Lebensm.-Chem. gerichtl. Chem.*, **20**, 225 (1966) ; *Kaffee- u. Tee-Markt* XVI/16 u. 17 (1966).

5. MOORES, R. G., McDERMOTT, D. L. u. WOOD, T. R. — *Anal. Chem.*, **20,** 620 (1948).
6. LEHMANN, G., HAHN, H.-G. u. MARTINOD, P. — *DLR*, **63,** im Druck.
7. KRÖPLIEN, U. — Dissertation Hamburg 1963.
8. DIEMAIR, W. u. GANNSSMANN, A. — *Mitt. Bl. GdCh.-Fachgr. Lebensm.- Chem. gerichtl. Chem.*, **20,** 125 (1966).
9. LEHMANN, G., HAHN, H.-G. u. MARTINOD, P. — *Z. analyt. Chem.*, **227,** 81-89 (1967).
10. LEHMANN, G., HAHN, H.-G. u. LUZURIAGA, O. — *DLR*, **63,** im Druck.
11. SONDHEIMER, E. — *Arch. Biochem.*, **74,** 131-138 (1958).
KRÖPLIEN, U. — Dissertation Hamburg 1963.
KOULEN, G. — Dissertation Frankfurt 1964.
LENTNER, C. u. DEATHERAGE, F. E. — *Food Res.*, **24,** 483-492 (1959).
12. HERRMANN, K. — *Pharmazie*, **11,** 433-449 (1956).
13. WEISS, L. C. — *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.*, **36,** 663-670 (1953).
14. GNAGY, M. J. — *ibid.*, **45,** 770-774 (1962).
15. JAKOBER, P. u. STAUB, M. — *Mitt. Lebensmitt.-Untersuch. Hyg.* (Bern), **54,** 26-34 (1963).
16. LENTNER, C. u. DEATHERAGE, F. E. — *Food Res.*, **24,** 483-492 (1959).
17. MOORES, R. G. u. GRENINGER, D. M. — *Anal. Chem.*, **23,** 327-331 (1951).
18. KOGAN, L., DI CARLO, F. J. u. MAYNARD, W. E. — *Anal. Chem.*, **25,** 1118-1120 (1953).
19. ADAMO, G. — *Ann. Chimica*, **45,** 274-278 (1955).
20. WALL, J. S., CHRISTIANSON, D. D., DIMLERR, J. u. SENTI, F. R. — *Anal. Chem.*, **32,** 870-874 (1960).
21. ALBANESE, F. — *DLR*, **60,** 38-43 (1964).

LEHMANN (G.), HAHN (H. G.). — **Dosage de l'acide chlorogénique et de la trigonelline.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 115-120, fig., tabl., réf.

Le dosage quantitatif de l'acide chlorogénique est indispensable à l'appréciation de la digestibilité du café torréfié et de l'extrait de café en poudre. Dans certaines limites on peut calculer le rendement en extrait du café en poudre à partir de la teneur en acide chlorogénique bien que celle-ci diminue, comme cela a été établi, avec le degré de torréfaction.

Actuellement les substances interférentes gênantes pour le dosage quantitatif sont éliminées par chromatographie sur papier.

Le procédé présenté consiste à adsorber l'acide chlorogénique sur des microcolonnes de poudre de polyamide, à éliminer les substances interférentes et à éluer quantitativement l'acide. La concentration est obtenue de façon habituelle par mesure de l'absorption de la lumière à 324 nm.

La trigonelline est dosée, sur le café préalablement décaféiné, par passage de la solution sur une colonne de polyamide, transformation en présence d'hydroxylamine et mesure colorimétrique de l'hydroxamate ferrique à 520 nm.

Par rapport aux méthodes habituelles de dosage de l'acide chlorogénique et de la trigonelline, ce procédé présente l'avantage de la rapidité et fournit des résultats plus reproductibles.

LEHMANN (G.), HAHN (H. G.). — **Quantitative determination of chlorogenic acid and trigonellin in coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 115-120, fig., tabl., réf.

The quantitative analysis of chlorogenic acid is indispensable in order to assess the digestibility of roasted coffee and of coffee extract in powder form. Within certain limits it is possible to calculate the yield in extract of powder coffee from the chlorogenic acid content, although this latter diminishes, as already proved, with the degree of roast.

Nowadays, substances interfering with the quantitative analysis are eliminated by paper chromatography.

The process described, consists in adsorbing the chlorogenic acid on polyamide powder microcolumns, in eliminating the interfering substances and in eluting quantitatively the acid. The concentration is obtained in the usual way by measuring the light absorption at 324 nm.

The trigonellin content is measured from coffee previously decaffeinated by passing the infusion through a polyamide column, transformation with hydroxylamine and the colorimetric measurement of the ferric hydroxamate at 520 nm.

Compared with the usual methods of the quantitative analysis of chlorogenic acid and trigonellin, this process has the advantage of speed and gives more easily reproducible results.

LEHMANN (G.), HAHN (H. G.). — **Über die Bestimmung der Chlorogensäure und des Trigonellins.** Troisième Colloque Internationale sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 115-120, fig., tabl., réf.

Die quantitative Bestimmung der Chlorogensäure ist für die Beurteilung der Bekömmlichkeit des Röstkaffees und des löslichen Kaffee-Extraktpulvers unerlässlich. Unter gewissen Einschränkungen kann auch die Extraktausbeute des Pulverkaffees aus der Menge der vorhandenen Chlorogensäure errechnet werden, jedoch nimmt der Gehalt, wie wir feststellten, mit steigendem Röstgrad des Kaffees ab.

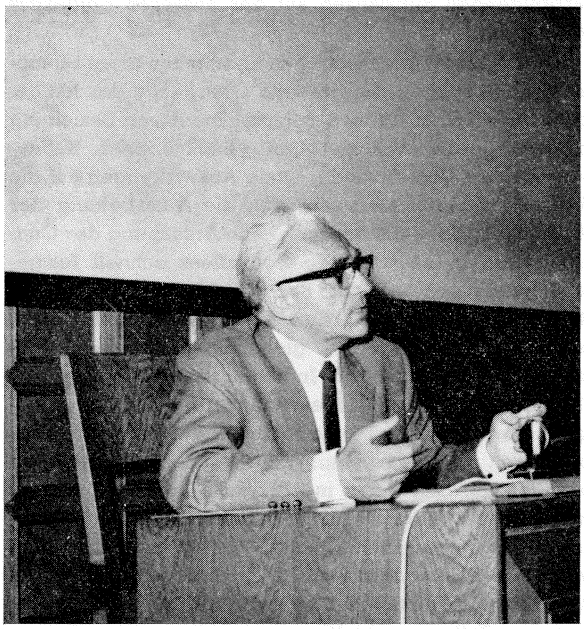
Für die quantitative Bestimmung werden störende Begleitstoffe heute mit Hilfe der Papierchromatographie abgetrennt.

Nach dem von uns entwickelten Verfahren wird die Chlorogensäure an Polyamidpulver in Mikrochromatographiersäulen adsorbiert, die Säule von den Begleitstoffen befreit und die Säure quantitativ eluiert. Die Messung der Konzentration erfolgt wie üblich durch Lichtabsorption bei 324 nm.

Trigonellin wird im vorher entcoffeinierten Kaffee nach Passage der Lösung durch eine Polyamidsäule und Umsatz mit Hydroxylamin als Eisen (III)-Hydroxamat bei 520 nm colorimetrisch gemessen.

Gegenüber den bisher üblichen Verfahren zur Bestimmung der Chlorogensäure und des Trigonellins besitzen die von uns entwickelten Methoden den Vorteil, dass die Bestimmungen sehr viel schneller durchführbar sind und zu besseren, reproduzierbaren Ergebnissen führen.

ÜBER PHENOLISCHE SUBSTANZEN IM KAFFEEWACHS



I. WURZIGER

J. WURZIGER, G. DICKHAUT

Chemische und Lebensmitteluntersuchungsanstalt im Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt, Hamburg

Bekanntlich wird die Kaffeebohne von einer dünnen, aber äusserst fest haftenden Auflagerung, dem sogen. Kaffeewachs umschlossen. Unter geeigneten Extraktionsbedingungen lässt sich das Kaffeewachs neben dem Öl mehr oder minder vollständig miterfassen. In der Literatur wird es daher meist auch zusammen mit Kaffeeöl erwähnt. Wie sehr die Extrakte vom Lösungsmittel bestimmt werden, ergibt sich aus dem Unverseifbaren des Kaffeeöls, das nach M. W. LINDNER (1) zwischen 1,9 % und 21 % schwanken kann. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Unverseifbare im Kaffeeöl aus dem Innern der Bohne etwa 2 % beträgt, dann lässt sich ungefähr die Wachsmenge abschätzen, die bei der Extraktion in das Kaffeeöl geht.

Physiologische Untersuchungen wurden an Kaffeewachs, soweit dies der uns zugänglichen Literatur zu entnehmen war, bisher nicht durchgeführt. Allerdings wird bei Kaffees, die nach dem Lendrich-Verfahren (2) bearbeitet wurden, in Verbindung mit dem Hinweis auf die Entfernung beschwerdeauslösender Verbindungen auch Kaffeewachs erwähnt. Hieraus ist zu folgern, dass dem Kaffeewachs nicht nur eine unerwünschte Wirkung zugemessen wird, sondern dass diese Wirkung auch bekannt ist. Über charakteristische Verbindungen des Kaffeewachses müsste es möglich sein, eine analytische Unterscheidungsmöglichkeit zwischen derartig behandelten und unbehandelten Kaffees zu finden.

In der Aussenauflagerung der Kaffeebohne konnten J. WURZIGER und F. GÜNTHER (3) phenolische Substanzen nachweisen, die mit Gibbs-Reagenz (4) eine intensive grünlich bis blaue Farbreaktion geben. Die Reaktion auf diese phenolischen Substanzen wird als einfache Tüpfelreaktion ausgeführt. Auf der Tüpfelplatte wird zu einer Roh- oder Röstbohne soviel Alkohol (96 %) gegeben, dass die Bohne gerade bedeckt ist. Nach etwa 1 Minute nimmt man sie aus dem Alkohol heraus und setzt diesem 3 Tropfen einer 0,05 % igen Lösung von 2,6-Dichlorchinonchlorimid in Alkohol und 1 Tropfen einer n/2 farblosen alkoholischen Kalilauge zu.

Während des Vortrags wurden Farbaufnahmen projiziert Wir bitten um Entschuldigung dafür, dass sie (Zwei ausgenommen) aus materialen Gründen nicht veröffentlicht worden sind. Sie stellen dar :

Bild 1. — *Unbehandelte und entkoffeinierte Kaffeebohnen.*

Bild 2. — *Anfärbung der äusseren Epidermis mit Gibbs-Reagenz*

Bild 3. — *Anfärbung der inneren Epidermis mit Gibbs-Reagenz.*

Bild 4. — *Anfärbung der inneren und äusseren Epidermis mit Gibbs-Reagenz.*

Bild 5. — *Löslichkeit der phenolischen Wachssubstanzen in organischen Lösungsmitteln (Kaffeewachs aus Sand mit Petroläther, mit Benzol, mit Chloroform, mit Diäthyläther, mit Aceton, mit Äthanol, mit Methanol und mit Benzol : Methanol = 1 : 1 extrahiert).*

Bei Rohkaffee tritt sofort an der Eintropfstelle der Kalilauge eine blaue bis blaugrüne Färbung auf. Die Färbung ist bei Röstbohnen im allgemeinen schwächer als bei Rohkaffees. Entkoffeinierte Kaffeebohnen geben die Reaktion nicht bzw. höchstens ganz schwach. Für die Praxis ergibt sich über diese Reaktion ein interessanter und einfacher Weg, um auf koffeinfreie Kaffees zu prüfen. Man kann hierdurch auf die zeitraubende Koffeinbestimmung vielfach ganz verzichten. Bild 1 zeigt die Reaktion an koffeinhaltigen und entkoffeinierten Kaffeebohnen in der früheren einfachen Form auf der Tüpfelplatte.

Die Gibbs-sche Reaktion zeigt in dieser Ausführungsform nur die An-oder Abwesenheit dieser phenolischen Verbindungen an. Es lassen sich aber keine Aussagen darüber machen, ob es sich um eine oder mehrere Verbindungen handelt. Unter diesen gewählten Bedingungen lässt sich ausserdem auch die Konzentration bei der von tiefblau bis dunkelgrün wechselnden Reaktionsfarbe nur schwer abschätzen. Die quantitative Erfassung ist jedoch dann interessant, wenn davon ausgegangen werden kann, dass sich die phenolischen Substanzen nur in den wachsartigen Auflagerungen der Kaffeebohnen befinden. In solchem Fall können sie, zumindest recht häufig, als Indikator für Kaffeewachs dienen. Die quantitative Bestimmung dieser Substanzen würde dann Aussagen über den Wachsgehalt der Kaffeebohnen ermöglichen und zum Nachweis einer Behandlung beitragen können. Durch schrittweise mechanische Entfernung der äusseren Bohnenschichten wurde die Verteilung dieser Substanzen in der Kaffeebohne ermittelt. Zu diesem Zweck wurde Rohkaffee mit Seesand geschüttelt und der Sand jeweils in Abständen von 4 Stunden erneuert. In den methanolischen Extrakten aus dem Seesand waren bis zur 6. Sandcharge, allerdings in abnehmender Konzentration, phenolische Substanzen nachweisbar. In späteren Chargen konnten über diese Farbreaktion derartige phenolische Substanzen nicht mehr festgestellt werden. Wurden jedoch die mit Sand abgeriebenen Bohnen anschliessend mit Alkohol ausgezogen, dann waren in den Extrakten wieder solche phenolischen Verbindungen nachzuweisen. Die Kaffeebohne besitzt durch die eingerollte Form eine mehr oder minder grosse « innere Oberfläche », von der mit Sand kein Wachs und damit auch keine phenolische Substanz abgerieben werden kann. Von dieser inneren Oberfläche löst aber der Alkohol diese Substanzen ab.

Aus diesem Verhalten ergibt sich bereits, dass diese phenolischen Substanzen, die mit Gibbs-Reagenz eine Umfärbung ergeben, charakteristische Bestandteile der Aussenauflagerungen von Kaffeebohnen sind. Noch eindeutiger lässt sich dies durch mikroskopische Untersuchungen nachweisen. Von unbehandelten Rohbohnen und solchen, deren Wachsschicht mit Sand entfernt worden war, wurden mikroskopische Querschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 2 Minuten in eine warme (50° C) 5 % ige Lösung von 2,6-Dichlorchinonchlorimid in Petroläther (105° C) gelegt und danach für etwa 30 Sekunden Ammoniakgas ausgesetzt. Auf dem Objektträger wurde der zusammengerollte Schnitt in Wasser gelegt und nach dem Absaugen des Wassers durch Filtrierpapier in Entellan eingebettet. Bilder 2, 3, 4 zeigen an einem mikroskopischen Querschnitt durch eine Kaffeebohne die äussere und die « innere » Epidermis, und an einem mikroskopischen Querschnitt durch eine mit Sand behandelte Kaffeebohne die innere und äussere Epidermis.

Die Bilder 2, 3 lassen deutlich erkennen, dass sich die phenolischen Substanzen auf der Epidermiszellenschicht in der Cuticula befinden. Im Bild 4 fehlen die farbbildenden Substanzen auf der äusseren Epidermis vollständig.

Nach diesen Untersuchungen überziehen diese phenolischen Substanzen die gesamte Oberfläche der Kaffeebohnen in einer dünnen Schicht. In dieser Beziehung bestehen auch zwischen den verschiedenen Kaffeesorten keine Unterschiede. Ohne Auswirkungen auf die Rohkaffees bleibt hiernach auch die Aufarbeitung der Rohkaffees. Über die beschriebene Anfärbung der Cuticula kann an bearbeiteten Rohkaffees schnell festgestellt werden, ob durch die Bearbeitung die phenolischen Substanzen entfernt wurden. Da diese farbbildenden, auf der Bohnenoberfläche gleichmässig verteilten Substanzen somit durchaus als Indikator für die wachsartigen Aussenauflagerungen angesehen werden können, ermöglicht diese einfache Methode gleichzeitig zu beurteilen, ob durch die Bearbeitung die Aussenauflagerungen entfernt wurden. Durch mechanische Bearbeitungen ist keine vollständige Entfernung der phenolischen Substanzen zu erreichen. Eine solche gelingt am günstigsten, wenn die Kaffeebohnen mit geeigneten Lösungsmitteln behandelt werden, wie dies z. B. bei der Entkoffeinierung von Kaffee geschieht.

Bei der Reaktion auf der Tüpfelplatte werden unter den gewählten Versuchsbedingungen keine einheitlichen Färbungen erhalten. Um Beeinflussungen der Farbreaktion durch Reagenz-Zersetzungsprodukte zu vermeiden und den Einfluss des Lösungsmittels auszuschalten, wurde auf eine dünnschichtchromatographische Arbeitsweise umgestellt. Verwendet wurden Kieselgel G-Platten. Entwickelt wurde in einem Glastrog bis zu einer Steighöhe von etwa 15 cm. Als brauchbares Fliessmittel erwies sich dabei ein Gemisch aus 88 Teilen Benzol und 12 Teilen Methanol. Wesentlich ist, dass der Methanolgehalt gut eingehalten wird, denn bei 8 Teilen Methanol bleiben die phenolischen Substanzen bereits am Startpunkt zurück und bei mehr als 15 Teilen laufen sie fast ohne Trennung unmittelbar hinter der Fliessmittelfront.

Bild 5 gibt zunächst einen Einblick in die Löslichkeit dieser phenolischen Kaffeesubstanzen in verschiedenen Lösungsmitteln. Für diese Versuche wurde Rohkaffee mit Sand im Verhältnis 1 : 1 etwa eine Stunde intensiv geschüttelt. Jeweils eine bestimmte Menge des Sandes wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert.

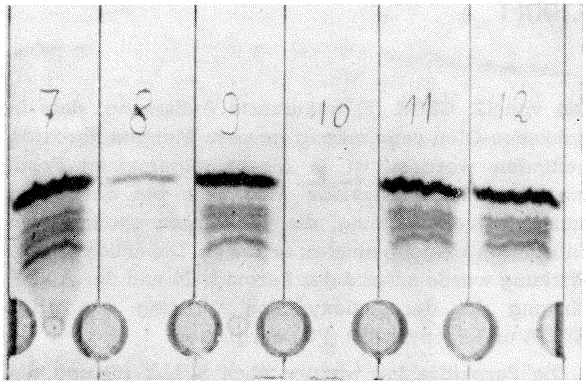


Bild 6. — *Phenolische Wachssubstanzen aus Röstkaffees*

7 *Röstkaffee, gedämpft.*
8 *Röstkaffee, entkoffeiniert.*
9 *Röstkaffee, gedämpft.*
10 *Röstkaffee, entkoffeiniert.*
11 *Röstkaffee, gedämpft.*
12 *Röstkaffee, gedämpft.*

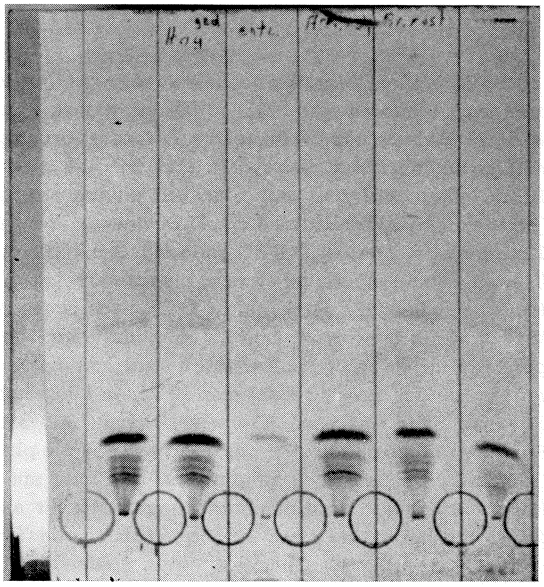


Bild 7. — *Phenolische Substanzen aus Röstkaffees*

Die Intensität der Farbflecken ist ein gutes Mass für die Löslichkeit der phenolischen Substanzen in den verschiedenen Lösungsmitteln. Im Chromatogramm wurden ausserdem Unterschiede sichtbar, die über die einfache Tüpfelreaktion nicht zu erkennen waren. Das interessante Ergebnis dieser Versuche ist, dass sich die phenolischen Substanzen des Kaffeewachses in etwa 8 Komponenten auftrennen lassen, die mit Gibbs-Reagenz tiefblaue Farbstoffe bilden. Dabei zeigt das Chromatogramm regelmässig hinter einem sehr starken blauen Flecken stets mehrere schwächere. Bild 6 zeigt die Dünnschichtchromatogramme der phenolischen Wachssubstanzen aus verschiedenen Röstkaffees.

Die Zusammenstellung im Bild 6 umfasst behandelte (gedämpfte und koffeinfreie) Röstkaffees. In den Auszügen aus den koffeinfreien Röstkaffees fehlten die phenolischen Substanzen so gut wie vollständig. Die Auszüge aus den behandelten Röstkaffees unterschieden sich voneinander nicht merkbar. Nach den bisherigen Untersuchungen bestehen aber auch zwischen behandelten (gedämpften) und unbehandelten unter diesen Versuchsbedingungen keine erkennbaren Unterschiede, wie aus dem Bild 7 zu entnehmen ist.

Die Dünnschichtchromatogramme koffeinhaltiger Kaffees wiesen stets neben einer sogen. Hauptkomponente mehrere Substanzen mit kleinerem R_f-Wert auf, die jedoch alle die Reaktion mit Gibbs-Reagenz gaben. Dabei wurde kein Unterschied zwischen frischen und abgelagerten Roh- bzw. Röstkaffees beobachtet. Diese verschiedenen Substanzen wurden ausserdem sowohl in frischen, auf dem Luftwege aus Brasilien besorgten Pergaminos wie in Samen aus unreifen Kaffeekirschen gefunden. Unabhängig davon, wie das Mengenverhältnis dieser Substanzen zueinander ist, kann gesagt werden, dass diese im R_f-Wert voneinander abweichenden phenolischen Wachssubstanzen charakteristisch für Kaffee sind und einen natürlichen Bestandteil darstellen.

Für die quantitative Bestimmung wurde die Gibbs-Reaktion beibehalten. Es wurde aber nur die Hauptkomponente herangezogen. Die blau gefärbten Flecken des Kieselgels wurden zunächst mit Benzol : Methanol = 9 : 1 gelöst und die Extinktion bei 570 nm, dem ausgeprägten Absorptionsmaximum des Farbstoffes gemessen. Unter diesen Versuchsbedingungen waren die Extinktionen aber nicht reproduzierbar. Weder wiederholtes Besprühen mit dem Reagenz noch Nachsprühen mit Borax-Lösung verbesserten die Ergebnisse.

Eine auswertbare Umsetzung wurde dadurch erreicht, dass der gefärbte Kieselgelfleck in einen kleinen Mörser abgekratzt und mit 0,5 ml einer 2 % igen Lösung von Gibbs-Reagenz in PAe (40° C) verrieben wurde. Zur Einstellung der richtigen Reaktionsbedingungen wurde noch eine Spatelspitze Siliciumdioxid zugesetzt, das zuvor mit Ammoniumkarbonat (2 % $(HN_4)_2CO_3$) bezogen auf SiO_2) verrieben worden war. Zur Ermittlung dieser phenolischen Hauptkomponente in Kaffeebohnen, wurden die grob zerkleinerten Bohnen in einem entsprechend umgebauten Rotationsverdampfer zuerst mit Petroläther (PAe) und dann mit Methanol extrahiert. Der eingeengte Methanolextrakt wurde über eine kleine Aluminiumoxid-Säule gereinigt. Insgesamt ergibt sich daraus folgende Arbeitsvorschrift.

ARBEITSVORSCHRIFT

10 g Roh- oder Röstkaffeebohnen werden grob zerkleinert und 30 Minuten mit PAe (40° C) extrahiert. Danach wird 10 Minuten mit Methanol im Rotationsverdampfer mit Extraktionszusatz extrahiert. Der Extrakt wird auf 10 ml eingeengt und auf eine Aluminiumoxid-Säule (Höhe der Al_2O_3-Schicht ca 5 cm, Durchmesser der Säule 10 mm, Aktivität des Al_2O_3 II-III) gegeben. Das Eluat kommt in einen 25 ml Kolben und es wird bis zum Erreichen der Marke mit Benzol : Methanol = 1 : 1 nachgewaschen. Von dieser Lösung wird 1 ml auf eine aktivierte Kieselgelplatte strichförmig aufgetragen und mit einer Mischung aus 88 Teilen Benzol und 12 Teilen Methanol bis zu einer Höhe von etwa 20 cm entwickelt. Mit Gibbs-Reagenz und gesättigter Boraxlösung werden die phenolischen Substanzen sichtbar gemacht. Die Zone mit der Hauptkomponente wird in einen kleinen Mörser abgekratzt und mit 0,5 ml einer 2 % igen Lösung von Gibbs-Reagenz in PAe (40° C) sowie einer Spatelspitze mit ammonium-karbonathaltigem Kieselgel versetzt. Die Mischung wird 2 Minuten intensiv verrieben. Danach wird das Kieselgel auf eine Glasfritte (G4) gebracht und mit PAe zunächst das überschüssige Reagenz ausgewaschen. Der gebildete Farbstoff wird in wenigen ml einer Mischung aus Benzol : Methanol = 9 : 1 gelöst und unter leichtem Vakuum in ein 10 ml Meskölbchen gesaugt. Mit Benzol wird zur Marke aufgefüllt. Die Extinktion des Farbstoffes wird bei 570 nm in einer 1 cm Küvette gemessen. In *Tabelle 1* ist für verschiedene Rohkaffees der Gehalt an dieser phenolischen Substanz angeführt.

TABELLE 1

Phenolische Hauptkomponente im Rohkaffee

Bezeichnung	Zahl der Bohnen/10 g	Extinktion
Mexico-Maragogype ..	32	0,450
Kenya	48	0,578
Columbia	49	0,564
Salvador	59	0,723
Santos	62	0,604
Santos Perl	92	0,762

Für Perlkaffees wurden die höchsten und für grossbohnige Kafiees die niedrigsten Extinktionen ermittelt. Da die phenolische Substanz nur auf der Oberfläche der Kaffebohnen vorkommt, überrascht die Beziehung zwischen Bohnengrösse und Extinktion bzw. Gehalt an dieser Substanz nicht. In diesem Zusammenhang kann nicht auf Veränderungen an diesen Substanzen während der Rohkaffeelagerung eingegangen werden. Bekanntlich lassen sich auch in Kaffeeölen aus alten Rohkaffees nur selten Peroxide in merkbarer Menge nachweisen. Die von G. CZOK (5) geäusserte Auffassung, dass in Rohkaffee-Ölen regelmässig gewisse Mengen Peroxide gefunden werden, ist in dieser allgemeinen Form unrichtig. Viele Peroxide sind auch bei der guten antioxydativen Wirkung, die von diesen phenolischen Substanzen ausgeht, nicht zu erwarten. Die antioxydative Wirkung wurde anhand der Peroxidzahl und der Alkalifärbung mit der antioxydation Wirkung von BHA, NDGA und Propylgallat (PG) verglichen.

Die Peroxidzahlen wurden nach SULLY (6) und die Alkalifärbung nach F. PALLAUF (7) in der von J. WURZIGER und E. LINDEMANN (8) für Speisefette modifizierten Form bestimmt. Für die Versuche wurde die phenolische Kaffeesubstanz und die Antioxydantien BHA, NDGA und PG frischem Schweineschmalz in einer Konzentration von 0,01 % zugesetzt. Als Versuchstemperaturen wurden 100° C und 130° C gewählt.

Bei 100° C erwies sich die phenolische Hauptkomponente in der Wirkung den Antioxydantien BHA und NDGA am ähnlichsten. Bezüglich der Alkalifärbung war sie auch mit PG gut vergleichbar. Bei 130° C zeigte die phenolische Substanz etwa die gleiche Schutzwirkung wie NDGA. Der Schutzfaktor betrug nach 3 Stunden bei 100° C unter den gewählten Bedingungen 4,5, nach 2 Stunden bei 130° C jedoch nur noch 1,2. Hierin zeigt sich, dass die auf der Oberfläche haftenden Substanzen durch Einwirkung höherer Temperaturen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff leicht zerstört werden. Daraus folgt, dass unter den üblichen Behandlungsbedingungen des Rohkaffess diese Substanzen zumindest teilweise zerstört werden. Nach den bisherigen Untersuchungen bewegt sich die Abnahme in gedämpften Rohkaffees um 20 %. In diesem Zusammenhang kann nicht darauf eingegangen werden, dass unter solchen Bedingungen auch Veränderungen anderer Art eintreten, die sich eventuell ebenfalls zum Nachweis der Behandlungsart eignen. Aus diesem Verhalten folgt aber weiter, dass diese Substanzen unter den üblichen Röstbedingungen in weit stärkerem Masse zerstört werden als unter den Dämpfungsbedingungen. *In Tabelle 2* sind einige Beispiele zusammengestellt, aus denen die Abnahme der Substanz beim Rösten der Kaffees zu ersehen ist.

Die Untersuchungen wurden an einem Costarica-Kaffee durchgeführt, der in 6 verschiedenen Röststufen vorlag. Die Ergebnisse vermitteln einen Einblick in die Abnahme der phenolischen Hauptkomponente unter diesen Röstbedingungen. Bei der Errechnung der phenolischen Substanz wurde von 14 % Einbrand ausgegangen. Diese Zusammenstellung lässt bereits erkennen, dass über den Gehalt an der phenolischen Hauptkomponente im Röstkaffee nicht allgemein gleichzeitig Aussagen über den Wachsgehalt des Rohkaffees und damit auch Aussagen möglich sind, ob eine Behandlung

TABELLE 2

Abnahme der phenolischen Hauptkomponente beim Rösten

Röstgrad	Extinktion der Blaufarbung bei 570 nm	mg % phenolische Substanz
Schwach geröstet ...	0,300	43,0
— — ...	0,286	40,8
Etwa normal geröstet	0,245	34,4
— —	0,229	32,2
Stark geröstet	0,167	17,4
Uberröstet	0,060	1,7

des Rohkaffees stattgefunden hat. Wie sich dies bei mechanisch bearbeitetem Kaffee auswirkt, veranschaulichen die Beispiele *in Tabelle 3*.

Durch die mechanische Bearbeitung wurde in den Rohkaffees eine mehr oder minder grosse Abnahme der phenolischen Hauptkomponente in den Aussenschichten der Kaffeebohnen erreicht. Die Abnahme war jedoch, wie die Beispiele zeigen kleiner als unter den Röstbedingungen. Die niedrigsten Werte waren in stark bearbeiteten Kaffees zu erwarten, unabhängig davon, ob die phenolischen Substanzen ausschliesslich über eine mechanische Bearbeitung entfernt wurden oder ob sie noch eine zusätzliche Dampfbehandlung erfahren hatten. Über die erläuterte Arbeitsweise kann der Nachweis einer derartigen Behandlung sicher nur erbracht werden, wenn unzerkleinerte geröstete Kaffeebohnen vorliegen, da die Bohnengrösse bei der Errechnung berücksichtigt werden muss. Ausserdem muss der Röstgrad bedacht werden. Es kommt also nicht nur auf die Behandlungsweise des Kaffees an, sondern zumindest in gleichem Masse auf die Röstbedingungen und den Röstgrad. Da mechanisch bearbeitete oder gedämpfte Rohkaffees unter anderen Bedingungen geröstet werden müssen als unbehandelte, wenn es auf den Röstgrad ankommt, verschieben sich zwangsläufig auch die Verhältnisse zwischen dem Gehalt an der Hauptkomponente in bearbeitetem Kaffees vor und nach dem Rösten anders als bei unbehandelten Kaffees. Insbesondere bei bearbeiteten Kaffees müsste, sofern in der Werbung Kaffeewachs angesprochen werden soll, auch diesen Substanzen mehr Beachtung geschenkt werden.

Die bisher von uns an Kaffeewachsen bzw. den darin vorkommenden phenolischen Substanzen durchgeführten Untersuchungen konnten hier nur kurz gestreift werden. Die Bedeutung dieser Substanzen erscheint auch zunächst insofern gering als sie wasserunlöslich sind. Unter den Bearbeitungsbedingungen der Rohkaffees mit Wasserdampf und den Aufguss- und insbesondere den industriellen Extraktionsbedingungen der Röstkaffees erfahren diese phenolischen Substanzen jedoch Veränderungen, die u. a. zu wasserlöslichen Stoffen führen. Wenn solche mögliche Veränderungen mit in die Betrachtung einbezogen werden, dann könnten die phenolischen Verbindungen, die in den Cuticularwachsen vorliegen, eventuell auch für die Beurteilung des Genusswertes und der Bekömmlichkeit von Kaffees wertvoll sein. Untersuchungen, die diesen Fragen gelten, sind jedoch noch nicht abgeschlossen.

Die chemische Natur dieser phenolischen Substanzen konnte von uns noch nicht restlos aufgeklärt werden. Nach den bisherigen Untersuchungen dürfte es sich bei der Hauptkomponente um ein Säureamid einer Indolverbindung handeln. Darüber wird aber in aller nächster Zeit berichtet werden können.

TABELLE 3

Änderung des Gehaltes an phenolischer Substanz durch mechanische Bearbeitung der Rohkaffees und durch den Röstprozess

Behandlung	Rohkaffee		Röstkaffee		
	Extinktion der Färbung	mg % Phenolische Substanz	Extinktion der Färbung	mg % Phenolische Substanz	% Abnahme der Substanz
Costarica-Kaffee, unbehandelt	0,322	57,5	0,245	34,4	40
Costarica-Kaffee, 10 Minuten mit Sand im Verhältnis 1 : 1 behandelt.....	0,299	50,0	0,259	30,4	39
Costarica-Kaffee, 30 Minuten mit Sand im Verhältnis 1 : 1 behandelt.....	0,276	45,0	0,234	26,8	41
Costarica-Kaffe, 50 Minuten mit Sand im Verhältnis 1 : 1 behandelt.....	0,260	42,5	0,216	24,1	44

LITERATURVERZEICHNIS

1. *Kaffee und Tee Markt*, **18**, S. 26 (1958).
2. Warenkunde und Untersuchung von Kaffee, Verlag A. W. Hayn, s Erben, Berlin SO 36 (1955).

2 *bis*. Patentschrift Nr. 576 515, Klasse 53 d, Gruppe 202, ausgegeben 16.5.1933.

3. *Mitteilungsblatt der GDCh-Fachgruppe Lebensmittel-Chemie und gerichtliche Chemie* 14, S. 181 (1960).
4. *J. biol. Chemistry*, **72**, S. 649 (1927).
5. G. CZOK, Untersuchungen über die Wirkung von Kaffee, Dr Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966, S. 64.
6. *Analyst*, 79, S. 86 (1954).
7. *Seifen, Fette, Öle, Wachse*, 75, S. 51 (1949). *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 52, S. 370 (1950).
8. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 60, S. 99 (1958).

WURZIGER (J.), DICKHAUT (G.). — **Les substances phénoliques de la cire de café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 121-126, fig., tabl., réf.

La cire de café entoure la graine telle une fine enveloppe externe fortement adhérente. On l'obtient plus ou moins totalement au cours de l'extraction, à côté de l'huile du grain. Selon les études entreprises, toutes les enveloppes externes du café vert de différentes origines et ayant subi diverses préparations contiennent des substances phénoliques possédant une forte activité antioxydante. Ces substances sont séparées en huit constituants par chromatographie sur couche mince et forment avec le réactif de Gibbs un colorant bleu profond. On montre que la réaction colorée convient comme indicateur de la cire de café et qu'elle permet d'autre part une estimation tant qualitative que quantitative des cafés verts et torréfiés.

WURZIGER (J.), DICKHAUT (G.). — **The phenolic substances contained in coffee wax.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 121-126, fig., tabl., réf.

The coffee wax covers the bean just like a thin very adhesive outer envelope. It is almost totally recovered during extraction along with the essential oil of the bean. Studies made of this, show that all the external envelopes of green coffees of different varieties and having undergone different treatments, contain phenolic substances having a powerful antioxydizing action. These substances are divided into eight constituents by thin-layer chromatography, and form together with Gibbs' reagent a deep blue dye. It is shown that colour reaction is suitable as an indicator of coffee wax and that it also makes possible a qualitative as well as quantitative valuation of raw and roasted coffees.

WURZIGER (J.), DICKHAUT (G.). — **Über phenolische Substanzen im Kaffeewachs.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 121-126, fig., tabl., réf.

Kaffeewachs umschliesst die Kaffeebohnen als äusserst fest haftende dünne Aussenauflagerung, die bei der Extraktion neben dem Öl des Samenkornes mehr oder minder vollständig miterfasst wird. Alle Aussenauflagerungen enthalten nach den an Rohkaffees verschiedener Herkunft und Bearbeitung durchgeführten Untersuchungen phenolische Substanzen mit hoher antioxydativer Wirkung, die sich dünnschichtchromatographisch in etwa 8 Komponente aufteilen lassen und mit Gibbs-Reagenz tiefblaue Farbstoffe bilden. Es wird gezeigt, dass die Farbreaktion als Indikator für Kaffeewachs geeignet ist und dass sie ausserdem qualitative und quantitative Aussagen über Roh- und Röstkaffees ermöglicht

HOCHPOLYMERE KOHLENHYDRATE DES ROHEN UND GERÖSTETEN KAFFEES

H. THALER, W. ARNETH

Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule, Braunschweig

Hochpolymere Kohlenhydrate sind als Bestandteile der grünen Kaffeebohne seit mehr als 70 Jahren bekannt. E. SCHULZE (1) hatte schon 1890 Cellulose, Pentosan, Mannose und Galactose nachgewiesen, die als Bauelemente der Zellwand des Kaffees angesehen werden mussten. Eine quantitative Bestimmung einzelner dieser Polysaccharide wurde 1935 von K. TÄUFEL und H. THALER (2) durchgeführt, die auch Xylan nachweisen konnten. Weitere Untersuchungen stellten dann M. L. WOLFROM und Mitarb. (3) 1960 an. Dabei fanden sie in dem mit kaltem Wasser aus einem rohen Santos-Kaffee erhaltenen Extrakt ein schon länger bekanntes Polysaccharid, das bis in die neueste Zeit als « Dextrin » bekannt war, und wiesen als dessen Bestandteile Galactose und Arabinose nach. Durch Extraktion des gleichen Kaffees mit Ammoniumoxalatlösung bekamen sie eine weitere Fraktion, die Uronsäuren, Arabinose, Galactose, Mannose und Rhamnose enthielt und wohl zum grössten Teil als Pektin anzusehen war. Eine durch Aufschluss mit Chlordioxid gewonnene Holocellulose war aus Cellulose, Mannan, Galactan, Araban und Xylan zusammengesetzt.

H. THALER



Beim I. Internationales Kolloquium über die Chemie des grünen und gerösteten Kaffees im Jahre 1963 hatten dann J. E. COURTOIS, F. PERCHERON und J.-M. GLOMAUD (4) über Untersuchungen an rohem Robusta-Kaffee berichtet wobei sie 2 Fraktionen von Polysacchariden isoliert hatten. Die eine war durch Extraktion des entfetteten Kaffees mit kaltem, die andere durch Behandlung des Rückstandes dieser ersten Extraktion mit heissem Wasser erhalten worden. Mit kaltem Wasser ging ein Glucogalactomannan in Lösung, mit heissem Wasser erhielten sie ein Arabinogalactan.

Ein Jahr später veröffentlichte der eine von uns (Th.) Untersuchungen über den Gehalt von geröstetem Kaffee an Holocellulose (5). Dabei ergab sich, dass diese schon von M. L. WOLFROM u. Mitarb. (3) aus einem leicht gerösteten Santos isolierte Substanz auch noch in sehr stark geröstetem Kaffee einen beträchtlichen Teil ausmacht. Es stellte sich aber auch heraus, dass anscheinend ein gewisser Anteil an Polysacchariden beim Aufschluss mit Chlordioxid in Lösung ging. Zwischen dem Gesamt-

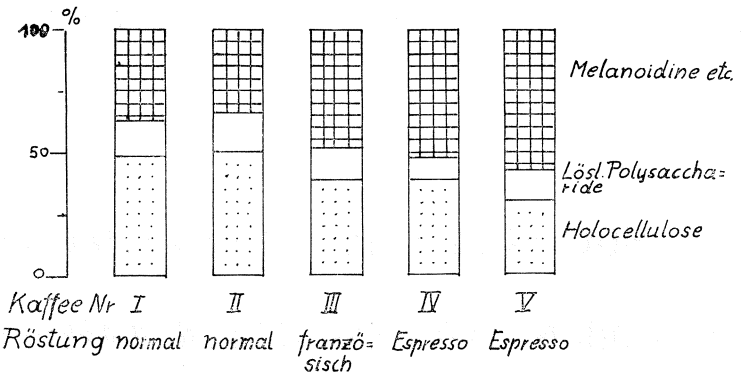


Abb. 1. — *Die Zusammensetzung des Kaffeesatzes verschieden stark gerösteter Kaffee-Mischungen des Handels n.* H. THALER (5)

Kohlenhydratgehalt des entfetteten und mit Wasser erschöpfend extrahierten Kaffeesatzes und der Menge der hochpolymeren Kohlenhydrate der Holocellulose bestand eine nicht unbeträchtliche Differenz (Abb. 1). Man musste also annehmen, dass durch die Behandlung des Kaffeesatzes mit Chlordioxid ein bestimmter Teil von Polysacchariden löslich würde. Da sich aber auch unter den beim Aufbrühen mit heissem Wasser in Lösung gehenden Extraktstoffen des gerösteten Kaffees hochpolymere Kohlenhydrate finden, so enthält dieser demnach ebenfalls mindestens zwei Komplexe von Polysacchariden, von denen der eine in Wasser löslich, der andere, nämlich die Holocellulose, darin gänzlich unlöslich ist. Als dritte Fraktion käme ev. jener Anteil hinzu, der erst beim Aufschliessen des Kaffeesatzes mit Chlordioxid in Lösung geht, dessen Existenz bisher aber nur rechnerisch nachgewiesen werden konnte.

Fasst man das bisher bekannte zusammen, so kommt man zum folgenden Ergebnis : Sowohl der rohe als auch der geröstete Kaffee enthalten Polysaccharide oder Komplexe von solchen, die sich anscheinend durch verschiedene Löslichkeit auszeichnen. Das Problem schien interessant genug, um den Verhältnissen weiter nachzugehen, wobei zunächst die folgenden Fragen geklärt werden sollten :

1) Enthält Rohkaffee Fraktionen von Polysacchariden, die sich durch verschiedene Löslichkeit gut voneinander unterscheiden ?

2) Welche Zusammensetzung haben diese Fraktionen ?

3) Welche Zusammensetzung besitzen die Polysaccharid-Fraktionen von geröstetem Kaffee ?

4) Welche Veränderungen erleiden die Polysaccharid-Fraktionen des Rohkaffees beim Rösten ?

Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

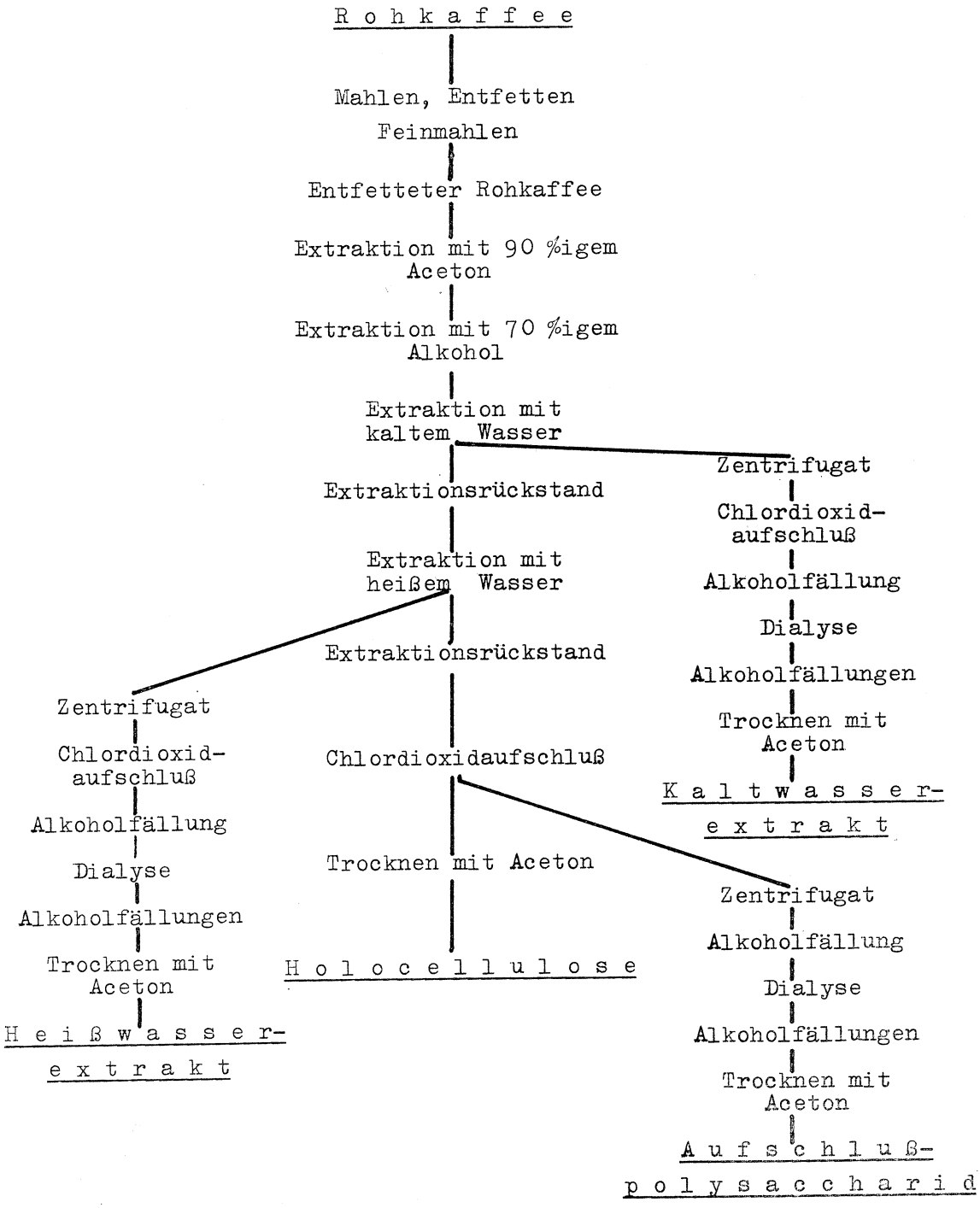
MATERIAL UND METHODEN

Um die Untersuchungen nicht allzu sehr auszudehnen, wurden ausschliesslich Arabica-Sorten untersucht, und zwar je ein Columbia-, ein Haiti-, ein Santos- und ein Kenya-Kaffee. Die Aufarbeitung geschah nach dem Schema I durch Entfetten und Mahlen des Rohkaffees. Das staubfein gemahlene Material wurde erst mit kaltem dann mit heissem Wasser erschöpfend extrahiert. Die im Vakuum-Verdampfer eingeengten Extrakte behandelte man mit Chlordioxid nach WISE, MURPHY und D'ADDIECO (6) und reinigte die Lösung durch Fällen der hochpolymeren Bestandteile mit Alkohol und durch Dialyse. Der nach der Extraktion mit heissem Wasser erhaltene Rückstand wurde ebenfalls mit Chlordioxid aufgeschlossen und die Holocellulose mit heissem Wasser gründlich ausgewaschen. Die Waschwasser vereinigte man mit der Aufschluss-Lösung und verarbeitete diese gemeinsam genauso wie die wässrigen Extrakte. Man erhielt auf diese Weise zwar keine reinen Polysaccharide, aber wenigstens Konzentrate, die mindestens 40 % Kohlenhydrate enthielten.

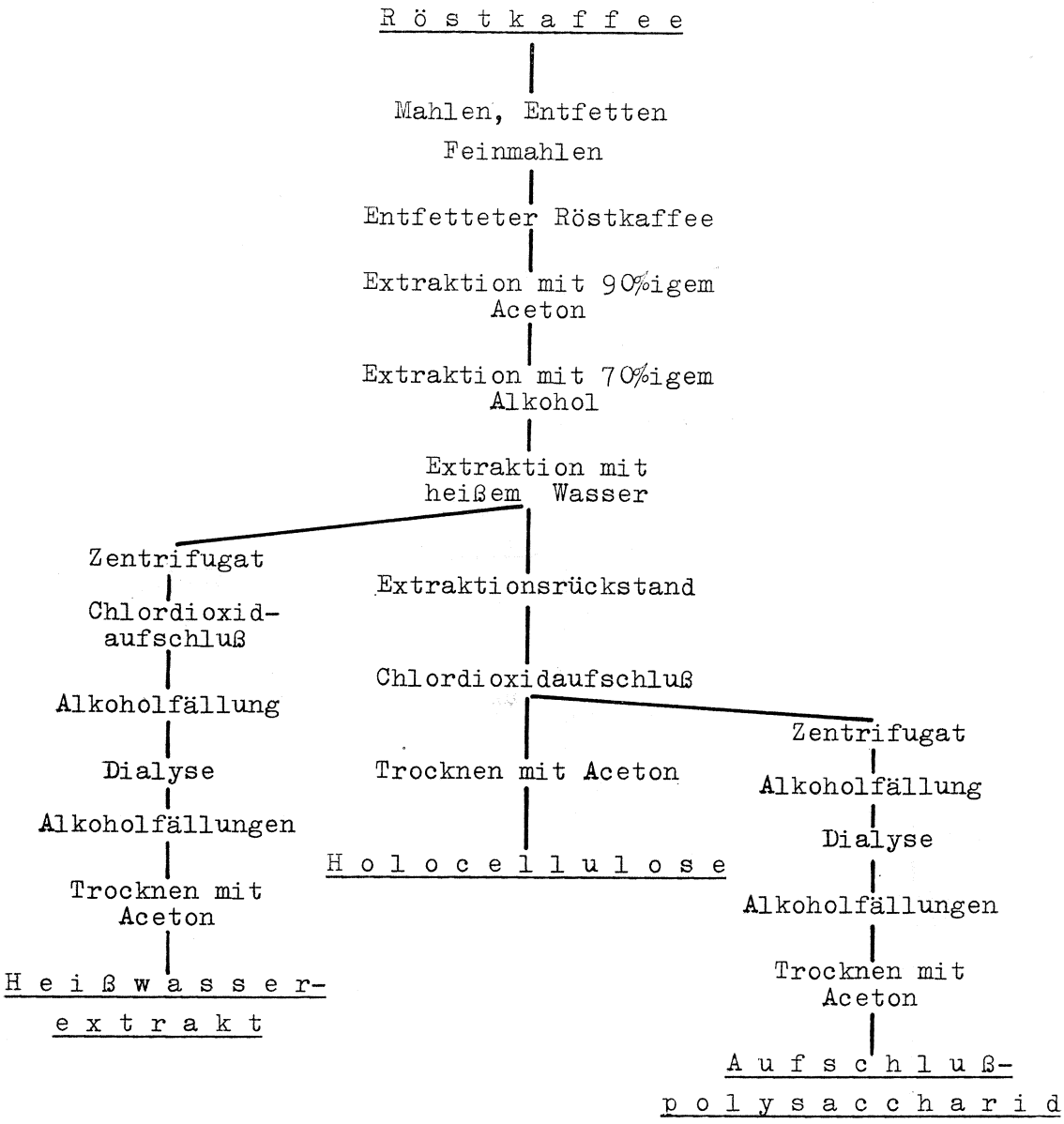
Diese Konzentrate hydrolysierte man mit 72 %iger Schwefelsäure, trennte die in den Hydrolysaten vorhandenen Zucker papierchromatographisch und bestimmte sie in den Eluaten mit Phenol-Schwefelsäure nach DUBOIS u. Mitarb. (7).

Von den 4 Kaffee-Sorten wurden dann in einem Probe-Röster je 3 Proben von geröstetem Kaffee hergestellt, und zwar eine leicht geröstete (Einbrand etwa 10-12 %), eine mittelstark geröstete (Einbrand etwa 15 %) und eine stark geröstete mit einem Einbrand von 19-22 %. Die Aufarbeitung dieser Röstkaffees erfolgte in der gleichen Weise wie die der Rohkaffees, die gerösteten Proben wurden jedoch nur mit kochendem Wasser extrahiert (Schema II).

Schema der Aufarbeitung des Rohkaffees I



Schema der Aufarbeitung des g e r ö s t e t e n Kaffees II



POLYSACCHARIDE DES ROHEN ARABICA-KAFFEES

Bei den aufeinanderfolgenden Extraktionen mit kaltem und heissem Wasser lieferten die 4 Arabica-Sorten 2 Polysacccharidhaltige Fraktionen. Überraschenderweise stellte es sich beim Aufschliessen des nach der Extraktion mit kaltem und heissem Wasser erhaltenen Rückstandes mit Chlordioxid heraus, dass dabei nochmal ein hochpolymeres Kohlenhydrat in Lösung ging. Der Rückstand dieses Aufschlusses enthielt die Kohlenhydrate der Zellwand. Er wird in der Regel als « Holocellulose » bezeichnet. Quantitative Bestimmungen ergaben, dass die einzelnen Polysaccharid-Fraktionen in definierten Mengen vorhanden sind. Es ist also z. B. nicht möglich,

durch öfters wiederholtes Extrahieren des Rohkaffees mit heissem Wasser mehr als eine ganz bestimmte Menge von löslichen Polysacchariden zu erhalten oder etwa durch Verlängern der Chlordioxid-Behandlung des mit heissem Wasser extrahierten Rohkaffees mehr als eine definierte Menge an « Aufschluss-Polysaccharid » zu gewinnen. Die Ergebnisse waren bei allen 4 Arabica-Kaffees gleich.

Somit enthält roher Arabica-Kaffee 4 Anteile von Polysacchariden, die sich durch ihre Löslichkeit recht erheblich unterscheiden. Vorhanden ist zum einen ein in kaltem Wasser lösliches hochpolymeres Kohlenhydrat, zum anderen eines, das erst beim Behandeln mit heissem Wasser in Lösung geht. Ferner findet sich der völlig unlösliche Komplex der Polysaccharide der Zellwand, die sog. Holocellulose, und endlich ein Anteil, der erst beim Aufschluss mit Chlordioxid, also nach der weitgehenden Oxydation von Eiweiss usw. in Wasser löslich wird. Da das bei allen 4 untersuchten Kaffee-Sorten in gleicher Weise der Fall war, so dürften diese 4 Gruppen von Polysacchariden allgemein mindestens für Arabica-Kaffee charakteristisch sein. Damit ist die erste Frage beantwortet.

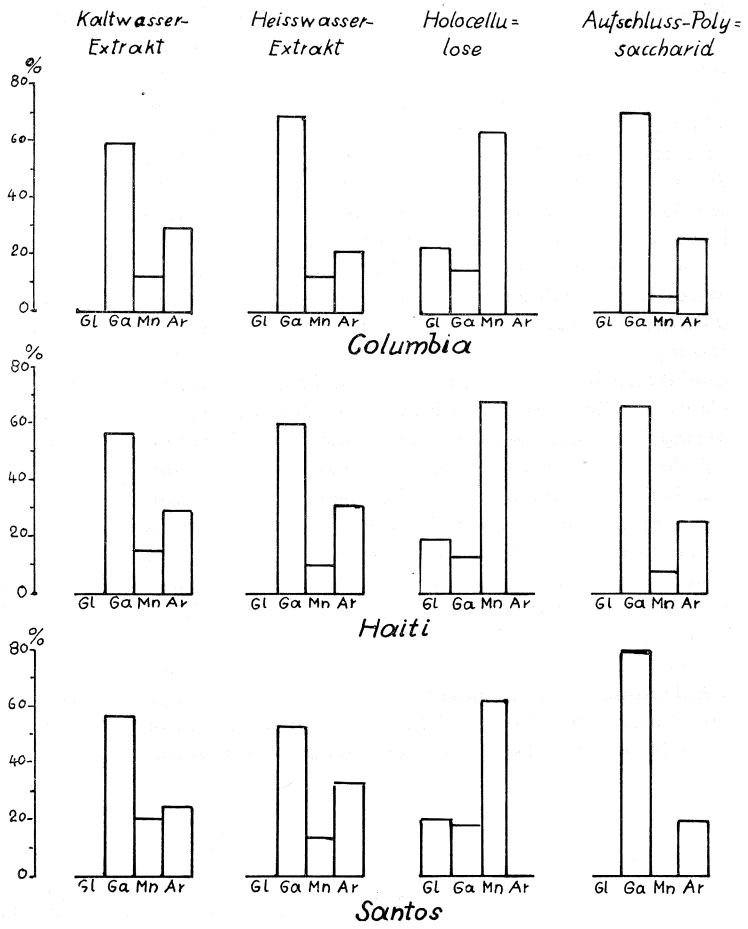


Abb. 2. — *Die Zusammensetzung der Polysaccharid-Komplexe von Arabica-Rohkaffee. Gl = Glucan, Ga = Galactan, Mn = Mannan, Ar = Araban*

Die nächste Frage war jene nach der Zusammensetzung der vier Polysaccharid-Komplexe. Die Resultate der Untersuchungen sind in der Abb. 2 zusammengestellt. Dabei sind hier nur 3 Rohkaffee-Sorten berücksichtigt. Der Kenya-Kaffee gelangte nämlich erst nach Abschluss der Untersuchungen in unsere Hände und konnte daher nicht mehr aufgenommen werden. Er lieferte jedoch keine grundsätzlich abweichenden Ergebnisse.

Wie aus der Abb. 2 zu ersehen ist, besteht das **in kaltem Wasser lösliche Polysaccharid** überwiegend, nämlich zu ca 55-60 %, aus einem Galactan(*). Araban ist zu etwa 25-30 % darin enthalten, während Mannan nur einen verhältnismässig kleinen Anteil von rund 12-20 % ausmacht. Dabei ist zwischen den betreffenden Polysaccharid-Komplexen der Kaffee-Sorten kein wesentlicher Unterschied vorhanden, nur beim Kenya war weniger Araban (21 %) als Mannan (27 %) vorhanden.

Sehr ähnlich zusammengesetzt ist auch **der Komplex der hochpolymeren Kohlenhydrate des mit heissem Wasser** erhaltenen Extraktes (Abb. 2). Der Prozentsatz des Galactans ist hier noch etwas höher als bei den Kaltwasser-Extrakten und liegt bei 53-68 %, der des Arabans schwankt zwischen 20 und 33 % und jener des Mannans zwischen 10 und 14 %. Der Unterschied zwischen den Polysacchariden des Kalt- und Heisswasser-Extraktes liegt also im wesentlichen darin, dass die letzteren etwas mehr Galactan und etwas weniger Mannan enthalten.

Es scheint daher die Überlegung berechtigt, ob man hier überhaupt von zwei gesonderten Polysaccharid-Fraktionen sprechen soll. Ohne Zweifel sind sie durch ihre Löslichkeit sehr gut voneinander unterschieden. Bei der Gleichartigkeit der Zusammensetzung aber

(*) Da wir keinen Beweis dafür haben, dass Galactan, Mannan und Araban miteinander durch kovalente Bindungen verbunden sind, möchten wir Bezeichnungen wie « Galactomannoaraban » vermeiden und lieber von « Polysaccharid-Komplexen » sprechen.

könnte es sich auch um einen einzigen Polysaccharid-Komplex handeln, dessen Fraktionen vielleicht verschiedenen Polymerisationsgrad besitzen, wobei der niedriger molekulare Anteil leichter, nämlich schon in kaltem Wasser löslich wäre. Ebenso gut könnte aber auch ein Teil des ganzen Komplexes frei, der Rest vielleicht an Proteine gebunden vorliegen. Dieser letztere Anteil würde dann möglicherweise erst durch die Hitze-Koagulation der Eiweiss-Stoffe frei und damit löslich.

Der in Wasser nicht lösliche Komplex der hochpolymeren Kohlenhydrate der Zellwand des grünen Kaffees, die **Holocellulose**, weist eine gänzlich andere Zusammensetzung auf als die eben besprochenen Fraktionen. Charakteristisch ist natürlich der Gehalt an Cellulose (Abb. 2). Ihre Menge schwankt in den erstaunlich geringen Grenzen zwischen 19 % und 23 %, bezogen auf den Polysaccharid-Komplex selbst. Der Hauptbestandteil dieses Komplexes ist aber Mannan, das bei drei der untersuchten Arabica-Kaffees (Columbia, Santos und Kenya) 62-63 %, beim Haiti sogar ca 68 % ausmacht. Von Galactan sind dagegen nur 13-18 % vorhanden, während Araban völlig fehlt, bzw. nur in nicht bestimmbaren Spuren vorhanden ist.

Eine Überraschung bot die Zusammensetzung des « **Aufschluss-Polysaccharids** » (Abb. 2). Hier beträgt der Anteil des Galactans 66-74 %, während Araban in einer Menge von 25-28 % vorliegt. Mannan ist dagegen nur beim Columbia und beim Haiti vorhanden, ersterer enthält rund 6 %, der letztere etwa 8 %. Im Aufschluss-Polysaccharid der beiden anderen Arabica-Sorten, Santos und Kenya, liess sich zwar ebenfalls Mannan nachweisen, seine Menge war aber so gering, dass es nicht mehr zu bestimmen war.

Die Frage 2 lässt sich demnach folgendermassen beantworten :

Die vier Polysaccharid-Fraktionen von rohem Arabica-Kaffee, die sich durch ihre Löslichkeit voneinander unterscheiden, besitzen auch verschiedene Zusammensetzung. Die im Kaltwasser- und Heisswasser-Extrakt vorhandenen Kohlenhydrat-Komplexe sind sich allerdings beträchtlich ähnlich. Sie enthalten als Hauptbestandteil Galactan, das etwas mehr als die Hälfte, und Araban, das ungefähr 20-30 % ausmacht. Mannan ist dagegen nur mit rund 2-7 % im Kaltwasser-Extrakt bzw. mit 10-14 % im Heisswasser-Extrakt enthalten. In der Holocellulose finden sich dagegen neben der Cellulose (ca 20 %) etwa 66 % Mannan und nur 13-18 % Galactan, während Araban nur in Spuren nachweisbar ist. Das Aufschluss-Polysaccharid wiederum besteht zu ca 70 % aus Galactan und enthält 25-28 % Araban. Mannan ist offenbar kein regelmässiger Bestandteil, da nur zwei der untersuchten Arabica-Kaffees 5 % bzw. 8 % davon enthielten, die beiden anderen aber nur Spuren.

POLYSACCHARIDE DES GERÖSTETEN KAFFEES

Um die Fragen 3 und 4 beantworten zu können, wurden wie schon erwähnt, Proben der vier Arabica-Sorten in einem elektrisch beheizten Probe-Röster verschieden stark geröstet und nach Schema II aufgearbeitet. Man erhielt 3 Polysaccharid-Komplexe, einen, der sich ohne weiteres in heissem Wasser löste, eine Holocellulose sowie das bislang von dem einen von uns (Th.) nur rechnerisch nachgewiesene Aufschluss-Polysaccharid.

Schon die Untersuchung der **in heissem Wasser löslichen Polysaccharid-Fraktion** der leicht gerösteten Kaffee-Sorten lieferte eine Überraschung (Abb. 3) (*).

Bereits bei leichter Röstung tritt eine sehr deutliche Veränderung in der Zusammensetzung dieses Komplexes ein. Zwar macht das Galactan immer noch den Hauptanteil aus, jedoch nicht mehr in solchem Ausmasse wie im Komplex der wasserlöslichen Polysaccharide des Rohkaffees. Während zudem bei diesem letzteren der Anteil des Arabans rund 25-30 % betrug, ist er nun auf 10-16 % gesunken. Dafür hat die Mannan-Komponente erheblich zugenommen und macht jetzt 33-42 % des gesamten Polysaccharid-Komplexes aus.

Bei stärkerer Röstung werden die hier schon recht deutlichen Veränderungen noch eindrucksvoller : Je höher der Röstgrad, desto mehr nimmt das Araban ab und das Mannan zu, während der Galactan-Anteil sich ebenfalls verringert, wenn auch nicht in solchem Ausmasse wie das Araban (Abb. 4). Dabei vollziehen sich diese Veränderungen mit zunehmendem Röstgrad mit einer solchen Regelmässigkeit, dass man in Versuchung geraten könnte, sie in Kurven darzustellen. In Wirklichkeit dürfte es sich aber mehr oder weniger um Zufälligkeiten handeln.

Bei der **Holocellulose** wirkt sich die Röstung ebenfalls merklich aus, wenn auch nicht in dem Masse wie bei den wasserlöslichen Polysacchariden (Abb. 5). Leichtes Rösten ist fast ohne Einfluss, die Veränderunge

(*) Da die in kaltem und heissem Wasser löslichen Polysaccharid-Komplexe des Roh-Kaffees eine weitgehend ähnliche Zusammensetzung besitzen, wurden sie nun als ein einziger « wasserlöslicher Komplex » angesehen, dessen prozentuale Anteile an Galactan, Araban und Mannan man berechnete und in den Abb. 3 und 4 einsetzte.

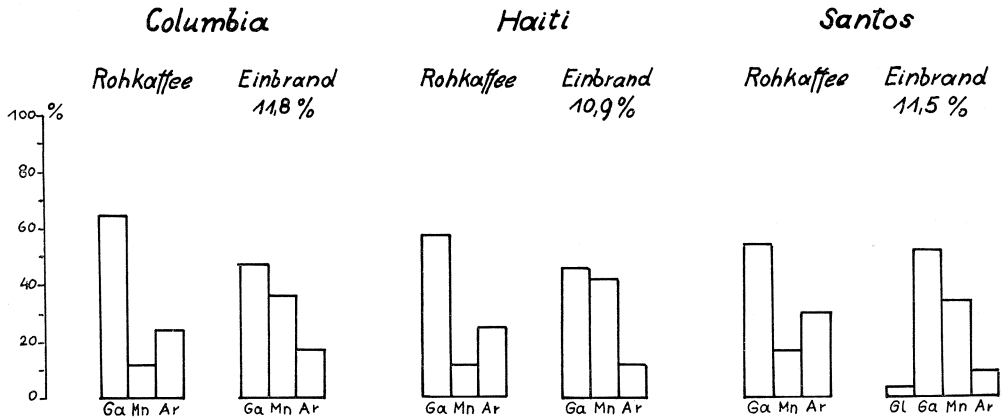


Abb. 3. — *Veränderung der Zusammensetzung des wasserlöslichen Polysaccharid-Komplexes von Arabica-Rohkaffee beim leichten Rösten. Ga = Galactan, Mn = Mannan, Ar = Araban*

Abb. 4. — *Veränderung der Zusammensetzung des wasserlöslichen Polysaccharid-Komplexes von Arabica-Kaffee mit zunehmendem Röstgrad. Gl = Glucan, Ga = Galactan, Mn = Mannan, Ar = Araban*

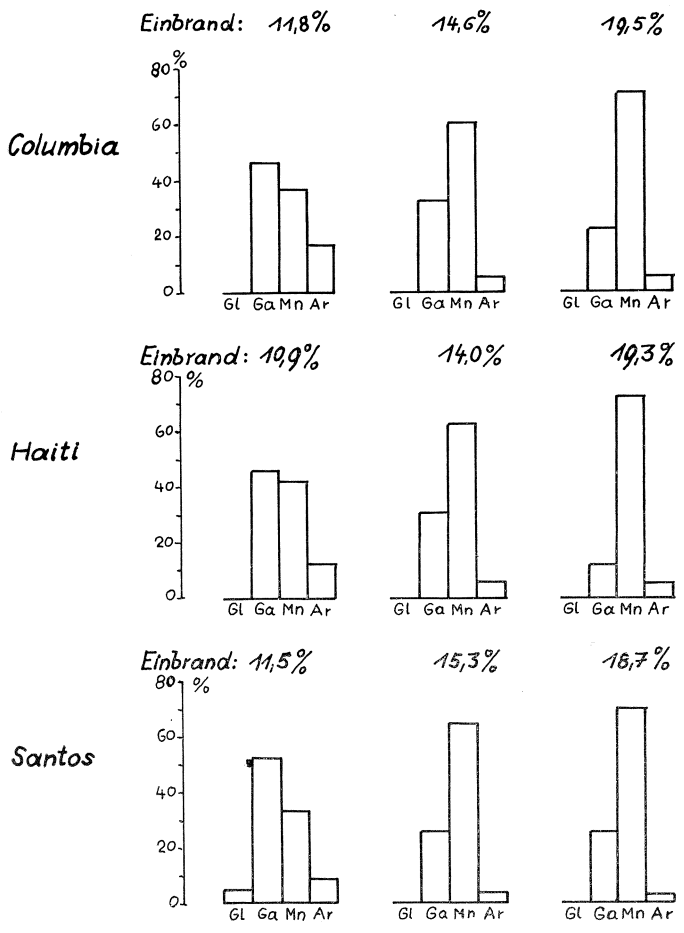
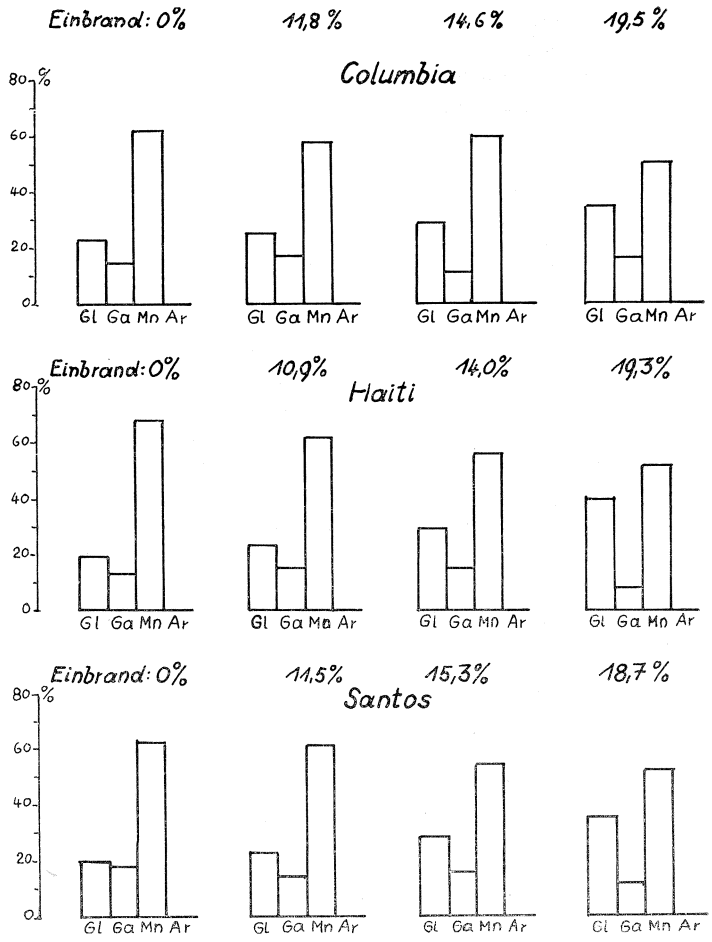


Abb. 5. — *Veränderung der Zusammensetzung der Holocellulose von Arabica-Kaffee mit zunehmendem Röstgrad. Gl = Glucan, Ga = Galactan, Mn = Mannan, Ar = Araban*



der Zusammensetzung scheinen zum Teil eher zufälliger Natur zu sein, zum mindesten jene des Galactans. Beim Columbia- und beim Haiti-Kaffee nimmt es geringfügig zu, beim Santos — und auch beim Kenya — ein wenig ab. Die Menge der Cellulose steigt um 1-3 % an und das Mannan nimmt bei zwei der untersuchten Kaffee-Proben (Columbia und Haiti) ab, bei den beiden anderen tritt jedoch keine Änderung ein.

Bei stärkerem Rösten vollziehen sich dann aber die gleichen Vorgänge wie sie beim wasserlöslichen Polysaccharid-Komplex zu beobachten waren : Der Gehalt der Holocellulose an Mannan nimmt etwas, aber nicht sehr stark, ab, während der Anteil an Galactan sich erheblich verringert. Die Cellulose dagegen erweist sich als recht stabil.

Die Bestandteile des **Aufschluss-Polysaccharides** verhalten sich ähnlich wie jene des wasserlöslichen Kohlenhydrat-Komplexes (Abb. 6). Als am empfindlichsten erweist sich das Araban, von dem nach starker Röstung nur noch höchstens 10 % vorhanden sind, während das Aufschluss-Polysaccharid des Rohkaffees etwa 25 % davon enthielt. Das Galactan ist dagegen bedeutend stabiler. Es tritt zwar auch hier eine Verringerung seines prozentualen Anteils ein, die aber eigentlich auf den Übergang von der leichten zur normalen Röstung beschränkt ist. Noch stärkeres Rösten ist dann weiterhin fast ohne jeden Einfluss. Der Gehalt des Polysaccharid-Komplexes an Mannan nimmt wiederum beträchtlich zu.

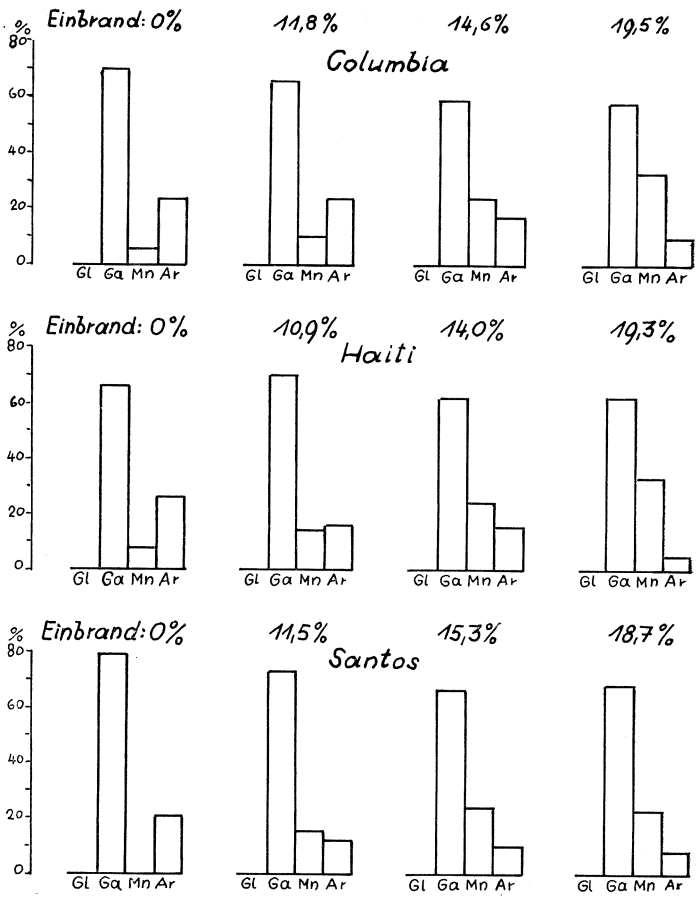


Abb. 6. — *Veränderung der Zusammensetzung des Aufschluss-Polysaccharids von Arabica-Kaffee mit zunehmendem Röstgrad. Gl = Glucan, Ga = Galactan, Mn = Mannan, Ar = Araban*

Die eingangs gestellten Fragen 3 und 4 können demnach folgendermassen beantwortet werden :

Gerösteter Arabica-Kaffee enthält 3 Fraktionen von Polysaccharid-Komplexen, die sich durch ihre Löslichkeit voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um einen in heissem Wasser löslichen Anteil, eine gänzlich unlösliche Holocellulose und wiederum um ein « Aufschluss-Polysaccharid », einen Komplex, der erst beim Chlordioxid-Aufschluss des mit kochendem Wasser erschöpfend extrahierten Röstkaffees, des sog. « Kaffeesatzes », in Lösung geht. Wie beim Rohkaffee sind auch diese Polysaccharid-Komplexe in definierten Mengen vorhanden.

Die 3 Komplexe unterscheiden sich auch in ihrer Zusammensetzung (Abb. 6). Der wasserlösliche Anteil besteht aus Galactan, Mannan und Araban. Die Holocellulose enthält neben der Cellulose selbst nur Mannan und Galactan, jedoch kein Araban, das Aufschluss-Polysaccharid dagegen besitzt als Hauptbestandteil Galactan, mehr oder weniger reichlich Araban und wechselnde Mengen von Mannan.

Eine definierte Zusammensetzung der einzelnen Komplexe des gerösteten Kaffees lässt sich natürlich nicht angeben, da das Verhältnis der Bestandteile zueinander sich mit steigendem Röstgrad ändert.

Neben der Cellulose ist ohne Zweifel das Mannan am stabilsten und gegen die Einwirkung der Hitze am wenigsten empfindlich. Galactan wird durch das Rösten dagegen recht merklich beeinflusst und nimmt in zunehmendem Masse ab je stärker der Rohkaffee geröstet wird. Am empfindlichsten ist das Araban, was auch zu erwarten war. Der Furanose-Ring der Pentosen ist, wie man seit langem weiss, bei höherer Temperatur bedeutend weniger stabil als der Pyranose-Ring der Hexosen. Die Veränderungen der Holocellulose und des Aufschluss-Polysaccharids beim Rösten entsprechen durchaus diesen Erfahrungen. Nach leichtem Rösten ist die Zusammensetzung dieser beiden Polysaccharid-Komplexe immer noch jener der betreffenden Komplexe des Rohkaffees durchaus ähnlich. Erst bei weitgehender thermischer Einwirkung tritt dann eine Änderung der

Verhältnisse der einzelnen Bausteine Mannan, Galactan, Cellulose und Araban zueinander ein.

Der wasserlösliche Anteil wird jedoch schon durch leichtes Rösten grundlegend verändert. Insbesondere nimmt der Anteil des Mannans schon bei einem Einbrand von nur etwa 10-12 % so stark zu, dass keine Ähnlichkeit mit dem Aufbau des entsprechenden Komplexes des Rohkaffees mehr besteht.

N. B. : Dem Verband der Chemischen Industrie e. V. danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

LITERATUR

1. E. SCHULZE, E. STEIGER u. W. MAXWELL. — *Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chem.*, **14**, 227 (1890).
2. K. TÄUFEL u. H. THALER. — *Ztschr. Unters. Lebensmittel*, **69**, 152 (1935).
3. M. L. WOLFROM, R. A. PLUNKETT u. M. L. LAVER. — *J. agric. Food Chem.*, **8**, 58 (1960).
4. J. E. COURTOIS, F. PERCHERON u. J.-Cl. GLOMAUD. — *Café, Cacao, Thé*, **3**, 231 (1963).
5. H. THALER. — *Ztschr. Lebensmittel-Unters.- Forsch.*, **125**, 369 (1964).
6. L. E. WISE, M. MURPHY u. A. A. D'ADDIECO. — *Paper Trade J.*, **122**, 35 (1946).
7. M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS u. F. SMITH. — *Analytic. Chem.*, **28**, 350 (1956).

THALER (H.), ARNETH (W.). — **Les hydrates de carbonne hautement polymérisés des cafés vert et torréfié.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris) 1968, p. 127-136, fig., réf.

1) Le café arabica vert contient quatre fractions de polysaccharides qui se différencient par leur solubilité : un des complexes de polysaccharides est déjà soluble dans l'eau froide alors qu'un autre ne l'est que dans l'eau chaude. Le troisième de ces complexes est la dite holocellulose qui précipite sous forme de résidu insoluble au cours de la dégradation du café vert par le dioxyde de chlore, une quatrième fraction de polysaccharide devient alors soluble et est appelée « polysaccharide de dégradation ». Les quatre complexes sont présents en quantités définies.

2) Les quatre complexes diffèrent dans leur composition.

3) On peut isoler trois complexes de polysaccharides du café arabica torréfié : une fraction soluble dans l'eau chaude, une holocellulose et un « polysaccharide de dégradation ». Les trois fractions diffèrent dans leur composition.

4) Au cours de la torréfaction la cellulose se révèle très stable. Le mannane aussi est relativement peu sensible aux températures de torréfaction. Par contre le galactane est très nettement influencé et l'arabane est détruit de façon considérable en fonction du degré de torréfaction.

THALER (H.), ARNETH (W.). — **The highly polymerised carbohydrates of green and roasted coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 127-136, fig., réf.

1) Raw Arabica coffee contains four fractions of polysaccharides which differ in solubility : one of these polysaccharide complexes is even soluble in cold water while another is only soluble in hot water. The third of these complexes is the so-called holocellulose which is precipitated as an insoluble residue during the degradation of green coffee by chlorine dioxide, a fourth fraction of polysaccharide then becomes soluble and is called « degradation polysaccharide ». The four complexes are present in definite quantities.

2) The four complexes differ in composition.

3) It is possible to isolate three polysaccharide complexes of roasted Arabica coffee : a fraction soluble in hot water, a holocellulose and a « degradation polysaccharide ». The three fractions differ in composition.

4) During roasting the cellulose appears very stable. The mannane is relatively unaffected by the roasting temperatures. On the other hand, the galactane is most definitely affected and the arabane is to a great extent destroyed in proportion to the degree of roast employed.

THALER (H.), ARNETH (W.). — **Hochpolymere Kohlenhydrate des rohen und gerösteten Kaffees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 127-136, fig., réf.

1) Arabica-Rohkaffee enthält 4 Fraktionen von Polysacchariden, die sich durch ihre Löslichkeit unterscheiden : Einer dieser Polysaccharid-Komplexe ist schon in kaltem, ein anderer dagegen nur in heissem Wasser löslich. Der dritte dieser Komplexe ist die sog. Holocellulose, die als unlöslicher Rückstand beim Aufschluss des Rohkaffees mit Chlordioxid anfällt, wobei eine vierte Polysaccharid-Fraktion löslich wird, die « Aufschluss-Polysaccharid » genannt wurde. Alle 4 Komplexe sind in definierten Mengen vorhanden.

2) Die 4 Komplexe unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung.

3) Aus geröstetem Arabica-Kaffee können 3 Polysaccharid-Komplexe isoliert werden : Ein in heissem Wasser löslicher Anteil, eine Holocellulose und ein « Aufschluss-Polysaccharid ». Die 3 Fraktionen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung.

4) Beim Rösten erweist sich vor allem die Cellulose als sehr stabil. Auch Mannan ist verhältnismässig wenig empfindlich gegen die Röst-Temperaturen. Galactan dagegen wird sehr merklich beeinflusst und Araban mit zunehmendem Röstgrad beträchtlich zerstört.

DISCUSSION

M. NAVELLIER : L'auteur peut-il indiquer les températures atteintes à la torréfaction et les teneurs en eau des cafés verts et torréfiés, afin de considérer les résultats par rapport à la matière sèche des cafés verts mis en œuvre ?

M. THALER : Ueber die Temperatur beim Rösten kann ich Ihnen leider nichts sagen. Wir haben einen einfacher Proberöster der Firma PROBAT, aber ohne Temperaturanzeige. Es tut mir leid ich kann das nicht beantworten, den Wassergehalt haben wir bestimmt. Ueber den Wassergehalt werden Sie in der Veröffentlichung lesen. Die Arbeiten erscheinen voraussichtlich in drei Veröffentlichungen und zwar in der Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.

M. WOOTTON : What are the hydrolysis conditions used by Dr. Thaler to degrade the polysaccharides to the individual monomers ?

M. THALER : Wir haben mit 72 %iger Schwefelsäure nach der Methode von Monier-Williams hydrolysiert, die wir aber in verschiedenen Punkten abgeändert haben. So musste z. B. die Einwirkungsdauer der 72 %igen Schwefelsäure verlängert werden. Auch wurde die Schwefelsäure nicht mit Bariumhydroxid, sondern mittels Ionenaustauschern entfernt.

M. WOODMAN : Could Prof. Thaler tell us if it was possible to distinguish from his results whether the decrease in the proportion of galactane present in his hot-water-soluble fractions of roast coffees having different degrees of roast was due to a decrease in the quantity of galactane dissolved or to an increase in the quantity of other polysaccharides rendered soluble during roasting ?

I would also be grateful if the Professor could indicate whether the amounts of various sugars found in the individual fractions account for the totality of the carbohydrates present in the roast coffee.

M. THALER : Darf ich die zweite Frage zuerst antworten.

Was wir an Polysacchariden in dem Kaffee festgestellt haben in den einzelnen Fraktionen, ist tatsächlich die Gesamtmenge. Wir haben den Kaffee bei der Aufarbeitung, wie ich schon sagte, zerkleinert, gemahlen, entfettet und haben ihn dann erstmal mit 70 % Alkohol heiss extrahiert um Saccharose, usw herauszulösen. Und dann, nachdem diese Oligosaccharide entfernt waren, haben wir unsere weitere Aufarbeitung durchgeführt. Aber Sie haben ja aus dem Aufarbeitungsschema gesehen, wir haben dialysiert und was wir bekommen haben und was uns interessiert hat, sind ja die Polysaccharide, also die hochpolymere Kohlenhydrate. Ich glaube aber nicht dass ausser den Oligosacchariden, also das heisst, der Saccharose, und den hochpolymeren Kohlenhydraten noch irgendwelche Zwischenstufen an höheren Oligosacchariden oder so etwas vorhanden sind. Davon hat auch Wolfrom nichts gefunden.

Nun ihre erste Frage. Sie meinten ob die Abnahme von Galactan usw, gleichzeitig eine Zunahme an wasserlöslichen Sacchariden überhaupt bedeutet. Das ist tatsächlich der Fall ; ich sagte ja vorhin wir haben die Menge dieser Polysaccharidefraktionen bestimmt. Man kriegt ganz bestimmte Mengen mit kaltem Wasser, mit heissem Wasser, dem Chlordioxidaufschluss aus dem grünen Kaffee, auch aus dem gerösteten Kaffee, heraus. Wenn man einen entfetteten Kaffeesatz mit Chlordioxid aufschliesst, noch so lange wie man will, da löst sich nichts mehr heraus als ein ganz bestimmtes Anteil, es tritt also kein allmähliches Auflösen der Holocellulose ein, sondern mit einem bestimmten Punkt ist das Lösen beendet. Es sind also definierte Menge, und damit kann man natürlich dann auf die Mengen an Galactan, Mannan zurückrechnen, auf das was im Rohkaffee ursprünglich vorhanden war, unter der Einrechnung des Röstverlustes. Ich habe hier darüber nicht sprechen wollen, denn die Zeit ist beschränkt, ich wollte Ihnen nur mal diese Ergebnisse vorführen.

Schliesslich werden Sie es ja in den Veröffentlichungen lesen, es kommt darauf hinaus dass beim Rösten anscheinend aus der Holocellulose Galactan und Mannan wasserlöslich werden. Da also aus der Holocellulose durch die Hitze Galactan und Mannan wahrscheinlich zerbrochen werden, dass Bruchstücke, aber immer noch hochpolymere Bruchstücke, entstehen die dann aber schon wasserlöslich sind. Der Cellulose passiert offenbar nichts, denn wir finden in unseren verschiedenen wasserlöslichen Fraktionen ganz gleich wie stark geröstet wurde, Glucose nur in Spuren, also in Mengen die einfach nicht mehr zu bestimmen sind.

M. ILLY : Welche Fraktionen haben die grösste Aktivität ?

M. THALER : Nein, die Frage kann ich nicht beantworten, denn das müsste natürlich betrachtet werden im Rahmen des ganzen. Ich glaube nicht dass diese Polysaccharidefraktionen in der wässerigen Lösung eines Kaffeeaufgusses als freie Polysaccharide herumschwimmen, sondern ich möchte meinen dass sie mindestens durch Absorption an (neue ?). Produkte gebunden sind. Ich darf da ruhig sagen dass es überaus komplizierte Komplexe sind, Verbindungen kann man nicht sagen, wie man das nehmen will, die natürlich gänzlich anders reagieren würden und sich physikalisch gänzlich anders verhalten als ein herausgelöstes isoliertes Polysaccharid.

M. STREULI : Dieser letzten Vermutung von Herrn Prof. Thaler dass keine isolierten Polysaccharide in Kaffee herumschwimmen, möchte ich folgenden Befund entgegenstellen. Wenn Sie einen Kaffee-Aufguss zuerst durch einen gewöhnlichen Kationenaustauscher passieren und nachher durch einen Sephadex-Anionenaustauscher, das ist sehr wichtig, dann erhalten Sie im endlichen Effluat ein schneeweisses Polysaccharid welches aus verschiedenen Monomeren zusammengesetzt ist. Das würde dafür sprechen dass solche Polysaccharide tatsächlich isoliert in der Lösung sich finden.

M. THALER : Das war mir nicht bekannt. Das spricht aber ganz entschieden tatsächlich dafür dass Polysaccharide frei, mindestens ein Polysaccharid-Komplex, frei im Kaffee vorhanden ist. Ich darf übrigens bei der Gelegenheit noch sagen, wir haben soeben eine eigene Arbeit begonnen über die Polysaccharide vom Kaffeeaufgüssen und technischen Kaffee-Extrakten, einmal so wie sie bei der technischen Extraktion anfallen. Dann habe ich selbst, es ist zehn Jahre her, mit alkalischer Kupferlösung einen Galactan-Mannan Komplex fällen können.

THE CARBOXYLIC ACIDS OF BREWED COFFEE

J. S. WOODMAN, A. GIDDEY, R. H. EGLI
Laboratoire de recherche des Produits Nestlé, Vevey

INTRODUCTION

Several authors have published papers concerning the carboxylic acids of coffee (1-4) and have generally emphasized the influence of these substances on the flavour and pH of the coffee brew. LENTNER and DEATHERAGE (5) reported that the initial fall in pH of the extracts of a series of coffees of increasing degrees of roast was due to the « formation of volatile acids which more than compensated the loss of phenolic acids » whereas at higher roasts the « amount of volatile acids remained relatively constant whilst the non-volatile acids decomposed further causing the pH to rise ».

In view of the apparant importance of these acids we have developed an analytical method for determining the total quantity present in infusions of coffee and also improved the method used by DEATHERAGE et al. (4, 5) for the quantitative determination of various of the individual acids present.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Total carboxylic acids

The method chosen was the isolation, purification and gravimetric assay of the acids as their sodium salts. The seven stages necessary are summarised in fig. 1. The drying processes are always carried out at low temperature at a pH of 7 thus avoiding both the degradation of any impurities present and the loss of the volatile acids. Before extraction with organic solvents the acids are liberated from any possible insoluble salt form by acidification. At stage 4 when the acids are re-extracted into an aqueous phase, a pH close to neutrality is chosen to reform the salts of the carboxylic acids, whilst leaving weak acids such as phenols in the acid form which is less readily extracted by the water. The final impurities are removed by absorption onto active carbon and the salts



J. S. WOODMAN

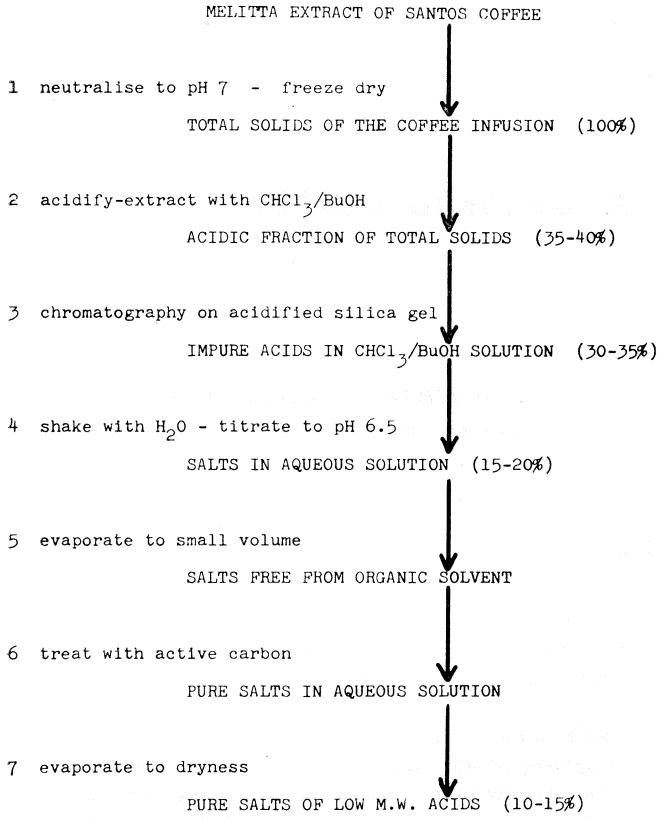


Fig. 1. — *Stages of the analytical procedure for the total carboxylic acids showing the approximate percentage of the total solids remaining after each step*

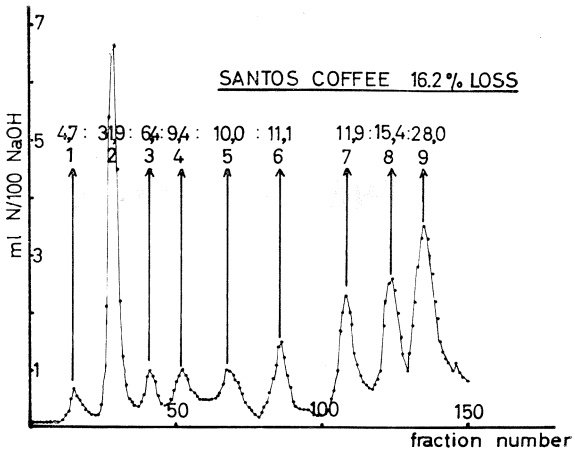


Fig. 1 (a). — *Typical separation obtained by column chromatography*

dried to constant weight over phosphorus pentoxide in a tared flask before weighing.

This entire process was shown to be quantitative by the classic procedure of re-addition of a known quantity of these salts to a coffee extract which had been previously analysed. Analysis of such samples showed recoveries better than 95 %. The salts obtained by this method contain no amino-acids and no polyphenols : only simple and polyfunctional carboxylic acids are detected.

Analysis of the individual acids

The salts isolated in this way are entirely suitable for analysis of the individual components by the method of BULEN, VARNER and BURRELL (7), as previously used by DEATHERAGE et al. (4, 5) who chromatographed the total soluble solids of various coffee extracts. The present method avoids the difficulty caused by interference of the other components of the mixture of coffee solids.

In the described method the acids are liberated from their salts with sulphuric acid and eluted from a column of acidified silica gel with a series of mixtures of chloroform and n-butanol of increasing polarity ; we obtained improved separations using a gradient elution with the same solvents (fig. 1a). Instead of titrating each fraction with aqueous alkali in a two phase system we used alcoholic sodium hydroxide with thymol blue as indicator. This has the advantage of facility as well as avoiding an excess of alkali. In this way the salts may be recovered and are, after eliminating the indicator with active carbon, sufficiently pure for infra-red spectroscopy.

The fig. 2 shows typical spectra of such salts. The spectrum of « peak 2 from sample II » is sufficiently pure sodium acetate for the spectrum to serve as an adequate identification of acetic acid in these coffee extracts. The spectrum of « peak 2 from sample IV », a high roast coffee, clearly indicates the presence of a second component and thus shows the error that would be made if the entire peak were to be counted as acetic acid. In this work the spectrum of the sodium salt was recorded in each case where there could be doubt as to the composition of a peak.

The acids identified by the evidence of the infra-red spectra of their sodium salts were :

Peak 1 — 2-furoic acid
Peak 2 — Acetic acid
Peak 4 — Formic acid
Peak 5 — Lactic acid.

It was observed that the composition of peaks 2 and 4 changed considerably with the degree of roast, acetic and formic acids being minor components of these peaks in high-roast coffees.

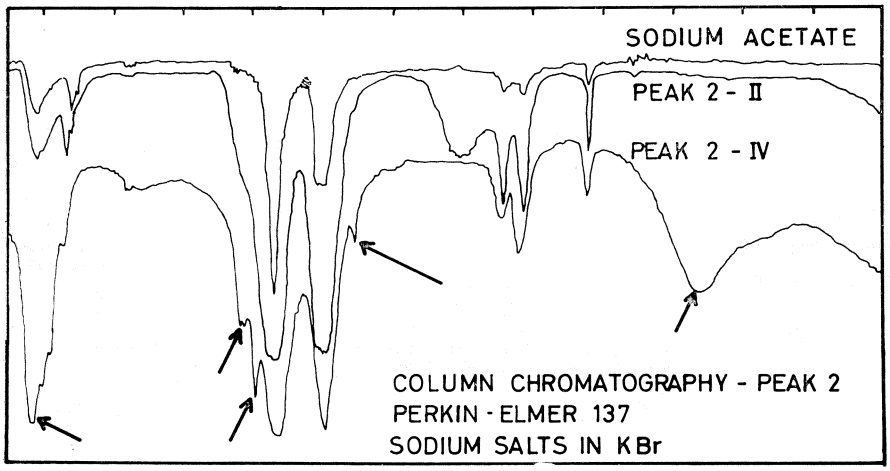


Fig. 2. — *Typical spectra of the sodium salts separated by column chromatography on acidified silica gel*

Identification of various acids

The prefered derivatives of the carboxylic acids for structure studies are generally the methyl esters. In this work the acids were liberated from the salts and esterified with boron trifluoride-methanol reagent (9). After extraction with methylene chloride the mixture of esters was concentrated and separated by gas-liquid chromatography (see fig. 3). Each fraction was recovered and re-chromatographed on a column of silicone rubber SE 30 which separated peaks 7 and 8 into two components each. The various fractions were analysed by infra-red and mass spectrometry (see figures 4 and 5 for typical spectra) which led to the identification of the following : succinic, fumaric, mesaconic, itaconic, citraconic and maleic acids as their methyl esters.

Methyl fumarate is eluted as peak 6 and peak 10 which must be accounted for by the presence of methyl malate which is dehydrated at the temperature of separation. Figure 6 summarises the acids identified in these mixtures and gives the number of the peak in which they are eluted during chromatography on the column of acidified silica-gel. The eight acids in capitals have not, to the best of our knowledge, been previously identified in coffee.

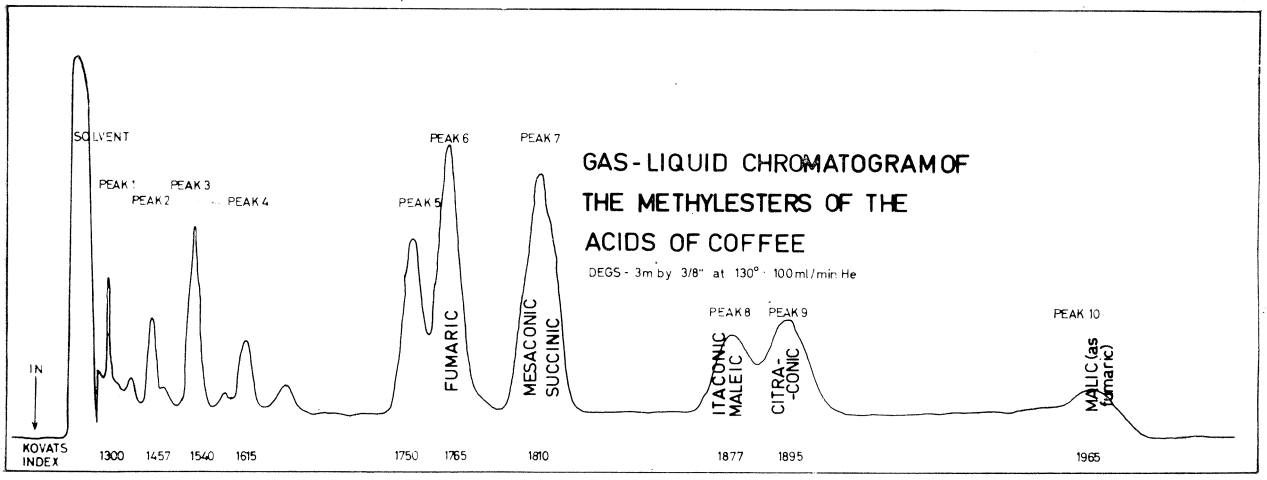


Fig. 3. — *Gas-liquid chromatogram of the methyl esters of the acids of coffee (DEGS 3m by 3/8'' at 130° : 100 ml/min He)*

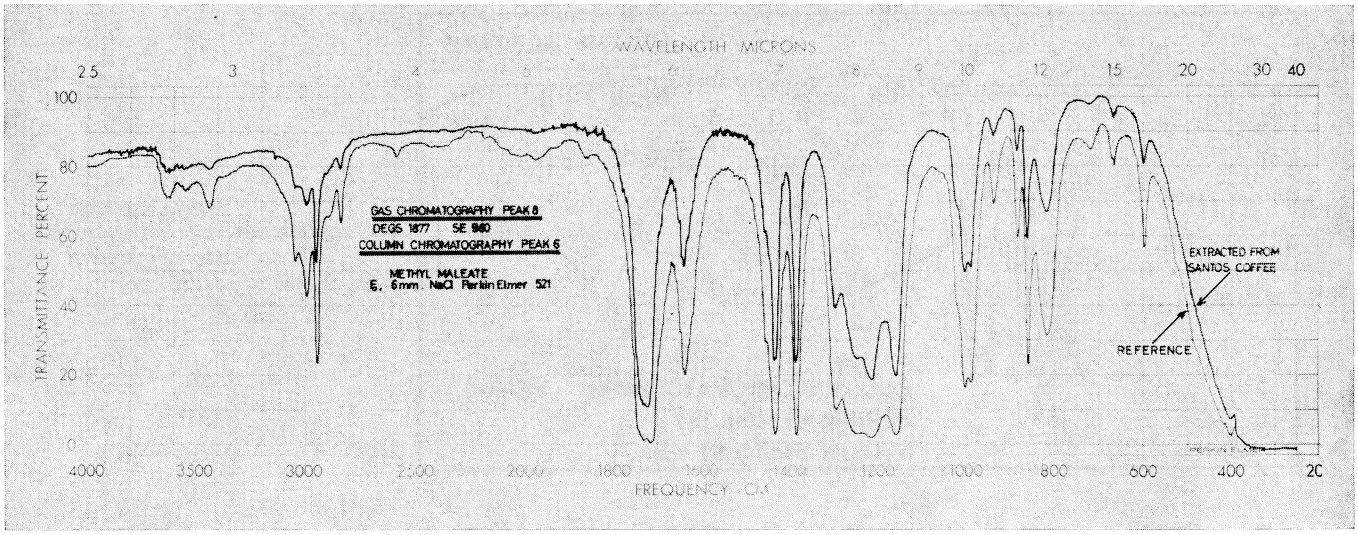


Fig. 4. — *Infra-red spectrum of methyl maleate separated from a mixture of methyl esters of the acids of coffee*

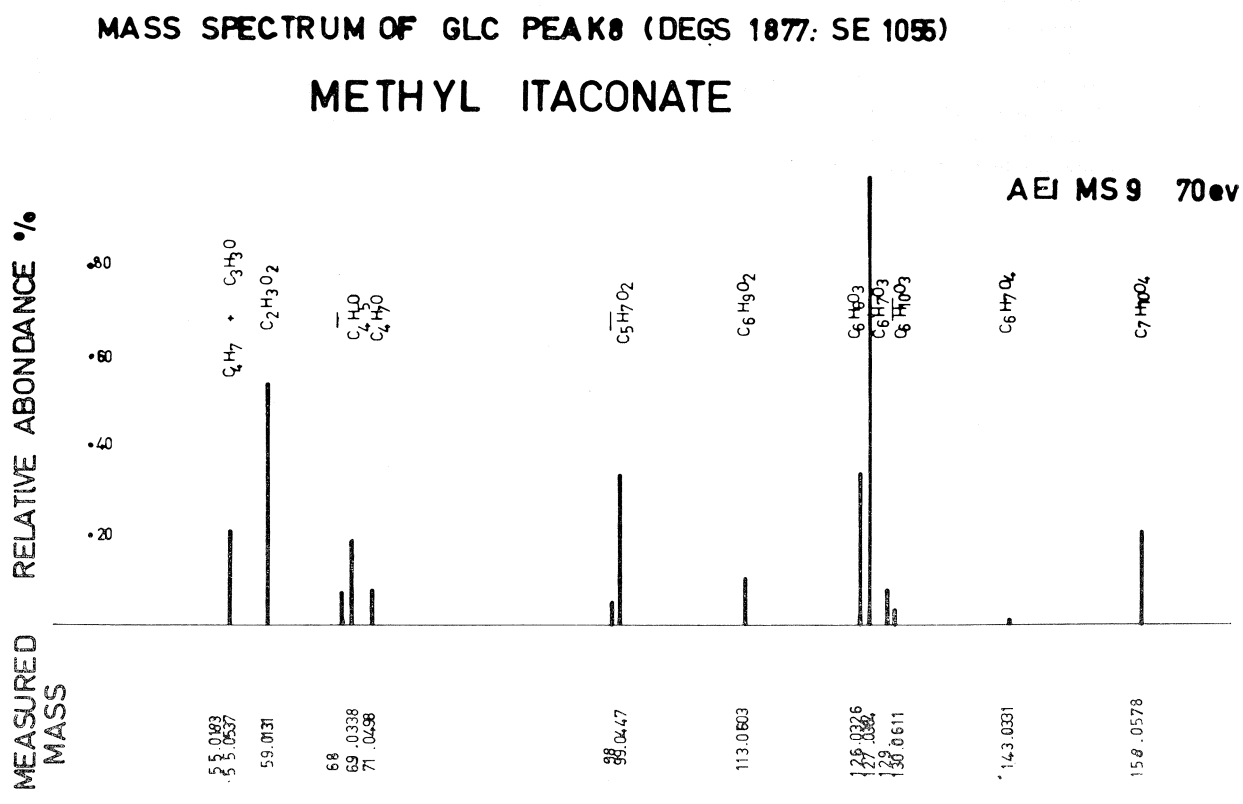


Fig. 5. — *Mass spectrum of methyl itaconate separated from a mixture of methyl esters of the acids of coffee*

COLUMN CHROMATOGRAPHY		GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY
Peak 1	2-FUROIC ACID	
Peak 2	Acetic Acid MESACONIC ACID	Peak 7
Peak 3	FUMARIC ACID	Peak 6
Peak 4	Formic Acid CITRACONIC ACID ITACONIC ACID	Peak 9 Peak 8
Peak 5	LACTIC ACID SUCCINIC ACID	Peak 7
Peak 6	MALEIC ACID Unknown	Peak 8
Peak 7	Unknown	
Peak 8	Malic Acid	(Peak 10)
Peak 9	Citric Acid	

Fig. 6. — *Summary of the acids identified in the various fractions, those in capitals being reported for the first time*

RESULTS AND DISCUSSION

Using these methods we have analysed a series of Melitta extracts of a homogenous sample of Santos coffee which had been roasted to different degrees. The upper curve of fig. 7 shows the total quantity of carboxylic acids in the various extracts calculated as a percentage of the total solids. It appears that there is a rapid solubilisation or formation of these acids at about 15 % roasting loss.

As the quantity of acids does not decrease at high roasts it is impossible to impute the rising pH observed in these extracts to a loss of carboxylic acids. It seems that the factor controling the pH of these infusions must be the degradation of the chlorogenic acids which account for 13,2 % of the soluble solids of the light roast sample but only 0,5 % of the soluble solids of the high roast coffee. These values were determined by the method of HAEUSERMANN and BRANDENBERGER (6).

The lower curve of fig. 7 shows the same results calculated as a percentage of the green coffee and it is therefore this curve which represents the formation and loss of these acids during roasting. The form of this curve confirms the observation of LENTNER and DEATHERAGE (5) that the quantities of these acids extracted pass through a maximum during roasting when calculated as a percentage of the original green coffee.

Analysis of the individual components of this mixture of acids provides further information on the changes taking place during roasting. It is seen (fig. 8) that 2-furoic acid (peak 1) passes through a maximum at about 16 % roasting loss. Peaks 2 and 4, however, show no consistent trend, but the infra-red spectra of the sodium salts show that there is a steady loss of acetic and formic acids during the roasting whilst mesaconic, itaconic and citraconic acids are present in increasing amounts. Fumaric acid (peak 3) also shows a consistent increase during roasting.

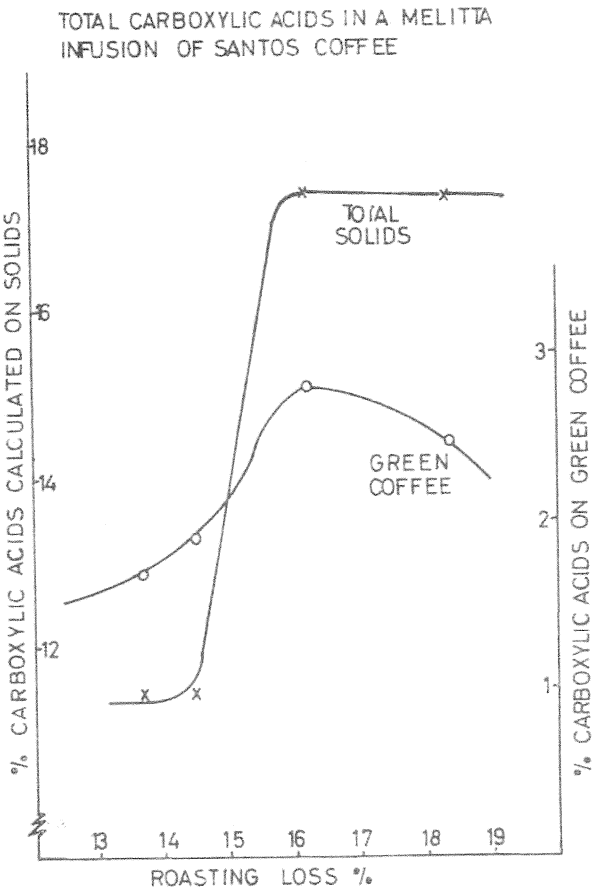
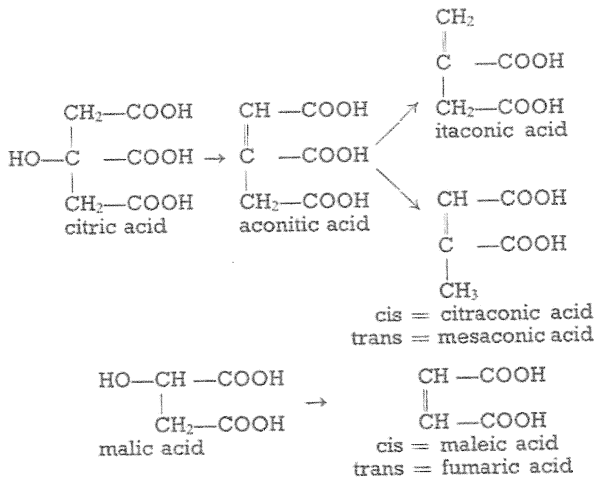


Fig. 7. — Total carboxylic acids in infusions of Santos coffees calculated as a percentage of the total solids and of the green coffee

Three types of acid are thus distinguishable, very volatile (acetic, formic) which decrease, non-volatile degradation products (e. g. mesaconic, etc.) which increase steadily and volatile degradation products which pass through a maximum during roasting. It is possible that had we worked with even lower roast coffees we would have observed the formation of acetic and formic acids that has been previously reported (4, 5).

It is possible that 2-furoic acid is formed from the polysaccharides during roasting as this type of product is typical of the pyrolysis of carbohydrates (8). Itaconic, citraconic and mesaconic acids presumably come from the degradation of citric acid, and fumaric from malic acid.



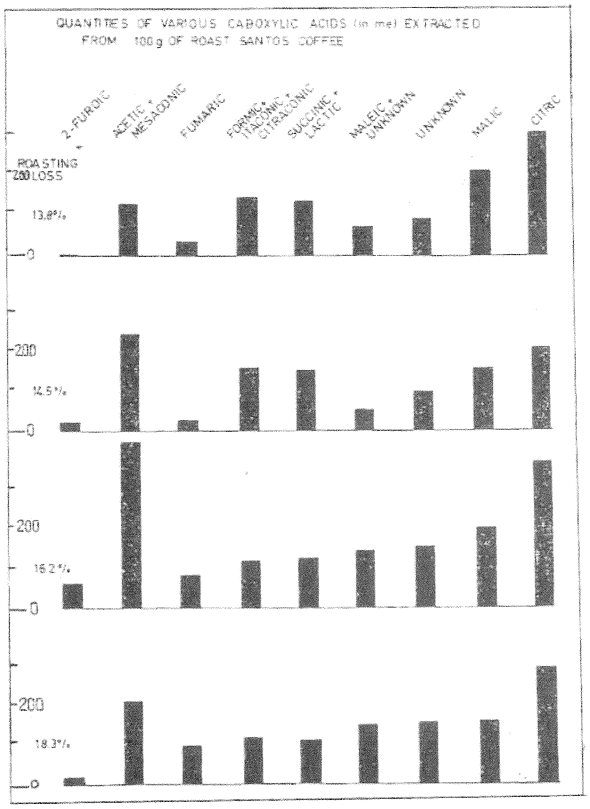


Fig. 8. — *Quantities of various carboxylic acids (in me) extracted from 100 g of roast coffee*

From this it would be expected that the quantities of malic and citric acids decrease during roasting but this is not observed. This may be either because these two acids are created by degradation of some other component of coffee during roasting or because these acids are more efficiently extracted from the higher roast Santos coffees by the Melitta process. These present results are insufficient to permit a choice between these two possibilities.

The work of identification was carried out by Mme F. MUEGGLER (gas chromatography), Dr. R. VIANI (infra-red spectrometry) and Mr. J. BRICOUT (mass spectrometry).

REFERENCES

1. KAUFMANN H. P. — *Food Tech.*, **5**, 154 (1951).
2. WURZIGER J. — *Kaffee u. Tee Markt*, **15** (6), 5 (1965).
3. WERNER von H. and KOHLEY M. — *ibid.*, **15** (1), 5 (1965) ; **15** (2), 6 (1965) ; **15** (5), 5 (1965).
4. MARBROUK A. F. and DEATHERAGE F. E. — *Food Tech.*, **10**, 194 (1956).
5. LENTER C. and DEATHERAGE F. E. *Food Res.* **24**, 483 (1959).
6. HAEUSERMANN M. and BRANDENBERGER H. — *Zeit. für Lebens. Unter. und Forsch.*, **115**, 516 (1961).
7. BULEN W. A., VARNER J. E. and BURRELL R. C. — *Anal. Chem.*, **24**, 187 (1952).
8. HEYNS G. — *Carbohydrate Research*, **2**, 132 (1966).
9. METCALF L. and SCHMITZ A. — *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961).

WOODMAN (J. S.), GIDDEY (A.), EGLI (R. H.). — **Les acides carboxyliques du café boisson.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris) 1968, p. 137-143 fig., réf.

Les auteurs donnent quelques indications sur une méthode gravimétrique de détermination des acides carboxyliques totaux présents dans une infusion de café. La quantité de ces acides augmente avec le degré de torréfaction.

L'élévation du pH des infusions de café très torréfié est attribuée à la destruction des acides phénoliques.

La chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie infra-rouge et de masse ont été utilisées pour identifier douze acides dont huit étaient signalés pour la première fois dans le café.

Une méthode améliorée pour la détermination quantitative de ces acides est décrite et les résultats interprétés de façon à montrer que les acides malique et citrique sont dégradés au cours de la torréfaction.

WOODMAN (J. S.), GIDDEY (A.), EGLI (R. H.). — **The carboxylic acids of brewed coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 137-143, fig., réf.

Brief details of a gravimetric method of determining the total carboxylic acids present in an infusion of coffee are given and this quantity is shown to increase with the degree of roasting. The rising pH of infusions of high roast coffees is attributed to the destruction of phenolic acids.

Gas chromatography, infra-red and mass spectrometry have been used to identify 12 acids, 8 of them being reported for the first time in coffee. An improved method for their quantitative assay is described and the results interpreted to show that malic and citric acids are degraded during roasting.

WOODMAN (J. S.), GIDDEY (A.), EGLI (R. H.). — **Die Karbonsäure des Kaffeegetränks.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 137-143, fig., réf.

Es wird über eine gewichtsanalytische Methode zur Bestimmung der Gesamtkarbonsäuren im Kaffeegetränk berichtet. Die Menge dieser Säuren nimmt mit dem Röstgrad zu.

Der hohe pH der Aufgüsse aus sehr geröstetem Kaffee wird der Zerstörung der Phenolsäuren zugeschrieben.

Gaschromatographisch und mit Hilfe der Infraroten- und Massenspektrometrie werden zwölf Säuren nachgewiesen, von denen acht zum ersten Mal im Kaffee festgestellt wurden.

Es wird eine verbesserte Methode zur quantitativen Bestimmung dieser Säuren beschrieben und die Ergebnisse ausgelegt, um zu zeigen dass die Apfelsäure und die Citronensäure im Verlauf der Röstung abgebaut werden.

DISCUSSION

M. WOOTTON : From work carried out in East Africa, we know that there is no correlation between pH and the liquorers' term « acidity ». There is also no correlation between titratable acids and « acidity ». From Dr Woodman's more detailed analyses, has it been possible to demonstrate any connection between this work and the organoleptic label of « acidity » ?

M. WOODMAN : I think it is clear that the total quantity of acids present play some rôle in determining the pH of an infusion of coffee, but the quantity of acids present in coffee and the quantity of acids present in an infusion are not all that well correlated. I think that the answer to your question must await further work.

M. NAVELLIER : L'aspect quantitatif des variations d'acides carboxyliques au cours de diverses torréfactions pourrait-il être exprimé par rapport à la matière sèche du café vert mis en œuvre ?

M. WOODMAN : We have not determined the humidity of our green coffee but as we were careful to use a homogenous sample of Santos coffee we can instead calculate these values on the green coffee using the reported roasting losses. If this is done the absolute values reported would change but the pattern of the results would remain the same.

THE CHEMICAL COMPOSITION AND THE QUALITY OF GUATEMALAN COFFEE

J. F. MENCHÚ
Asociación nacional del Café de Guatemala

E. IBARRA
Facultad de agronomia, Universidad de San Carlos de Guatemala

INTRODUCTION

The coffee-planted area in Guatemala (14.30° latitude North and 91° longitude West) is of approximately 235.000 ha and is distributed in zones with marked differences in climate and topography. Coffee is grown from 300 to almost 2,000 m over sea level. These zones have an annual yearly rainfall ranging from 1,500 to 4,000 mm. These great differences in the conditions in which coffee is grown are reflected in a definite manner in the quality of the product. This quality is determined both by the physical characteristics of the bean and by the qualities of the beverage. In this work, the first part of a study is presented that aims to correlate the chemical composition of the coffee with the different commercial types produced in the different coffee-growing regions of the country.

Main coffee-growing areas

In accordance with the topographical and climate characteristics most commonly found in the regions where coffee is grown in Guatemala, the following zones can be considered :

SOUTH-WESTERN ZONE

This is the most important zone, covering around 70 % of the area planted with coffee. It is a belt located between the Pacific Ocean and the chain of volcanoes that extends from the border with Mexico to the center of the country. The plantations are practically all located between 300 and 1,400 m, and the zone mainly includes areas located in the ecological zone called « sub-tropical very humid » by HOLDRIGE (4), with mean temperatures between 27.0° C and 19.7° C and yearly rainfall ranging between 3,000 and 4,000 mm.

Most of the crop is harvested at the height of the rainy season, in a region where the yearly average rainy days are 120.

EASTERN ZONE

It covers approximately 10 % of the coffee-planted area, and is characterized by irregular topography, with a warmer and drier climate than the foregoing zone. In general, the plantations are located at altitudes between 500 and 1,300 m. An important part is located in the ecological zone called « sub-tropical humid », with rainfalls ranging between 1,500 and 2,000 mm and mean temperatures between 25° C and 20° C. The harvesting is done mainly during the dry season, for which reason the quality of the coffee produced here is superior to that of the coffee harvested in the previously-mentioned zone. The rainy days range from 120 to 90 in the lower plantations.

NORTHERN OR VERAPACES ZONE

This is a mountainous, very irregular area, with the main plantations located between 800 and 1,300 m, with rainfalls ranging from 3,000 to 3,800 mm and mean temperatures between 25° and 20° C. It comprises almost exclusively « sub-tropical very humid » zones, with mean temperatures that are in general below those of the previously-mentioned zones. The harvest begins during the rainy season and ends at the beginning of a short dry period, and rainfall is more evenly distributed than in the foregoing zones, since at 1,300 m of altitude there is a yearly average of 210 rainy days.

CENTRAL AND OTHER ZONES

The rest of the coffee-growing area is mainly distributed in the central plateau and in different remote regions of the country. The central zone has its plantations above 1,400 m, with yearly mean temperatures of about 19° C and a mean yearly rainfall of 1,500 mm with an average of 100 rainy days per year. It is located in the ecological zone called « low montano tropical humid » by HOLDRIGE. Harvesting is done in the dry season and this is the zone that produces the best qualities of coffee in the country.

Commercial types or qualities

Throughout the years, the trade has established eight general types, i. e. types of beans defined by their characteristics, regardless of the zone where they are produced. Special types have also risen, such as the so-called « Antiguas », « Atitlans », etc., which produce a beverage with unique characteristics. The determining factor is essentially the altitude over sea level of the plantation, and the general types are : « good washed », grown at altitudes up to 600 m ; « extra good washed », grown at altitudes up to 750 m ; « prime », up to 900 m ; « extra Prime », up to 1,050 m ; « semi hard bean », up to 1,200 m ; « hard bean », up to 1,350 m ; « fancy hard bean », up to 1,425 m ; and « strictly hard bean », produced above 1,425 m. Among the characteristics used to define these types are : the size and shape of the green bean, which is known as the « character » of the roasted bean, and the specific qualities of the beverage : aroma, body and acidity, the sum of which, i. e. the flavor of the cup, are determinant factors in differentiating the types.

Insofar as regards the main zone I, which is topographically and climatically the best-defined one, the physical characteristics such as the size and apparent density, vary definitely with the altitude and therefore with the commercial type. As the altitude increases, these characteristics are more marked, and the maximum is reached between 1,000 and 1,300 m over sea level.

The chemical composition of coffee

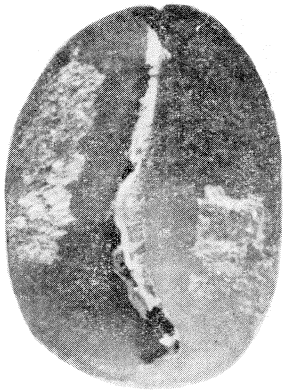
It is doubtless that the chemical composition of coffee is influenced by the species, the varieties, the climate conditions, the processing system, etc. Although a lot is known about the general composition of coffee very little is known about how the proportion of its components varies with regard to some of the factors such as climate and the system of preparation, since there is some information about the species and varieties. Different authors have found the basic differences between certain components and the species. WILBAUX (9) has made a good revision in that respect, finding for example that the species *C. eugenoides*, *C. excelsa*, *C. congensis* and *C. arnoldiana*, are especially rich in fats ; *C. arabica* is considered as a species with a medium fat content and as species poor in fats he found *C. canephora* (Robusta variety), *abeokutae* and *liberica*. It has been found that the varieties of the species *C. canephora* contain a greater proportion of caffeine than the varieties of *C. arabica* and that these, in turn, contain more than *C. eugenoides*. In what regards the varieties themselves, TANGO and CARVALHO (8) found, working with sixteen varieties of *C. arabica*, that the extract obtained with petroleum ether varies with the harvest, the form of preparation and the variety ; the maximum was obtained with the variety « mucronata », with 16 %, and the minimum with the variety « murta », with 12.2 %. The maximum of caffeine was found by them in the « amarelo de Bocatú », with 1.34 %, and the minimum in the variety « laurina », with 0.62 %. It is necessary to know the composition of the different types and qualities of coffee in the producing countries, in order to be able to establish correlations useful for the standardization of the different types of green export coffee, or of the roasted coffee ready for internal consumption. KADEN (5) noted that there is a significant difference in the chemical composition of lower quality beans that give light roasts and are separated by photoelectrical classification.

It is wise to remember that normal beans that are of different quality due to the production zone, when roasted in similar conditions, give different degrees of roasting ; the higher qualities give darker roasts. In the existing literature there are very dissimilar data regarding the chemical composition of Guatemalan coffee. This is mainly due to the lack of adequate techniques for the preparation of the green coffee samples for their chemical analysis and to the lack of standardization in the analytical techniques themselves.

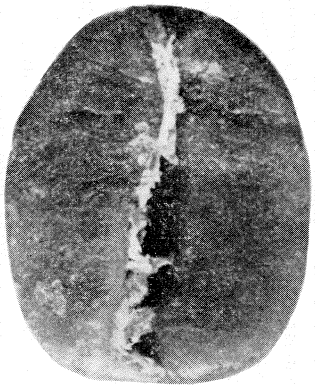
It cannot be doubted that factors such as processing or preparation, the altitude of the plantation, etc., produce changes in the composition of the bean. However, as these changes are less marked, they pass unnoticed, due to the lack of uniformity in the analytical methods or to the manner in which the results are expressed by the different authors.

With the purpose of obtaining basic information for the

GUATEMALAN COFFEE TYPES



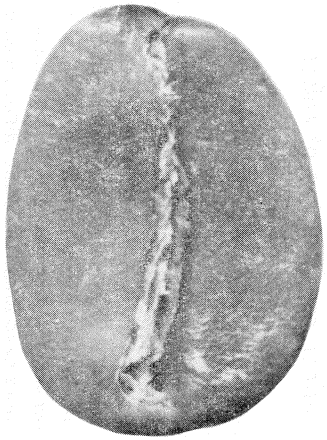
Good Washed



Extra Good Washed



Prime Washed

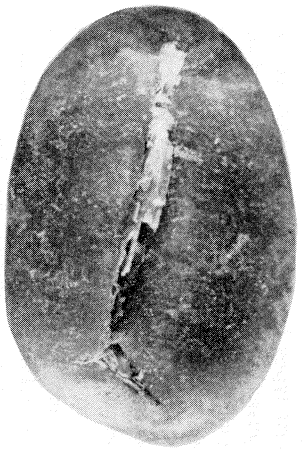


Extra Prime Washed

Notice the centre-cut width. Size bean increases in this direction →



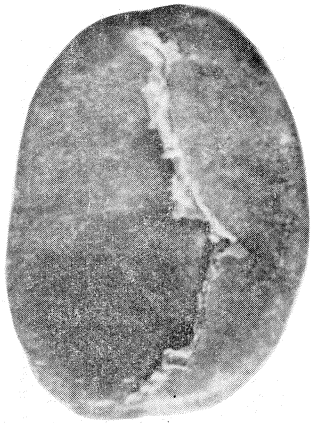
Semi Hard Bean *



Hard Bean *



Fancy Hard Bean *



Strictly Hard Bean *

Notice the centre-cut greatly reduced width and it's broken shape

* Washed

TABLE 1

Chemical composition of five types of roasted coffee of Guatemala

Type	Ether extract	Crude fiber	Total nitrogen	Ash	Solid solubles	Solid solubles	
	(percentage on dry basis)					Color % Transmission 770 mμ	pH
			Light roast (American)				
1. Strictly hard bean	17.02	10.04	2.13	4.59	29.00	84.0	5.52
2. Hard bean	15.45	16.87	2.04	4.68	25.23	89.5	5.20
3. Prime	15.03	17.03	2.05	4.75	24.48	89.0	5.15
4. Good washed	14.88	15.81	2.09	4.99	30.39	88.0	5.10
5. Natural* (unwashed)	14.25	15.65	2.14	5.99	28.78	87.0	5.30
			Medium roast				
1. Strictly hard bean	17.35	10.56	2.18	4.71	27.67	82.0	5.40
2. Hard bean	15.96	13.20	2.07	4.78	28.87	86.0	5.20
3. Prime	15.76	13.12	2.11	5.06	26.48	87.0	5.30
4. Good washed	15.51	13.81	2.19	5.11	26.95	85.0	5.35
5. Natural* (unwashed)	15.78	14.90	2.17	5.27	30.83	73.0	5.40
			High roast (Italian)				
1. Strictly hard bean	16.82	10.62	2.21	5.01	27.81	79.0	5.70
2. Hard bean	16.87	8.98	2.21	5.22	29.70	78.0	5.80
3. Prime	15.80	9.65	2.21	5.64	29.59	77.0	5.90
4. Good washed	15.48	10.40	2.27	5.60	27.03	80.0	6.00
5. Natural* (unwashed)	16.03	6.93	2.23	5.99	28.56	58.0	5.80

* This type is not for export.
Method of analysis : A. O. A. C. 8th. Edition, 1955.

future standardization of roasted and ground coffee for internal consumption, the « Asociación Nacional del Café » of Guatemala had roasted coffee of the main commercial types of the country analyzed. The result was that a significant difference was found in the fat and crude fiber contents between the best and the lowest qualities, as can be seen in table 1. The best qualities show a higher fat content and a lower crude-fiber content, which seems to indicate that there are definite differences among the main types. This tendency can be clearly observed when revising the data published for the arabicas by GORDIAN (3), at least in what refers to the fat content. The highest contents were found in coffees from high-altitude plantations, the sample from Kivu, Belgian Congo, having obtained the highest proportion, 17 %, followed by the « strictly hard beans » from Costa Rica and Guatemala. The lowest contents were found in countries where the plantations are located at low or medium altitudes, for example Haiti, its sample having reached 13 %. On the other hand, BRESSANI and NAVARRETE (2) found radical differences insofar as regards the content of nicotinic acid, when studying samples of Guatemalan coffee. For a « fair washed » grown at 500 m, they found in green coffee 1.07 mg/100 g, in « extra prime » 1.23 mg/100 g, and in « strictly hard » bean 1.33 mg/100 g. When these samples were roasted, the contents rose accordingly, as follows : 13.30 mg/100 g ; 5.65 mg/100 g ; and 32.66 mg/100 g.

For the above reasons, it was decided to investigate the fat, total nitrogen and caffeine contents of green coffee samples from two of the coffee-growing zones of the country.

MATERIALS

Each year, the « Asociaciôn Nacional del Café » receives for classification around 900 samples sent by plantations that process their own harvests. This work was started by revising the samples sent from three of the twenty-one departments that produce coffee and samples from Alta Verapaz, Northern zone, from Chimaltenango and Escuintla, both in the South-Western zone, were selected for their good aspect and cup. All of the samples were from plantations of *C. arabica*, of the commercial varieties Typica and Bourbon. The samples were previously graded for their beverage, a commercial type being assigned to each.

ANALYTICAL CHEMICAL METHODS

The samples were prepared by grinding the material in a Wiley micro-grinder of the n° 20 sieve gauge of the U. S. S. series and then passed through a roller grinder with rollers 0,1 mm apart.

The determinations of fat content (extract with petroleum ether) and total nitrogen were made using the official methods of the A. O. A. C. (1). The caffeine content was determined by the Bailey-Andrews method modified from the same methods.

STATISTICAL ANALYSIS

From the point of view of statistical analysis the ether extract, total nitrogen and caffeine determinations constitute correlated aleatory variables (X_1, X_2, X_3, respectively) which were analyzed simultaneously to test the hypothesis that average of the three substances together does not differ for the various qualities.

Before any statistical analysis, the data were transformed from percentages to angle degrees, and then, to test the hypothesis as indicated, recourse was made to WILKS criteria of multiple variable analyses in which the statistic :

$$V = -m \log_e \Lambda$$

was used, the frequency function of which can be obtained in asymptotic form through the use of the distribution of Chi-square ; and where :

$$m = n \frac{p + q + 1}{2}$$

m being the total number of samples of all qualities, p the number of qualities minus 1. Likewise :

$$\Lambda = \frac{Te}{T}$$

in which Te is the determinant of the matrix of dispersion of the error and T the determinant of total dispersion ; both matrices being obtained from a common analysis of co-variance.

Each of the three variables was also analyzed with the purpose of proving hypotheses regarding the differences between qualities when considering each substance independently, through the analysis of common variance.

RESULTS

(see tables 2, 3 and 4 pages 150-151)

Verapaces

Simultaneous analysis of the three variates
Transformed data

(Dispersion matrices)

Total T			Error Te		
17.278 4	0.842 6	— 0.300 3	12.035 4	0.336 4	— 0.125 8
0.842 6	1.008 0	0.334 9	0.336 4	0.865 4	0.291 3
— 0.300 3	0.334 9	0.386 8	— 0.125 8	0.291 3	0.337 9

Test statistic : $V = -m \log_e \Lambda$, $\Lambda = \frac{Te}{T} = 0.597\,9$

$$V = -2\,1 \log_e 0.5979 = 11.91$$

Analysis of variance of ether extract (x_1), total nitrogen (x_2) and caffeine (x_3)
Data transformed in angular degrees

Source of Variation	D. F.	x_1			x_2			x_3		
		S. S.	M. S.	F	S. S.	M. S.	F	S. S.	M. S.	F
Total	23	17.278 4		—	1.008 0		—	0.386 8	—	—
Between types	2	5.243 2	2.621 6	4.57*	0.142 6	0.071 3	1.73 ns	0.048 9	0.024 4	1.52 ns
Within types	21	12.035 2	0.573 1	—	0.865 4	0.041 2	—	0.337 9	0.016 1	—

* : significante, probability 0.05. ns : not significative.

For ether extract, minimun significant differences between qualities :
comparison of « extra prime » with « semi-hard » : ± 0.761
comparison of « extra prime » with « hard » : ± 0.892

When comparing the ether extract, total nitrogen and caffeine determinations simultaneously, the result was that the test statistic was near but did not exceed the level of significance of 5 % probability.

From the variance analysis to which each of the determinations was separately submitted, it is gathered that only the ether extract presents significant differences between qualities. The hard type contains a lesser amount of ether extract than the « extra prime » and « semi hard » types, but the difference in the content of this matter between the two last types is not significant.

As to the total nitrogen determinations, although the differences are not significant, it is apparent that said content increases slightly with the following order of types : « extra prime », « semi hard », and « hard ».

The differences between caffeine contents are not significative either, but it is noted that the types « extra prime » and « semi hard » tend to have the same caffeine content, while that of the « hard » type is slightly higher.

Chimaltenango

Simultaneous analysis of the three variates
Transformed data

(Dispersion matrices)

Total T			Error Te		
9.700 0	— 0.173 8	— 0.759 5	7.400 0	— 0.170 3	— 0.376 2
— 0.173 8	0.360 0	0.332 4	— 0.170 3	0.300 0	0.246 7
— 0.759 5	0.332 4	0.580 0	— 0.376 2	0.246 7	0.380 0

$$\Lambda = \frac{Te}{T} = 0.448\,4$$

$$V = - \text{ mln } \Lambda = 10.43$$

Analysis of variance of ether extract (x_1), total nitrogen (x_2) and caffeine (x_3).
Data transformed in angular degrees

Source of Variation	D. F.	x_1			x_2			x_3		
		S. S.	M. S.	F	S. S.	M. S.	F	S. S.	M. S.	F
Total	15	9.70	—		0.36			0.58		
Between types	2	2.30	1.15	2.02 ns	0.06	0.03	1.50 ns	0.20	0.03	3.33 ns
Within types	13	7.40	0.57		0.30	0.02		0.38	0.10	

ns : not significante, probability 0.05.

The first approximation to the probability of V = 19.43 is around 10 %. Therefore, there is no significative difference (5 %) between the averages of ether extract, total nitrogen and caffeine, between the three qualities.

A greater content of ether extract is observed in the « semi-hard » type, in comparison with the types « extra prime » and « hard ».

This same relation is also observed in the total nitrogen content, whereas the caffeine content increases linearly in the following order of types: extra prime, semi-hard and hard.

The specific comparisons made in this group of Chimaltenango samples were not significante.

Escuintla

Simultaneous analysis of the three variates
Transformed data

(Dispersion matrices)

Total T		Error Te	
—		—	
14.151 5	0.003 7	4.131 5	0.214 2
0.003 7	0.557 5	0.214 2	0.391 0

TABLE 2

Green coffee : Verapaces
Ether extract content (x_1), total nitrogen (x_2) and caffeine (x_3)

Extra prime				Semi hard				Hard bean			
Sample no.	x_1	x_2	x_3	Sample no.	x_1	x_2	x_3	Sample no.	x_1	x_2	x_3
1	14.74	2.212	0.53	1	14.33	2.217	0.64	1	15.18	2.168	0.64
2	13.75	1.950	0.56	2	13.75	2.109	0.60	2	12.86	2.230	0.68
3	13.13	1.887	0.56	3	14.05	2.040	0.57	3	14.70	2.18	0.60
4	13.02	2.264	0.67	4	13.70	2.156	0.62	4	13.62	2.315	0.65
5	12.64	2.096	0.58	5	15.67	2.212	0.64	5	13.57	2.202	0.61
6	12.47	1.951	0.65	6	15.73	2.176	0.58	6	12.86	2.033	0.59
7	12.93	2.185	0.59	7	15.51	2.135	0.59				
				8	15.66	2.196	0.57				
				9	13.38	2.084	0.56				
				10	14.69	2.188	0.61				
$\bar{X}$ %	13.42	2.09	0.59		14.65	2.16	0.61		13.30	2.19	0.64
$\bar{X}$ grades*	21.48	8.31	4.40		22.49	8.45	4.48		21.80	8.51	4.55

* $\bar{X} = \text{Sen}^{-1}\sqrt{\quad}$ %.

TABLE 3

Green coffee : Chimaltenango
Ether extract content (x_1), total nitrogen (x_2) and caffeine (x_3)

Extra prime				Semi hard				Hard bean			
Sample no.	x_1	x_2	x_3	Sample no.	x_1	x_2	x_3	Sample no.	x_1	x_2	x_3
1	13.48	2.13	0.65	1	13.64	2.25	0.75	1	10.36	2.19	0.76
2	12.83	2.00	0.58	2	13.02	2.12	0.63	2	11.97	2.36	0.79
3	13.78	2.14	0.61	3	13.83	2.26	0.65	3	12.92	2.15	0.65
4	13.26	2.16	0.70	4	13.42	2.23	0.69	4	13.59	2.22	0.70
5	12.92	2.19	0.67		——	——	——	5	12.72	2.12	0.68
6	11.58	2.19	0.62		——	——	——		——	——	——
7	12.58	2.21	0.65		——	——	——		——	——	——
$\bar{X}$ %	12.90	2.15	0.64		13.50	2.24	0.68		12.30	2.20	0.72
X grades*	21.06	8.42	4.59		21.54	8.56	4.72		20.52	8.54	4.85

* $\bar{X} = \text{Sen}^{-1}\sqrt{\quad}$ %.

Statistic of the test $V = -m \log_e \Lambda$, $\Lambda = \frac{Te}{T} = 0.197\ 2$

$$V = -m \log_e \Lambda = 26.79$$

The significant value (approximate) at the 5 % level of probability (8 degrees of freedom) for statistic V is 15.51.

Analysis of variance of ether extract (x_1) and total nitrogen (x_2). Data transformed in angular degrees

Source of Variation	D. F.	x_1			x_2		
		S. S.	M. S.	F	S. S.	M. S.	F
Total	20	14.15	2.505		0.56		
Between types	4	10.02	2.505	9.71**	0.17	0.042	2.12 ns
Within types.	16	4.13	0.258		0.39	0.020	

** : significant at the 1 % probability level.
ns : not significant.

Minimum significant differences (at 5 %) for intermediate compositions of ether extract :

« Extra good washed » compared with « prime »: ± 0.84
« Extra good washed » compared with « extra prime » : ± 0.91
« Extra good washed » compared with « semi hard » : ± 0.91
« Extra good washed » compared with « hard » : ± 0.98

The analysis of the ether extract and total nitrogen content in simultaneous form indicates that for these two determinations there are significant differences among the five Escuintla coffee types. The ether extract increases progressively in the following order of qualities : « extra good washed », « prime », « extra prime », « semi hard » and « hard » ; whereas the total nitrogen content is relatively higher in the types « good washed », « semi hard » and « hard » and lower in « prime » and « extra prime ».

The analysis of variance for each of the determinations indicates significant differences in the ether extract content among qualities and not in the total nitrogen content.

With the indicated results it can be established that the ether extract and total nitrogen are characteristics that together can establish differences between the five types of coffee and that of these characteristics, ether extract is the determination that contributes more to this separation.

TABLE 4

Green coffee : Escuintla
Ether extract content (x_1) and total nitrogen (x_2)

Extra good washed			Prime			Extra prime			Semi hard			Hard		
Sample no.	x_1	x_2	Sample no.	x_1	x_2	Sample no.	x_1	x_2	Sample no.	x_1	x_2	Sample no.	x_1	x_2
1	11.10	2.32	1	12.90	2.27	1	12.84	2.14	1	12.94	2.27	1	13.78	2.20
2	10.95	2.18	2	11.86	2.06	2	12.00	2.24	2	12.57	2.22	2	13.46	2.21
3	9.96	2.35	3	11.48	2.35	3	11.78	2.11	3	11.10	2.22	3	13.47	2.26
			4	11.38	2.33	4	11.72	2.33	4	11.79	2.40			
			5	12.63	2.17									
			6	11.92	2.16									
$\bar{X}$ %	10.67	2.38		12.03	2.22		12.08	2.20		12.10	2.28		13.57	2.22
$\bar{X}$ grades*	19.06	8.66		20.29	8.46		20.33	8.48		20.35	8.67		21.64	8.59

* $\bar{X} = \text{Sen}^{-1}\sqrt{\ \ }\ \%$.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The tendency shown in table 1, in which the higher altitude coffees proved to have a higher content of fats, differs from the results obtained for the Verapaces and Chimaltenango (Southern part of that Department), where the « hard bean » type appears with a lower proportion. This can be explained by the fact that the samples included in that table are those considered by the tasters as representative types and come from different part of the country. For example : « strictly hard bean » and « hard bean » come from the Central and Eastern parts of the country, where harvesting is done at the height of the dry season, and where, in present commercial practice, the samples are obtained that best fit those types. In the Verapaces and Chimaltenango, « hard bean » coffees are harvested while the rainy season is still in.

On the other hand, the results obtained reflect themselves on the size and density of the bean, which in the Verapaces and in Chimaltenango is larger in the called « semi hard bean », that is, where the highest proportion of fats was found. It is also to be noted that the Departments of Chimaltenango and Escuintla belong to the Southwestern part of the country, but are not really the best representatives of that zone, since they are very close to the Eastern zone. Escuintla is practically the division between the two zones, and perhaps for this reason the tendencies found are different, that is that the fat content increases as the type improves, or the altitude over sea level increases.

It is interesting to note the low caffeine content, if it is compared with the figures reported in the literature. As additional information in what regards caffeine in Guatemalan coffees, one can mention the fact that the instant coffee produced by INCASA in Guatemala has a caffeine content that varies around 2.85 % and sometimes goes slightly over 3.00 %, which does not fulfill the requirements of certain regulations such as those of the NETHERLANDS (6), which demand that instant coffee have at least 3.50 %.

Although this is a preliminary work, because there is a greater number of coffee-producing departments, it can be observed even now that the fat, total nitrogen and caffeine contents tend to increase starting from the lower types to the type called « semi hard bean ». This occurs in the Southern part of the department of Chimaltenango and in the Verapaces, where the plantations are in a « sub-tropical very humid » zone according to HOLDRIDGE (4) ; on the other hand it can be observed that in higher and drier « low montano tropical humid » zones, according to the same author, where the best qualities of coffee of the country are produced (« strictly hard bean » and others of the so-called « fancy » types), the highest proportions of fats and caffeine are apparently obtained, as well as a lesser proportion of crude fiber. In general, it can be considered that the fat content (ether extract) is definitely the best indication of quality found until now.

BIBLIOGRAPHY

1. A. O. A. C. — Methods of analysis, 9th edition, 1960.
2. BRESSANI, R. and NAVARRETE, D. A. — Niacin content of coffee of Central America. *Food Research*, 24, 344, 1959.
3. Gordian Publishing House. — Green and Roasted Coffee Tests, 1963.
4. HOLDRIDGE, L. R. — Los bosques de Guatemala, Instituto de Fomento de la Producción, Guatemala, 1950.
5. KADEN, O. F. — Analyses chimiques comparatives des qualités de café torréfié obtenues par triage photo-électrique, *Café, Cacao, Thé*, **8**, 211-14, 1964.
6. Nederlandse Staatswetten, WEEVER, P. L. de, Warenwet, Veertiende druk (Bijgewerkt tot 1 nov. 1958), Deel I, p. 295.
7. RAO, C. RADHAKRISHNA. — Advanced statistical methods in biometric research. John Wiley, 1952, p. 258.
8. TANGO, J. S. and CARVALHO, A. — *Bragantia*, **22** (2), 793-8, 1963.
9. WILBAUX, R. — Les caféiers au Congo Belge. Technologie du café. Direction de l'Agriculture, des Forêts et de l'Elevage, Bruxelles, 1956.

MENCHU (J. F.), IBARRA (E.). — **Composition chimique et qualité du café du Guatemala.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 144-154, fig., tabl., réf.

La production de grains de qualités physiques et organoleptiques différentes est due aux climats et aux altitudes variés des diverses régions caféicoles du Guatemala ; ces différences de qualité ont une importante répercussion sur les prix.

Par suite, huit types principaux de qualité ont été définis, outre les types spéciaux ou fantaisistes.

Dans cette étude, la teneur en matière grasse, l'azote total et la caféine ont été déterminés ainsi que, pour certains échantillons, les teneurs en trigonelline et en matière sèche.

L'analyse statistique des résultats comprend une analyse multivariée des trois teneurs moyennes en matière grasse, azote et caféine. Une autre analyse a été effectuée en éliminant la caféine et finalement une analyse de variation a été faite pour chacune des variables. La teneur en matière grasse est le facteur qui influence le plus le classement dans un type donné.

En général, en partant des types inférieurs, on constate une augmentation des teneurs en matière grasse, azote total et caféine qui atteignent un maximum pour le type « semi hard », puis décroissent.

C'est ce qui se passe pour les cafés Verapaces, produits dans le sud des départements de Chilmaltenango et Escuintla qui, d'après Holdridge, est une zone subtropicale très humide.

D'après le même auteur, dans les zones montagneuses subtropicales humides où le café « strictly hard » est produit, on a trouvé les plus grandes quantités de matières grasses, d'azote, d'alcaloïdes, de caféine et de trigonelline et les plus petites teneurs en matière sèche.

MENCHU (J. F.), IBARRA (E.). — **The chemical composition and the quality of Guatemalan coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 144-154, fig., tabl., réf.

The result in the production of beans of different physical and organoleptic qualities, is due to the differences in climate and altitude of the various coffee zones of the country, which in the long run determines great differences in market prices.

As a consequence, eight general quality types have been established, in addition to the types considered as special or fancy.

In this study, fat content, total nitrogen, and caffeine determinations were made and in some samples crude fiber and trigoneline contents were also determined.

The statistical analysis of results includes a multivaried analysis of the averages of fat contents, nitrogen and caffeine ; another analysis was made eliminating the caffeine, and finally a variation analysis was made for each one of the variables ; the fat content is the factor which contributes mostly in the type classification.

In general, starting with the inferior types, a tendency was found of increasing the fat contents, total nitrogen, and caffeine obtaining a maximum in the « semi-hard » type and then start decreasing again. This is what happens in the Verapaces coffees, in the Southern part of the Chimaltenango and Escuintla departments, which is according to Holdridge a very humid subtropical zone. In the high altitud zones according to the same author, on mountainous subtropical humid zones where the « strictly-hard bean » is produced, it was found the greatest amount of : fat, nitrogen, alkaloids, caffeine and trigoneline, as well as the smallest amount of crude fiber.

MENCHU (J. F.), IBARRA (E.). — **Chemische Zusammensetzung und Qualität des Kaffees aus Guatemala.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 144-154, fig., tabl., réf.

Die Produktion von Kaffeebohnen mit verschiedenen physikalischen und organoleptischen Eigenschaften ist dem unterschiedlichen Klima und den verschiedenen Höhenlagen der einzelnen kaffeeproduzierenden Gegenden Guatemalas zuzuschreiben ; diese Qualitätsunterschiede wirken sich auf die Preise aus.

Acht hauptsächliche Qualitätssorten ausser den speziellen und den angeblichen Sorten konnten daher gekennzeichnet werden.

In dieser Arbeit wurde der Gehalt an Fettstoffen, der Gesamtstickstoff und der Coffein sowie bei gewissen Musterproben der Gehalt an Trigonellin und Trockensubstanz bestimmt.

Die statistische Analyse der Ergebnisse umfasst eine vielfältige Analyse des Durchschnittgehalts an Fettstoffen, Stickstoff und Coffein. Eine weitere Analyse wurde unter Ausschaltung des Coffeins vorgenommen und schliesslich eine Variationsanalyse für jede Variable durchgeführt. Der Gehalt an Fettstoffen beeinflusst am meisten die Klassifizierung bei einer gegebenen Sorte.

Allgemein wird von den untersten Sorten ausgehend eine Erhöhung des Gehalts an Fettstoffen, Gesamtstickstoff und Coffein festgestellt, der bei der Sorte « halb hart » seinen Höhepunkt erreicht und sodann abnimmt.

Dies ist z. B. bei den Kaffees Verapaces der Fall, die im südlichen Teil des Bezirks von Chilmaltenango und Escuintla, einer nach Holdridge äusserst feuchten subtropischen Gegend, kultiviert werden.

Dem selben Autor zufolge wurden in den feuchten subtropischen Gebirgsgegenden, wo der « sehr harte » Kaffee erzeugt wird, die grössten Mengen an Fettstoffen, Stickstoff, Alkaloiden, Coffein und Trigonellin und der niedrigste Gehalt an Trockensubstanz angetroffen.

DISCUSSION

M. CALZOLARI : L'oratore ha parlato più volte dell 'importanza delle sostanze grasse nell'ambito della definizione dei caratteri del caffè. Nelle tabelle ha riportato il contenuto in estratto etereo. Ma s'intende con etere di petrolio o etere etilico ?

M. MENCHU : the ether extract to which I refer is petroleum ether extract, not ethylic ether extract.

M. CALZOLARI : Lo schiarimento che chievedo era se si tratasse di estratto etereo di etere di petrolio o di sostanza grasse. Chiedevo :

— 1° il tipo di solvente impiegato ;

— 2° se il dato riportato in tabella come estratto etereo viene poi utilizzato per la definizione del contenuto di sostanze grasse oppure se questo contenuto è riferito ad altro dato.

M. MENCHU : I am not quite sure to have understood your question. When we are speaking of fat, we mean the petroleum ether extract.

M. CALZOLARI : Per quanto riguarda il contenuto di sostanze grasse, volevo chiedere se si è proceduto anche a una definizione del tipo di sostanze grasse presenti nel grasso totale.

M. MENCHU : I know that there are differences between the composition of the different types of extracts, but the aim of our work was to find some determinations that correlate chemical composition with quality. We did not work with the composition of the extract that we obtained.

ÜBER GASCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN AUFGÜSSEN AUS RÖSTKAFFEES UND KAFFEE-EXTRAKTPULVERN

J. WURZIGER, R. D. WEEREN

Chemische und Lebensmitteluntersuchungsantalt im Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt, Hamburg

Bei der Beurteilung des Genusswertes von Röstkaffee wird den Aromastoffen eine besondere Bedeutung zugemessen. Da die Aromastoffe zum Teil leicht flüchtig sind, und ausserdem sich auf den Genusswert der Kaffeegetränke nachteilig auswirkende Oxydationen, hydrolytische Spaltungen, Polymerisationen und Kondensationen erleiden können, spielt die « Frische » des Röstkaffees sowohl aus der Sicht des Kaffeerösters als auch des Verbrauchers stets eine besondere Rolle. Erhöhte Ansprüche der Verbraucher an die Kaffeequalität haben die Kaffee-Industrie zur Entwicklung neuer Röstverfahren und Verpackungsformen angeregt. Insbesondere führte eine erhöhte Nachfrage dazu, dass Röstkaffee mehr als früher auf Vorrat geröstet und abgepackt werden musste. Hierbei ergibt sich bekanntlich die grosse Schwierigkeit, das Aroma des Kaffees in seiner ursprünglichen Menge und Zusammensetzung über längere Zeit zu erhalten und zu verhindern, dass sich ein störender Altgeschmack bemerkbar macht. Ähnliche Aufgaben stellen sich dem Hersteller von Kaffee-Extraktpulver. Hier ist es trotz vieler Bemühungen bisher noch nicht gelungen, Trockenextrakte zu gewinnen, die das ganze natürliche Aroma des Röstkaffees enthalten. Da es sich bei diesen Produkten jedoch um arteigene Erzeugnisse handelt, die mit Röstkaffee nicht mehr gleich gesetzt werden können, wäre Art und Menge der Aromastoffe ohne grosse Bedeutung, wenn nicht von verschiedenen Extraktherstellern in hervorhebender Weise auf den Genusswert der Kaffee-Extraktpulver hingewiesen würde.

Über die chemischen Veränderungen beim Altern von Röstkaffee bzw. über das Charakteristische des Altgeschmacks lässt sich trotz zahlreicher bisher durchgeführter Untersuchungen nicht Genaues aussagen. Davon kann aber ausgegangen werden, dass die Vorgänge, die zum Altgeschmack führen, nicht mit den Veränderungen an den flüchtigen Aromastoffen identisch sind. Das bedeutet, dass Röstkaffee auch dann altert, wenn die flüchtigen Aromastoffe keine oder nur geringe Veränderungen erleiden. Andererseits wirken sich selbstverständlich Umsetzungen an den Aromastoffen auch nachteilig auf den Geruch und Geschmack des Röstkaffees aus.

Wenn man also davon ausgeht, dass die flüchtigen Aromastoffe allgemein ein Mass für die Frische und den Genusswert des Kaffeegetränkes sind, dann ergibt sich im Zusammenhang mit der Untersuchung von Röstkaffee und Kaffee-Extraktpulver als eine wesentliche Aufgabe die Überprüfung der flüchtigen Kaffee-Aromastoffe. Über die chemische Zusammensetzung des Kaffee-Aromas herrscht trotz intensiver Bemühungen noch keine völlige Klarheit. Bei der Analyse ergeben sich grosse Schwierigkeiten nicht allein dadurch, dass ein Teil dieser Stoffe sich sehr leicht verändert, sondern weil viele Substanzen nur in ganz geringen Mengen vorliegen.

Ein einfacher Weg, vergleichende Untersuchungen durchzuführen, besteht in der Oxydation der unter bestimmten Bedingungen aus Zubereitungen von Röstkaffees und Kaffee-Extraktpulvern ausgetriebenen wasserdampfflüchtigen Verbindungen. *In Tabelle 1* sind Tassenwerte und Aromazahlen für Röstkaffeezubereitungen angeführt, die nach der von J. WURZIGER (1) beschriebenen Arbeitsweise gewonnen wurden.

Für nach dem Filtrationsverfahren aus Röstkaffee und Wasser im Verhältnis 1 : 25 gewonnenen Auszüge werden häufig Aromazahlen in der angeführten Höhe gefunden. Sie bewegen sich also meist zwischen 35 und 38.

TABELLE 1

Tassenwerte u. Aromazahlen für Röstkaffeezubereitungen

Bezeichnung	Extrakt %	Tassenwert Oxydationszahl für 4 g/100 ml	Aromazahl Oxydationszahl für 1 g Extrakt aus 4 g/100 ml
Kaffeeaufgu β aus 4 g Röstkaffee und 100 ml Wasser	25,0	38,0	38,0
	24,3	35,5	36,5
	25,4	37,3	36,6
	24,0	35,8	37,3
	24,8	36,3	36,7
	25,8	38,0	36,8

TABELLE 2

Untersuchungen an Röstkaffees verschiedenen Alters

Bezeichnung	Gemisch aus koffeinhaltigem und koffeinfreiem Kaffee			
	gemahlen	gemahlen, 5 Tage an der Luft gelagert	gemahlen	gemahlen 5 Tage an der Luft gelagert
Aromazahl	28,9	17,9	29,3	18,4
pH-Wert :				
4 g/100 ml	5,20	5,36	5,00	5,20
ml n/100 Natronlauge bei pH 7 für 1 g Extrakt aus 4 g/100 ml	47,1	36,7	58,4	46,1
E 0,8 g/100 ml 1 cm, S47 E	0,501	0,575	0,463	0,513

Allerdings wirkt sich sowohl die Zubereitungsweise als auch das Alter des Getränks auf die Höhe der Aromazahl aus. Dies lässt sich gut verfolgen an den zur Zeit bei uns handelsüblichen Flüssigextrakten aus Röstkaffee. Von noch stärkerem Einfluss auf die Aromazahl ist jedoch das Alter des Röstkaffees. *In Tabelle 2* sind Untersuchungsergebnisse an Röstkaffees verschiedenen Alters zusammengestellt.

Die untersuchten Röstkaffees bestanden zu gleichen Teilen aus koffeinhaltigen und koffeinfreien Röstkaffees. Die Kaffees wurden unmittelbar nach dem Zerkleinern untersucht und ausserdem nachdem die gemahlenen Produkte 5 Tage in dünner Schicht an der Luft bei Zimmertemperatur gestanden hatten. Unter den gewählten Bedingungen gingen nicht nur die Aromazahlen um etwa 40 % zurück, sondern auch die sauren Anteile nahmen auf 1 g Extrakt bezogen um mehr als 20 % ab. Die Röstkaffees wurden durch das Aufbewahren an der Luft gewissermassen milder oder « saureärmer ». Dies drückt sich auch in den veränderten pH-Werten sehr deutlich aus. Ausserdem führte das Stehen der gemahlenen Röstkaffees an der Luft zu einer Farbvertiefung der Aufgüsse. In diesem Zusammenhang sollen jedoch allein die flüchtigen Aromastoffe betrachtet werden. *In Tabelle 3* sind Aromazahlen zusammengefasst, die unter gleichen Arbeitsbedingungen an handelsüblichen und aus Versuchsherstellungen stammenden Kaffee-Extraktpulvern gewonnen wurden.

TABELLE 3

Aromazahlen in Kaffee-Extraktpulvern

Bezeichnung	Aromazahlen (1 g Extrakt/100 ml)
Kaffee-Extraktpulver, Normaltrocknung	15,3
	17,5
	15,8
	18,2
	19,7
	12,9
Kaffee-Extraktpulver, gefriergetrocknet	13,8
	17,0
	17,7
	22,3
	40,4
	32,2

Unter den gewählten Bedingungen werden aus den wässrigen Lösungen, unabhängig von der Art der Extraktherstellung für 1 g Trockenextrakt meist Aromazahlen zwischen 13 und 22 gefunden. Dabei sind Werte über 20 bisher durchaus noch nicht sehr häufig. Hier bleibt jedoch zu erwähnen, dass die höheren Aromazahlen bei gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulvern wesentlich häufiger vorkommen als bei den sprühgetrockneten. Interessant ist zweifellos, dass auch Kaffee-Extraktpulver hergestellt werden können, die sich in den Aromazahlen von Aufgüssen aus Röstkaffee kaum unterscheiden. Bei diesen Versuchsherstellungen konnte also ein Verlust an flüchtigen oxydierbaren Substanzen weitgehend verhindert werden. In handelsüblichen Kaffee-Extraktpulvern werden unter diesen gewählten Untersuchungsbedingungen vielfach weniger als 50 % der in Zubereitungen aus frischen Röstkaffees vorhandenen oxdierbaren flüchtigen Stoffe gefunden. Wenn die Aromazahlen in Kaffee-Extraktpulvern mit denen verglichen werden, die in den Aufgüssen aus dem gemahlenen, 5 Tage der Luft ausgesetzten Röstkaffees festgestellt wurden, dann zeigt sich, dass hier kaum Unterschiede bestehen. Hieraus folgt, dass es wohl auch die leichtflüchtigen Aromasubstanzen sind, die in Kaffee-Extraktpulvern mehr oder minder vollständig fehlen. In der grossen Flüchtigkeit dieses Aromateils dürfte es auch begründet liegen, dass Zubereitungen aus gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulvern nur unwesentlich höhere Aromazahlen haben als solche aus sprühgetrockneten Erzeugnissen.

Diese Arbeitsweise ermöglicht eine gewisse Aussage über die Gesamtmenge der flüchtigen Aromabestandteile in Zubereitungen aus Röstkaffee und Kaffee-Extraktpulver. Auf die Art der Substanzen, die z. B. beim Stehen des gemahlenen Röstkaffees an der Luft oder bei der Herstellung der Trockenextrakte entweichen, lässt sich daraus jedoch nicht schliessen. Ein günstiger Einblick in die Unterschiede zwischen den Substanzen in Zubereitungen aus z. B. Röstkaffee und Kaffee-Extraktpulver ist durch gaschromatographische Untersuchungen zu gewinnen, sofern die Prüfungen an wässrigen Lösungen vorgenommen werden. Hierdurch entfällt die Substanzisolierung bzw. -anreicherung etwa durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln und damit werden auch Verluste oder Konzentrationsverschiebungen an flüchtigen Substanzen zumindest weitgehend vermieden. Die gaschromatographische Analyse wasserhaltiger Lösungen bereitet jedoch oftmals erhebliche Schwierigkeiten, da Wasser an den meisten flüssigen Phasen nicht als scharfe Bande getrennt wird. Besonders die Trennung der Verbindungen, die direkt hinter dem Wasser eluiert werden, leidet bekanntlich unter der starken Schwanzbildung der Wasserbande. Entscheidende Vorteile brachte der Zusatz von Wasserdampf zum Trägergas. Unter den von R. D. WEEREN, H. WERNER und J. WURZIGER (2) gewählten Bedingungen ist es grundsatzlich möglich, Kaffee-Aufgüsse aus Röstkaffee oder Zubereitungen aus Kaffee-Extraktpulver direkt in den Gaschromatographen zu injizieren. Leider tragen dabei die nicht flüchtigen Extraktstoffe zu einer schnellen Verschmutzung des Einspritzblockes bzw. des ersten Teiles der Trennsäule bei. Ausserdem bedarf es, um bei diesem Verfahren zu gut auswertbaren Chromatogrammen zu kommen, sehr konzentrierter den haushaltsüblichen Bedingungen nicht mehr ganz entsprechender Aufgüsse. Daher wurden die flüchtigen Aromastoffe zunächst durch eine einfache Destillation von den nicht flüchtigen Bestandteilen abgetrennt und gleichzeitig angereichert. Dabei wurde in folgender Weise verfahren : 9 g gemahlener Röstkaffee wurden mit 150 ml siedendem Wasser nach dem Filtrationsverfahren ausgelaugt. Bei Kaffee-Extraktpulver wurden 2,25 g in 135 ml Wasser gelöst. Die Kaffeelösungen wurden in eine Gaswaschflasche mit eingebauter Glasfritte gegeben und 10 Minuten lang im Trockenschrank bei einer Temperatur von 95° C gehalten. Anschliessend wurde Stickstoff (90-100 ml/Min.) durch den Aufguss geleitet. Der Gasstrom wurde mit Eiswasser gekühlt und das Destillat aufgefangen. Die Destillation wurde nach 10 Min. abgebrochen. Unter diesen Bedingungen wurden insgesamt etwa 0,8 ml überdestilliert. Die Destillate waren klare und farblose Flüssigkeiten mit deutlichem Kaffeegeruch. Die Destillation wurde im Trockenschrank vorgenommen, weil dadurch eine gleichmässige und leicht reproduzierbare Temperierung aller Teile der Apparatur bis zum Kühler erreicht wurde.

Für die gaschromatographische Untersuchung dieser Destillate wurde das Modell « Gasofract 300 B » der Firma Dr. Virus, Bonn, benutzt. Allerdings wurde das Gerät für diese Untersuchungen zunächst erst entsprechend umgebaut. Darauf kann in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden. Als Säulen dienten Glasrohre von 3 mm innerem Durchmesser. Sie wurden U-förmig gebogen und mit imprägnierten Trägermaterial gefüllt. Zur Erzeugung des Wasserdampfes wurde ein Gerät der Firma Wilkens (Aerograph Steam Generator Modell A-675) benutzt. Die Temperatur des Wasserdampfbereiters wurde meist auf 93° C gehalten. Als Trägergas diente ein Stickstoff-Wasserdampf-Gemisch.

Den Einfluss des Wasserdampfzusatzes zum Trägergas auf die gaschromatographische Trennung verdeutlichen *die Bilder 1 und 2.*

Die Chromatogramme wurden aus demselben Destillat unter gleichen Bedingungen gewonnen. Bei dem Versuch der 2. Abbildung wurde das Trägergas lediglich durch den Wasserdampfbereiter mit einer Temperatur von 94° C geleitet.

Unter den gewählten Bedingungen, die in diesem Zusammenhang nicht ausführlich erläutert werden können, wurden Destillate aus Röstkaffees und Kaffee-Extraktpulver analysiert. *Bild 3* zeigt das Chromatogramm eines Destillates aus frischem Röstkaffee.

Die gleichen Untersuchungen wurden an dem Rostkaffee vorgenommen, nachdem dieser 13 Monate in

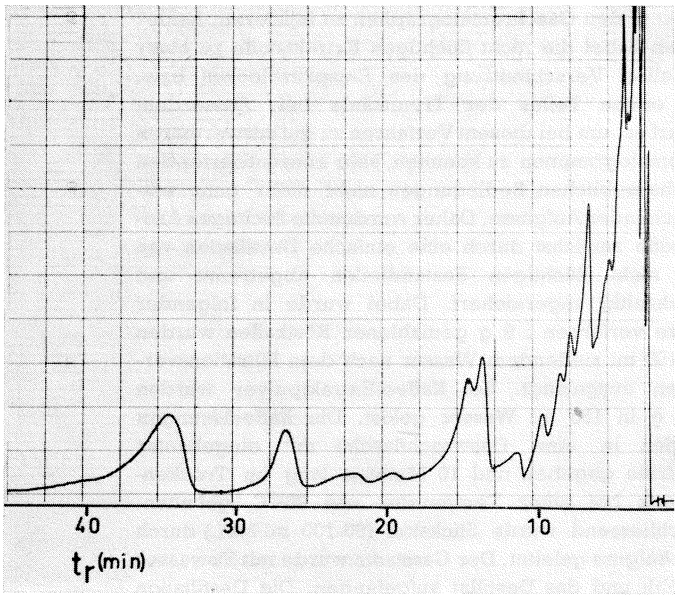


Bild 1. — *Chromatogramm des Destillates eines Kaffeeaufgusses, Trägergas ohne Zusatz von Wasserdampf.*
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 100° *C*

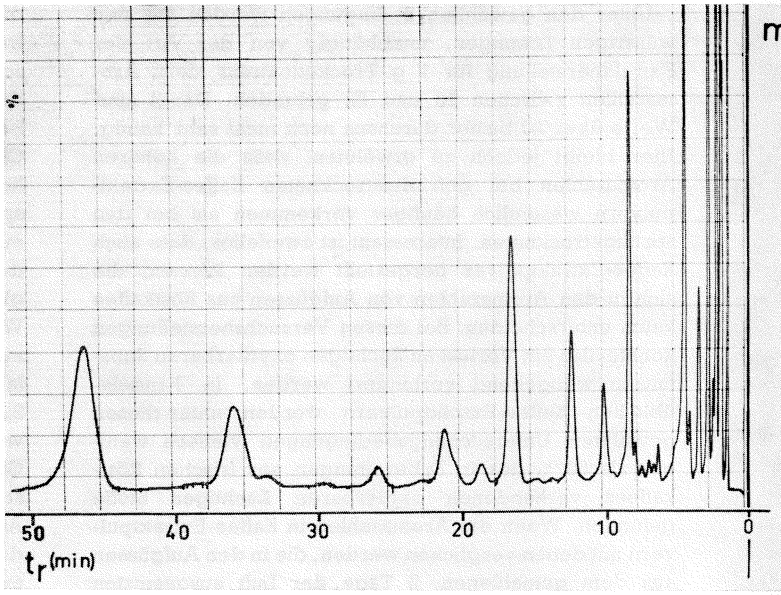


Bild 2. — *Chromatogramm des Destillates eines Kaffeeaufgusses, Trägergas mit Zusatz von Wasserdampf*
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 100° *C*

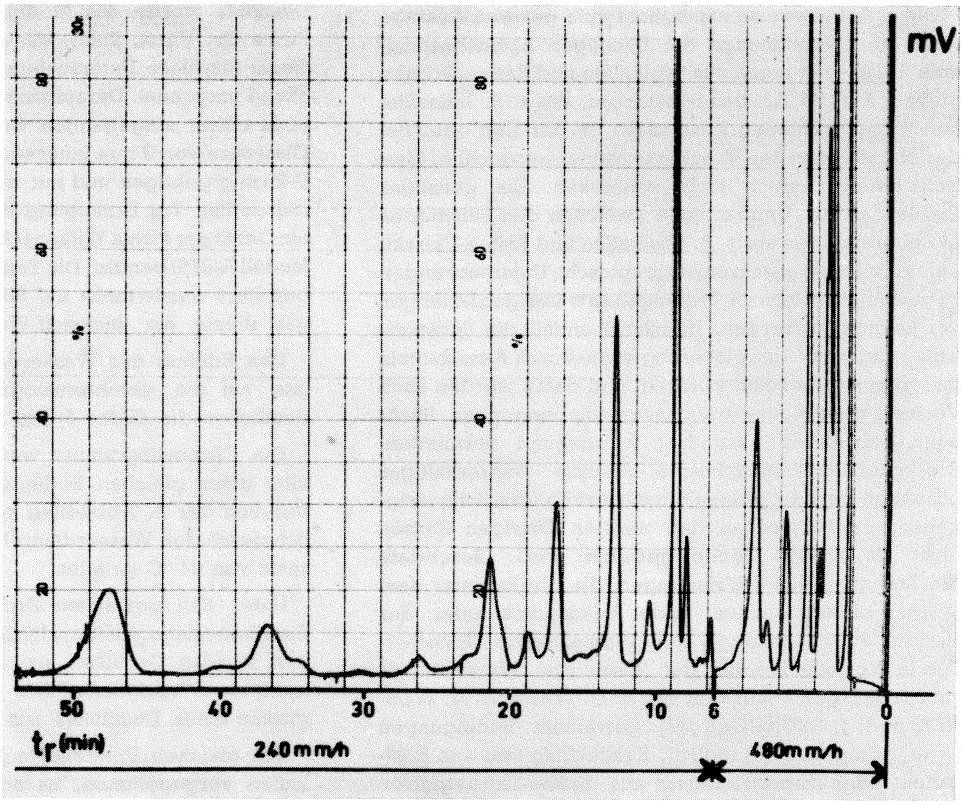


Bild 3. — *Chromatogramm von einem Destillat aus dem Aufguss eines frischen Röstkaffees*
Injektionsmenge: 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L*10 %
Temperatur des Thermostaten : 100° *C*
Temperatur des Wasserdampfbereiters: 93°*C*

verschlossenen Behältern gelagert hatte. Das Chromatogramm ist in *Bild 4* wiedergegeben.

An dem gelagerten Röstkaffee waren deutlich geruchliche und geschmackliche Mängel wahrzunehmen. Das Chromatogramm glich jedoch, wenn man von der Abnahme der Bandenhöhe absieht, weitgehend dem Chromatogramm des frischen Röstkaffees. Hier traten allerdings 3 neue, sehr kleine Banden auf. Untersuchungen zur Aufklärung der Substanzen, die diese Banden ergeben, konnten bisher nicht unternommen werden. Der Altgeschmack des gelagerten Röstkaffees dürfte jedoch kaum von diesen geringen Substanzmengen herrühren.

Aus den Bildern 3 und 4 folgt, dass unter üblichen Lagerbedingungen nicht einzelne Aromabestandteile besonders stark abzunehmen scheinen, sondern dass die gesamten Aromastoffe etwa im gleichen Verhältnis zurückgehen. In welcher Grössenordnung sich dieser Anteil bewegt, hängt von den jeweiligen Bedingungen ab und lässt sich über die Ermittlung der wasserdampflüchtigen oxdierbaren Substanzen im allgemeinen recht gut abschätzen. Die Oxydationszahlbestimmung ist nach diesen gaschromatographischen Untersuchungen jedenfalls ein durchaus brauchbarer Weg zur Beurteilung der Frische von Röstkaffees bzw. der daraus hergestellten Zubereitungen.

Bild 5 zeigt das Chromatogramm für ein sprühgetrocknetes Kaffeeprodukt.

Bild 6 zeigt zum Vergleich das Chromatogramm für ein gefriergetrocknetes Kaffee-Extraktpulver.

Beide Chromatogramme unterschieden sich von denen für Röstkaffee-Destillate sehr eindeutig. Dabei ist das gefriergetrocknete Produkt noch etwas günstiger zu beurteilen als das sprühgetrocknete, wenn die Höhe der Banden als Beurteilungsmassstab gewählt wird. Auffallend ist jedoch, dass die Destillate aus Röstkaffeezubereitungen und solchen aus Kaffee-Extraktpulvern, unabhängig vom Alter des Röstkaffees und von der Art der Trocken-Extraktherstellung im wesentlich die gleichen Banden aufwiesen. Nach diesen Untersuchungen an wässrigen Destillaten verschwinden bei der industriellen Kaffee-Extraktherstellung die leicht flüchtigen Aromasubstanzen in der Regel nicht vollständig, sondern auch bei diesen Erzeugnissen setzt sich der verbleibende Aromarest etwa so zusammen wie in Zubereitungen aus frischen Röstkaffees. Die wesentlichen Unterschiede liegen also darin, dass in Trockenprodukten die Gesamtmenge an flüchtigen Aromastoffen viel kleiner ist. An diesen Chromatogrammen wird verständlich, dass in Kaffee-Extraktpulvern über die analytische Erfassung der flüchtigen Bestandteile nur Tassenwerte ermittelt werden, die oftmals noch nicht 50 % der Werte

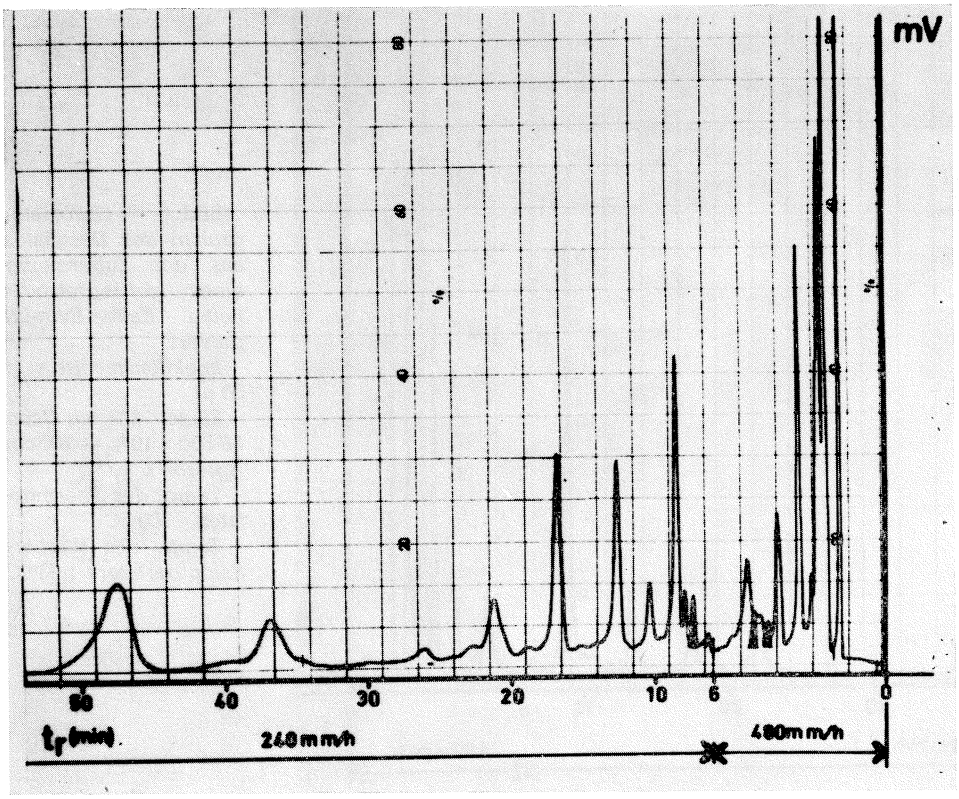


Bild 4. — *Chromatogramm von einem Destillat aus dem Aufguss des Röstkaffees (Bild 3) nach 13-monatiger Lagerung*
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 cm *Ucon LB*-550 × 10 % + 100 cm *Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 100° C
Temp. des Wasserdampfbereiters : 93° C

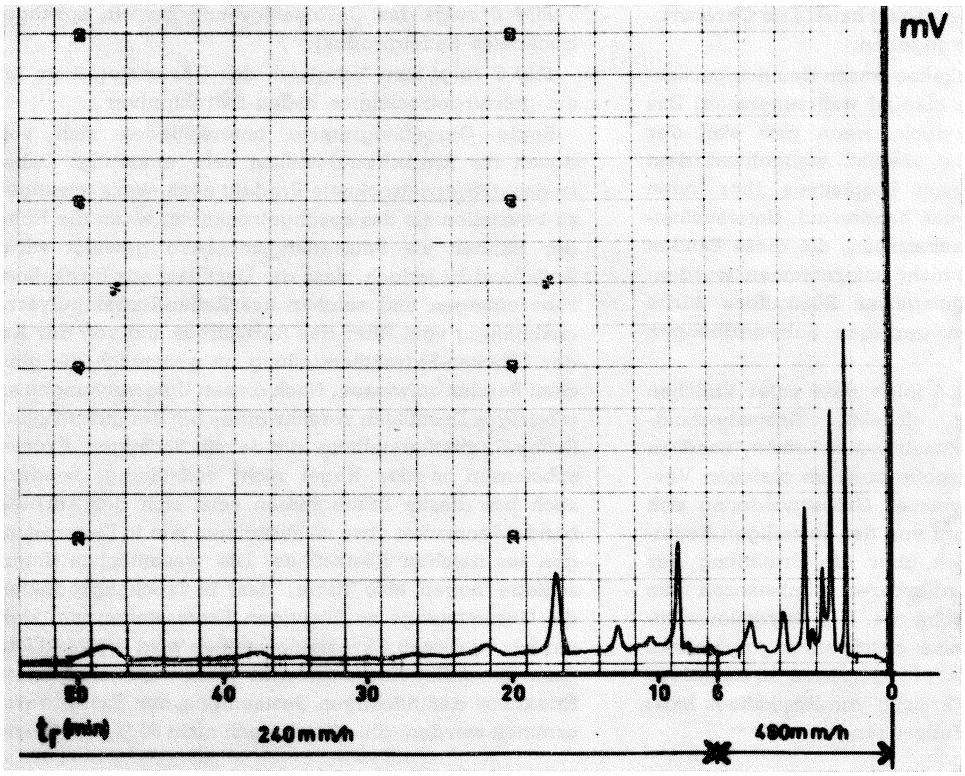


Bild. 5. — *Chromatogramm des Destillates aus der Zubereitung eines sprühgetrockneten Kaffee-Extrakt-pulvers.*
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 100° *C*
Temp. des Wasserdampfbereiters : 93° *C*

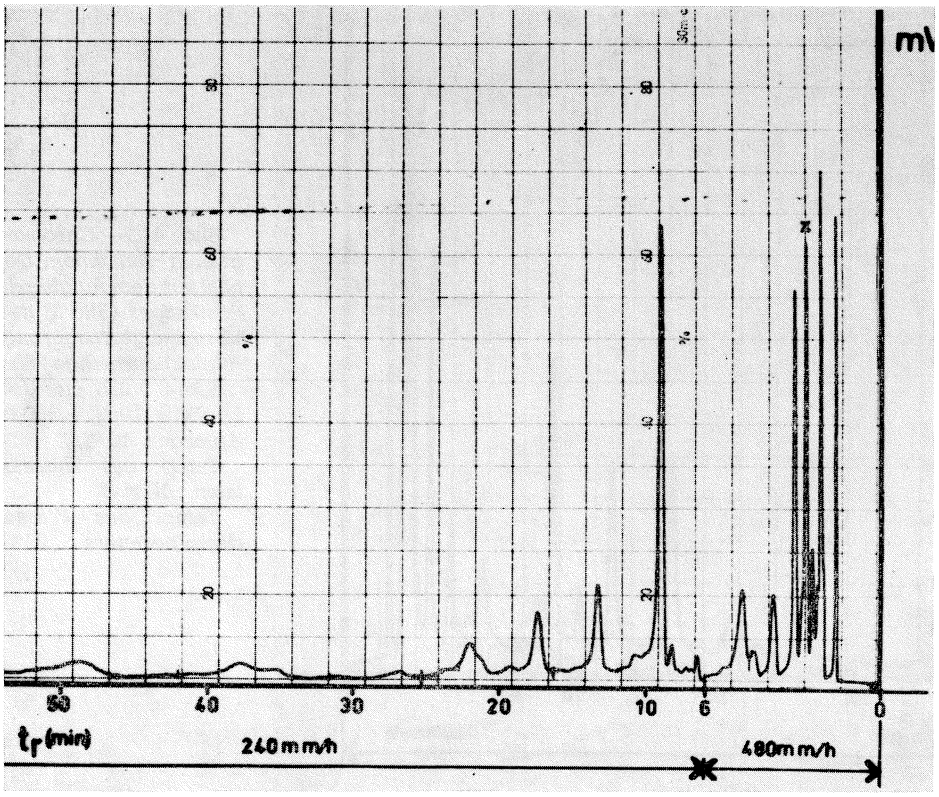


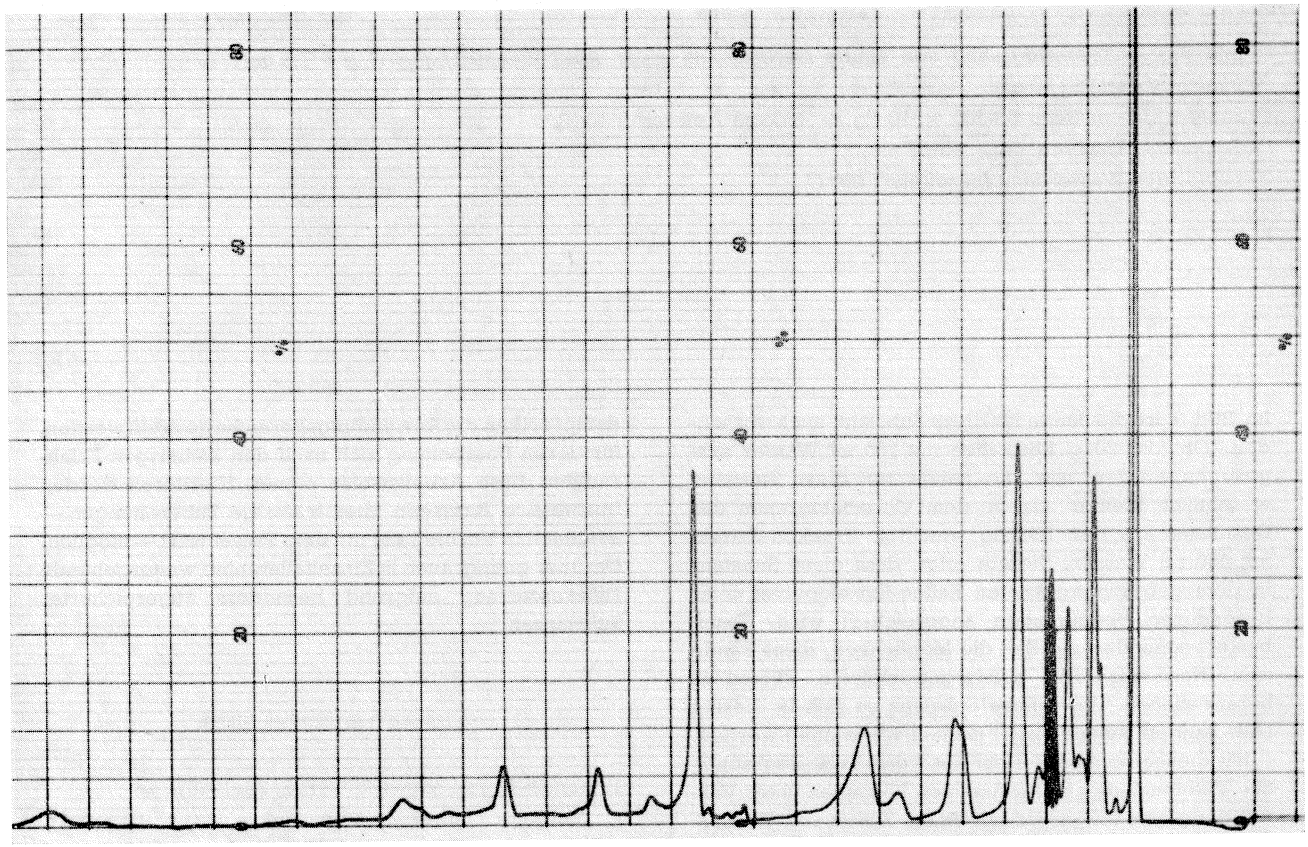
Bild 6. — *Chromatogramm des Destillates aus der Zubereitung eines gefriergetrockneten Kaffee-Extrakt-pulvers*
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 100° *C*
Temp. des Wasserdampfbereiters : 93° *C*

betragen, die für Zubereitungen aus handelsüblichen Röstkaffees erhalten werden. Die von wässrigen Kaffee-Auszügen ausgehende gaschromatographische Untersuchung ermöglicht somit in jedem Falle eine günstigere Beurteilung unbekannter Kaffeegetränke. Bisher wurde diese gaschromatographische Untersuchung durch die Tassenwertbestimmung ergänzt. Für die normalen Aufgaben z. B. im Rahmen der Lebensmittelüberwachung hat sich diese Kombination als recht günstig und ausreichend erwiesen. Es soll jedoch erreicht werden, die Beurteilung wässriger Kaffee-Auszüge auf eine quantitative Auswertung der Gaschromatogramme zu stützen.

Im Zusammenhang mit gaschromatographischen Untersuchungen an solchen wässrigen Lösungen wurde noch eine interessante Beobachtung gemacht. *Bild 7 zeigt* nochmals ein Chromatogramm für das Destillat aus einem gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulver. Das Destillat wurde jedoch aus einem Aufguss von 5 g Trocken-Extrakt mit 150 ml Wasser gewonnen. Da das Trockenerzeugnis etwa 40 % der eingesetzten Röstkaffeemenge ausmachte, entsprachen diesen 5 g Trocken-Extrakt etwa 12,5 g Röstkaffee. *Bild 8 zeigt* zum Vergleich das Chromatogramm für das Destillat aus einer Kaffeezubereitung. Der Aufguss wurde aus 20 g Röstkaffee mit 150 ml Wasser bereitet. Es kann davon ausgegangen werden, dass unter den gewählten Aufgussbedingungen etwa 20 % der Kaffeesubstanzen mit dem siedendem Wasser herausgelöst wurden.

Diese Chromatogramme wurden unter etwas abgewandelten Bedingungen aus wesentlich verstärkten Destillaten gewonnen. Im Bild 7 fällt eine Bande besonders auf. Sie wurde bis jetzt nicht in sprühgetrockneten Erzeugnissen beobachtet. Sie wurde bisher auch nur in einem bestimmten gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulver festgestellt. Um beurteilen zu können, ob es sich um eine natürliche, im Röstkaffee allgemein vorkommende Substanz handelt, wurden Destillate aus stärker konzentrierten Zubereitungen untersucht.

Bild 7. — *Chromatogramm von einem Destillat aus der Zubereitung eines gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulvers* (1 *g* : 30 *ml*)
Injektionsmenge : 50 *µl*
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 95° *C*
Temp. des Wasserdampfbereiters : 86° *C*



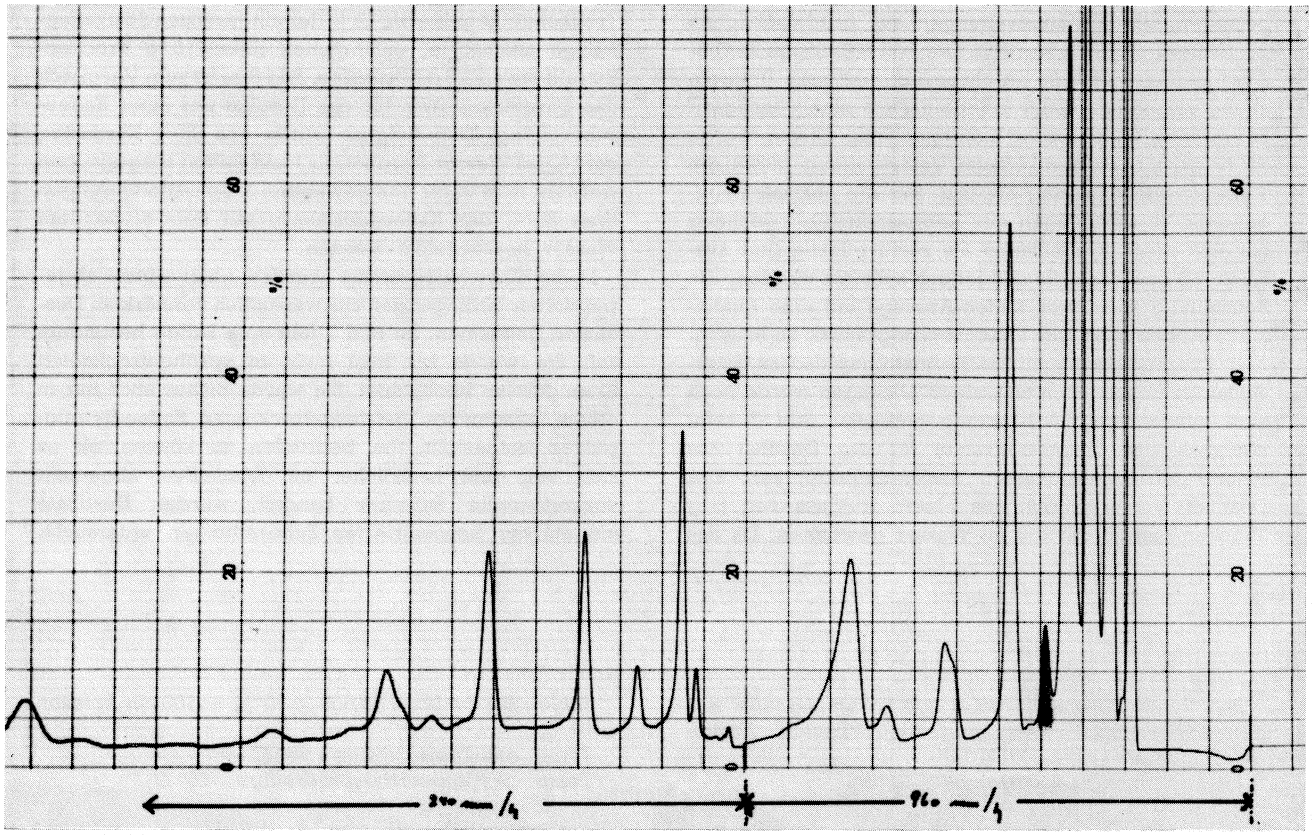


Bild 8. — *Chromatogramm von einem Destillat aus einer Röstkaffeemischung* (1 *g* : 7,5 *ml*)
Injektionsmenge : 50 µl
Säule : 225 *cm Ucon LB*-550 × 10 % + 100 *cm Apiezon L* 10 %
Temp. des Thermostaten : 95° *C*
Temp. des Wasserdampfbereiters : 86° *C*

Im Bild 8 ist die Bande für diese Substanz auch vorhanden. Obwohl 20 g Röstkaffee mit 150 ml Wasser ausgezogen wurden, war die Bande für diese Substanz wesentlich kleiner als in dem Chromatogramm des Destillates aus der Lösung von 5 g Trocken-Extrakt mit 150 ml Wasser. Hieraus folgt, dass diese Substanz in dem gefriergetrockneten Kaffee-Extraktpulver unter besonderen Bedingungen angereichert wird. Damit besteht zumindest zur Zeit die Möglichkeit, diese Bande zum Nachweis des gefriergetrockneten Produktes heranzuziehen. Um welche Substanz es sich in diesem Falle handelt, konnte bisher noch nicht ermittelt werden.

Mit diesem kurzen Bericht über gaschromatographische Untersuchungen an wässrigen Lösungen unter Verwendung von Trägergas mit einem Zusatz von Wasserdampf sollten die Anwendungsbereiche gestreift werden, für deren Bearbeitung sich nach den bisherigen Erfahrungen diese Arbeitsweise eignet. Hierdurch werden quantitative Aussagen über wässrige Zubereitungen — eventuell in Verbindung mit dem Tassenwert — möglich. Darüber gelingt auch in Einzelfällen eine weitergehende Differenzierung aufgrund besonders angereicherter Substanzen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. *Kaffee- u. Tee-Markt*, VIII/18, S. 23 (1958).
2. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 62, S. 13 (1966).

WURZIGER (J.), WEEREN (R. D.). — **Etudes de boissons de cafés torréfiés et d'extraits de café en poudre par chromatographie en phase gazeuse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967, A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 155-164, fig., tabl., réf.

L'arôme revêt une importance particulière, à côté de la caféine, lors de l'estimation de cafés torréfiés et d'extraits de café en poudre. Cet exposé constitue un rapport sur des analyses de distillats aqueux de cafés torréfiés et d'extraits en poudre par chromatographie en phase gazeuse. Du point de vue quantitatif les extraits de café en poudre diffèrent nettement du café torréfié normal. Dans les conditions choisies, les cafés torréfiés traités et stockés ne se différencient pas nettement des cafés torréfiés non traités.

WURZIGER (J.). WEEREN (R. D.). — **Studies by gas chromatography of roasted coffee brews and of powder extracts of coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris), 1968, p. 155-164, fig., tabl., réf.

Aroma is of particular importance, next to caffeine, when judging roasted coffees and coffee extracts in powder form. This paper consists of a report on the analysis by gas chromatography of water distillates of roasted coffees and powder extracts. From the quantitative point of view, the powder extracts sof coffee differ radically from normal roasted coffee. Under the conditions chosen, the roasted coffees, treated and stocked, do not differ markedly from the untreated coffees.

WURZIGER (J.), WEEREN (R. D). — **Über gaschromatographische Untersuchungen an Aufgüssen aus Röstkaffees und Kaffee-Extraktpulvern.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 155-164, fig, tabl., réf.

Bei der Bewertung von gerösteten Kaffees bzw. Kaffee-Extraktpulvern, kommt dem Aroma neben dem Koffein besondere Bedeutung zu. Es wird über gaschromatographische Untersuchungen an wässrigen Destillationen von Röstkaffees und Kaffee-Extraktpulvern berichtet. Kaffee-Extraktpulvern fallen bei diesen Untersuchungen in quantitativer Hinsicht deutlich gegenüber normalem Röstkaffee ab. Für behandelte und abgelagerte Röstkaffees ergaben sich unter den gewählten Bedingungen gegenüber unbehandelten Röstkaffees keine nennenswertern Unterschiede.

DISCUSSION

M. PRCHAL : Können Sie mir Auskunft darübergeben, was für eine Chromatographiesäule Sie verwendet haben ?

M. WURZIGER : Verwendet wurden ganz allgemein Glasssäulen, 3 mm innerer Durchmesser, 3 Meter lang, 225 cm Ucon LB-550 × 10 % + 100 cm Apiezon L 10 % auf Kieselgur.

M. CALZOLARI : Abbiamo sentito un'interessantissima relazione del Prof. Gautschi a proposito dei componenti dell'aroma. Sappiamo quanto delicato è questo argomento anche perchè le sostanze presenti in piccolissima percentuale, quindi difficiímente rilevabili con una tecnica se non molto sensibile, sono quelle che danno il maggior apporto all'aroma stesso. Quindi vorrei sapere se un metodo di questo tipo e une soluzione di questo genere possano dare una certa significatività all'interpretazione di questi dati.

M. WURZIGER : Ich habe den interessanten Vortrag am Sonnabend gehört, indem uns erzählt wurde, dass bereits 286 Substanzen ermittelt wurden. Es ist ganz selbstverständlich, dass sich diese Zahl ändern kann. Sie hängt ja nicht nur von der Herkunft der Bohne ab, sondern besonders von den Röstbedingungen, abgesehen davon, dass selbstverständlich auch die Bearbeitungsverfahren eine verhebliche Rolle spielen. Uns ging es aber bisher nicht darum bestimmte Substanzen zu isolieren, sondern nur um vergleichende Untersuchungen. Die letzten Chromatogramme, die ich Ihnen zeigte sollten nur klar machen, dass es in einzelne Fällen möglich ist Unterschiede zu erkennen. Uns ging es also zunächst einmal darum festzustellen, ob es eine natürliche im Kaffee vorkommende Substanz ist. Wenn es eine fremde Substanz gewesen wäre, die irgendwie über die Bearbeitung oder die Herstellung in den Kaffee-Extrakt gekommen wäre, dann wären wir sogar auf Grund unserer Deutschen lebensmittelrechtlichen Bestimmungen nicht um die Frage herumgekommen zu prüfen, ob der Kaffee überhaupt verkehrsfähig ist. Darum mussten wir uns bemühen festzustellen, ob er nicht doch irgendwie natürlich vorkommt und daher diese Anreicherung und daher dieser Vergleich. Festzustellen um welche chemische Substanz es sich handelt dafür fehlte bisher die Zeit.

M. STREULI : Wie Sie zu Beginn ihres Vortrages betont haben, möchten Sie daraus auch Frische und Genusswert schliessen ?

Wie sieht das nun aber in der Praxis aus ? Sie erheben irgendwo eine Probe in einem Restaurant, Sie machen da Chromatogramme und auf Grund welcher Werte entscheiden Sie nun, dass da ein frischer Kaffee oder ein abgelagerter Kaffee ist ? Soll ich den Kauf dieses Kaffees verbieten oder kann ich das nicht tun.

M. WURZIGER : Das müsste schon ein sehr alter Kaffee sein. Die Zahlen, die ich Ihnen nannte, sind selbstverständlich zunächst solche für gute frische Kaffees. Ich habe auch schlechtere Qualitäten im Handel, das gibt es überall.

Die Zahlen sind natürlich auch vom Röstgrad abhängig. Somit kommen durchaus Kaffees vor, die Zahlen um 30 ergeben. Mit nachträglichen Veränderungen ist auch zu rechnen, wenn die Aufgüsse lang in den Kaffeemaschinen stehen. Die Beurteilung hängt vom Einzelfall ab.

M. LOCKHART : I should like to ask Dr Wurziger whether his gas chromatographic analysis has ever been correlated with consumer acceptance studies ?

M. WURZIGER : Nein. Es liegt bei uns jedoch nahe die Aufgaben oder Probleme aus dieser Sicht mitzusehen, weil wir uns auch mit Lebensmittelüberwachung zu befassen haben.

M. FAVRETTO : Poichè è stata tentata una correlazione tra proprietà organolettiche (aroma) e presenza di certi componenti dell' aroma rivelati gascromatograficamente, vorrei sapere se sono state eseguite prove di ripetibilità per valutare se differenti altezze di picchi cromatografici, corrispondenti a campioni diversi, abbiano significatività statistica.

M. WURZIGER : Es ist selbstverständlich, dass die Gaschromatogramme wiederholt und die Distillations-bedingungen auch so gewählt wurden dass, soweit es unter diesen Bedingungen überhaupt möglich war, reproduzierbare Verhältnisse geschaffen wurden. Kleine Unterschiede sind selbstverständlich nicht zu vermeiden. Das liegt nicht am Gaschromatographen, sondern das liegt daran, dass auch bei grössten Bemühen unter gleichen Bedingungen zu arbeiten, insbesondere bei Röstkaffees, dann niemals die gleichen Extrakte erhalten werden können. Man muss also immer mit kleinen Unterschieden rechnen. Ich möchte sagen, es geht nicht, bei kleinen Unterschieden, auf die Gaschromatogramme zurück, sondern mehr auf die Vorbereitung der Proben. Darauf kommt es hier nicht an. Es geht nur darum zu zeigen, dass wenn z. B. ein solcher Kaffee-Extrakt anfällt, man über diesen Peak fällt, den man sonst nicht findet. Dann liegt es doch nahe, dass man sich Gedanken macht, wie kommt er hinein und das war der Anlass, dass die Kaffeemengen vergrössert wurden um festzustellen ob die Substanz in dem Kaffee natürlich vorkommt.

M. STREULI : Gestatten Sie mir noch mal auf Ihre sehr wertvollen Ausführungen in der Diskussion zurückzukommen. Ich bin an dem Problem sehr interessiert und sehe, dass Sie das genau verfolgen. Aber es interessiert mich, was man heute damit machen kann. Darf ich aus Ihren Ausführungen entnehmen, dass weder Ihre derzeitigen Gaschromatogramme noch die Oxydationszahlen etwas über die Frische oder den Genusswert des Kaffees auszusagen gestatten (2).

M. WURZIGER : Wir hatten noch keine Veranlassung, uns darüber Gedanken zu machen. Wenn natürlich ein Kaffeegetränk, zwei oder drei Tage alt ist, da leite ich nichts mehr aus den Zahlen ab, weil man in dieser Grössenordnung wirklich die Aromazahlen oder Tassenwerte in dem Handelsprodukten findet.

M. STREULI : Aber eine abweichende Zahl würde also nicht notwendigerweise bedeuten, dass das betreffende Getränk alt ist und aus der Benutzung gelenkt sein muss.

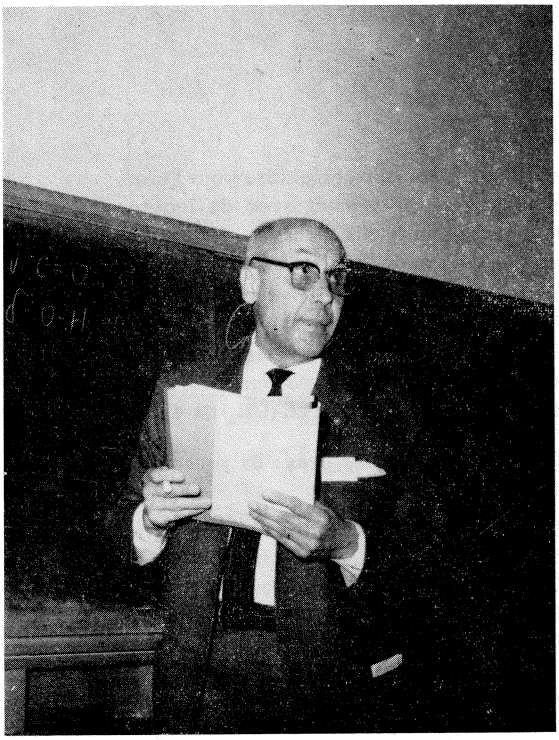
M. WURZIGER : Damit würde ich mich allein mit dieser Untersuchung nicht zufrieden geben.

M. PYPKER : There are possibilities of artifacts and a warning must be given when a « new peak » is seen in a series of chromatograms. Sometimes it stems from an uncontrolable source. In my experience I had this situation several times and in two instances I found the origin only after an intensive research. The first time a new kind of soap was used to rinse dirty glassware Some substances survived after the cleaning. It adhered to the glass giving off slowly a volatile compound under the conditions of my experiments. It took a long time to find the origin of this new peak. The second time, the new peak was trapped and the structure of the corresponding compound evaluated by spectroscopic techniques. It was benzene. A coworker had at the same time started a series of experiments in which he used benzene that stayed in the siphon of the washing basin. So the origin of the new peak could be correlated to a wrong way of washing away a used solvent. Gaschromatography with modern instruments is so sensitive that traces of extraneous material soon can be present in about the same amount as the compounds under investigation and as shown in the two examples. There are possibilities of contamination of the gaschromatographic sample you will not be aware of. Therefore it is recommended to trap such a new peak and try to get more information of the structure.

M. WURZIGER : So wie ich es hier dargestellt habe, erscheint alles natürlich sehr einfach. Aber so einfach haben wir es uns nicht gemacht, das ist wohl klar, sondern sehr viele Untersuchungen sind in dieser Richtung gelaufen, um sicher zu sein, dass es bisher nur der eine Kaffee-Extrakt ist, der diese Substanz in einer grösseren Menge enthält. Darum geht es.

M. FLAMENT : Vous avez surtout mentionné les différences observées par chromatographie en phase gazeuse parmi les composants volatils. Il ne faut cependant pas perdre de vue que des différences très importantes existent également dans la région des composants peu volatils, qui sont surtout responsables du goût. D'autres techniques sont alors nécessaires, dont la chromatographie sur couche mince. Pratiquement il est d'ailleurs possible de combler la perte des produits volatils due au séchage, alors que le problème qui consisterait à enlever au café soluble les substances peu volatiles qui s'y trouvent en excès n'a pas encore été résolu.

M. WURZIGER : Jetzt wenn ich Sie richtig verstanden habe, dann darf ich darauf sagen, ich habe nur hier etwas über die flüchtigen Anteile gesagt. Ich weiss sehr wohl, dass im Kaffeeextraktpulver auch andere Stoffe enthalten sind, sogar solche, die in normalen Röstkaffeeaufguss nicht vorhanden sind. Ich kenne solche Substanzen durchaus schon. Aber es würde uns viel zu weit führen. Ich könnte Sie jedenfalls noch sehr lange dann über Kaffee unterhalten.



A. CHARRO ARIAS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CAFÉS SOLUBLES AU MOYEN DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE INFRA-ROUGE

A. CHARRO ARIAS, J. SIMAL LOZANO, D. VILLAR NOGUEIRA

Facultad de Farmacia, Santiago de Compostela

L'emploi des surfactifs dans l'industrie alimentaire est de plus en plus fréquent. Leur addition aux aliments se fait dans des buts les plus divers : stabilisation de l'humidité, fixation d'arômes, action émulsifiante, action mouillante, etc. (1) (2).

Dans l'élaboration d'extraits de café en poudre (café soluble, café instantané), ils trouvent aussi leur application ; on signale dans la littérature l'addition d'acides gras à la poudre de café soluble comme moyen d'éviter la formation d'écume au moment de la dissolution dans l'eau (3), et celle d'esters d'acides gras et de saccharose pour augmenter la capacité d'absorption de l'eau et faciliter la solubilisation de la poudre lors de la préparation de la boisson (4) (5).

Dans la fabrication d'extraits de café on a essayé divers surfactifs (Tegomuls, Twen, Myverol, etc.) comme moyen de contrôler la formation d'écume pendant le processus de concentration des solutions aqueuses d'extraction (6).

La législation de certains pays autorise l'emploi de surfactifs déterminés (acides gras, mono- et di-glycérides, etc.) dans quelques aliments, même sans nécessité d'en faire la déclaration (7), mais il n'est pas fait mention de leur usage dans les extraits solubles de café, ce qui rend leur emploi illégal.

En Espagne, il n'y a rien d'établi par la loi en ce qui concerne l'emploi de tels additifs dans les aliments ; leur présence dans un café soluble constitue donc une fraude.

En raison de tout cela, il est facile de comprendre l'intérêt extraordinaire qu'offre la recherche qualitative des surfactifs dans les cafés solubles, et même leur ultérieure détermination quantitative, étant donné que les législations font aussi mention, en général, de concentrations maxima. Il ne faut pas oublier que l'innocuité de certains surfactifs est encore à l'étude.

Etant donné d'une part le grand nombre de surfactifs qui s'offre de nos jours aux industries de l'alimentation et, d'autre part, le manque d'une systématique analytique qui rende possible une détection rapide de la présence d'un surfactif et, le cas échéant, qui permette de connaître sa nature, il nous a paru intéressant d'appliquer dans ce but la spectrophotométrie infra-rouge puisque, si cela réussissait, la recherche spécifique qualitative et quantitative serait très facile.

Les surfactifs qui dans la bibliographie apparaissent comme les plus employés aux fins alimentaires et qui, pour les causes signalées ci-dessus, peuvent se trouver dans les cafés solubles, sont les suivants :

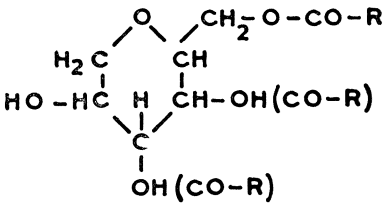
Acides gras

$$R-COOH$$

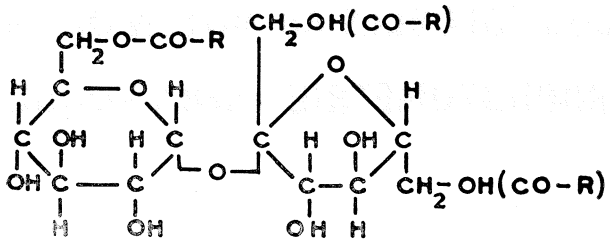
Mono- et di-glycérides d'acides gras (Tegacid, Emcol, etc.)

$$\begin{array}{l} CH_2-O-CO-R \\ | \\ CH-OH\,(CO-R) \\ | \\ CH_2-OH \end{array}$$

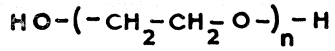
Esters d'acides gras avec sorbitan (Span, etc.)



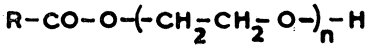
Esters d'acides gras de la saccharose



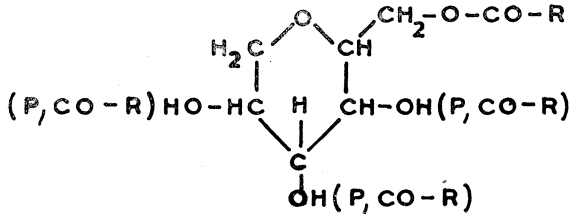
Polyoxyéthylènes (Carbowax, POE)



Esters d'acides gras avec polyoxyéthylènes (Myrjs)



Esters d'acides gras de sorbitan et polyoxyéthylènes (Tween)



R = radicaux aliphatiques
P = chaînes polyoxyéthylènes

Les caractéristiques spectrophotométriques de chaque groupe (8, 9), qui en permettent l'identification, sont les suivantes :

Acides gras : leur identification se base sur la présence des bandes d'absorption suivantes :

1 725 - 1 700 cm^{-1} v. C=O (carboxylique libre) (*)
950 - 900 cm^{-1} d. O—H (carboxylique libre).

Ce groupe se caractérise aussi par l'absence de la large bande causée par les OH associés (3 550-3 200 cm^{-1}), qui apparaît dans les autres groupes de surfactifs.

D'autres absorptions d'un intérêt moindre pour l'identification, puisqu'elles se présentent avec de légères variations dans tous les surfactifs, sont les absorptions comprises dans la région de 3 010 à 2 840 cm^{-1} (v. C—H, des groupements CH, CH_2 et CH_3).

Dans les acides gras et dans les surfactifs qui les contiennent (tous, excepté les polyoxyétylènes), il apparaît aussi des absorptions en 1 470 - 1 435 cm^{-1} (d. C—H en C—CH_3) et en 750-720 cm^{-1} (r. CH en $(CH_2) \geqslant 4$).

Mono- et diglycérides d'acides gras : ils présentent les bandes d'absorption suivantes :

3 550 - 3 200 cm^{-1}	v. O—H assoc.	(bande très large)
1 750 - 1 735 cm^{-1}	v. C=O	(ester)
1 200 - 1 170 cm^{-1}	v. C—O—C	(ester)
1 120 - 1 030 cm^{-1}	d. O—H	(alcool secondaire)
1 075 - 1 000 cm^{-1}	d. O—H	(alcool primaire)

De la même façon que dans les acides gras, apparaissent les bandes d'absorption dues aux chaînes alifatiques entre 3 010 et 2 840 cm^{-1} ; les bandes d. C—H en 1 470-1 435 cm^{-1} et la bande r. CH en $(CH_2) \geqslant 4$ en 750-720 cm^{-1}.

Esters d'acides gras avec sorbitan : pour leur identification il faut tenir compte de leur bande d'absorption :

1 150 - 1 060 cm^{-1} v. C—O (éther).

Ils présentent aussi les bandes v. O—H associées de la région 3 550 - 3 200 cm^{-1} ; celles qui sont situées dans la région de 3 010 - 2 840 cm^{-1} de chaînes alifatiques ; celles qui sont dues à la fonction ester 1 750 - 1 735 cm^{-1} et 1 200 - 1 170 cm^{-1}, et les autres, déjà citées, communes au chaînes grasses.

Esters d'acides gras de la saccharose : les surfactifs de ce groupe présentent les deux absorptions typiques de la saccharose : l'une en 991 cm^{-1}, attribuée au groupe O—C—O—C—O, et l'autre en 935-926 cm^{-1}, qui forment deux bandes consécutives très caractéristiques.

Il y a en outre toutes les bandes d'absorption citées pour les surfactifs qui appartiennent au groupe précédent.

Polyoxyéthylènes : parmi les nombreuses bandes d'absorption, les plus caractéristiques sont les suivantes :

1 123 - 1 100 cm^{-1} v. $(—CH_2—CH_2—O—)_n$

Dans les liquides elle est très forte et large ; dans les solides elle est aussi très forte, mais moins large :

1 370 - 1 333 cm^{-1} v. CH_2

simple ou double selon le poids moléculaire :

962 - 944 cm^{-1} v. $(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n$

(*) Quand l'acide est salifié, la v. C=O se déplace vers 1 560 cm^{-1} et la d. O—H disparaît. Quand l'acide est estérifié la v. C=O se déplace vers 1 740 cm^{-1} et la d. O—H disparaît aussi.

Fréquemment dédoublée dans les solides la première s'intensifie avec le degré de cristallisation :

953 - 926 cm^{-1}

Dans les liquides, large :

862 - 833 cm^{-1} r. CH_2

Son intensité augmente avec la longueur des chaînes (POE) dans les liquides :

848 - 841 cm^{-1} r. CH_2

Très forte dans les solides.

Il apparaît aussi les bandes en 3 550-3 200 cm^{-1} des OH associés ; celles de la région 3 010-2 840 cm^{-1} des CH_2, mais par contre les absorptions en 1 750-1 735 cm^{-1} et 1 200-1 170 cm^{-1} correspondant aux esters n'existent pas, de la même façon que n'existent pas non plus ni l'absorption en 1 725-1 700 cm^{-1} du v. C = O carboxylique libre, ni l'absorption en 750-720 cm^{-1} du groupement $(CH_2) \geqslant 4$.

Esters d'acides gras avec polyoxyéthylènes : leurs spectres présentent les bandes caractéristiques de la fonction ester gras et celles des polyoxyéthylènes.

Esters d'acides gras de sorbitan et polyoxyéthylènes : les spectres infra-rouge de ces surfactifs sont analogues à ceux du groupe précédent puisque l'absorption de la fonction ester du sorbitan est cachée par l'intense bande des POE, ce qui empêche de les différencier de ceux du groupe antérieur.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Spectres infra-rouge de surfactifs

Dans la bibliographie générale sur les surfactifs, il existe d'abondants renseignements sur leurs spectres infra-rouge (8, 9) ; néanmoins, étant donné que ces substances, en leur qualité technique, n'ont généralement pas de composition définie, nous avons considéré nécessaire d'obtenir les spectres infra-rouge des produits commerciaux qui existent sur le marché espagnol.

L'analyse spectrophotométrique a été faite au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, modèle 237, en opérant sur une pellicule du surfactif obtenue en laissant évaporer quelques gouttes de sa solution chloroformique, sur un prisme de ClNa. Il convient de noter que la technique d'obtention de la pellicule influe sur le spectre, par suite de phénomènes de cristallisation, de l'action du solvant, etc.

Les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 montrent les spectres d'absorption en infra-rouge d'un représentant de chacun des groupes de surfactifs étudiés, où l'on peut vérifier la présence des bandes d'absorption mentionnées pour chaque groupe.

Extraction et purification de surfactifs

Ayant observé que les surfactifs auxquels nous nous sommes limités sont parfaitement solubles dans le chloroforme, l'extraction se réalise au moyen de ce solvant à chaud pour faciliter l'épuisement. On opère avec 10 à 20 g de « café soluble » qui, une fois desséchés au four à 105° C, sont soumis à l'extraction dans un appareil du type Grossfeld.

On concentre à sec l'extrait chloroformique sur bain d'air, et le résidu est traité avec du chloroforme à froid afin d'éliminer les matières interférentes. L'analyse spectrophotométrique de la pellicule obtenue à partir de cette dernière solution chloroformique ne permet pas d'établir des conclusions, à cause de la présence de caféine (comparons les spectres des figures 8, 9 et 10, qui correspondent respectivement à de la caféine cristallisée, à de la caféine en solution chloroformique et à du « café soluble ».

Donc, profitant de la grande solubilité de la caféine dans l'eau froide, en contraste avec la faible solubilité des surfactifs (exception faite des POE et de leurs dérivés), on soumet le résidu chloroformique à une ou deux extractions avec de l'eau distillée, on sépare l'insoluble par centrifugation (4 000-5 000 r. p. m.) et même parfois par filtration, on le dessèche et on l'analyse spectrophotométriquement suivant la technique déjà mentionnée.

En opérant dans ces conditions, on obtient des spectres pratiquement exempts des bandes de la caféine (comparons les spectres des figures 10 et 11 qui correspondent à un même « café soluble », avant et après l'élimination de la caféine moyennant son extraction par l'eau).

La technique a été essayée avec divers surfactifs ajoutés en quantité d'environ 0,25 % du « café soluble » exempt de surfactifs et les spectres obtenus coïncident avec ceux qui correspondent au surfactif ajouté.

Les surfactifs solubles dans l'eau accompagnent la caféine dans la solution aqueuse, et pour les identifier il faut réaliser une séparation la plus parfaite possible.

Pour cela, profitant de l'action insolubilisante du carbonate de soude pour les POE et leurs dérivés (10), on traite la solution aqueuse avec du carbonate de sodium jusqu'à saturation, on l'agite plusieurs fois et on centrifuge. Le surfactif une fois séparé est recueilli au moyen d'une spatule ou d'une pipette, transféré dans un verre de montre, desséché et finalement soumis à l'analyse spectrophotométrique.

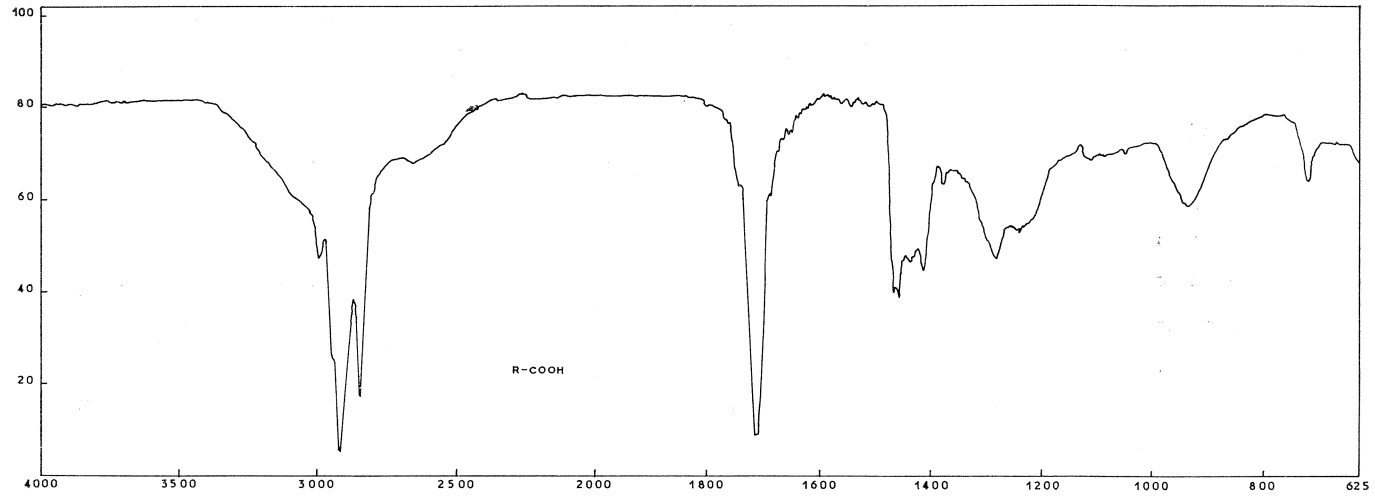


Fig. 1.

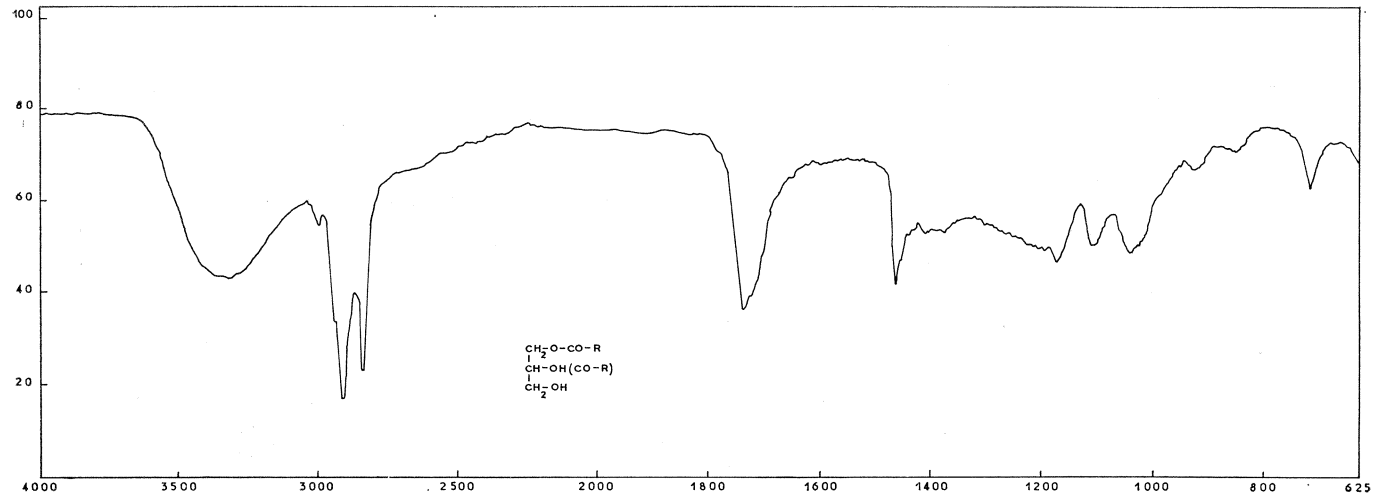


Fig. 2.

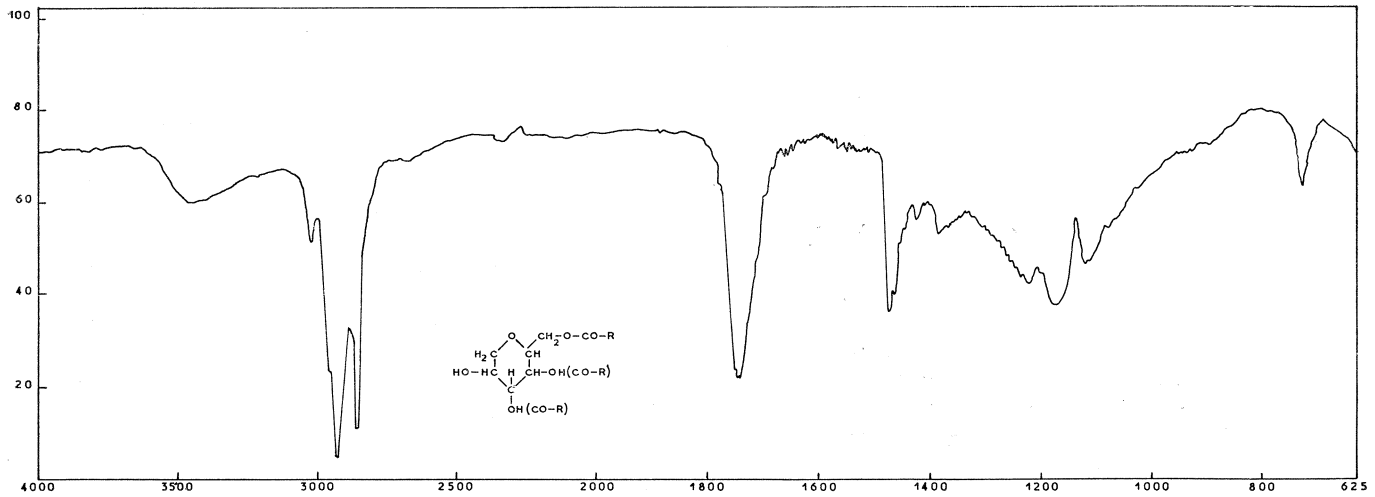


Fig. 3.

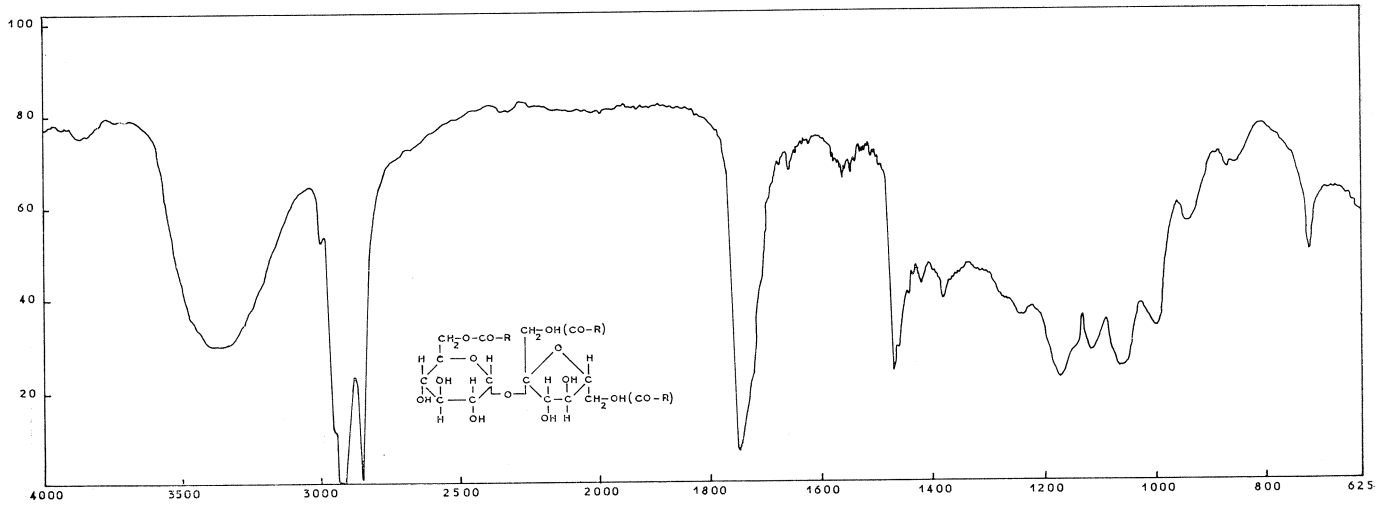


Fig. 4.

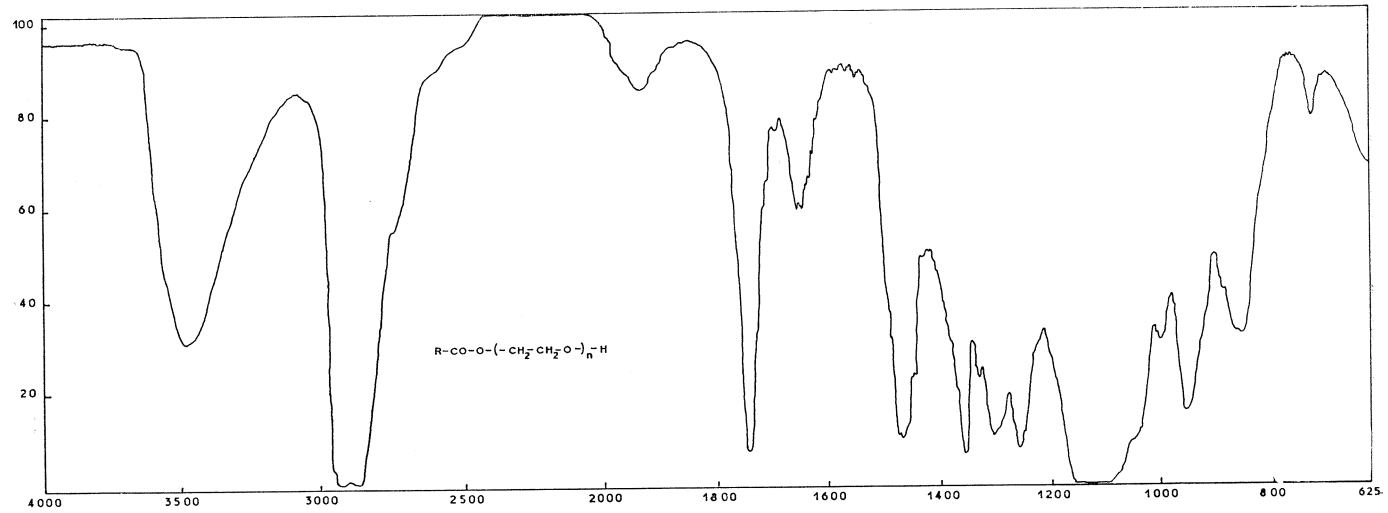


Fig. 5.

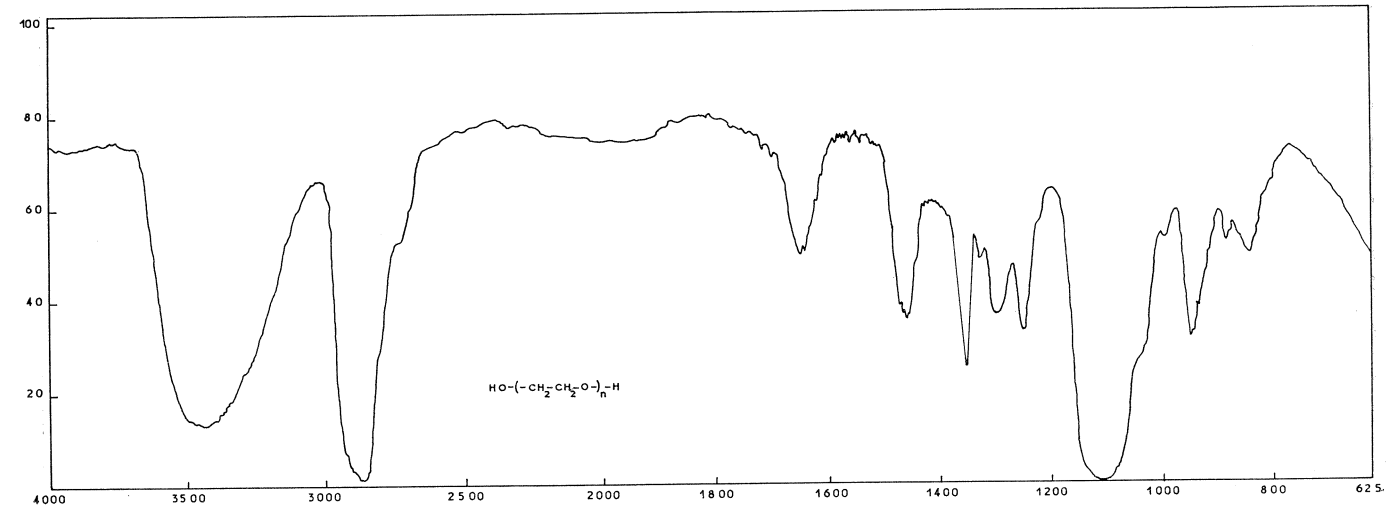


Fig. 6.

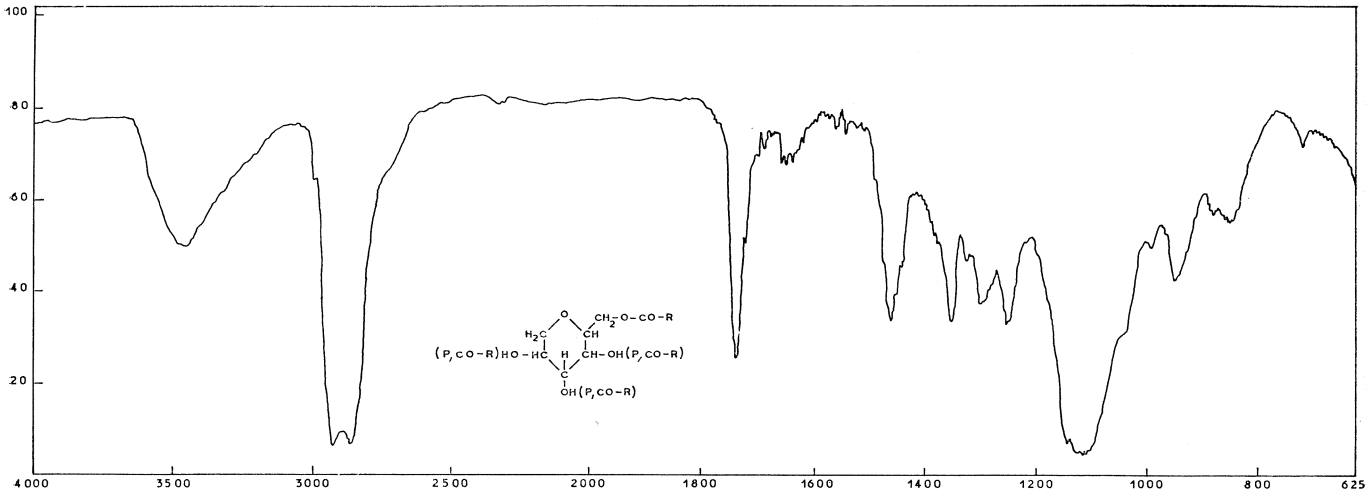


Fig. 7.

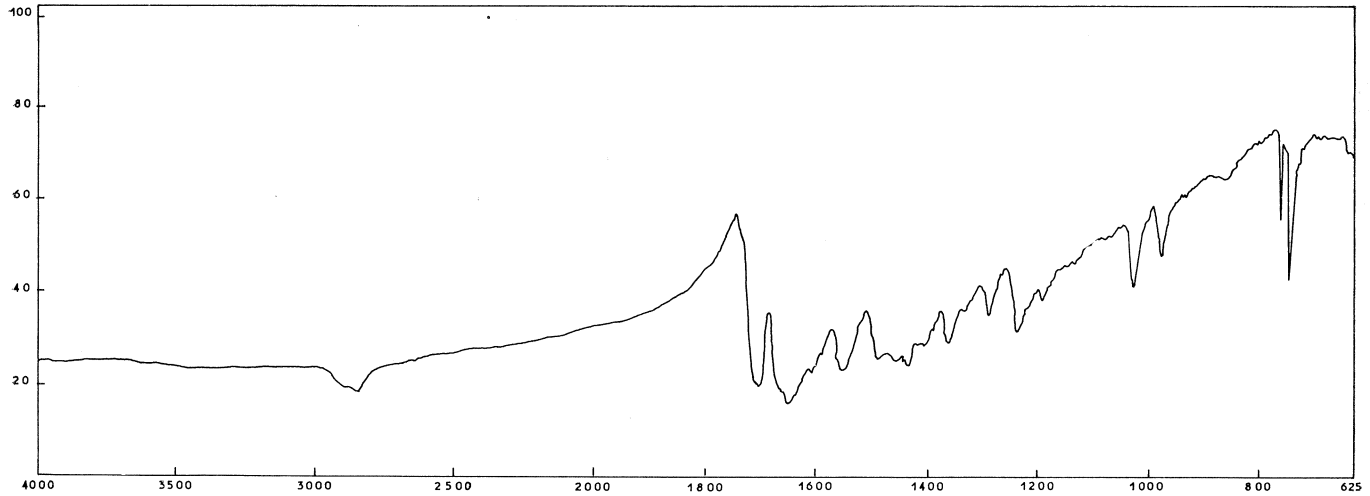


Fig. 8.

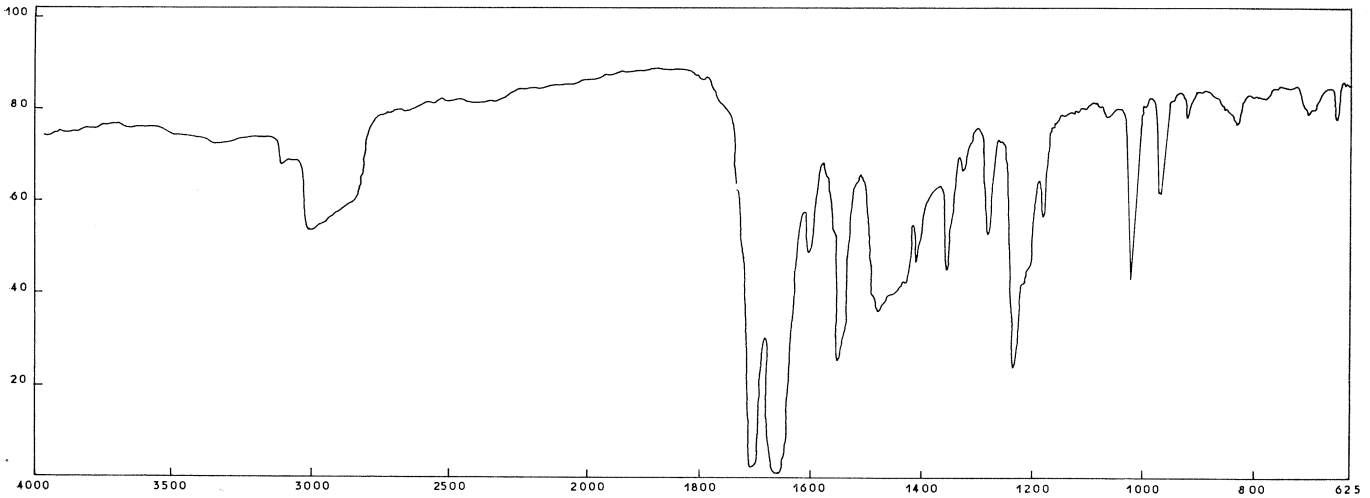


Fig. 9.

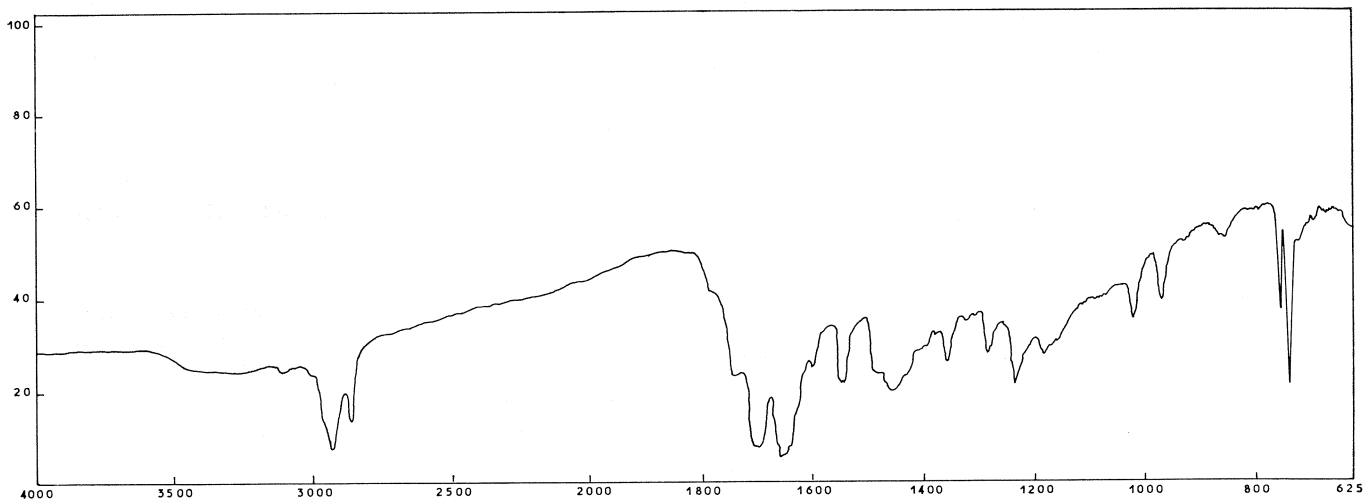


Fig. 10.

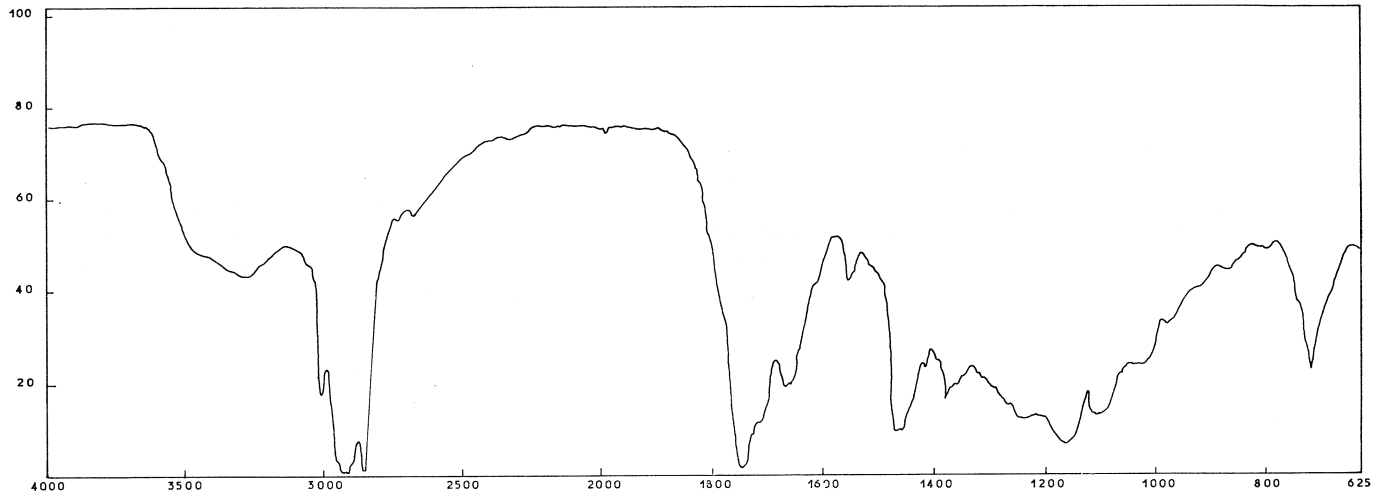


Fig. 11.

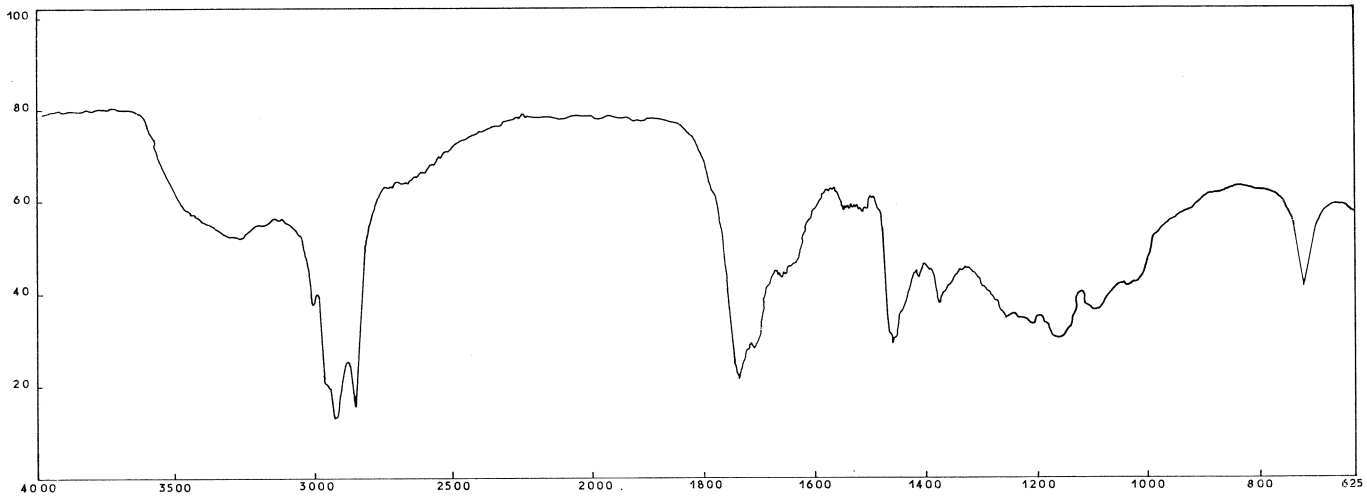


Fig. 12.

S'il n'y en avait qu'une petite quantité ou s'il s'agissait d'un surfactif liquide, on pourrait ajouter du benzène qu'on laisse surnager ; en agitant soigneusement au moyen d'une baguette, on réussit à faire passer le surfactif dans la phase benzénique. La solution benzénique est amenée à sec et le résidu est analysé en infra-rouge.

Application à l'analyse de cafés solubles

La technique d'extraction et de purification du surfactif a été appliquée à l'analyse de cinq cafés solubles en vente sur le marché espagnol. Les spectres obtenus (figures 11 et 12) montrent que la présence d'un surfactif du groupe des mono- et di-glycérides est possible dans deux des cafés solubles. On observe clairement les bandes de OH primaires et secondaires, en 1 075-1 000 cm^{-1} et 1 120-1 030 cm^{-1} respectivement, ainsi que celles des OH associés, en 3 550-3 200 cm^{-1}, et celles qui correspondent aux glycérides neutres.

Afin d'en confirmer la présence, nous avons fait l'application de la chromatographie en couche mince, en opérant avec des plaques de silicagel G activé et en employant un mélange d'éther et de n-hexane (1 : 1) comme phase mobile (11), ce qui permet la séparation entre mono-, di- et tri-glycérides ; ces derniers se déplacent avec le front du solvant tandis que les di-glycérides présentent un Rf proche de 0,5, et les mono-glycérides restent pour ainsi dire sur le point de départ. Pour la détection on a utilisé la fluorescéine et la lumière de Wood. Le procédé nous a permis de vérifier l'existence des surfactifs détectés par la spectrophotométrie infra-rouge.

Les spectres des trois autres échantillons n'ont pas présenté d'absorptions caractéristiques des surfactifs étudiés ; ils ont seulement présenté les absorptions qui correspondent à la graisse naturelle du café.

Appréciation de la décaféination des cafés solubles par spectrophotométrie infra-rouge

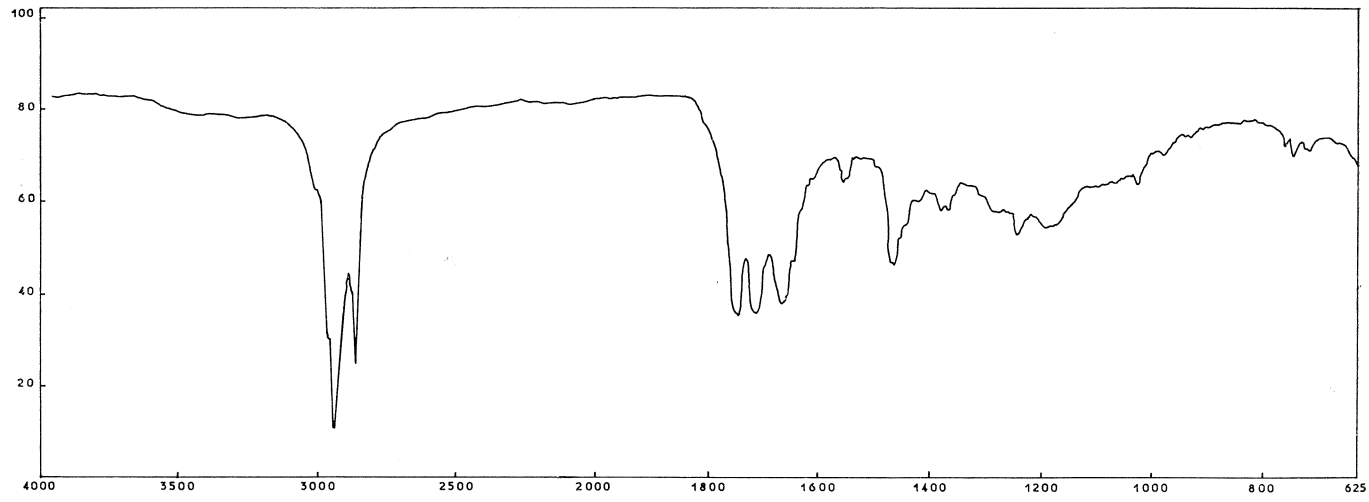
Pendant le cours de nos travaux nous avons pu nous rendre compte que la spectrophotométrie infra-rouge peut être employée pour le contrôle rapide du degré de décaféination des cafés solubles.

Si l'on réalise un spectre de l'extrait chloroformique obtenu à froid, suivant la technique que nous avons proposée, la relation qui existe entre les bandes d'absorption en 1 740 cm^{-1}, correspondant à la fonction ester de la graisse naturelle du café, et les bandes correspondant à la caféine, en 1 710 et 1 670 cm^{-1}, nous renseigne sur la teneur en caféine du café soluble.

A titre d'exemple, nous pouvons voir les spectres des figures 10 et 13, qui correspondent à deux cafés solubles, l'un normal et l'autre décaféiné, respectivement. Dans le premier, on observe que la bande de la fonction ester est réduite à une petite inflexion, tandis que les absorptions de la caféine sont très accusées ; dans le second, la bande d'ester est très rehaussée, tandis qu'au contraire les bandes d'absorption de la caféine sont très réduites.

Nous nous proposons de compléter cette étude dans de prochains travaux.

Fig. 13.



BIBLIOGRAPHIE

1. M. B., JACOBS. — Synthetic Food Adjuncts. Van Nostrand Co, N. Y. 1947 .
2. S. W. SOUCI und E. MERGENTHALER. — Frendstoffe in Lebensmitteln. Verlag von J. F. Bergmann. München 1958.
3. S. W. SOUCI und E. MERGENTHALER. — Handbuch der Lebensmittelchemie. Von Acker, Bergner, etc. Springer-Verlag, Berlin, 1965, I.
4. E. KRÖLLER. — Untersuchungen zum Nachweis von Emulgatoren in Lebensmitteln, 3 Mitteilung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1963, 6.
5. LEDOGA S. p. A. — Bolletino Tecnico, 1962.
6. T. LOURIC, M. BOSKOVIK and Z. SABLEK. — *Chem. Abstr.*, 1966, **65**, 11231.
7. FAO. — Inspección y Vigilancia de aditivos alimentarios, números 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.
8. D. HUMMEL. — Identification and Analysis of Surface-active Agents by Infrared and Chemical Methods . Interscience publishers. N. Y. 1962.
9. M. J. ROSEN and H. A. GOLDSMITH. — Systematic Analysis of Surface-active Agents. — Interscience publishers. N. Y. 1960.
10. M. J. SCHICK. — Nonionic Surfactants. — Marcel Dekker, Inc., N. Y. 1967.
11. F. MAZUELOS et coll. — *Grasas y Aceites* (Madrid), 1964, **15**, 12.

CHARRO ARIAS (A.), SIMAL LOZANO (J.), VILLAR NOGUEIRA (D.). — **Contribution à l'étude des cafés solubles au moyen de la spectrophotométrie infra-rouge.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 165-174, fig., réf.

Dans le contrôle analytique des cafés solubles, il est entre autres intéressant de connaître la présence de surfactifs synthétiques, étant donné que leur emploi possible est signalé dans la littérature. Compte tenu du grand nombre de surfactifs que l'industrie fabrique de nos jours, il se peut que l'on en utilise qui ne soient pas autorisés.

L'étude chimique des surfactifs présentant quelques difficultés faute d'un procédé adéquat, on a utilisé la spectrophotométrie infra-rouge qui donne d'intéressantes indications pour une identification ultérieure et une détermination par d'autres méthodes.

Le surfactif a été extrait en mettant à profit sa solubilité dans le chloroforme à chaud, puis, après un traitement approprié de l'extrait, le spectre de celui-ci a été obtenu à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, modèle 237, et comparé aux spectres des surfactifs représentatifs de chaque groupe. La spectrophotométrie infra-rouge a été également utilisée pour le contrôle rapide du degré de décaféination dans des extraits de café décaféiné du commerce.

CHARRO ARIAS (A.), SIMAL LOZANO (J.), VILLAR NOGUEIRA (D.). — **Contribution to the study of soluble coffee by means of the infra-red spectrophotometry.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 165-174, fig., réf.

For the analytical control of the soluble coffees it is interesting, among other researches, to know the presence of synthetic surfactants, seeing that their possible use is pointed out in the literature.

Because of the great number of surfactants that the industry provides nowadays, it is possible that some non-authorised ones may be used and, as their chemical study offers difficulties for lack of an adequate process, the I. R. spectrophotometry has been applied, as it enables a valuable orientation for further identification and determination by other methods.

The authors attain the extraction of the surfactant by making the best of its solubility in hot chloroform, and, after a suitable treatment of the extract, they obtain its spectrum by means of a spectrophotometer Perkin-Elmer, mod. 237, which is studied comparatively with the spectra of the surfactants representative of each group.

They have also employed the I. R. spectrophotometry for the rapid control of the decafeination degree in the extracts of coffee offered under such a denomination.

CHARRO ARIAS (A.), SIMAL LOZANO (J.), VILLAR NOGUEIRA (D.). — **Beitrag zur Untersuchung des löslichen Kaffees mittels der infraroten Spektralphotometrie.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 165-174, fig., réf.

Bei der analytischen Kontrolle des löslichen Kaffees ist u. a. die Kenntnis der Anwesenheit von oberflächenaktiven synthetischen Stoffen von Interesse, da die Literatur auf ihre mögliche Verwendung hinweist. Angesichts der grossen Anzahl an oberflächenaktiven Stoffen welche die Industrie heute herstellt könnte es vorkommen, dass einige von ihnen verwendet werden, ohne erlaubt zu sein.

Da die chemische Untersuchung der oberflächenaktiven Stoffe in Ermangelung eines angemessenen Verfahrens mit Schwierigkeiten verbunden ist, wurde die infrarote Spektralphotometrie verwendet, die interessante Hinweise für eine spätere Kennzeichnung und eine Bestimmung mittels anderer Methoden liefert.

Der oberflächenaktive Stoff wurde unter Ausnützung seiner Löslichkeit im Chloroform warm extrahiert ; sodann wird nach einer angemessenen Behandlung des Extrakts das Spektrum des letzteren mit Hilfe eines Spektralphotometers Perkin-Elmer Modell 237 gemessen und mit den Spektren der für jede Gruppe typischer oberflächenaktiver Stoffe verglichen. Die infrarote Spektralphotometrie wurde ebenfalls für eine Schnellkontrolle des Coffeingehalts in den Extrakten von handelsüblichem coffeinfreiem Kaffee verwendet.

DISCUSSION

M. SIMON : M. Charro Arias peut-il me dire si beaucoup de cafés solubles espagnols renferment des surfactifs ?

M. CHARRO ARIAS : Nous avons limité notre étude à cinq cafés solubles et avons trouvé des surfactifs dans deux d'entre eux.

COMPOSITION ET CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DE *COFFEA* SAUVAGES DE MADAGASCAR (*)

IV. – ISOLEMENT ET ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE LA CAFAMARINE, SUBSTANCE AMÈRE DE *C. BUXIFOLIA*

F. CHASSEVENT, M. d'ORNANO, S. POUGNEAUD

Institut Français du Café et du Cacao, Paris



Mlle F. CHASSEVENT

INTRODUCTION

L'étude des cafés sauvages, et plus particulièrement de leurs substances amères, présentée à Paris lors du Deuxième Colloque sur la Chimie des Cafés (1) a été poursuivie.

Cette fois, nous nous sommes attachés plus spécialement à l'étude du principe amer de *Coffea buxifolia*. En effet, les premières recherches avaient montré l'intérêt de cette espèce : l'application de techniques fines de purification n'a jamais permis d'y déceler la présence de caféine. Les boissons préparées tant à partir de café vert que de café torréfié présentent une amertume très forte ; une fraction très amère présentant un spectre caractéristique dans l'ultraviolet a été isolée des extraits aqueux ou éthanoliques. D'autre part, l'échantillon mis à notre disposition était suffisamment important pour nous permettre des recherches approfondies, ce qui n'est malheureusement pas le cas pour tous les cafés sauvages que nous désirons étudier.

Dans un but de simplification, nous avons conservé le terme de cafamarine, introduit par G. BERTRAND en 1901, à propos du constituant amer de *Coffea humblotiana* (2). Toutefois, cette dénomination ne préjuge en rien des caractéristiques et de la structure de la fraction amère de *Coffea buxifolia*, de même qu'elle ne tend pas à affirmer que l'amertume de certains cafés sauvages est due à un constituant unique et identique pour tous.

1re partie de cette étude : I. Recherches préliminaires sur leur teneur en caféine et isolement de la cafamarine. Second Colloque Int. Chimie Cafés (Paris), 3-7 mai 1965. I. F. C. C. (Paris), 1966, p. 131-144. 2e et 3e partie : II. Recherche de la caféine et d'autres méthylxanthines dans les feuilles et les graines de caféiers sauvages et cultivés ; III. Cafamarine et trigonelline contenues dans les graines de trois caféiers sauvages. Troisième Colloque Int. Chimie Cafés (Trieste), 2-9 juin 1967 A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 101-114.

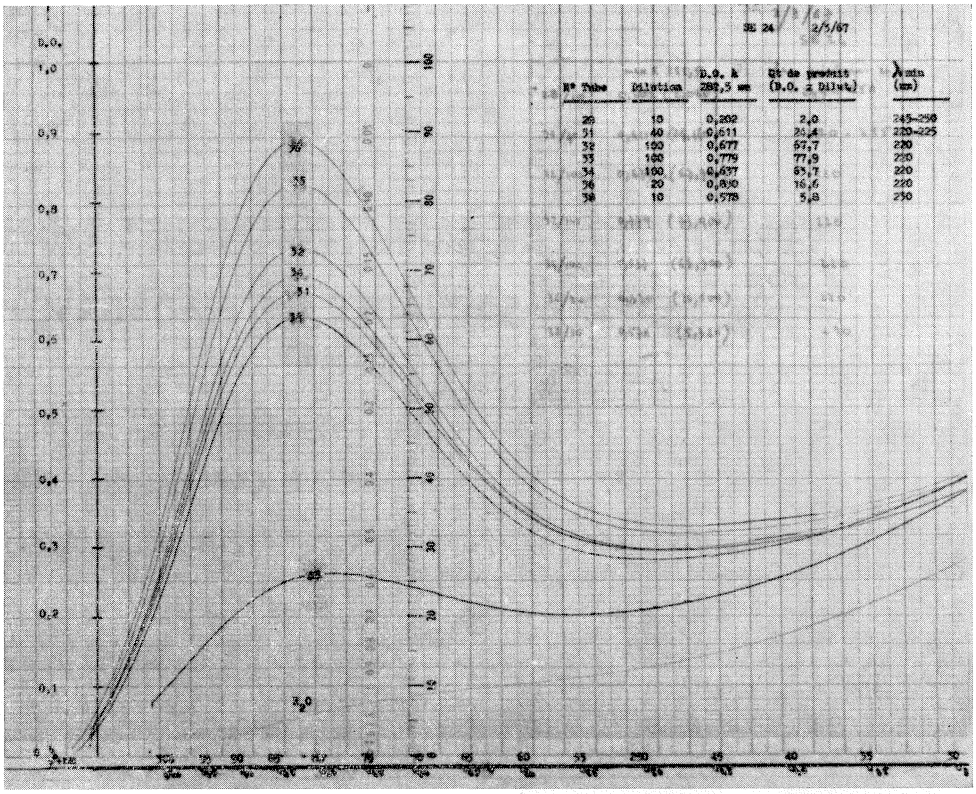


Fig. 1. — *Spectre d'absorption UV de la cafamarine éluée sur gel Sephadex * G 10 par l'eau (SE 24)*

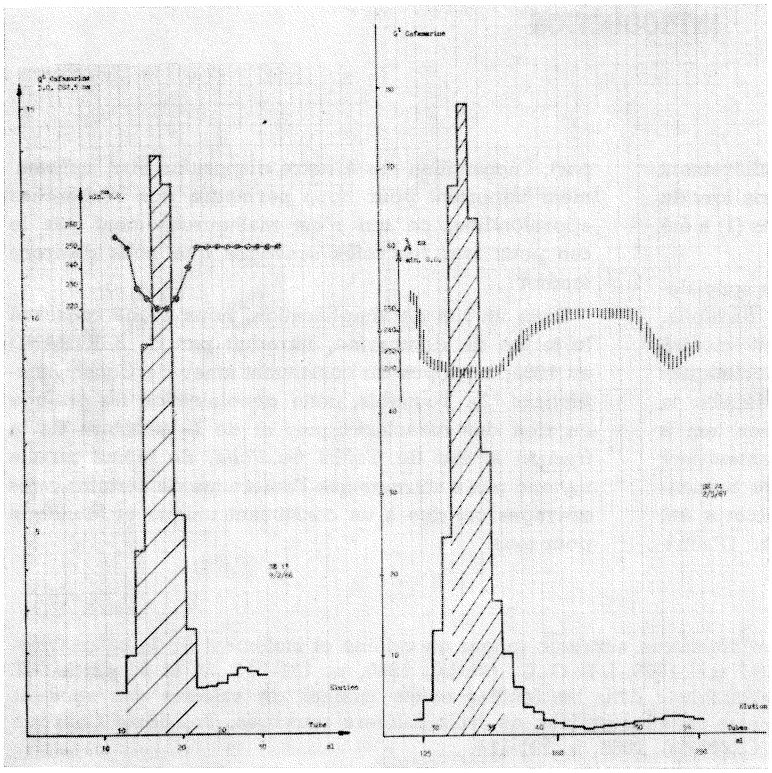


Fig. 2. — *Courbes d'élution de la cafamarine sur gel Sephadex * G 10 (SE 13, SE 24)*

CARACTÉRISTIQUES DE LA CAFAMARINE DE *Coffea buxifolia*

Avant d'aborder la description des techniques ayant permis d'isoler et de purifier la cafamarine, il serait bon de rappeler quelques-unes de ses caractéristiques.

A température ambiante, elle se présente sous la forme d'une masse amorphe, légèrement poisseuse, blanc à blanc-jaunâtre. Par chauffage, même modéré, elle brunit très rapidement et tend à caraméliser. Il faut donc prendre les plus grandes précautions lors de la concentration des extraits et travailler, sinon à température ambiante, à température douce.

A froid, la cafamarine est très soluble dans l'éthanol, le butanol, peu soluble dans l'isopropanol et l'alcool amylique, très peu soluble dans le chloroforme, l'acétone, l'acétate d'éthyle. Elle est insoluble dans l'éther et le sulfure de carbone.

La cafamarine ne présente pas de fonction acide ou basique nette.

Sa particularité la plus immédiate est la forte intensité de son amertume, comme nous avons pu le constater au cours des recherches préliminaires, alors que la dégustation seule nous permettait de la situer.

Nous savons maintenant qu'elle présente un spectre d'absorption caractéristique dans l'ultraviolet avec un maximum à 282,5 nm et un minimum vers 220 nm, en solution aqueuse, dans les cas de plus grande pureté obtenue. L'emplacement du maximum peut nous suggérer la présence d'une fonction cétone ou d'une fonction aldéhyde.

ISOLEMENT DE LA CAFAMARINE

Pour l'expérimentation qui va suivre, nous sommes toujours partis de *Coffea buxifolia* vert recueilli à Madagascar par les soins de la station de l'I. F. C. C.

Au cours des premiers essais d'obtention de la cafamarine, celle-ci a été extraite de *Coffea buxifolia* broyé, par l'eau à ébullition, pendant 1 heure 30 environ. Par la suite, disposant d'un broyeur homogénéiseur (Ultra-Turrax, Janke u. Kunkel K. G.), nous l'avons extraite à froid par l'éthanol pendant quelques minutes, notre principal souci n'étant pas d'obtenir une extraction totale. Les extraits ainsi obtenus étaient alors centrifugés. La solution surnageante, toujours trouble, était débarrassée des protéines par plusieurs précipitations à l'éthanol et centrifugations successives, jusqu'à obtention d'une liqueur limpide. L'éthanol était ensuite éliminé dans un évaporateur rotatif sous vide et le résidu était repris par l'eau en vue de sa purification ultérieure. Pour les extraits éthanoliques, nous avons dû, au préalable, procéder à une extraction liquide-liquide, entre éthanol et hexane, afin d'éliminer les matières grasses solubilisées au cours de l'extraction et susceptibles de nous gêner dans la suite de l'étude.

La cafamarine impure en solution aqueuse était alors filtrée sur résine (Amberlite* IR-120, 16-50 mesh) sous forme H^+, contenue dans une colonne de diamètre interne 1 cm et de longueur 25 cm. Le filtrat et le rinçage aqueux obtenus étaient rassemblés, concentrés dans l'évaporateur rotatif sous-vide et filtrés sur une résine (Amberlite* IR-45, 16-50 mesh) sous forme OH^-, contenue dans une colonne de mêmes dimensions que la précédente.

Les caractéristiques spectrales de la solution ainsi obtenue ne nous semblant pas assez satisfaisantes et jugeant qu'il devait être possible d'obtenir une plus grande pureté, nous avons pensé que la purification sur gel de Sephadex* serait une façon convenable et élégante de résoudre ce problème. Après plusieurs essais sur différents types de Sephadex*, nous avons choisi le Sephadex* G 10, qui convient au fractionnement des solutés de poids moléculaire inférieur à 700 et à certaines études de structure.

Les extraits purifiés sur colonnes cationique et anionique ont été concentrés, déposés sur colonne de gel de Sephadex* G 10 d'un diamètre interne de 2,5 cm et de longueur 45 cm, élués par l'eau et recueillis par fraction au moyen d'un collecteur. Chaque fraction (de volume variable selon les essais) a été étudiée au spectrophotomètre d'absorption dans l'ultraviolet (Zeiss PMQ II et enregistreur Graphisphot GRVAM, SEFRAM).

La figure 1 présente les spectres d'absorption dans l'ultraviolet des fractions intéressantes obtenues par élution sur gel de Sephadex* G 10. Les quantités de cafamarine présentes dans chaque fraction ont été exprimées de façon arbitraire en multipliant la densité optique (pour une épaisseur de couche e = 1 cm) au maximum d'absorption par la dilution. On constate la formation d'un pic d'élution, dont le maximum se situe au 33e tube dans les conditions de l'essai (SE 24). Les spectres présentés ont tous un maximum d'absorption à 282,5 nm ; le minimum se déplace vers les plus faibles longueurs d'onde lorsque la concentration en cafamarine des tubes augmente.

La figure 2 donne deux exemples de courbe d'élution de la cafamarine sur gel de Sephadex* G 10. On a porté en abscisse les numéros des tubes du collecteur (ou les volumes écoulés) et en ordonnée les quantités arbitraires de cafamarine ; le volume recueilli par tube est différent pour chacun des essais, SE 13, SE 24. On a complété les figures en représentant l'évolution de l'emplacement du minimum spectral en fonction du volume écoulé. On remarque que c'est au maximum de

* Marque déposée

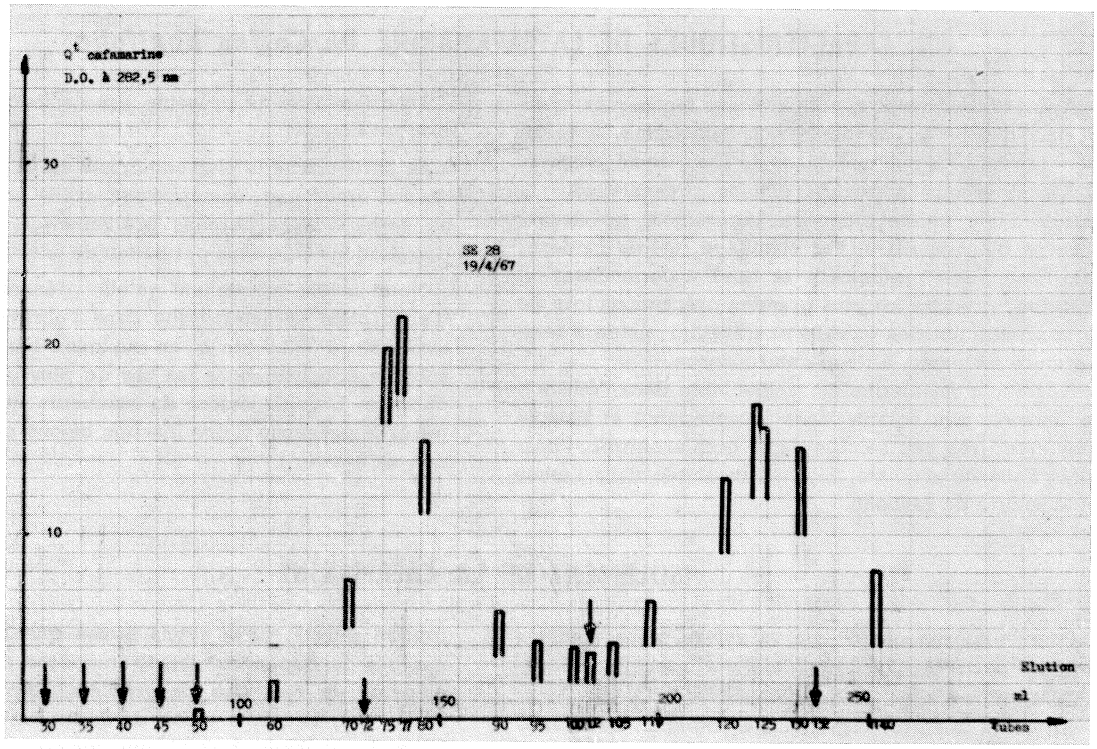


Fig. 3. — *Courbe d'élution de l'hydrolysat de cafamarine sur gel Sephadex * G 10 (SE 28)*

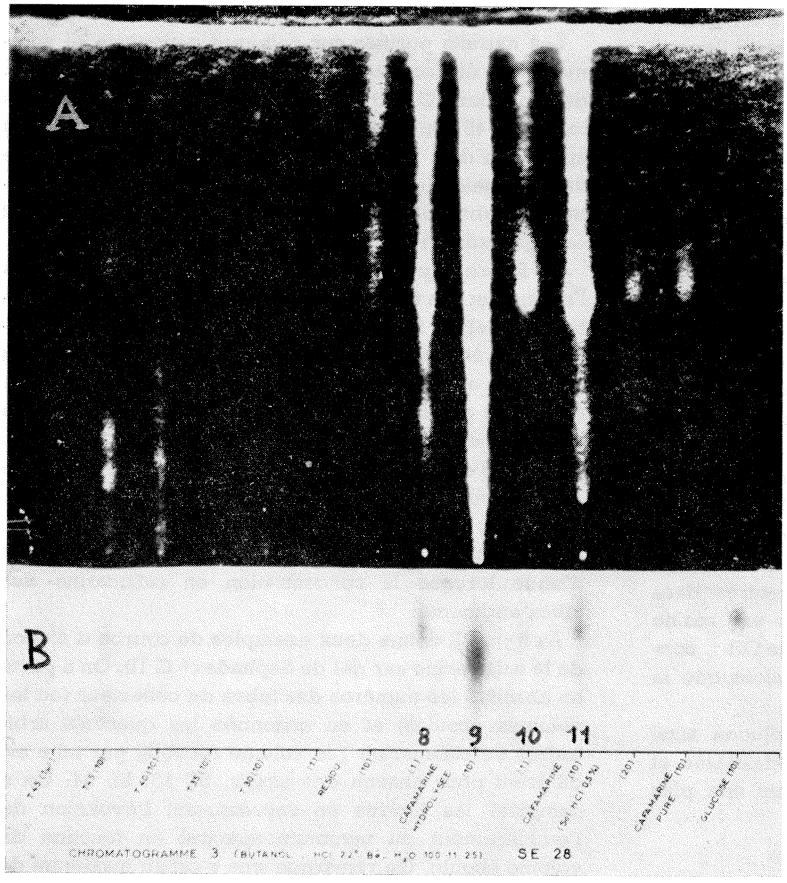


Fig. 4. — *Chromatogramme nº 3 (SE 28)*

la courbe d'élution de la cafamarine que l'on a le minimum spectral le plus bas dans l'échelle de longueur d'onde (220 nm). Ceci est logique, car il est vraisemblable de penser que les impuretés susceptibles de perturber le spectre interfèrent moins lorsque la concentration en cafamarine est élevée. L'emplacement du minimum nous sert ainsi à estimer la pureté de la cafamarine obtenue. A la suite du pic d'élution de la cafamarine, on constate l'apparition d'un épaulement dû à une substance présentant le même spectre UV que la cafamarine, possédant un poids moléculaire moins élevé, du fait de son élution plus tardive (à moins qu'il ne s'agisse d'une substance plus adsorbée sur Sephadex*), et de structure vraisemblablement voisine. Son amertume paraît plus faible que celle de la cafamarine. Nous appelons cette substance « cafamarine *bis* ».

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DE LA CAFAMARINE

Essais d'hydrolyse

L'hypothèse que la cafamarine était un hétéroside nous a conduits à tenter de l'hydrolyser en vue d'une étude plus approfondie de sa structure. Une fraction de cafamarine, pure selon notre estimation, obtenue de la façon décrite précédemment, a été hydrolysée par l'acide chlorhydrique à 0,5 %, pendant 1 heure, au bain-marie bouillant. L'hydrolysat neutralisé par une résine anionique et filtré a été ensuite élué par l'eau sur une colonne de gel de Sephadex* G 10 et les fractions ont été recueillies au moyen du collecteur.

La figure 3 représente la courbe d'élution de l'hydrolysat sur gel de Sephadex* G 10. Toutes les fractions n'ayant pas été étudiées au spectrophotomètre, la représentation est discontinue. On voit que la cafamarine n'a été hydrolysée qu'en partie et que la réaction a produit une substance identique à la cafamarine *bis* par ses caractéristiques et son volume de rétention, à l'exclusion de tout autre corps présentant un spectre caractéristique dans l'ultraviolet. Les flèches portées sur le graphique correspondent aux tubes du collecteur de fractions dont le contenu concentré a été déposé sur papier (Schleicher et Schüll 2043 Mgb) et chromatographié par voie ascendante avec le mélange solvant : n-butanol-acide chlorhydrique à 22° Baumé-eau (100 : 11 : 25). On a chromatographié simultanément la cafamarine pure en solution éthanolique et en solution chlorhydrique à 0,5 %, l'hydrolysat non fractionné et le glucose. Les chromatogrammes développés étaient, après séchage, examinés sous lumière ultraviolette de courte longueur d'onde ($\neq$ 254 nm) et photographiés par simple contact, le chromatogramme étant appliqué sur le papier photographique sensible, sous le même rayonnement incident ; ainsi les spots correspondant à des substances absorbant la lumière ultraviolette apparaissent, à la photographie, en clair sur un fond noir. Ces chromatogrammes intacts ont été ensuite révélés par pulvérisation d'une solution de phtalate d'aniline (aniline 0,93 g, acide o-phtalique 1,66 g, dans 100 ml n-butanol saturé en eau) et séchage à 100° C. On a superposé aux chromatogrammes révélés (B) leur photographie sous lumière ultraviolette (A) en ne laissant apparaître que la partie intéressante de (B). Ces montages photographiés ont fourni les figures 4 et 5.

Le dépôt 8 du chromatogramme 3 (fig. 4), correspon-

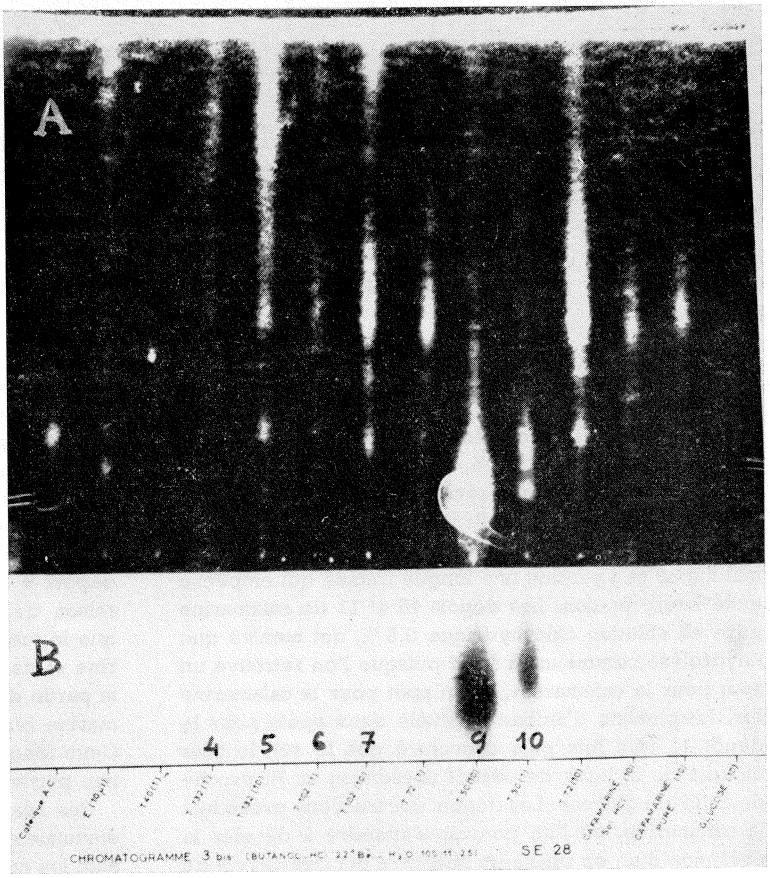


Fig. 5. — *Chromatogramme n° 3 bis (SE 28)*

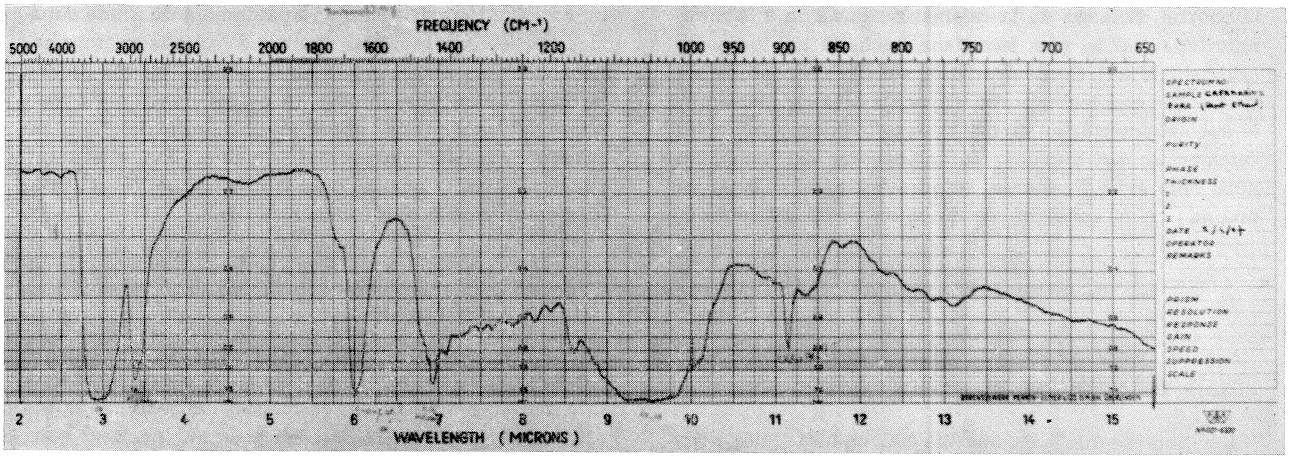


Fig. 6. — *Spectre infra-rouge de la cafamarine*

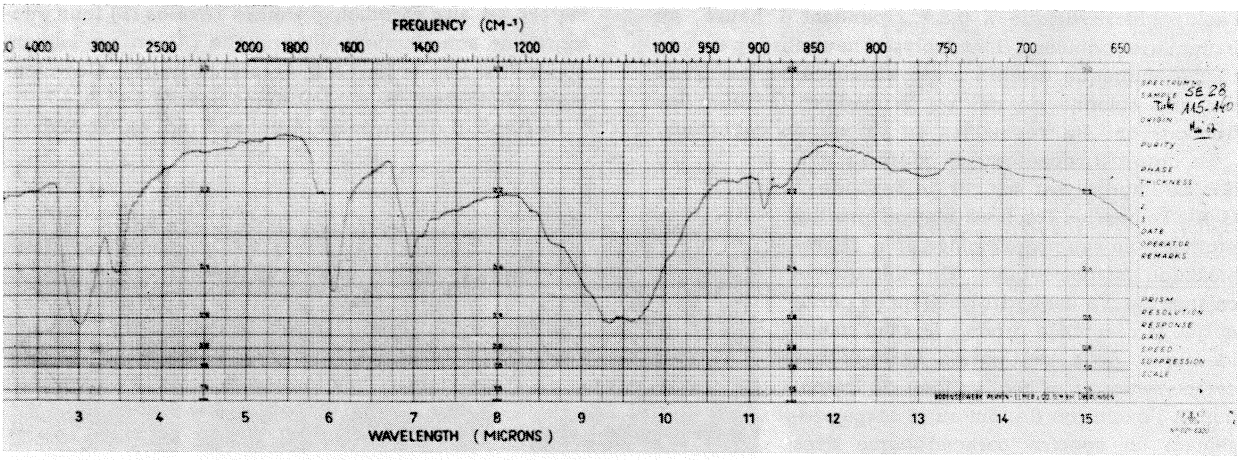


Fig. 7. — *Spectre infra-rouge de la cafamarine* bis

dant à l'hydrolysat de la cafamarine, a donné deux spots importants, assez mal séparés, absorbant la lumière ultraviolette (A). L'un correspond à la cafamarine pure et l'autre, de Rf plus élevé, à la cafamarine hydrolysée ou cafamarine *bis*. Le spot révélé en brun par le phtalate d'aniline (B) présente un Rf pratiquement équivalent à celui du glucose. Le dépôt 9, dix fois plus concentré, a mal migré et a produit une longue traînée qui empêche toute interprétation. Les dépôts 10 et 11 de cafamarine pure en solution chlorhydrique 0,5 % ont montré que l'hydrolyse commence à froid puisque l'on retrouve un spot pour la cafamarine, et un spot pour la cafamarine *bis*. Le phtalate d'aniline a révélé deux spots pour le dépôt 11 (dix fois plus concentré que le 10), le plus éloigné de la ligne de départ présentant un Rf proche de celui du glucose. Les dépôts des fractions précédant la cafamarine, où l'on pouvait s'attendre à déceler la présence d'un ou plusieurs sucres, n'ont rien révélé de caractéristique. Le chromatogramme 3 *bis* (fig. 5) montre que la séparation obtenue sur Sephadex* G 10 n'est pas parfaite, car les produits de l'hydrolyse se chevauchent quelque peu. Pour le tube 50 (9, 10) où débute l'élution de la cafamarine (décelée par spectrophotométrie), le phtalate d'aniline a révélé une tache importante de Rf inférieur à celui du glucose ; les dépôts 9 et 10 ont mal migré, vraisemblablement en raison de concentrations trop importantes. Il se peut que le tube 102 (6, 7) contienne un mélange de cafamarine et de cafamarine *bis*. Le tube 132 (4, 5), situé dans la partie descendante de la courbe d'élution de la cafamarine *bis*, contient encore des traces de cafamarine. Cette longue traînée est sans doute due à une adsorption partielle de la cafamarine sur Sephadex *.

Ces résultats nous montrent que l'hydrolyse n'a pas été totale et qu'il nous faut poursuivre les essais en modifiant les conditions opératoires.

Spectres infra-rouges

Grâce à l'obligeance de Mme HÉROS, du Laboratoire municipal de Paris, que nous tenons à remercier ici, nous avons obtenu des spectres infra-rouges de la cafamarine et de la cafamarine *bis* produite par hydrolyse. Il ne nous a malheureusement pas été possible de tracer un spectre significatif de la fraction supposée contenir un ou plusieurs sucres par suite de sa quantité trop réduite.

La cafamarine et la cafamarine *bis* dont on désirait étudier les spectres d'absorption IR ont été déposées en solution éthanolique sur deux lentilles de chlorure de sodium. Après évaporation de l'éthanol, les deux lentilles étaient accolées et placées sur le trajet du faisceau lumineux, les spectres étant tracés par rapport à l'air.

La cafamarine (fig. 6) présente les bandes d'absorption caractéristiques suivantes :

3.350 cm^{-1} (OH) ou (NH)
3.050 cm^{-1} (CH)
1.670 cm^{-1} (C = O) perturbé par une double liaison, ou (= C — CO —) sont possibles (OH)
1.440 cm^{-1} (CH_3)
1.090 — 1.020 cm^{-1} alcool primaire
895 cm^{-1} (CH)

Le spectre IR de la cafamarine *bis* (fig. 7) est très voisin avec des bandes d'absorption à 3.350, 3.050, 1.670, 1.440, 1.090-1.030, 895 cm^{-1}. Cependant, ces bandes sont moins intenses que dans le spectre de la cafamarine. Ces résultats montrent bien que l'hydrolyse n'a pas été totale et confirment l'hypothèse, faite après obtention des spectres d'absorption UV, selon laquelle cafamarine et cafamarine *bis* seraient des substances très proches.

Analyse élémentaire

Afin de circonscrire le problème, nous avions fait effectuer antérieurement une analyse élémentaire de la cafamarine**. Cependant la cafamarine analysée était encore assez impure et les résultats demandent à être vérifiés. Ces résultats étaient de l'ordre de :

C	49,9 %
H	7,9 %
O	36,3 %

La présence d'azote mise en évidence au cours d'un des essais (1,56 %) n'a pas encore été confirmée.

CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude ne nous permettent encore aucune affirmation quant à la structure de la cafamarine. Cependant, il paraît logique de supposer qu'il s'agit d'un glucoside constitué par un ou plusieurs sucres simples, du fait de son poids moléculaire peu élevé, comme le montre son volume de rétention sur gel de Sephadex*, accolé à un groupement aglycone vraisemblablement cétonique. De nouvelles analyses élémentaires sont nécessaires pour préciser sa composition centésimale ; elles nous permettraient également une meilleure interprétation des spectres d'absorption infra-rouge. Les essais d'hydrolyse vont être poursuivis en vue du fractionnement de la cafamarine en ses divers éléments. Enfin bien des informations utiles nous seraient fournies s'il nous était possible d'étudier la cafamarine par spectrographie de masse et par résonance magnétique nucléaire.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ORNANO (M. d'), CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. I/ Recherches préliminaires sur leur teneur en caféine et isolement de la cafamarine. Deuxième Colloque international sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Paris, 3-7 mai 1965. I. F. C. C. (Paris), 1966, p. 131-144.

(2) BERTRAND (G.). — Sur la composition chimique du café de la Grande-Comore. *C. R. Acad. Sci.*, 1901, vol. 132, p. 162-4 ; *Bull. Soc. Chim.*, 1901, vol. 25/26, p. 379-81.

* Marque déposée.

** Nous remercions le Service de microanalyse du C. N. R. S. pour la conduite de cette analyse.

CHASSEVENT(F.), ORNANO (M.d'), POUGNEAUD (S.). — **Composition et caractéristiques chimiques de *Coffea* sauvages de Madagascar. IV. — Isolement et étude de la structure de la cafamarine, substance amère de *C. buxifolia*.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 175-182 fig., réf.

La substance amère, cafamarine, a été extraite de *Coffea buxifolia* par l'eau ou l'éthanol et purifiée par passages successifs sur résine cationique, anionique et finalement sur gel de Sephadex* G 10. Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet et les courbes d'élution sur Sephadex* sont présentés. Des essais d'hydrolyse ont été tentés. Les hydrolysats ont été étudiés par chromatographie sur papier et spectrophotométrie dans l'infra-rouge après fractionnement préalable sur gel de Sephadex*. Les résultats obtenus sont discutés et doivent être précisés par des études ultérieures.

CHASSEVENT (F.), ORNANO (M. d'), POUGNEAUD (S.). — **Composition and chemical characteristics of the wild *Coffea* of Madagascar. IV. — Isolation and study of the structure of cafamarine, a bitter substance extracted from *C. buxifolia*.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 175-182 fig., réf.

The bitter substance, cafamarine, has been extracted from *Coffea buxifolia* by means of water or ethanol and purified by successive passages on cationic and anionic resins and finally on the gel of Sephadex * G 10. The absorption spectrum in the ultraviolet range and the elution curves on Sephadex * are shown. Hydrolysis trials have been tried out. The products of the hydrolysis have been examined by paper chromatography and spectrophotometry in the infra-red range after previous fractionation on the gel of Sephadex*. The results obtained are discussed and shall be more clearly defined by further study.

CHASSEVENT (F.), ORNANO (M.d'), POUGNEAUD (S.). — **Zusammensetzung und chemische Eigenschaften der wildwachsenden *Coffea* aus Madagaskar. IV. Isolierung und Prüfung der Struktur von Kafamarin, einem Bitterstoff von *C. buxifolia*.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 175-182 fig., réf.

Der Bitterstoff Kafamarin wurde mit Wasser oder Aethanol aus *Coffea buxifolia* extrahiert und nacheinander über Kationen und Anionen-Austauscher sowie über Sephadex* Gel G 10 gereinigt. Das UV Absorptionsspektrum und die Elutionskurven auf Sephadex* werden gezeigt. Hydrolyseversuche wurden unternommen. Die Hydrolysate wurden mittels Papierchromatographie und infrarote Spektralphotometrie nach vorheriger Fraktionierung durch Sephadex* Gel untersucht. Die Ergebnisse werden erörtert und werden in späteren Untersuchungen genau bekannt gegeben.

DISCUSSION

M. REYMOND : Je n'ai pas bien suivi les détails de vos chromatogrammes : cette cafamarine est-elle fluorescente ou s'agit-il d'une absorption ?

Mlle CHASSEVENT : La cafamarine n'est pas fluorescente ; il s'agit d'une absorption dans l'ultra-violet court à 254 nm.

REPORT OF THE WORKING PARTY ON COFFEE ODOUR RESEARCH METHODS

G. VERHAAR, C. WEURMAN



INTRODUCTION

G. VERHAAR
Royal Tropical Institute, Amsterdam

As a result of discussions held at the first « Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés » held in Paris in May 1963, a working group was created with the aim of bringing together a number of laboratories in which coffee aroma was being studied, particularly by means of gas chromatography. The secretariat of this group was established at the Royal Tropical Institute in Amsterdam, with Mr. HEESTERMAN as its secretary, while Dr. WEURMAN of the Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO at Zeist, Holland assumed the responsibility of technical co-ordinator. The reason I stand before you today is that I have replaced Mr. HEESTERMAN in his position at the Tropical Institute following his retirement and that I have also taken over from him the secretaryship of this working group. The technical activities of the group are still led by Dr. WEURMAN who will report later, following this introduction.

The activities of the group started with a joint analysis of the headspace mixture of an aqueous solution of ten volatile compounds, composed and distributed by Dr. WEURMAN to the participants. This sample was analyzed for the composition of its head space vapour and the resulting chromatograms were discussed by Dr. WEURMAN at the second colloquium, held in Paris in May 1965.

During this second colloquium the sub-committee on coffee odour research methods discussed its activities over the period between the first and the second colloquium, its future program, and adopted a recommendation to continue its activities on a permanent basis. It was also decided that the tasks to be assumed by the working party should include the establishment of standardized methods for research on coffee odours and the location of publications on coffee aroma that could be of interest to researchers in this field. As far as the latter is concerned I have here a very modest contribution, a few references of such literature, a copy of which is available for everyone in this meeting. I am well aware of the fact that it is far from complete but it may serve a useful purpose to those who have no easy access to the publications mentioned, the more so as copies of the full publications can be obtained on request. At the second colloquium an appeal was made to all interested parties to provide the working group with reference material and reprints. A few have responded but I would like to repeat this invitation to all of you, to help us build up a centre of information for workers on coffee aroma by sending us reprints of your publications or any literature references that you think are relevant.

In May 1965, the working party also decided to devise and perform experiments necessary to gain its objective, to finalize the joint investigation of the first experiment, to organize a similar joint investigation under somewhat better defined conditions, including Kovàts indices determinations and, in addition, to organize a joint investigation with a head space mixture of ground roasted coffee.

In December 1965, Dr. WEURMAN reported on the

results of the first experiment by circular letter to all actual and future participants and suggested the next experiment.

In January 1966, circular letter n° VI was sent out containing further details for the experimental conditions of the second experiment, followed by circular letter n° VII in April 1966, announcing the third experiment which was to be an analysis on the headspace over ground coffee, also directly followed by the same hydrocarbon mixture. Samples and the material, i. e. support with the stationary phase applied, were distributed at the same time.

A total of nine researchers participated in these experiments and the results were fully discussed by Dr. WEURMAN in circular letter n° VIII, dated December 20, 1966. In the same circular letter suggestions were made for the next experiment, Expt. n° IV, with the objective of establishing the reproductibility of results within and between two single sets of runs by each of the individual participants. Interest in this new experiment remains high and several laboratories are now working on it, using the materials and the sample that were distributed last May.

I would now like to ask Dr. WEURMAN to bring us up to date on the results so far achieved in this working group.

REPORT ON THE ACTIVITIES OF THE « WORKING PARTY ON COFFEE ODOUR RESEARCH METHODS », PARTICULARLY ON THE EXPERIMENTS II AND III

C. WEURMAN
Centr. Inst. Nutrition and Food Res., TNO, Zeist

Mr Chairman, Ladies and Gentlemen,

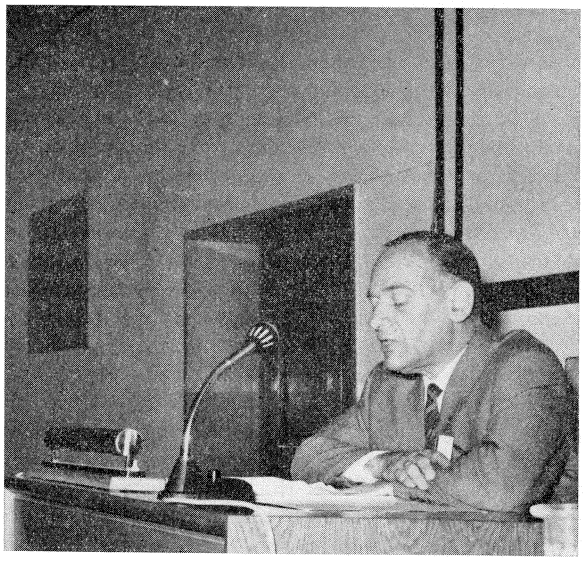
For those amongst the audience, who have participated in the activities of the « Working Party » sofar I can, of course, not tell anything that is new ; all is in the written reports which the participants have received in December last year.

For most of those, who know of our « Working Party » and nevertheless have not participated, this verbal report on our experiments cannot be of too much interest either, since if it would have been, they would have taken part in our activities.

For both of these two groups therefore, I must promise to be short. But there are — possibly — a few amongst you, who are new in our midst and who might become interested in what this « Working Party » is doing. For them a short résumé of what we are trying to do, and of what we have done is in place.

It is felt by many odour research workers that when they are using gas-chromatography in their experiments, the results are not readily — or not at all — comparable with the work of others. The way in which the sample for analysis is prepared, the type of the gas-chromatographic column that is used, the conditions under which the analysis is run, and the detector that is applied, all influence and to some extent determine the appearance of the resulting chromatograms.

It then becomes virtually impossible to decide on whether the variations we observe in these chromatograms are caused by the variety of the processed coffee



— if that is what is to be studied and compared — or whether they are due to the various ways that are used during the analysis. Nor, if we wish to tentatively name a peak in our chromatogram of which we know from the work of others that it should be somewhere in the graph, do we find it easy or possible to do so. On these difficulties in getting results that are mutually comparable many of us agree.

So a number of us have decided to try and develop methods of analysis which we could use if and when we want to do a piece of work that should be compared with that of others. Those who felt the desire to cooperate in these plans and who could spend a couple of days or one or two weeks a year, joined in our « Working Party on Coffee Odour Research Methods ».

It is good to emphasize at this point that by arranging our plans in this way, the work in the « Working Party » hardly interferes with the program of the laboratory or institute the participant is working at. The plans are further adjusted so as not to make any demands on special techniques or information to be conveyed from any institute to the « Working Party ». Apart, that is, from the Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO, at Zeist, Holland — which is at all times free to inform interested parties on techniques and methods of analysis — and from other laboratories and institutes which specifically desire, and are free, to pass on such information.

It was thus suggested to start the experiments of the « Working Party » by investigating a synthetic aqueous solution — samples of which were taken from a single batch and sent to all participants — and to analyze its vapours under standardized conditions on the same type of column, fully prepared, originally, by the participants themselves. All the resulting chromatograms were sent to the Royal Tropical Institute at Amsterdam, where they were copied and coded under the administration of Dr. HEESTERMAN, who has recently resigned and whose task has now been taken over — as you have heard — by Dr. VERHAAR.

The copies of the chromatograms were passed on to the Aroma Dept. of the Institute for Nutrition and Food Research, TNO, at Zeist. At this institute they were « analysed » : peak heights and retention times were measured and tabulated, detector sensitivities and resolution were judged and calculated, etc. Then all these data, together with the copies of the chromatograms and discussions on possible causes for chromatographic irregularities, such as baseline instabilities, noise levels, varying retention times, etc., were sent to the participants.

In response to these discussions and notes many of the participants in their turn sent their remarks and corrections on our discussions to us. These were again copied, annotated and redistributed to all others.

I do not know exactly what the others think of our work as a whole, but I can say for my colleagues and for myself that we feel very much excited — and inspired — to receive these numbers of chromatograms ; to discuss them ; to read the suggestions and remarks of the others and to compare them with one another and with our own. It is quite a new experience to be able to do so. And never have I learned from others so thoroughly that I still have a lot to learn myself.

Well, this is what the « Working Party » is trying to collaborate on.

Now with the last set of experiments on which I am here to report, the general procedure of our arrangements is still unaltered. The preparation of column packing, however, had also been centralized, as was the preparation of the synthetic mixture, the hydrocarbon mixture for Kovats Indices determinations, and the distribution of an authentic coffee sample. Again the vapours over the synthetic mixture and over the dry, ground coffee were to be analysed directly. No remarks, suggestions and additions to our discussion have so far reached us from the others. Ours, on the other hand, are now in the possession of the participants and I will therefore be pointing out the main aspects of interest only.

We can devide these aspects into « positive » and « negative » ones ; that is in instances where we have been successful and where we have been more or less disappointed in our results.

Some of the « positive » points are the following :

1. All participants — even though some of them never used direct vapour analysis before — are now running quite acceptable, and a few of them even very good, head space chromatograms.

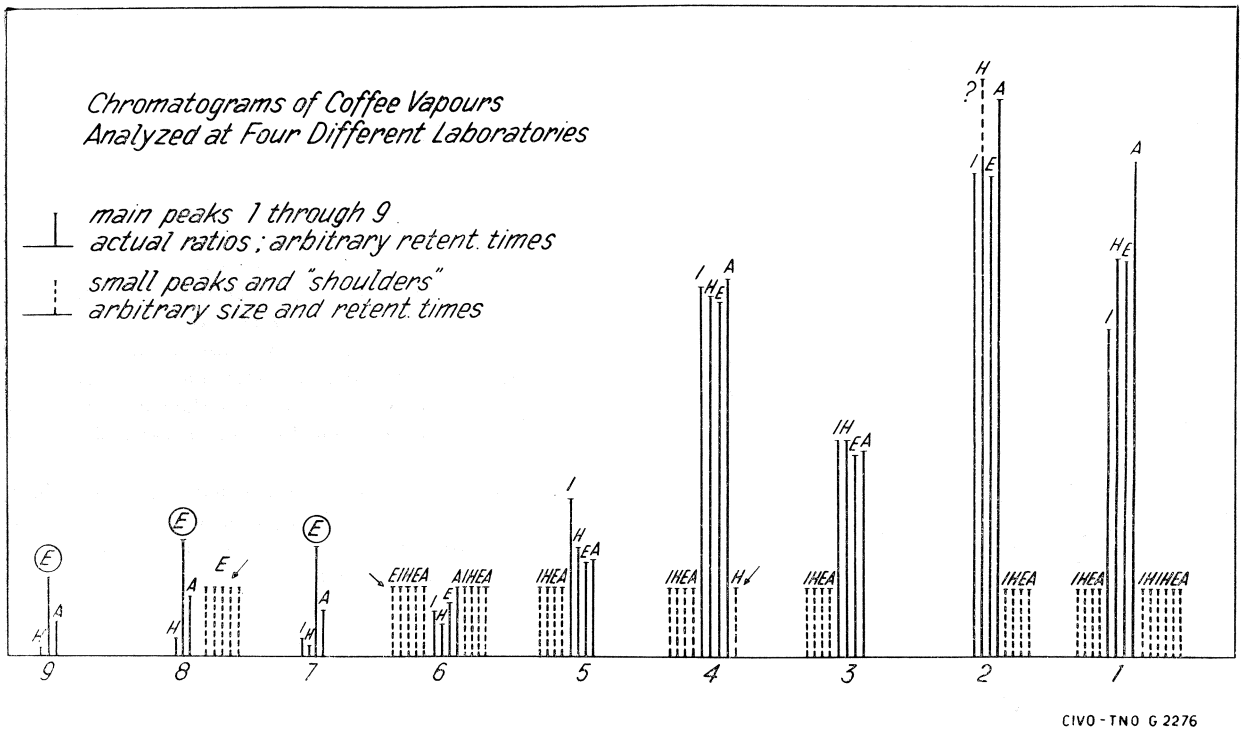
2. Sensitivity of all the different apparatus used by the participants is adequate. This is of course not surprising since all firms building FID's nowadays know their job and all more or less approach the maximum sensitivity that can be obtained for the money we are prepared to pay.

What is « positive » in this respect is that all of us have kind of mastered the art to actually use our apparatus at the very high sensitivity settings that are necessary in head space analysis. For here, now, all parameters — such as purity of carrier gas and H_2, stability of flow and temperature, cleanliness of flame tip, electric connections, stability of recorder, etc. — must be near-optimum at the time of our runs and, on the whole, they were.

3. The « positive » point in our results we can be most happy about, is the high degree of comparability in our chromatograms of the actual coffee vapour analyses.

I believe that nowhere in full-aroma research (with the exception of essential oil investigations) results of gas chromatographic analyses on the same commodity by different authors at different laboratories can be found that can so well be compared as those of ours. Not — let me be quick to add — because of our work being so exceptionnaly well done, but simply because we performed our experiments in exactly the same standardized way. Which really is what we set out to do.

Actually, at « first sight », conformity of the chromatograms is not all that good, but in fig. 1 we can see what I am so excited about. Four of the coffee vapour chromatograms (indicated A, E, H, and I) received from parti-



cipants working at institutes ranging from Norway to Italy are shown together for easier comparison. The nine main peaks are presented by straight lines according to peak heights and have been arranged in order of their K. I.'s (see table 3, where A = AA, E = EE, etc.). « Shoulders » and small peaks have been indicated on the basis of their position between the main ones at arbitrary heights.

The chromatograms can now actually be compared and mutually discussed. Conformity is « interesting » to say the least. Of course some irregularities exist. Some peak heights of main components are higher or lower in one chromatogram than they are in the others — the peaks marked with an E in a circle probably indicate an error in the sensitivity setting of that particular participant — and some small peaks are present in one chromatogram that are not observed in the others (marked with an arrow in the figure), but one surely can point them out in the various chromatograms and one can be sure of which one is which in each of them.

Anyhow — whether you agree with my optimism or not — at the moment these are the results of our attempts in the investigations on the coffee vapours. It was not « excellent » with all participants yet, but in all of their chromatograms — so not only the ones that were used for fig. 1 — virtually each one of the individual peaks, including « shoulders » and small ones, can be retraced and considered in relation to the other chromatograms.

So far, however, for the « positive » aspects of our results.

In the next two tables we can point at some of the most important of the « negative » ones.

TABLE 1

Information on the chromatograms of the synthetic mixture

chromatogram	plate number per m*	resolution**	sensitivity	
AA	830	2.1	1/4 =	pract. max. sens.
BB	980	3.1	1/8 = 1/8	—
CC	1,010	3.6	1/4 =	—
DD	800	2.8	p. m.	
EE	765	3.0	1/8 = 1/8	—
GG	620	1.8	1/2 = 1/2	—
HH	680	3.0	1/8 = 1/8	—
II	1,085	2.7	1/10 = (1/3?)	—

* on the last emerging peak
** on peak 4 and 5 from end

In table 1 we can see that column reproducability is not as good as we had hoped for. Numbers of theoretical plates and resolution differ considerably even though the column packing had been prepared by one of us and samples were distributed from one single batch

TABLE 2

Kovats indices of the components of the synthetic mixture*

nr.	Peak	Chrom. AA**	BB	CC without C_{14}	DD	EE	GG	HH	II without C_{14}	Δ	S
1	prop. aldeh.	?	?	?	?	?	?	820	—	—	—
2	eth. form.	860	840	850	830	850	860	860	845	30	10.6
3	ethanol	931	910	910	895	915	930	915	925	35	12.4
4	dieth. ket.	1,020	1,010	1,010	1,000	1,010	1,020	1,015	1,015	20	7.1
5	eth. butyr.	1,065	1,055	1,055	1,045	1,055	1,060	1,060	1,060	20	7.1
6	butanol	1,129	1,110	1,105	1,100	1,110	1,130	1,105	1,125	30	10.6
7	diprop. ket.	1,161	1,150	1,150	1,140	1,150	1,160	1,150	1,155	20	7.1
8	eth. but. ket.	1,186	1,175	1,175	1,170	1,170	1,185	1,175	1,185	15	5.3
9	eth. capr.	1,251	1,240	1,240	1,235	1,240	1,245	1,245	—	15	5.3
10	eth. am. ket.	1,277	1,265	1,270	1,265	1,265	1,275	1,270	1,275	10	3.5

* the K. I.'s are rounded off to 0 or 5.
** the K. I.'s are measured by the participant.

to all participants. In a special session of the participants of the « Working Party », which we hope can be arranged, we expect that some suggestions for an explanation in respect to the non-correlation between plate numbers and resolution will be brought forward (*).

In table 2 the Kovats indices of the components of the synthetic mixture have been put together. Actually agreement is excellent when the use of a polar phase and, probably, slight variations in column temperature are taken into account. If we look at BB, CC, EE, HH, and II the conformity is better than we dared to expect. That the results of some of the participants differ to a somewhat larger extent is possibly due to polarity changes that occurred in the stationary phase. By conditioning of the column may be ? But see again how closely AA and GG agree mutually. So, actually, still more of a « positive » than of a « negative » point after all.

In the last table (table 3), where K. I.'s of the main peaks of the coffee sample chromatograms are put together, other aspects come to the fore. (These K. I.'s, by the way refer to the same chromatograms of which a number were presented in fig. 1).

Let us look at the K. I.'s for peak n° 7 as an example. They check for AA and BB (AA is a bit higher, but so are all AA's peaks) ; this also holds for CC and DD, where all values are somewhat lower, although we can still be sure the peaks are the same ones in these chromatograms. Clearly they are the same again in GG, HH,

(*) Such a « special session » indeed was arranged in the early evening of June 6. No explanation however derived and we could only agree on the possibility that column filling techniques and conditioning varied too much with the participants to produce uniformity of results in this respect.

TABLE 3

K.I.'s of peaks 1-9 in the chromatogram of coffee odour*

Peak nr.	AA K.I.	BB K.I.	CC K.I.	DD K.I.	EE K.I.	GG K.I.	HH K.I.	II K.I.
1	766	725	710	700	750	740	750	735
2	875	845	835	825	860	865	865	860
3	901	885	880	875	895	895	900	890
4	962	945	935	940	955	955	955	955
5	1,022	1,010	995	1,000	1,020	1,020	1,015	1,015
6	1,099	1,090	1,075	1,085	1,100	1,100	1,095	1,100
7	1,168	1,160	1,150	1,155	1,135	1,160	1,160	1,165
8	1,302	1,285	1,275	1,285	1,295	1,300	1,285	—
9	1,312	1,295	—	—	1,300	1,320	—	—

* The chromatograms BB through II have been compared with the numbered peaks in chromatogram AA. The K. I.'s with AA were measured by the author. The remaining K. I.'s were rounded off to 0 or 5.

and II. We now compare for a moment the indices for all the peaks of the two chromatograms EE and GG with one another. They all agree very well :

	EE	GG
	—	—
1	750	740 (the early peaks are always difficult to measure correctly)
2	860	865
3	895	895
4	955	955
5	1 020	1 020
6	1 100	1 100
7		

and then, all of a sudden peak n° 7 ;

1135 for EE and 1160 for GG — with around 1160 in the other chromatograms.

One would, I believe, conclude on these figures that peak n° 7 in chromatogram EE does not represent the same compound as peak n° 7 in the other chromatograms. If you could have a look at the actual chromatograms however, you would feel sure that they are.

So, we have met here with a phenomenon which we find difficult to explain. Is peak n° 7 representing a polar compound while column EE has become less polar than GG when originally it had been the same ? I doubt it, but I do not know of a better explanation.

Still another aspect which bothers us considerably and most certainly is coming out in our experiments as an important « negative » feature, is the fact that compounds that are present in our samples in the same concentration (and I do not even think in this respect of ethyl formate or even ethyl caproate which might either evaporate or hydrolize), do not appear in our chromatograms with equal peak areas. The phenomenon is not easily shown here now so we cannot carry the discussion too far. Somehow it might not seem all that bad, but we — the participants — feel somewhat disappointed in this respect.

My colleague VAN STRATEN will discuss the matter in some further detail later on today and may propose some tentative explanations. I will leave the matter now as « negative ».

Let me end this short survey of our last experiments by mentioning that the joined effort which is now under way and is already approaching its conclusion has been directly concerned — not with the variations that are to be found in the results between the different participants, but with the variations which show in the results of series of experiments performed by each of the individual participants of the « Working Party ».

A LITERATURE SURVEY ON THE CHEMISTRY OF COFFEE
SOME RECENT PUBLICATIONS

1. ZLATKIS, A. and SIVETZ, M. — Analysis of coffee volatiles by gas chromatography. *Food Research*, 25, 395 (1960).
2. STREULI, H. — Fraktionierung von Farb- und Geschmackstoffen des Röstkaffees mittels Sephadex G 25. *Chimia*, 16, 371 (1962).
3. BAZINET, M. L. and MERRIT, C. — Techniques for the mass spectrometric analysis of volatile compounds isolated from natural sources. *Anal. Chem.*, 34, 1143 (1962).
4. RADTKE, R. et al. — Untersuchungen über die chemische Vorgänge beim Altern von Röstkaffee. I Gaschromatographische Analyse der leichtflüchtige Aromabestandteile. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 119, 293 (1963).
5. SELF, R. et al. — The low-boiling volatiles of cooked foods. *Chem. Ind.*, 863 (1963).
6. MERRIT, C. et al. — Mass spectrometric determination of the volatile components from ground coffee. *Agr. Food Chemistry*, 11, 152 (1963).
7. HEISS, R. und BUCHNER, N. — Probleme bei der Verpackung von Röstkaffee in Vakuum-und Gaspackungen aus Folien hoher Gasdichtigkeit. *Verpackungs Rundschau*, 9, 67 (1963).
8. GIANTURCO, M. A. et al. — The volatile constituents of coffee. III The structure of two heterocyclic compounds and the synthesis of tetrahydrofuranones. *Tetrahedron*, 20, 1763, 2951 (1964).
9. KAUFMANN, H. P. und LIVINGSTON, E. M. — Über die Lipoide der Kaffeebohne V. Die Triterpene und Kohlenwasserstoffe. *Fette, Seifen u. Anstrichmittel*, 66, 461 (1964).
10. RADTKE, R. — Zur Kenntnis des Kaffee-Aromas und seiner Veränderungen im Laufe der Lagerung von Röstkaffee. Dissertation, München, 1964.
11. VIANI, R. et al. — Sur la composition de l'arôme de café. *Helv. Chim. Acta*, 48, 1809 (1965).
12. SCHWEISHEIMER, W. — Peut-on mesurer l'arôme du café ? Dispositif mécanique pour remplacer le dégustateur. *Parf. Cosm. Sav.*, 8, 282 (1965).
13. SMITH, R. F. — The chemistry of coffee. *New Scientist*, May 6, 1965, p. 380.
14. GIANTURCO, M. A. et al. — Votalile constituents of coffee, V. *Nature*, 210, 1358 (1966).
15. GRIMMER, G. und HILDEBRANDT, A. — Der Gehalt polycyclischer Kohlenwasserstoffe in Kaffee und Tee. *D. Lebensm. Rundschau*, 62, 19 (1966).
16. REYMOND, D. et al. — Gaschromatographic analysis of steam volatile aroma constituents ; application to coffee, tea and cocoa aromas. *J. Gaschromatography*, 4, 28 (1966).
17. MUNELLY, K. P. et LIVINGSTON, E. M. — Expérience sur les substances volatiles du café ordinaire et du café soluble. *World coffee and tea*, **6**, 5, 36 (1965).
18. HEINS, J. Th. et al. — Direct vapour analysis and component identification by a coupled capillary GLC-MS arrangement. *J. Gaschromatography*, 4, 395 (1966).
19. RADTKE, R. et al. — Zur Kenntnis des Kaffee-Aromas und seiner Veränderungen im Laufe der Lagerung von Röstkaffee. Untersuchung der schwerflüchtigen Aroma Verbindungen und flüchtigen Säuren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 129, 349 (1966).
20. WOLFROM, M. L. et al. — Carbohydrates of the coffee bean. *J. Agr. Food. Chem.*, 8, 58 (1960).
21. BAIAO ESTEVES, A. — Determination of the moisture content of raw commercial coffee. *Rev. Café Português*, 7, 33 (1960).

22. SÖHN, G. — Möglichkeiten einer Methodik der Geruchs- und Geschmacks-Prüfung von Röstkaffee-Aufgüssen. *Kaffee u. Tee markt*, 14, 6 (1964).

23. BAIAO ESTEVES, A. — The action of time upon the acidification of fat in the raw coffee bean. *Rev. Café Português*, 7, 74 (1960).

24. WOOTTON, A. E. — Fermentation and onion flavour. *Kenya Coffee*, 26, 304, 126 (1961).

25. CARVALHO, A. — Preliminary observations on the variability of niacin in coffee progenies. *Bragantia*, 22, 27 (1963).

26. MARTINEZ NADAL, N. G. — Coffee mucilage — its chemical composition. *Coffee Tea Industr.*, 82, 17 (1959).

27. FREEDMAN, S. O. et al. — Chlorogenic acid : an allergen in the green coffee bean. *Nature*, 192, 241 (1961).

28. JOSÉ PEREIRA, M. — Proof of the existence of a chlorogenic oxidase in the coffee bean. *Estud. Agron.*, 3, 151 (1962).

29. WERNER, H. und KOHLEY, M. — Untersuchungen über den Säuregehalt von Roh- und Röstkaffee verschiedener Herkunft. *Kaffee u. Teemarkt*, 15, 1, 5 ; 15, 2, 6 ; 15, 3, 6 ; 15, 4, 6 ; 15, 5, 5 (1965).

30. ASENJO, C. F. et al. — Niacin in Puerto Rican coffees. *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, 47, 186 (1963).

31. WILBAUX, R. — Quelques dosages de cuivre dans la fève de café marchand. *Bull. Agr. Congo*, 51, 1010 (1960).

32. RHOADES, J. W. — Analysis of the volatile constituents of coffee. *J. Agr. Food Chemistry*, 8, 136 (1960).

33. BURMEISTER, H. — Zur Bestimmung der Gesamtsäure von Röstkaffee. *Kaffee u. Tee markt*, 12, 12, 14 (1962).

34. KOVACS. A. S. und WOLF, H. O. — Über das Aroma des Röstkaffees. *Kaffee u. Tee markt*, 12, 11, 5 (1962).

35. WOOTTON, A. E. — The fermentation of coffee, Part I-IV. *Kenya Coffee*, 28, 317 (1963) ; 28, 331, 239 (1963) ; 28, 334, 359 (1963) ; 28, 332, 277 (1963).

36. WOOTTON, A. E. and BROWNBRIDGE, J. M. — The use of pectic enzyme preparations in coffee processing. *Kenya Coffee*, 31, 366, 253 (1966).

37. JAYARAMAN, K. S. et al. — A new colorimetric method for the estimation of caffeine in beverages. *Current Sci.*, 31, 282 (1962).

Compiled by the « Working Party on Coffee Odour Research Methods ».

VERHAAR (G.), WEURMAN (C.). — **Rapport du groupe de travail sur l'arôme du café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 183-190, fig., tabl., réf.

M. VERHAAR rappelle l'origine et l'organisation du groupe de travail sur l'arôme du café ainsi que ses premiers travaux. Au cours du deuxième colloque de 1965, il avait entre autre été décidé de mettre au point des méthodes standards de recherches sur l'arôme du café et de centraliser toutes les publications sur l'arôme du café.

Pour les nouveaux venus au colloque, M. WEURMAN montre, en s'appuyant sur les résultats d'expériences réalisées par les membres du groupe, tout l'intérêt des travaux entrepris. On peut noter que les participants tirent maintenant le meilleur parti de leurs appareils de chromatographie et que ceux-ci ont une sensibilité adéquate ; que tous les chromatogrammes reçus présentent un haut degré de comparabilité, ceux-ci ayant été effectués dans des conditions expérimentales identiques. Par

VERHAAR (G.), WEURMAN (C.). — **Report of the working party on coffee odour research methods.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 183-190, fig., tabl., réf.

Dr. VERHAAR recalls the origin and the organisation of the study group working on the aroma of coffee, as well as its early work. During the second conference in 1965, among other matters, it had been decided to finalize standard methods of research on coffee aroma and to centralize all the literature published on the aroma of coffee.

For the benefit of those newly arrived at the conference, Dr. WEURMAN points out, on the basis of the results of experiments carried out by members of the group, the importance of the work undertaken. It is to be noted that the members are now making the best use of their chromatographic apparatus and that these latter are sufficiently accurate for the work ; that all the chromatograms received show a high degree of

VERHAAR (G.), WEURMAN (C.). — **Bericht der Arbeitsgruppe für Kaffee-Aroma.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I.C., (Paris) 1968, p. 183-190, fig. tabl., réf.

H. VERHAAR weist auf die Entstehung und die Organisation der Arbeitsgruppe für Kaffeearoma sowie auf ihre ersten Arbeiten hin. Beim 2. Kolloquium im Jahre 1965 sei u. a. beschlossen worden, Standardmethoden zur Kaffeearomaforschung auszuarbeiten und alle Veröffentlichungen über Kaffeearoma zu zentralisieren.

Für die neuen Teilnehmer am Kolloquium unterstricht H. WEURMAN das Interesse der unternommenen Arbeiten, wobei er sich auf die Ergebnisse der von den Gruppenmitgliedern ausgeführten Versuche stützte. Es zeigt sich, dass die Teilnehmer nun den grössten Vorteil aus ihren Chromatographiegeräten ziehen und diese eine angemessene Empfindlichkeit besitzen ; alle eingegangenen Chromatogramme sind in hohem Grade vergleichbar, da sie unter gleichen Versuchsbedingungen erzielt worden sind. Die Reproduzier-

contre, la reproductibilité des colonnes n'est pas aussi bonne qu'on l'espérait. Certains chromatogrammes présentent une mauvaise corrélation entre le nombre de plateaux et la résolution de la colonne ; il y a de grandes variations dans les indices de Kovats. M. WEURMAN suppose que certaines divergences peuvent provenir des conditions différentes de remplissage et de conditionnement des colonnes entraînant peut-être des variations de polarité. Des composés qui sont à la même concentration dans les échantillons n'ont pas des pics égaux sur les chromatogrammes des différents participants. Tous ces points « négatifs » doivent être discutés au cours d'une réunion du groupe de travail.

comparability, having been made under identical experimental conditions.However, the columns do not lend themselves to reproduction as well as was expected. Some chromatograms show a bad correlation between the number of plates and the resolution of the column ; there are wide variations in the Kovats' indices. Dr. WEURMAN considers that certain discrepancies could result from different ways of filling and preparing the columns, which might cause perhaps variations of polarity. Constituents having the same concentration in the samples have not equal peaks on the chromatograms of the various contributors. All these « negative » points should be discussed at the meeting of the study group.

barkeit der Saülen dagegen ist weniger gut als erwartet. Gewisse Chromatogramme wiesen eine schlechte Korrelation zwischen der Zahl der Trennstufenhöhe und des Trennvermögens der Saüle auf ; es bestanden grosse Variationen bei den Retentionszahlen nach Kovats. H. WEURMAN sprach die Vermutung aus, gewisse Verschiedenheiten könnten von den Unterschieden in der Packung und der Konditionierung der Saülen herrühren, die vielleicht Veränderungen der Polarität bewirkten. Bei gleicher Konzentration der Proben hatten die Komponenten keine gleichen Peaks auf den Chromatogrammen der verschiedenen Teilnehmer. All diese « negativen » Punkte werden im Verlauf einer Sitzung der Arbeitsgruppe erörtert.

IRREGULARITIES IN GASCHROMATOGRAPHIC DIRECT VAPOUR ANALYSIS

G. VAN LUNTEREN, S. VAN STRATEN, C. WEURMAN
Central Institute for Nutrition and Food Research, TNO, Zeist

Gaschromatographic direct vapour analysis theoretically should be one of the best ways to quantitatively analyse the odour of dilute aqueous solutions of volatile compounds. This may even hold in general for the analysis of the odorous vapours which we inhale on smelling and testing the odour of all our food and drinks. Results obtained in using this technique, on the other hand can be of little value when our sample or the method is not handled or applied carefully. A few examples may clarify our statement.

Experiments on direct vapour analysis are initiated by first **equilibrating the product against its vapour.** To this end the sample usually is put in a flask closed with a pierceable cap and placed in a thermostated oven or waterbath. The vapour sample is taken through the cap with a clean syringe which should be at the same temperature as the sample or slightly higher, and is then injected in the carrier gas stream just in front of or even in the top of the column.

Insufficient equilibration times and variable bath temperatures as well as syringes that are too cold in relation to the sample can cause erratic results. These errors are easily prevented by carefully adhering to well chosen standardized conditions.

At the moment **when the vapour sample is taken** we are, however, not able to prevent disturbing the equilibrium in the flask and the syringe. The wall of the syringe to some extent selectively adsorbs a part of the volatiles, while the pressure in the flask decreases. The disturbances can be reduced sufficiently in practice by saturating the syringe-wall with the vapours and by taking small samples out of a large sample flask.

Any leaks in the syringe or the injection port and septum will cause variable losses which can usually be prevented by testing the syringe under counter-pressure before using it and by regular renewing the injection septum.

So far direct vapour analysis appears to be rather straightforward and simple but we will now discuss some of the causes for erratic results that are less easily obviated.

Starting point for our considerations with respect to the phenomena that occur during injection is the fact that at the moment when a 5 ml vapour sample is injected in the carrier gas stream, existing flow and pressure equilibria are disturbed. These disturbances are considerably larger than the ones that are caused by the

S. VAN STRATEN



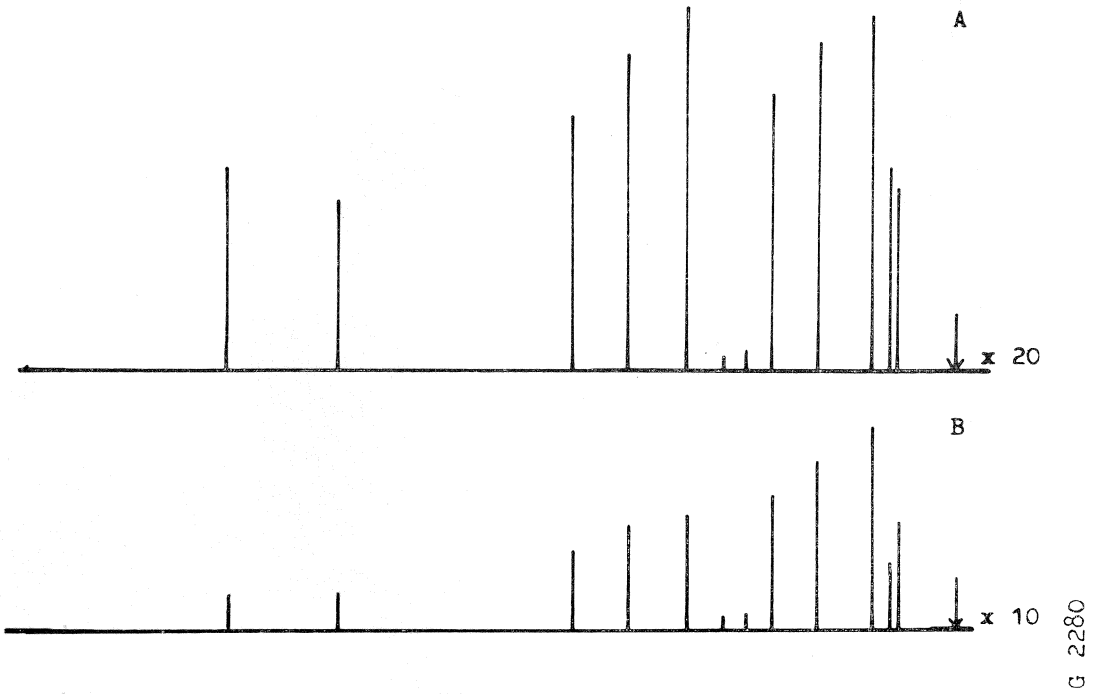
injection of 0.1 µl of a liquid sample, which corresponds roughly, to about 0.02 ml of vapour.

As a result of the injection a pressure wave quickly moves along the column towards the detector. The nitrogen, on reaching the flame causes a first « pressure » peak followed by the non-separated peaks of gasses like methane, ethane, ethene, etc., present in the vapour. Often this peak is simply referred to as the « air-peak ». If large amounts of carbondioxide are present, this peak or the first part of it will be negative.

It can be reasoned that the obstruction to gas movement will be greater in the direction of the column than in the one opposite to it. So mass-transport following injection in the up-stream direction to some extent must take place.

To check on this hypothesis a double carrier gas lead, splitting at a 50 : 50 ratio near the flow-regulator and joining together again by way of a three way cock just in front of the injection port, was constructed. A pressure-gauge, placed in the single line up-stream the split, enables observations on pressure surges following the injection. A 5 ml vapour sample is now injected while the three way cock is positioned to have only one carrier gas line functioning ; the other just stays filled with stagnant gas. The gauge indicates a quick rise in pressure and at the moment of its highest reading, the three way cock is turned to develop further the analysis by the second line. A normal chromatogram is recorded. When the last component peak of the sample has been registered, the three way cock is again turned to the position occupied during the injection. Now a new chromatogram develops showing again all components of the sample. Peaks are smaller — indicating that most of the material, whether directly or still by way of the second up-stream line, has reached the column in the first instance — but it is of particular interest to note that peak-height ratios in the second chromatogram differ from the ones in the first. In figure 1 the peaks of the two chromatograms have been reproduced by vertical lines which have the actual relative peak-heights and retention times. Clearly we observe in chromatogram B the material which had been pushed up-stream into the carrier gas line during the injection. Under normal conditions where there is only one flow line, peak broadening and tailing will result from the material which « follows after » and thus represents a delayed application. At the same time peak-height ratio variations will occur as a consequence of variable selective adsorption and condensation in the carrier gas line. Head-pressure on the column and temperature, construction material and geometry of the up-stream flow line will all contribute in various degrees to the erratic results which are often obtained when the same sample is analysed repeatedly and which always occur with experiments on different instruments.

Fig. 1. — *Backflush in flowline : A, chromatogram of the vapour injected in the column ; B, chromatogram of the vapour in the flowline.*



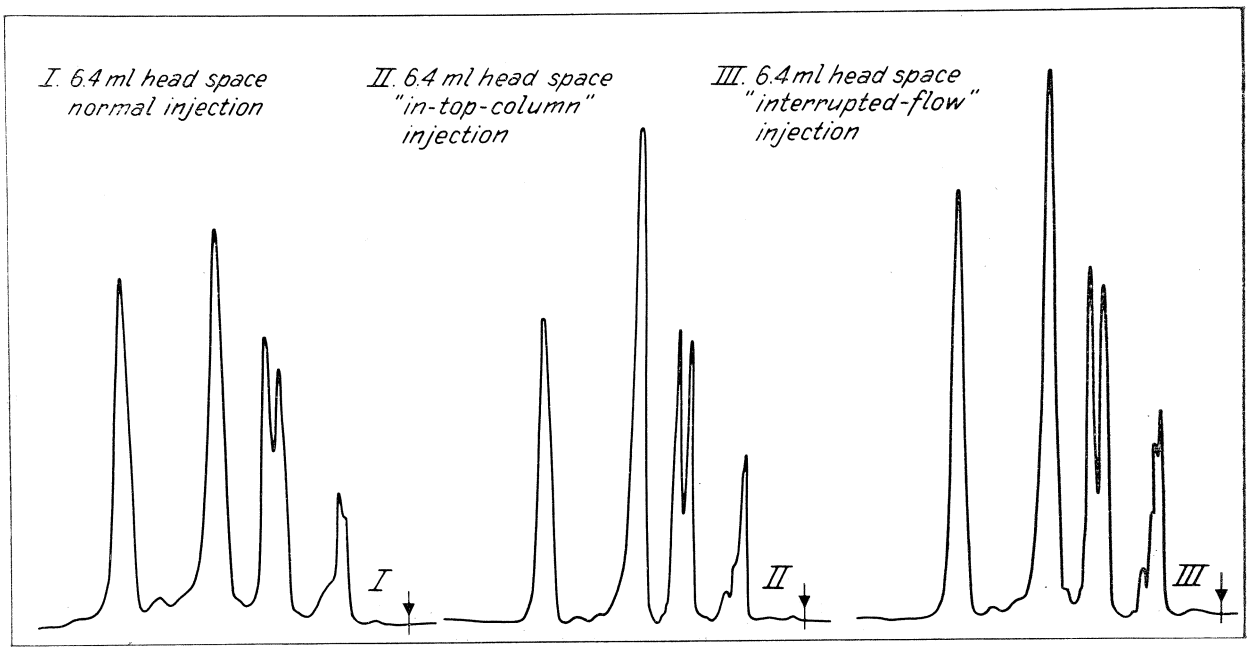


Fig. 2

Actually the « mist » formation, which at the moment of injection at times is observed in a syringe when it has been made of clear glass and the inlet-pressure of the column is rather high, indicates visibly what probably takes place just as well in the non-heated up-stream carrier gas line.

It will be difficult to effectively control and standardize all the up-stream factors, but there are two simple ways to almost completely eliminate them :

— First : we can inject our sample while the carrier gas flow at that moment is stopped, and thus head-pressure is reduced.

— Second : we can apply the sample on a pre-column — or the top part of the actual column — which is cooled and thus prevents any movement of material along the column before all of it has been gathered.

For the injection of a sample while the carrier gas flow is stopped or interrupted (JACOB et al.), a two way cock is placed in the carrier gas line as near to the injection port as possible. The cock is closed just before injection and opened again after the injection has taken place and the needle has been withdrawn from the septum.

Injections against various head-pressures which quickly drop down on closing the flow, can be studied and optimum conditions be chosen by varying the time between closing the cock and the moment of injection. Two or three seconds under our conditions gave best results in this respect.

The advantages of the method are shown in figure 2, sub-figures I and III, where two chromatograms, taken without and with interrupted flow respectively, can be compared. It is seen that separation is better, peak-heights and peak-areas are larger and tailing is reduced when the carrier gas flow is interrupted during injection.

The second way of eliminating the errors demands the injection of a vapour-sample into a short pre-column or the first part of the actual column, which is cooled and can quickly be heated when the sample has been injected. The method has been discussed previously in collaboration with some of our colleagues (WIENTJES et al., WEURMAN et al., where further reference on the earlier use of the technique by other investigators can be found).

Figure 3 gives a schematic drawing of the arrangement using the first part of the actual column as pre-column. As with the interrupted flow injections peak-heights and peak-areas are larger. Again better quantitative results are obtained and some of the reasons for variable results in direct vapour analysis on different apparatus are eliminated.

Of the last irregularity which we will try to describe it is better to say in advance that we have not been able to arrive at a satisfactory explanation.

In figure 4 the chromatograms are shown of an experiment which clearly depicts what seems to be the problem. The peaks have again been reproduced by verti-

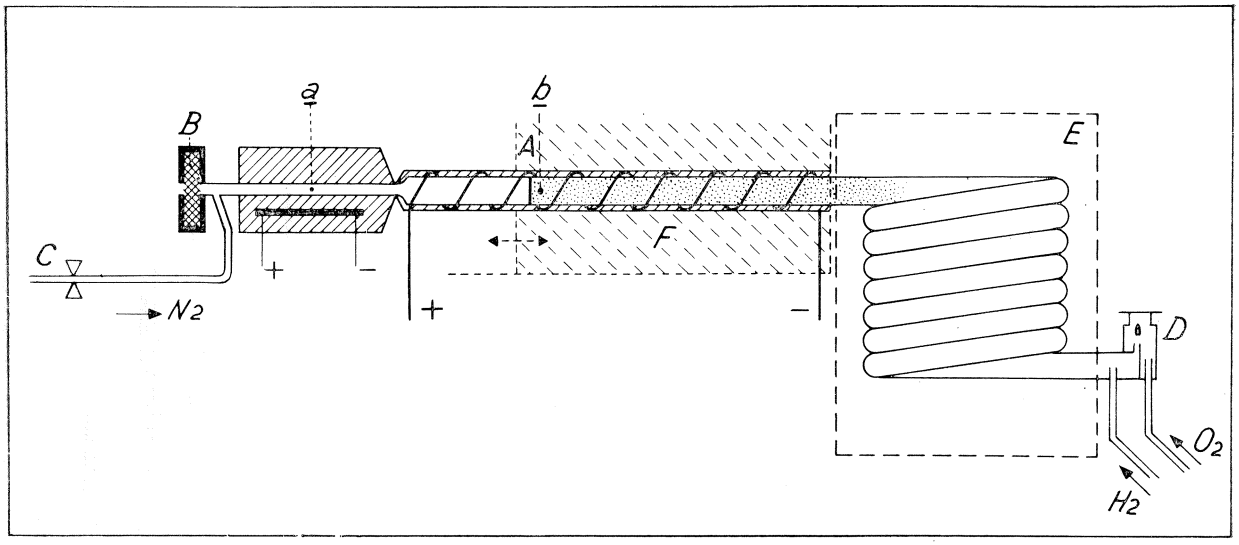
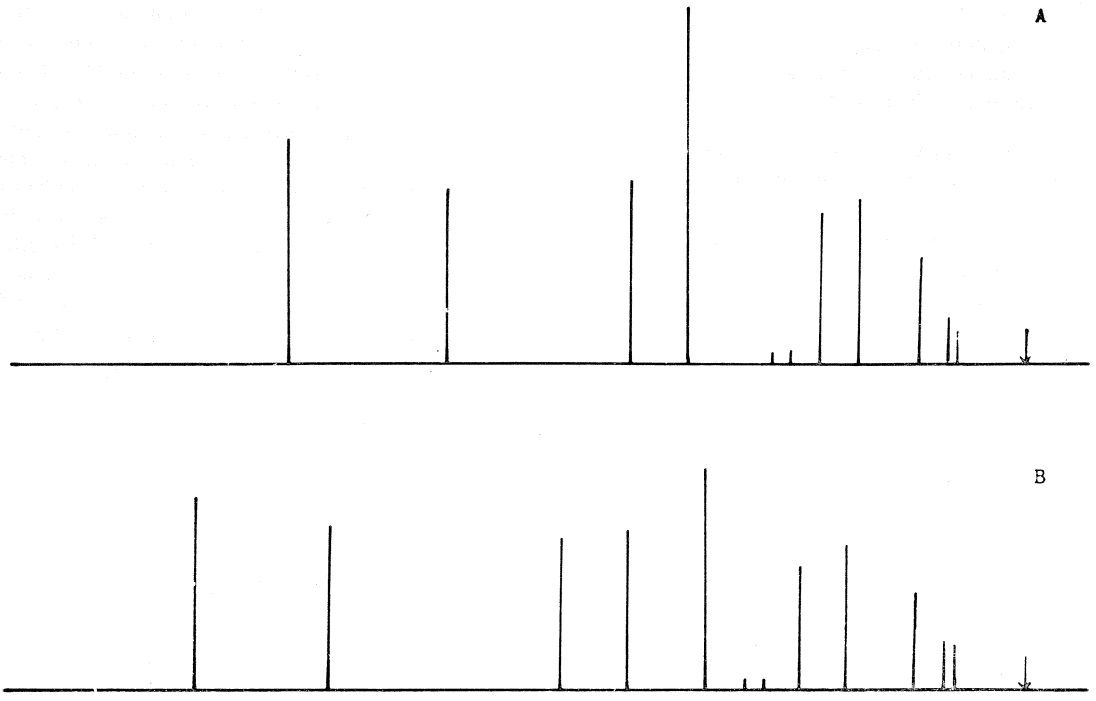


Fig. 3. — *A, top of column packing ; B, injection point septum ; C, stop valve ; D, flame ionization detector ; E, column oven ; F, removable solid* CO_2 *;* a, b : *points of injection of vapour*

Fig. 4. — *Injection techniques : A, injection with interrupted flow - cold injection port ; B, injection with interrupted flow - heated injection port*



cal lines which have the actual relative peak-heights and retention times. The vapour of an aqueous mixture consisting of a number of polar compounds (alcohols, esters and carbonyls) was injected on a polar column (diethyleneglycoladipate). The technique of interrupted flow was used but the phenomenon occurs just as well when regular injection procedures are applied.

Chromatogram 4B was recorded when the sample had been injected into a heated port (100° C, at a column temperature of 80° C). In chromatogram 4A all experimental conditions were the same with the exception of the temperature of the injection port, this time being 25° C. It is seen — and the two experiments could be repeated many times with the same results — that by heating or non-heating the injection port the sixth peak (which represents the highly polar n-butanol) could be made to completely coincide with the seventh peak (representing dipropylketone). On close examination it is seen that all peaks of the mixture with the exception of n-butanol have shorter retention times when the injection port is cooler.

As has been mentioned before, we have no explanation for the phenomenon which only showed on one of many similar columns that were tested for it.

We like to remind those of you who have joined us in the « working-party on coffee odour research methods », however, of some of our experiments where the same type of shift of n-butanol relative to dipropylketone occurred. In those instances, presumably injection ports were all heated. As a result poor resolution figures, calculated on these two compounds, were found with columns of high theoretical plate numbers. At the time we suggested that the stationary phase of the column packing had become more polar, but we are not too sure now any longer.

Summarizing the results of our checks on different injection techniques, we have come to realize that there is still a great deal to be learned on the best way for obtaining accurate and reproducable quantitative data in direct vapour analysis. In our opinion the best ways at the moment are those in which either the interrupted flow or the cooled pre-column technique is used. For accurate Kovats indices it might be desirable to run the hydrocarbons simultaneously with the test sample.

LITERATURE

JACOB, L., GUIOCHON, G. Step increase of the carrier gas inlet pressure in gas chromatography. *Nature*, 213 (1967), 491.

WEURMANN, C., LUNTEREN, G. van. The application of gas chromatography in food odour research Symp. Rept. Fortbildungskurs « Aroma- und Geschmackstoffe in Lebensmitteln », Zürich, Apr. 1967.

WIENTJES, A. G., MAARSE, H., STRATEN, S. van. A gas chromatographic procedure for measuring the isostatic permeation of volatile aroma compounds of food through packaging films. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 1967 (in press).

VAN LUNTEREN (G.), VAN STRATEN (S.), WEURMAN (C.). — **Irrégularités dans l'analyse directe par chromatographie en phase gazeuse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 191-196, fig., réf.

L'analyse chromatographique en phase gazeuse peut être la meilleure façon d'analyser les solutions aqueuses de composés volatils.

Quelques-unes des irrégularités et des erreurs qui peuvent se produire, causées par l'échantillonnage et les manipulations au cours de la chromatographie en phase gazeuse, sont discutées dans cette étude.

VAN LUNTEREN (G.), VAN STRATEN (S.), WEURMAN (C.). — **Irregularities in gaschromatographic direct vapour analysis.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 191-196, fig., réf.

The gaschromatographic vapour analysis can be the ideal way of analysing diluted aqueous solutions of volatile compounds. Some of the errors, and irregularities that may occur and are caused by sampling and managing

VAN LUNTEREN (G.), VAN STRATEN (S.), WEURMAN (C.). — **Unregelmässigkeiten bei der direkten gaschromatographischen Analyse.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 191-196, fig., réf.

Die gaschromatographische Analyse kann sich als die beste Art der Analyse der wässerigen Lösung flüchtiger Komponenten erweisen.

Es werden einige der vorkommenden Unregelmässigkeiten und Irrtümer besprochen, die durch die Stichprobeentnahme und die Bedienungsweise im Verlauf der Gaschromatographie bewirkt werden.

Les auteurs donnent des exemples de pertes dans la seringue et de formation de traînées dues à un contre-courant dans la ligne d'écoulement.

Les décalages des composés les plus polaires par rapport aux moins polaires, observés au cours des expériences réalisées par le groupe de travail sur la chromatographie en phase gazeuse, sont discutés et reliés à quelques résultats obtenus en utilisant différentes techniques d'injection.

the gaschromatographic arrangements, are discussed.

Examples are given of losses in the syringe and tail formation due to backflush in the flow line. Shifts of the more polar compounds relative to those of the less polar ones, which have been observed during experiments of the gaschromatographic working party, are discussed and related to some results obtained by using different injection techniques.

Es werden Beispiele von Verlusten in der Spritze sowie von Schwanzbildung angeführt, die auf eine Gegenströmung im Durchfluss zuruckzuführen ist.

Die Verschiebungen zwischen den maximal polaren und den weniger polaren Komponenten die im Verlauf der gaschromatographischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe festgestellt wurden werden besprochen und mit einigen Resultaten in Verbindung gebracht, die unter Verwendung verschiedener Probenaufgabeverfahren erzielt worden waren.

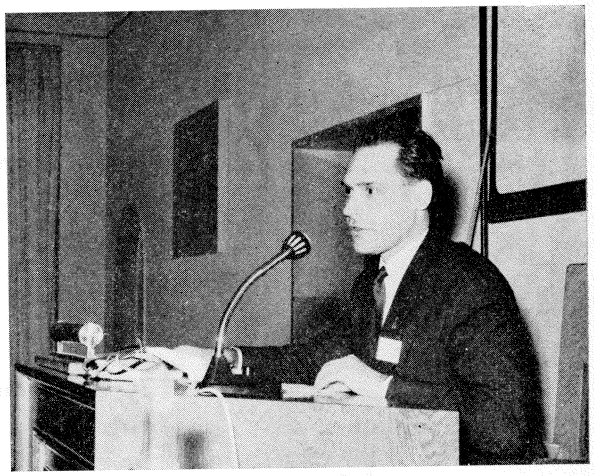
DISCUSSION

M. REYMOND : Quel est le système de réchauffement de la trappe froide dans le dispositif décrit ?

M. VAN STRATEN : The pre-column is cooled half an hour before and during the injection. Cooling material is carbondioxide. The heating after injection is an electrical heating, which takes about one minute.

LES COMPOSANTS FURANNIQUES DE L'ARÔME DE CAFÉ :

QUELQUES ASPECTS CHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES



I. FLAMENT

I. FLAMENT, F. GAUTSCHI, M. WINTER, B. WILLHALM, M. STOLL

Laboratoire de recherches, Firmenich & Cie, Genève

Dans une communication antérieure (1) nous avons décrit les travaux analytiques réalisés sur un arôme de café et y avons notamment mentionné l'identification d'une série de quarante-six composants furanniques non condensés. Après avoir rapidement examiné certains aspects de leur formation et de leur transformation au cours de la torréfaction, nous exposerons les procédés de synthèse et discuterons des propriétés spectroscopiques de quelques représentants des différents groupes fonctionnels.

ANALYSE DU CAFÉ VERT

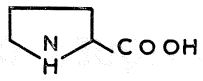
Le café vert a une composition qui dépend non seulement de son espèce et de son origine (altitude de la plantation, nature du sol, conditions climatiques...), mais aussi du traitement auquel il a été soumis (décorticage, enlèvement du mucilage, lavage, séchage, stockage). De plus, les méthodes analytiques sont généralement trop sélectives et encore trop imparfaites pour que l'on puisse obtenir une composition d'ensemble cohérente : citons à ce propos HADORN et SUTER (2) qui, après une analyse aussi complète que possible, constatent qu'il manque encore environ 10 % dans le bilan des substances solubles dans l'eau. De nombreux autres travaux ont été et sont encore consacrés à améliorer nos connaissances dans ce domaine et nous voudrions seulement citer les tableaux récapitulatifs (analyses composites) publiés par LOCKHART (3) et par SIVETZ (4). Relevons cependant quelques analyses particulières effectuées sur le café vert et qui présentent un intérêt spécial pour le présent exposé : UNDERWOOD et DEATHERAGE (5) (6), BARBERA (7) et THALER et GAIGL (8) ont identifié dix-huit acides aminés parmi les hydrolysats de protéines (tableau I) alors que THALER (9), NATARAJAN et coll. (10) mentionnent la présence, notamment parmi les produits d'hydrolyse des polysaccharides insolubles, de plusieurs sucres réducteurs (galactose, mannose, xylose, arabinose, glucose) ainsi que d'une certaine

TABLEAU I

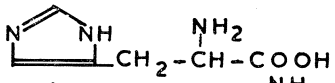
Acides aminés identifiés dans le café vert

Alanine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, leucine, isoleucine, phénylalanine, sérine, thréonine, valine, arginine, lysine, tyrosine,

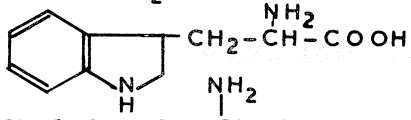
Proline



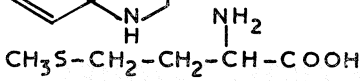
Histidine



Tryptophane



Methionine



Cystine

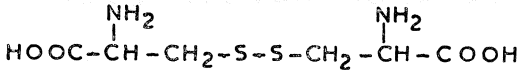
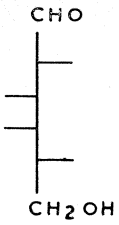
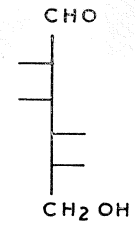


TABLEAU II

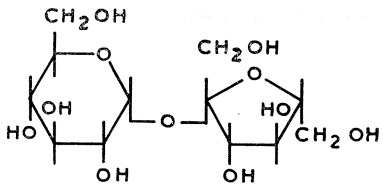
Hydrates de carbone identifiés dans le café vert



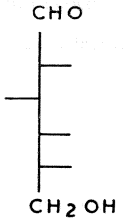
Galactose



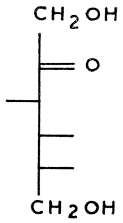
Mannose



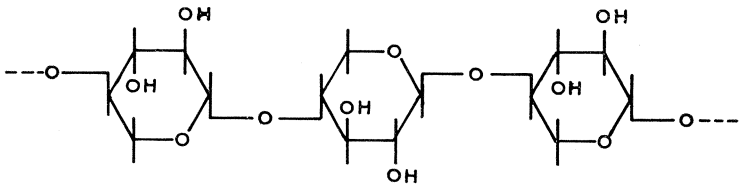
Sucrose



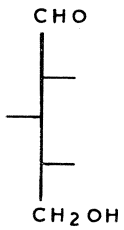
Glucose



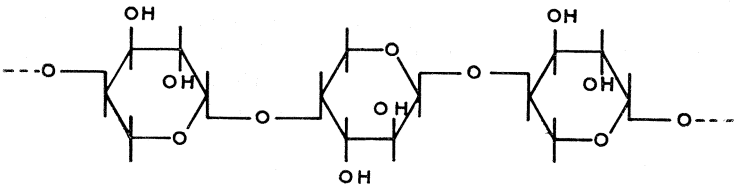
Fructose



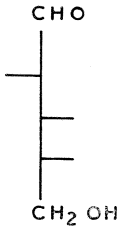
Xylane



Xylose



Arabane



Arabinose

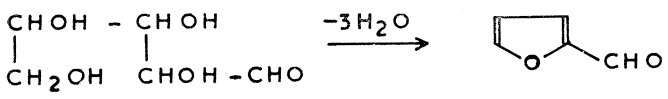
quantité de fructose provenant de l'hydrolyse du saccharose (qui représente 5 à 8 % du café vert) (tableau II). La présence dans le café vert de ces composants des glucides et protides est particulièrement importante, puisque ces groupes subissent des modifications considérables au cours de la torréfaction et sont principalement responsables de la formation des furannes.

FURANNES IDENTIFIÉS DANS L'ARÔME DU CAFÉ

Nous avons groupé dans le tableau III les cinquante et un furannes non condensés identifiés jusqu'à présent dans le café torréfié. Un premier examen permet de constater que tous ces hétérocycles, à l'exception du phényl-3-furanne, sont monosubstitués en position 2 ou disubstitués en positions 2 et 5. Nous remarquons ensuite combien est nette la cohésion à l'intérieur des différents groupes fonctionnels. Ainsi, on peut identifier dans une sous-fraction enrichie par chromatographie d'adsorption les divers homologues d'une série possédant une même polarité : bi-(furyl-2)-méthane, (méthyl-5-furyl-2)-(furyl-2)-méthane et bi-(méthyl-5-furyl-2)-méthane (11). On constate d'autre part que l'absence dans le groupe I de l'éthyl-2-furanne rompt une séquence ; on peut donc s'attendre à son identification ultérieure dans l'arôme de café. Le groupe des esters furfuryliques est également remarquable puisqu'on y retrouve formiate, acétate, propionate, butyrate, isobutyrate et isovalerate. Puisque les acides correspondants ainsi que l'acide valérique ont été identifiés dans le café (12) (13), on peut affirmer que la confirmation de la présence du valérate de furfuryle n'est plus qu'une question de temps. Le groupe des cétones et dicétones constitue enfin un bel exemple de séries complètes : la série IV A où le groupe fonctionnel est conjugué à l'hétérocycle ne contient qu'un produit non apparié à son homologue méthylé : le butyryl-2-furanne. En revanche, les séries IV B et IV C (fonctions cétoniques distantes de l'hétérocycle de 1 ou 2 atomes de carbone) ainsi que la série des dicétones V sont parfaitement cohérentes, l'existence d'homologues supérieurs n'étant cependant pas exclue.

FORMATION DES FURANNES AU COURS DE LA TORRÉFACTION

La présence d'importantes quantités de furfural dans le café torréfié s'explique aisément par la dégradation des pentosanes (xylane, arabane) en aldopentoses (xylose, arabinose) qui subissent aisément une cyclo-déshydratation :

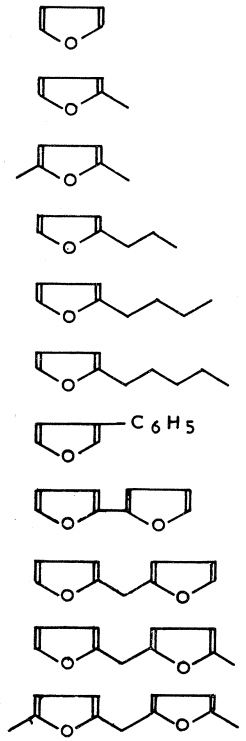


Il s'agit là d'une réaction bien connue, puisqu'elle est exploitée à l'échelle industrielle au départ des déchets de céréales qui sont particulièrement riches en pentosanes. Outre le furfural et l'hydroxyméthylfurfural, qui sont les principaux produits de transformation des pentoses et des hexoses, on retrouve dans les pyrolysats de sucres nombre de furannes divers présentant une forte similitude avec ceux du café. Ainsi HEYNS et coll. (14) ont effectué une remarquable analyse des produits de pyrolyse du D-glucose à 300° : des vingt-quatre furannes

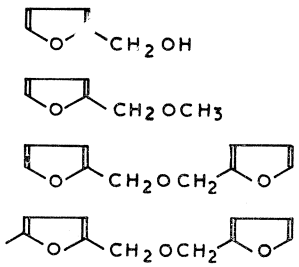
TABLEAU III

Furannes non condensés identifiés dans l'arôme de café

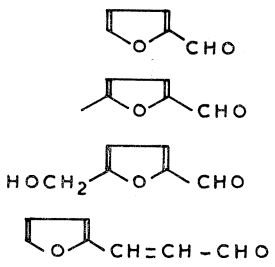
I Hydrocarbures



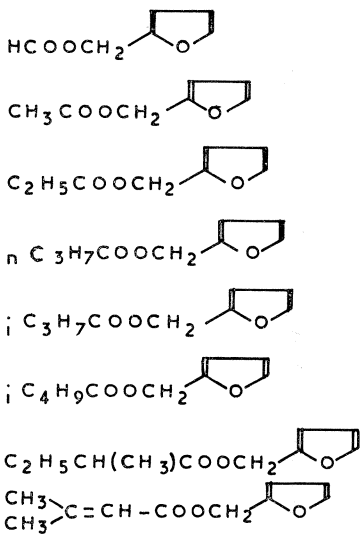
II Alcools - Ethers



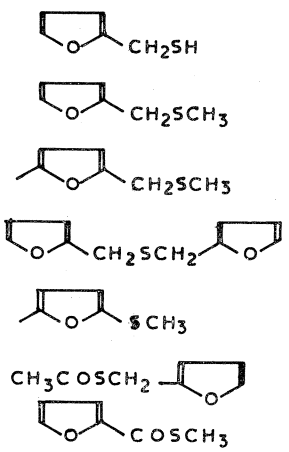
III Aldéhydes



VI Esters



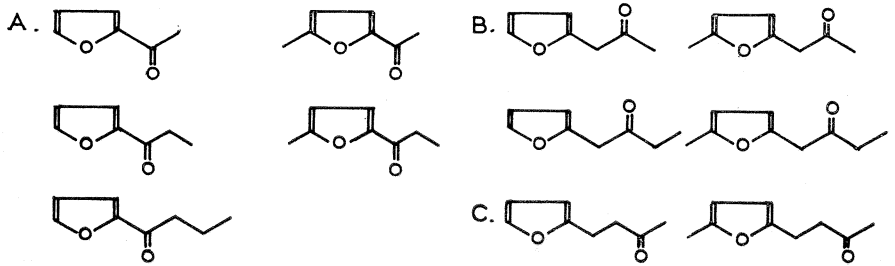
VII Prod. soufrés



VIII Nitrile



IV Cétones



V Dicétones

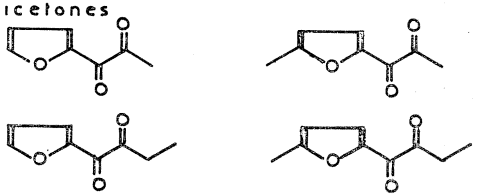
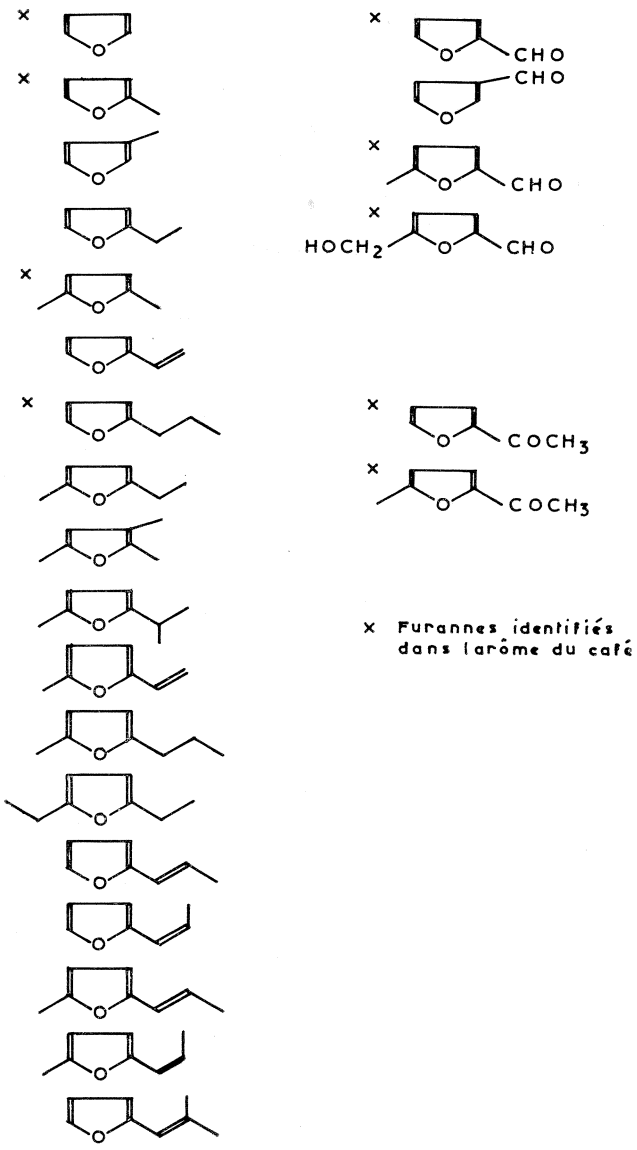


TABLEAU IV

Furannes formés par pyrolyse de D-glucose

(selon K. HEYNS & coll., *Carbohydrate Research*, 2, 132, 1966)



simples (tableau IV) qui ont été identifiés, neuf sont présents dans l'arôme de café. HEYNS a également constaté (15) que les autres pentoses, hexoses, di- et polysaccharides fournissent pratiquement les mêmes produits de pyrolyse, mais dans des proportions variables. Il est difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de proposer un mode de formation pour chacun de ces furannes, mais on peut raisonnablement penser qu'ils ont des origines relativement diverses, certains comme le furfural et l'hydroxyméthyl-furfural résultant directement d'une déshydratation des sucres, d'autres provenant de la cyclisation de fragments aliphatiques qui sont particulièrement nombreux, d'autres enfin étant issus de transformations (déshydratations, condensations, estérifications...) qui s'effectuent aux dépens de furannes déjà élaborés ou même d'autres hétérocycles (conversions hétérocycliques). La présence de radicaux libres dans le café torréfié (16) permet également d'expliquer la présence de bon nombre de composants et de formuler certaines hypothèses de travail dans le domaine synthétique.

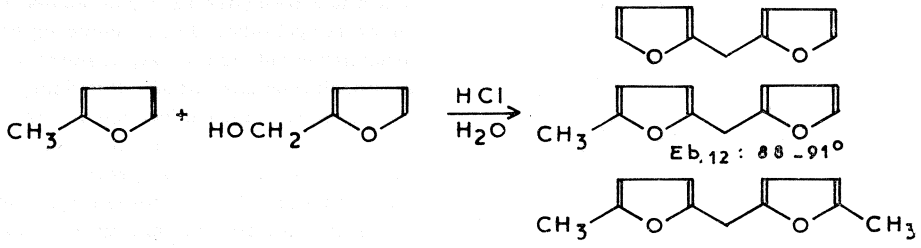
L'examen des propriétés chimiques du furfural nous permettra d'illustrer par un exemple concret certaines transformations qui peuvent se produire au cours de la torréfaction. Signalons d'abord que GIANTURCO (17) a observé que la concentration du furfural dans un extrait aromatique de café augmente durant les dix premières minutes de chauffage puis se met brusquement à décroître. Les réactions chimiques qui peuvent se produire dans ces conditions sont nombreuses ; citons seulement la condensation aldolique, la réduction, la formation d'acétals, la réaction avec l'ammoniac, les amines, l'hydrogène sulfuré ou le méthylmercaptan (provenant de la dégradation des acides aminés), l'hydrolyse, la polymérisation,... Un moyen d'améliorer quelque peu nos connaissances dans ce domaine serait de procéder à la torréfaction d'un café vert préalablement imprégné de furfural contenant un atome de carbone radioactif : par l'identification des furannes marqués ainsi engendrés, on pourrait établir l'importance de la participation du furfural à la formation des autres représentants de cette famille d'hétérocycles.

Les formidables progrès réalisés au cours de ces dernières années dans le domaine de l'analyse, et notamment la mise au point du couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, nous permettent également d'espérer une réponse relativement rapide à un certain nombre de problèmes concernant le mécanisme de la torréfaction. De toute façon nous sommes encore loin d'avoir identifié tous les produits présents dans l'arôme de café. La variété et le nombre de représentants du seul groupe des furannes que nous venons de passer en revue aura suffi, pensons-nous, à faire entrevoir la complexité du problème que représente pour tout chimiste l'analyse totale d'un arôme de café.

SYNTHÈSES ET PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DE QUELQUES FURANNES IDENTIFIÉS DANS L'ARÔME DE CAFÉ

(Méthyl-5-furyl-2)-(furyl-2)-méthane

SYNTHÈSE



Selon L. BIRKOFER, F. BECKMANN, *Ann.*, **620,** 21 (1959) et L. L. J. FAUQUE, U. S. Pat. 2.681.917 (1954), *C. A.* **49,** 7600 g (1955) ; voir aussi W. H. BROWN, H. SAWATZKY, *Can. J. Chem.*, **34,** 1147 (1956).

UV (EtOH)

λ max : 222,5 mμ, log ε : 4,19

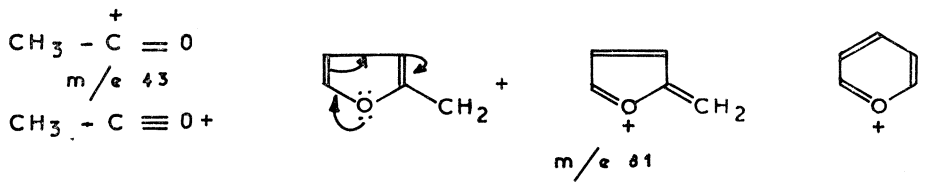
IR (liquide)

3112* (m), 2925 (m), 1593* (m), 1563* (s), 1501* (m), 1448 (m), 1420 (m), 1380 (m), 1213* (s), 1146* (s), 1071 (m), 1017* (s), 1007* (s), 963 (m), 949 (m), 933 (m), 882* (m), 779* (s), 758-750 (s), 727* (s), 596* (s) cm^{-1}.

*) bandes caractéristiques du cycle furannique (voir tableau V) et (18), (19).

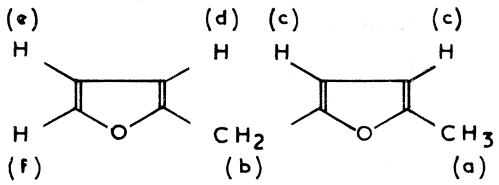
SM

Le spectre de masse du difurylméthane lui-même a été discuté par BIEMANN (20). On retrouve ici une forte similitude, le pic moléculaire étant simplement déplacé de quatorze unités de masse. Le pic à m/e 147 correspond à la perte d'un groupe méthyle tandis que les fragments 119 et 91 proviennent de l'élimination successive de deux molécules d'oxyde de carbone. Les fragments 43 et 81 sont d'autre part caractéristiques d'une structure furannique : ils correspondent respectivement à un furanne méthylé en position α et à un groupe furfuryle :



Un article sur la spectrométrie de masse des furannes a été récemment publié par HEYNS et coll. (21). Nous avons commenté ailleurs quelques exemples d'application de la méthode (22) (23).

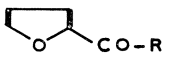
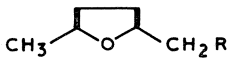
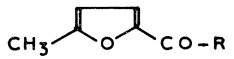
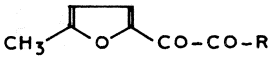
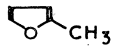
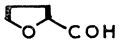
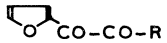
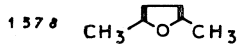
RMN



	δ (ppm)	
a	2.20	3H
b	3.85	2H
c	5.76	2H
d	5.93	1H
e	6.15	1H
f	7.18	1H

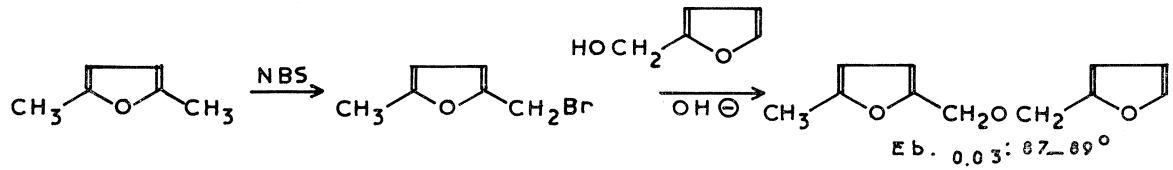
TABLEAU V

Bandes IR caractéristiques des furannes 2-mono- et 2,5-di-substitués (cm^{-1})

2- monosubstitués		2,5- disubstitués		
 R = Alcoyle, fur (fur)yle	 R = H, alcoyle	 R = H, alcoyle furyle	 R = Alcoyle	 R = Alcoyle
585 - 600 (fine)				
725 - 745 (large) 715 	758 - 763 753  768 - 770 	779 - 787	790 - 800	800
879 - 886				
1002 - 1015	1012 - 1028	1015 - 1023	1023 - 1025	1016 - 1021
1140 - 1163 (large)				
			1203 - 1220 aussi dans éthers monosubstitués	
	1460 - 1470			
1500 - 1510 (fine)			~1510 (large)	~1500 (doublet)
	1562 - 1570 1552 	1560 - 1570 1578 		1575 - 1580
1590 - 1612			1588 - 1590	
		1610 - 1625		
		3100 - 3130		

Ether méthyl-5-difurfurylique

SYNTHÈSE



Bromuration du diméthyl-2,5-furanne par la N-bromo-succinimide selon Ng. Ph. BUU-HOI et J. LECOCQ, *C. R.*, **222**, 1441 (1946).

UV (EtOH)

λ max : 225 mμ, log ε : 4,20

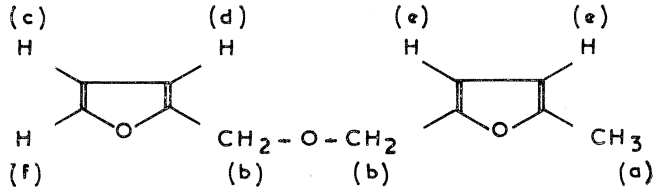
IR (liquide)

3150-3120* (m), 2925 (m), 2860 (m), 1768 (m), 1606* (m), 1560* (s), 1502* (m), 1440 (s), 1382 (m), 1355 (s, large), 1287-1265 (m), 1220* (s), 1148* (s), 1055 (s, large), 1010* (s, large), 977 (m), 922 (s), 882* (m), 787* (s), 740* (s, large), 598* (s) cm^{-1}.

SM

Ce spectre est caractérisé par deux pics majeurs m/e 95 et 81) que l'on peut immédiatement attribuer aux fragments méthyl-5-furfuryle et furfuryle (voir exemple I). La différence entre le poids moléculaire (192) et la somme de ces deux fragments (176) correspond à l'oxygène. La fonction éther est d'ailleurs confirmée par le fragment 111 (95 + 16).

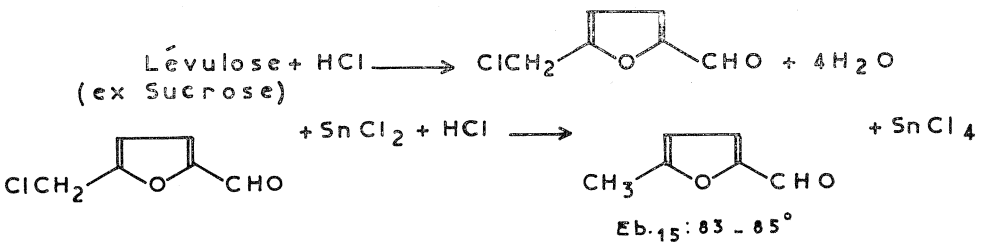
RMN



a	2,26	3H
b	4,29 et 4,36	4H
c	5,80	1H
d	6,08	1H
e	6,22	2H
f	7,30	1H

Méthyl-5-furfuraldéhyde

SYNTHÈSE



Selon I. J. RINKES, *Org. Syntheses*, **14**, 62 (1934) ; voir aussi D. A. H. TAYLOR, *J. Chem. Soc.*, 2767 (1959).

UV (EtOH)

λ max : 285 mμ, log ε : 4,25 ; λ max : 223 mμ, log ε : 3,73

IR (liquide)

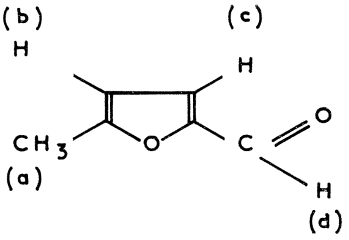
3320 (w), 3100* (m), 2800 (m), 2720 (w), 1780 (w), 1670 (s), 1580 (m), 1510* (s), 1440 (m), 1389 (m), 1370 (m), 1353 (m), 1279 (m), 1233 (m), 1200 (m), 1080 (m), 1005 (m), 964 (m), 942 (m), 799* (vs) 758 (vs, large) cm^{-1}.

SM

L'intensité relativement grande du pic à M-1 (109) est caractéristique de la fonction aldéhyde.

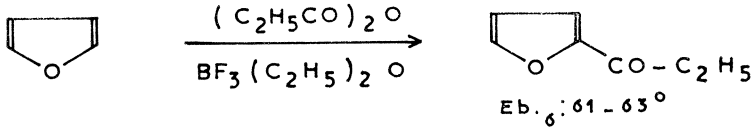
RMN

a	2.38	3H
b	6.20	1H
c	7.11	1H
d	9.43	1H



Propionyl-2-furanne

SYNTHÈSE



Selon J. V. HEID et R. LEVINE, *J. Org. Chem.*, **13**, 409 (1948).

UV (EtOH)

λ max : 270 mμ, log ε : 4,14 ; λ max : 224 mμ log ε : 3,43

IR (liquide)

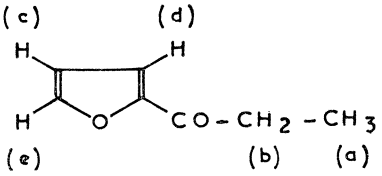
3130* (s), 2980 (s), 2940 (s), 1675 (s, large), 1565* (s), 1460* (s), 1391 (s), 1257-1245 (s), 1165-1155* (s), 1030* (s), 1007 (s), 957 (s), 901 (s), 887-880* (s), 760* (s, large), 595* (s, fine) cm^{-1}.

SM

Ce spectre est très simple : le fragment principal m/e 95 correspond au groupe furoyle résultant de la perte du radical éthyle.

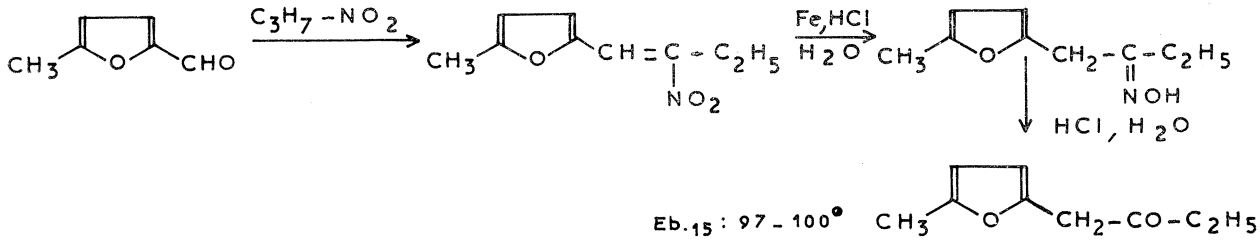
RMN

	δ (ppm)	
a	1.14	3H
b	2.80	2H
c	6.48	1H
d	7.08	1H
e	7.55	1H



(Méthyl-5-furyl-2)-1-butanone-2

SYNTHÈSE



Selon H. B. HASS, A. G. SUSIE et R. L. HEIDER, *J. Org. Chem.*, **15**, 8 (1950).

UV (EtOH)

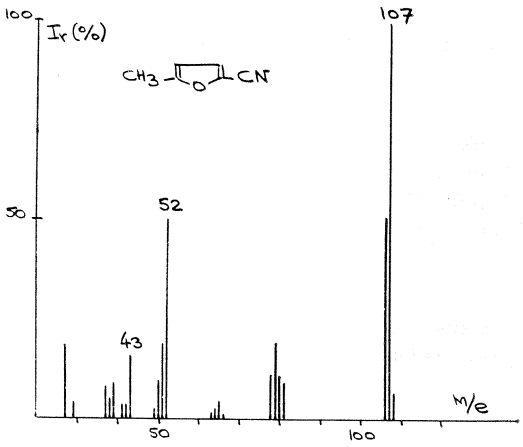
λ max : 220 mμ, log ε : 3,88 ; λ max : 286 mμ, log ε : 3,02

IR (liquide)

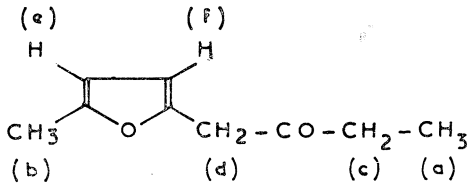
3130-3105* (w), 2980 (s), 2940-2925 (m), 1715 (s, large), 1612* (m), 1564* (s), 1455 (m), 1408 (m), 1375 (m), 1347 (m), 1216* (s), 1170 (m), 1105 (m), 1018* (s), 960 (m), 943 (m), 781* (s) cm^{-1}.

SM

Le pic principal (95) correspond au fragment méthyl-5-furfuryle ; on remarque aussi la présence du fragment m/e 57 provenant du groupe propionyle de la chaîne latérale.



RMN



	δ (ppm)	
a	0.97	3H
b	2.23	3H
c	2.40	2H
d	3.52	2H
e	5.80	1H
f	5.94	1H

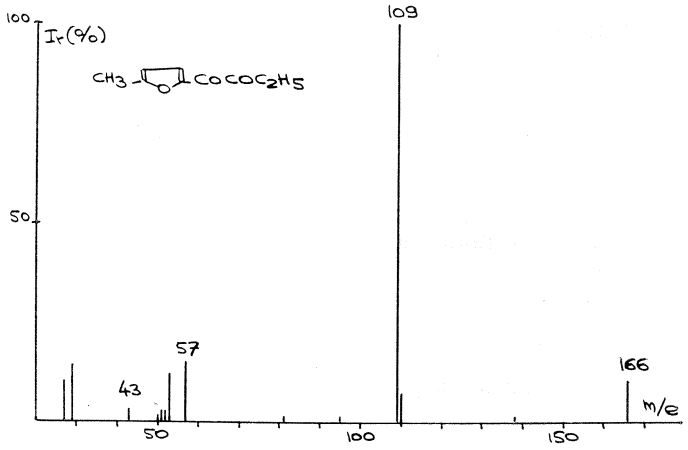
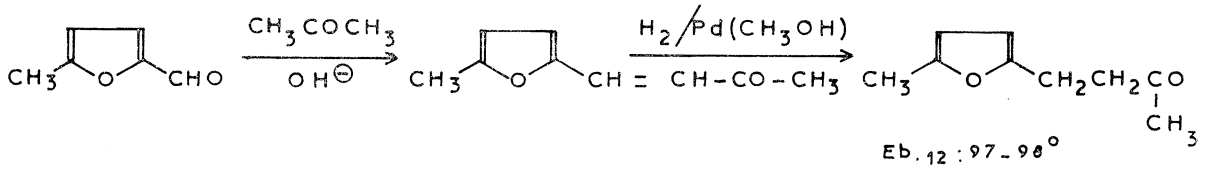


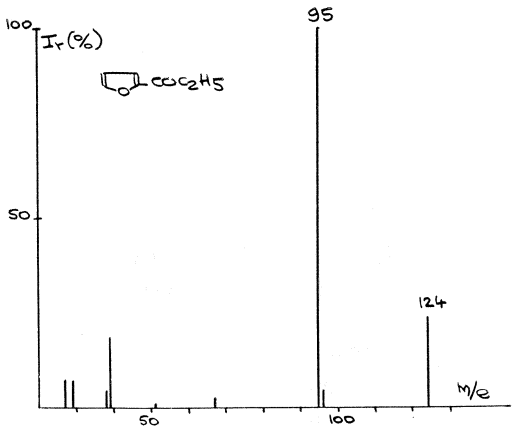
Fig. 1. — *Ci-dessus et ci-contre : spectres de masse de quelques furannes identifiés dans l'arôme de café*

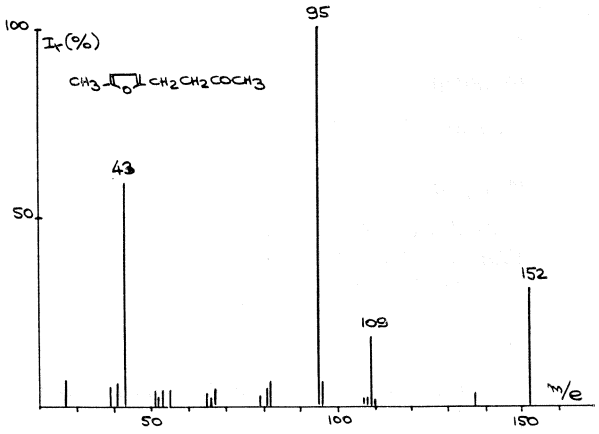
(Méthyl-5-furyl-2)-1-butanone-3

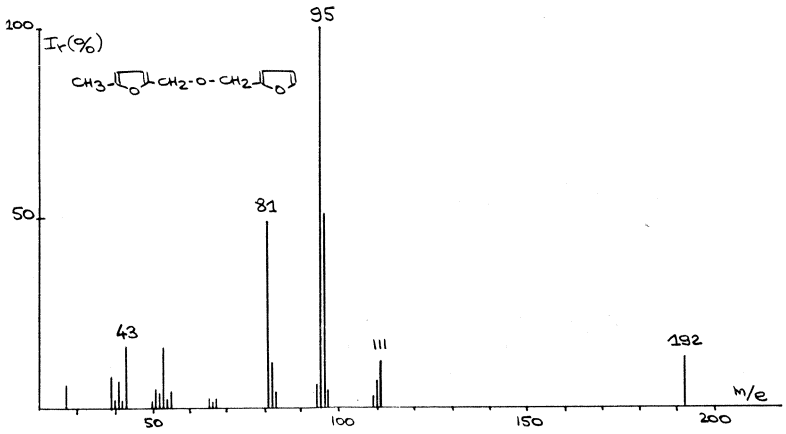
SYNTHÈSE

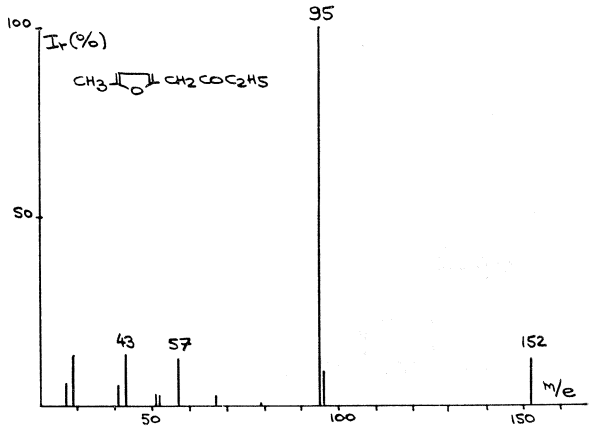


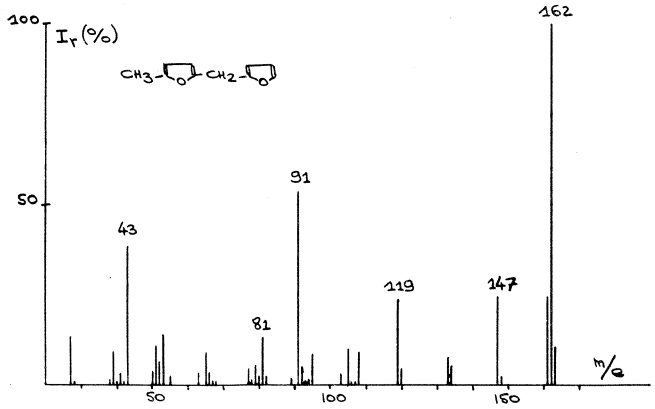
Selon K. ADLER et C. H. SCHMIDT, *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, **76**, 183 (1943).

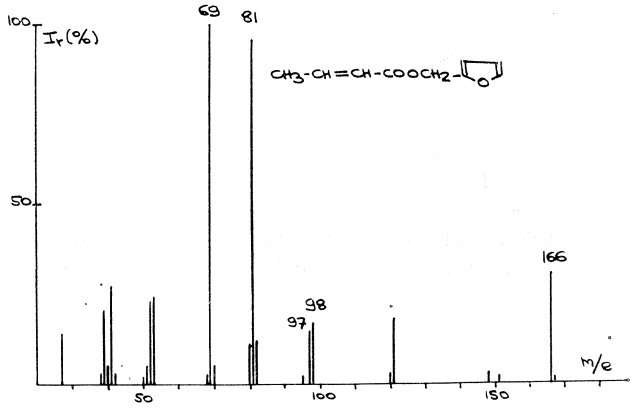

100
50
I_r(%)
95
124
m/e
50
100

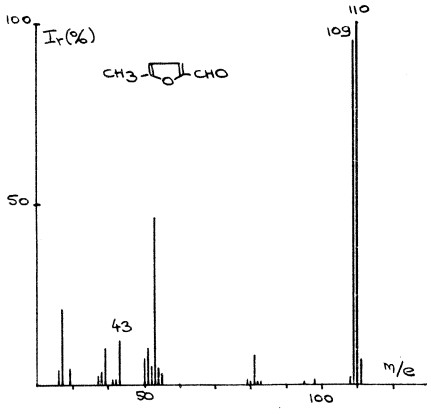

100
50
I_r(%)
95
43
108
152
m/e
50
100
150

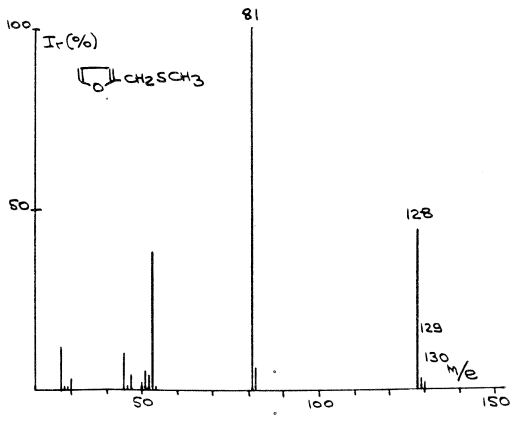

100
50
I_r(%)
95
81
43
111
192
m/e
50
100
150
200


100
50
I_r(%)
95
43
57
152
m/e
50
100
150


100
50
I_r(%)
162
91
43
81
119
147
m/e
50
100
150


100
50
I_r(%)
69
81
166
98
97
m/e
50
100
150


100
50
I_r(%)
110
109
43
m/e
50
100


100
50
I_r(%)
81
128
129
130
m/e
50
100
150

UV (EtOH)

λ max : 220 mμ, log ε : 3,93

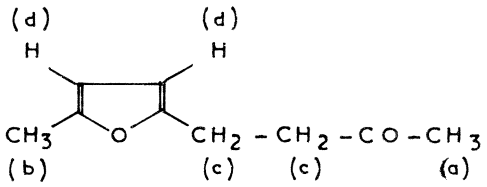
IR (liquide)

3105* (w), 2950-2920 (s), 1715 (s, large), 1616* (m), 1570* (s), 1435-1410 (m), 1358 (s), 1216* (s), 1160 (s), 1017* (s), 945 (m), 780* (s), cm^{-1}.

SM

Le pic à m/e 95 correspond, comme dans l'exemple précédent, au fragment méthyl-5-furfuryle. La présence d'un groupe méthylène entre ce fragment et le groupe acétyle (m/e 43) est responsable du pic à m/e 109.

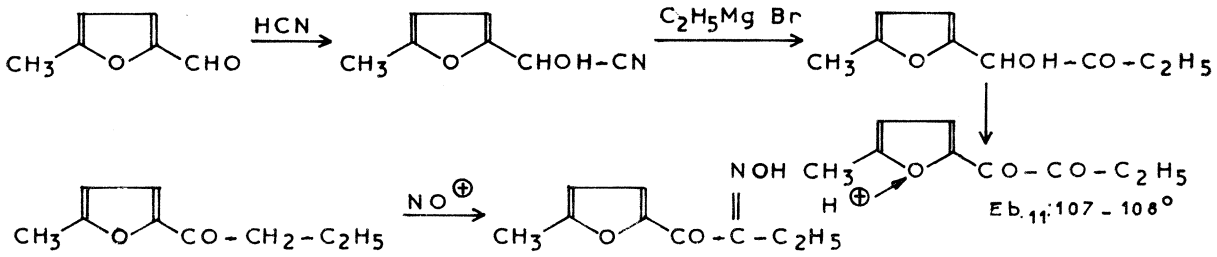
RMN



	δ (ppm)	
a	2.06	3H
b	2.21	3H
c	2.71	4H
d	5.73	2H

(Méthyl-5-furyl-2)-1-butanedione-1,2

SYNTHÈSE



D'après D. GAUTHIER, *C. R.*, **152**, 1100 (1911) ; voir aussi H. T. CLARKE et E. E. DREGER, *Org. Syntht.*, **6**, 6 (1926) ; M. WEISS et M. APPEL, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3666 (1948) : M. A. GIANTURCO, A. S. GIAMMARINO, P. FRIEDEL, V. FLANAGAN, *Tetr.*, **20**, 2951 (1964).

UV (EtOH)

Ce produit absorbe dans le visible, il possède la couleur jaune caractéristique des α-dicétones :

λ max : 310 mμ, log ε : 4,01 ; λ max : 217 mμ, log ε : 3,56

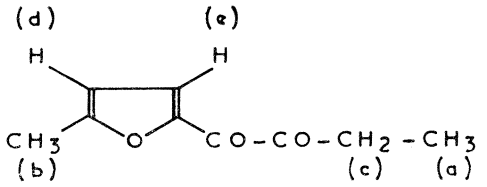
IR (liquide)

3155-3120* (m), 2980-2940 (m), 1715 (s), 1650 (s, large), 1576* (m), 1508-1497* (s), 1452 (m), 1368-1351 (m), 1300 (s), 1207* (s), 1142 (m), 1073 (m), 1021-1005* (s), 965 (s), 942 (s), 833-800* (s, large), 651 (m) cm^{-1}.

SM

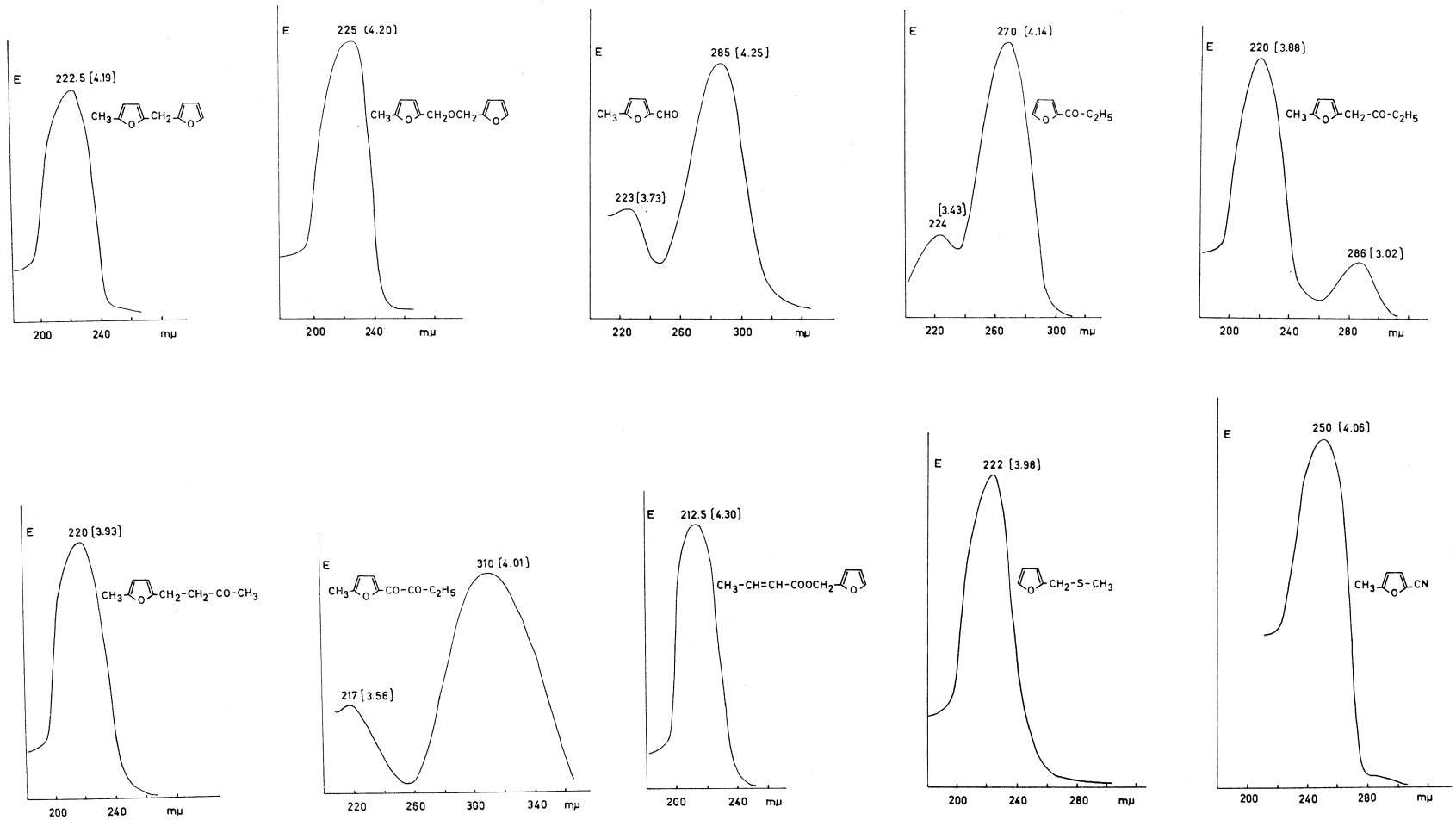
Le pic majeur à m/e 109 correspond au fragment méthyl-5-furoyle, le reste propionyle (m/e 57) venant ensuite par ordre d'importance. Le fragment 43 caractéristique de la structure α-méthylée est également présent.

RMN



	δ (ppm)	
a	1.11	3H
b	2.44	3H
c	2.85	2H
d	6.17	1H
e	7.44	1H

Fig. 2. — *Spectres U. V. de quelques furannes identifiés dans l'arôme de café*



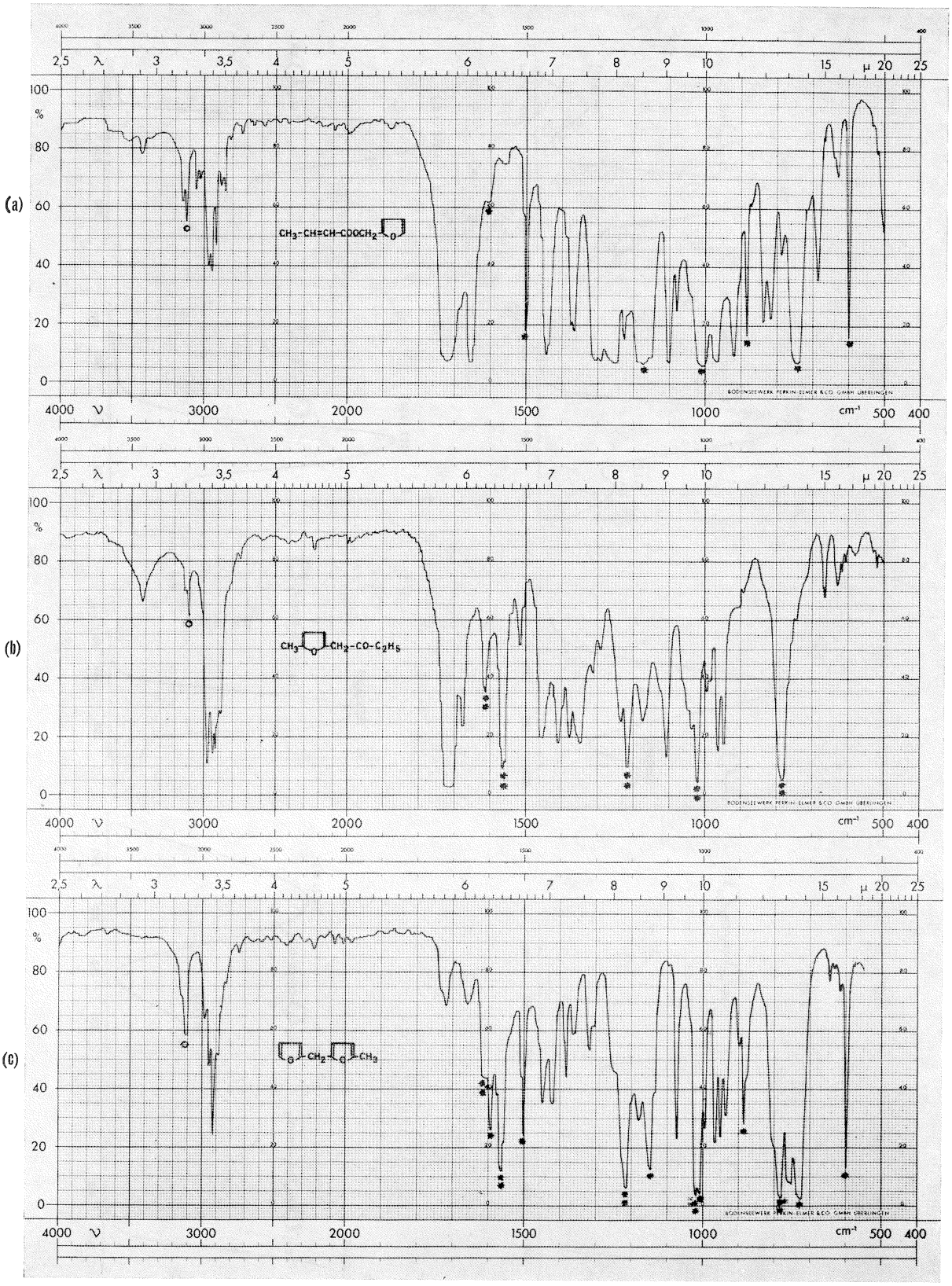


Fig. 3 a). — *Spectres I. R. de furannes 2-monosubstitué* (a), 2,5-*disubstitué* (b) *et* 2- *et* 2,5-*substitué* (c)

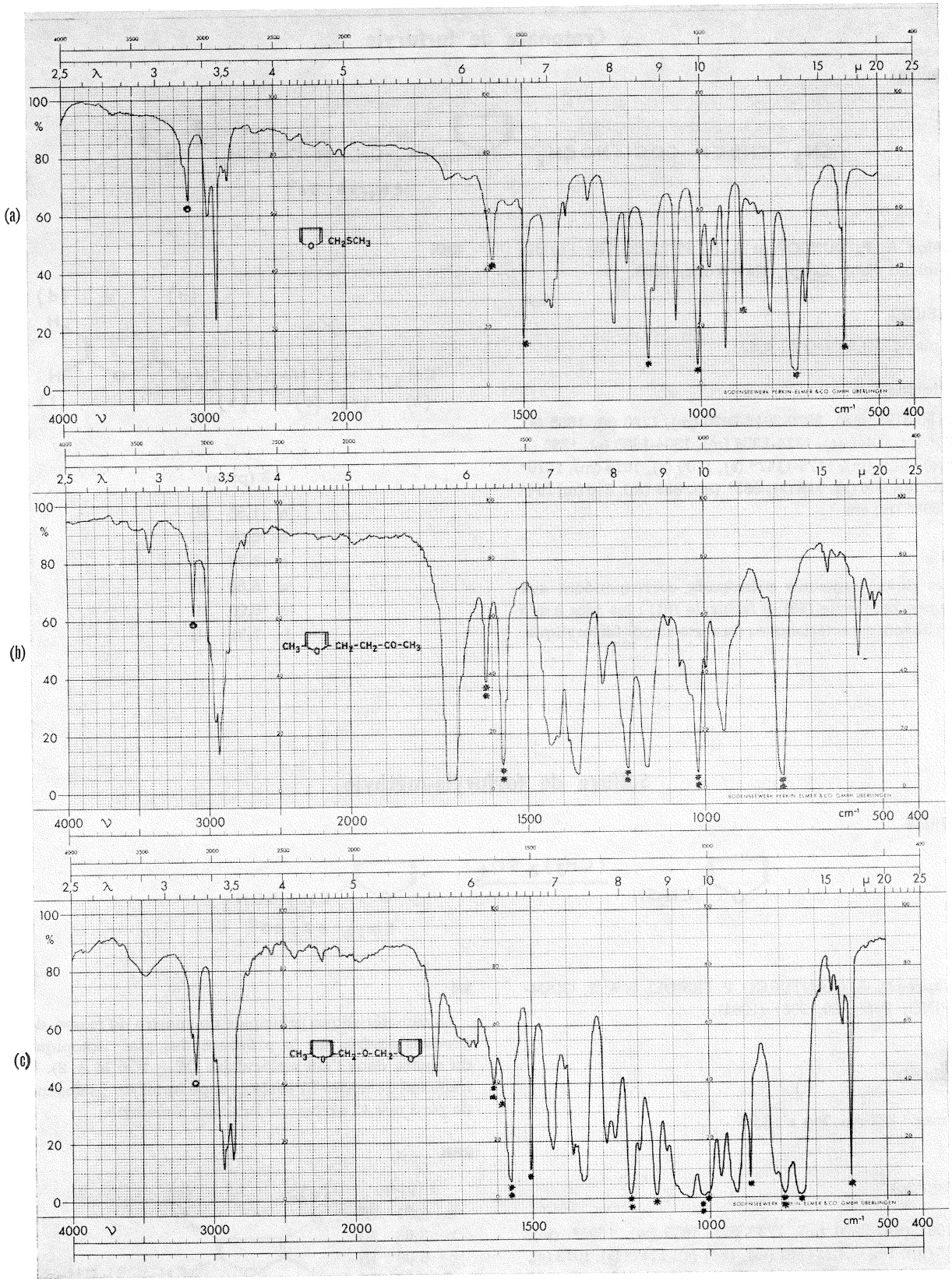
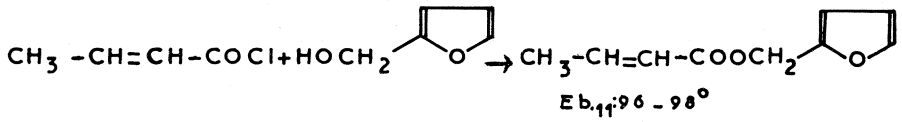


Fig. 3 b). — *Spectres I. R. de furannes* 2-*monosubstitué* (a), 2,5-*disubstitué* (b) *et* 2- et 2,5-*substitué* (c)

Crotonate de furfuryle

SYNTHÈSE



Selon A. P. DUNLOP et F. N. PETERS, The Furans, Rheinhold Publ. Corp., New York, 1953.

UV (EtOH)

λ max : 212,5 ; log ε : 4,30

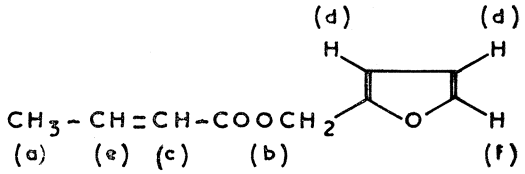
IR (liquide)

3150-3125* (w), 2970-2945-2920 (m), 1720 (s), 1655 (s), 1500* (m), 1442 (s), 1374-1366 (m), 1304-1290 (s), 1255 (s, large), 1224 (m), 1175-1147* (s), 1100 (s), 1078 (m), 1010* (s, large), 966 (s), 918 (s), 883* (m), 835 (m), 815 (m) 744* (s), 598* (m) cm^{-1}.

SM

Les deux fragments principaux correspondent aux groupes buténoyle (69) et furfuryle (81) ; les pics à m/e 98 et 97 sont caractéristiques du reste alcool furfurylique.

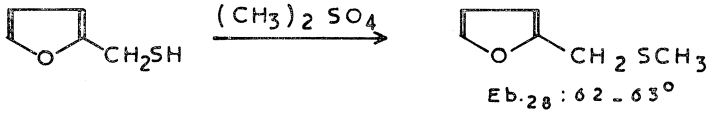
RMN



	δ (ppm)	
a	1.85	3H
b	5.01	2H
c	5.75	1H
d	6.30	2H
e	6.90	1H
f	7.31	1H

Sulfure de furfuryle-méthyle

SYNTHÈSE



D'après M. A. GIANTURCO, P. FRIEDEL et A. S. GIAMMARINO, *Tetr.*, **20**, 2951 (1964).

UV (EtOH)

λ max : 222 mμ, log ε : 3,98

IR (liquide)

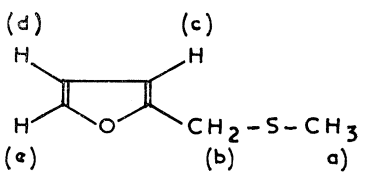
3100* (w), 2920 (m), 1720 (w), 1670 (w), 1595* (m), 1502* (m), 1433-1420-1407 (m), 1247 (s), 1147* (s), 1072 (s), 1008* (s), 938 (s), 884* (m), 805 (s), 730* (vs, large), 705 (m), 596* (s, fine) cm^{-1}.

SM

La caractéristique principale du spectre de masse des produits soufrés est la présence des pics isotopiques du soufre dans l'ion moléculaire (M + 1 et M + 2). Le fragment de masse 81 est le groupe furfuryle ; l'absence de pic à m/e 43 exclut une structure α-méthylée.

RMN

	δ (ppm)	
a	2.01	3H
b	3.58	2H
c	6.08	1H
d	6.21	1H
e	7.25	1H



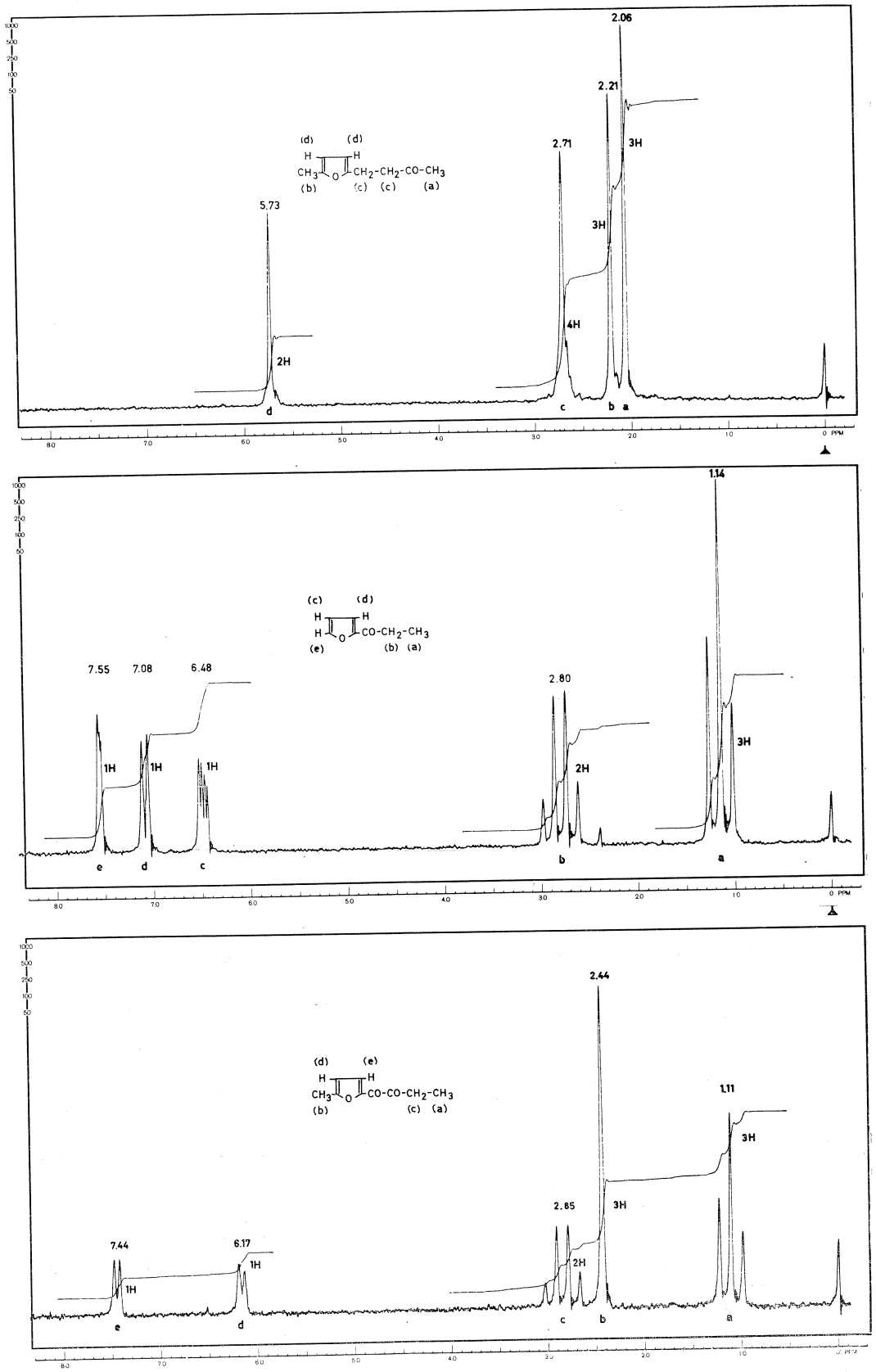
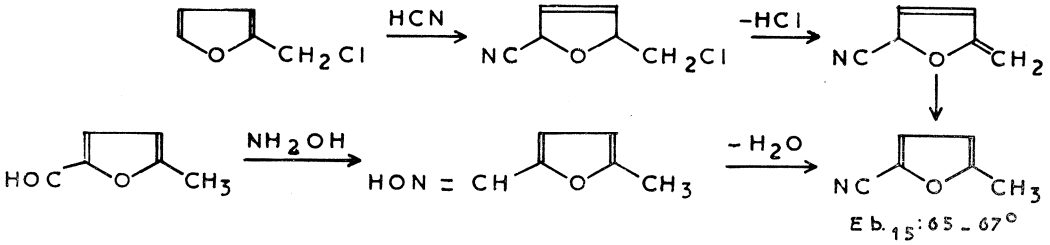


Fig. 4. — *Spectres de résonance magnétique nucléaire de quelques furannes identifiés dans l'arôme de café*

Cyano-2-méthyl-5-furanne

SYNTHÈSE



Selon E. W. SCOTT et J. R. JOHNSON, *J. Amer. Chem. Soc.*, **54**, 2549 (1932).

UV (EtOH)

λ max : 250 mμ, log ε : 4,06

IR (liquide)

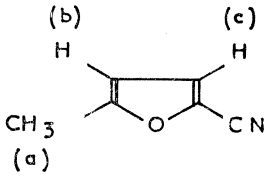
3110* (m), 2925 (m), 2225 (s), 1750-1715 (m), 1680 (m) 1595* (s), 1520* (s), 1445 (s), 1225* (vs), 1200 (s), 1020* (s), 945 (s), 870 (m, large), 795* (vs, large) cm^{-1}.

SM

La valeur impaire du pic moléculaire (107) est caractéristique de la présence d'un atome d'azote ; le fragment m/e 43 indique bien qu'il s'agit d'un furanne méthylé en position α.

RMN

	δ (ppm)	
a	2.39	3H
b	6.12	1H
c	6.93	1H



RÉFÉRENCES

1. M. STOLL, M. WINTER, F. GAUTSCHI, I. FLAMENT, B. WILLHALM. — *Helv. Chim. Acta*, **50**, 628 (1967).
2. H. HADORN, H. SUTER. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, **47**, 33 (1956).
3. E. E. LOCKHART. — Chemistry of natural food flavors, Advisory Board on Quartermaster Research and Development, Washington, p. 174 (1957).
4. M. SIVETZ. — Coffee Processing Technology, AVI Pub. Co., vol. II, 165 (1963).
5. G. E. UNDERWOOD. — A study of the non-caffeine nitrogenous compounds of coffee. Ph. D. Diss. Ohio State Univ. (1951). *Diss. Abs.*, **18**, 1603 (1958).
6. G. E. UNDERWOOD, F. E. DEATHERAGE. — *Food Research*, 419, 425 (1952).
7. C. E. BARBERA. — *Coffee and Tea Ind.*, **79**, 12 (1956).
8. H. THALER, R. GAIGL. — *Z. Lebensm. Unters.*, **119**, 10 (1962).
9. H. THALER. — *Z. Lebensm. Unters.*, **106**, 2, 128 (1957).
10. C. P. NATARAJAN, K. M. URS, D. S. BHATIA. — *J. Indian Chem. Soc. and News*, **18**, 9 (1955).
11. I. FLAMENT, M. WINTER, F. GAUTSCHI, B. WILLHALM, M. STOLL. — 4e Symposium International de Chromatographie et Electrophorèse (Bruxelles, sept. 1966) et *Chimia*, **21**, 39 (1967).
12. F. GAUTSCHI. — « Nouveaux laboratoires de Recherche, Firmenich », p. 28, édité par Firmenich & Cie, Genève 1959.
13. C. LENTNER, F. E. DEATHERAGE. — *Food Research*, **24**, 483 (1959).
14. K. HEYNS, R. STUTE, H. PAULSEN. — *Carbohydrate Res.*, **2**, 132 (1966).
15. Prof. K. HEYNS, Hambourg, Communication privée.
16. J. P. O'MEARA, F. K. TRUBY, J. M. SHAW. — Coffee Brewing Inst. Publ. nº 18, March 1957 ; *Food Res.*, **22**, 96 (1957).
17. M. A. GIANTURCO. — The volatile constituents of coffee. Flavor Symposium, Univ. of Oregon, Sept. 1965.

18. M. A. GIANTURCO, A. S. GIAMMARINO P. FRIEDEL, V. FLANAGAN. — *Tetr.*, **20**, 2951 (1964).
19. A. R. KATRITZKY. — Physical Methods in Heterocyclic Chemistry. Academic Press, vol. II (1963).
20. K. BIEMANN. — Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications. Mc Graw Hill (1962), p. 139.
21. K. HEYNS, R. STUTE, H. SCHARMANN. — *Tetr.*, **22**, 2223 (1966).
22. F. GAUTSCHI, M. WINTER, I. FLAMENT, B. WILLHALM, M. STOLL. — *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 15 (1967).
23. M. WINTER, F. GAUTSCHI, I. FLAMENT, B. WILLHALM, M. STOLL. — « Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln » Agrikulturchemisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, 4-5 April 1967.

FLAMENT (I.), GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), WILLHALM (B.), STOLL (M.). — **Les composants furanniques de l'arôme du café : quelques aspects chimiques et spectroscopiques.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 197-215, fig., tabl., réf.

Après avoir défini les conditions moyennes de torréfaction (précurseurs, température, durée, pression...) on passe en revue les principaux groupes de composants de l'arôme de café torréfié. On examine ensuite les différents modes de formation du cycle furannique en tenant compte des conditions réactionnelles et de la présence d'autres produits de torréfaction. Sur la base de la réactivité chimique, on tente ainsi d'expliquer d'une part la structure d'une cinquantaine de composants furanniques identifiés et d'autre part leur transformation en d'autres produits hétérocycliques déjà identifiés ou encore hypothétiques.

La seconde partie de cet exposé est plus spécialement consacrée à l'étude structurale des composants furanniques, à leurs caractéristiques spectroscopiques (IR, UV, RMN) et à leur fragmentation en spectrométrie de masse.

FLAMENT (I.), GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), WILLHALM (B.), STOLL (M.). — **The furanic components of coffee aroma : some chemical and spectroscopical aspects.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 197-215, fig., tabl., réf.

After having defined the average roasting conditions (precursors, temperature, time period, pressure) the principal groups of constituents making up the aroma of roasted coffee are examined. Afterwards, the various methods of forming the furanic cycle are considered while allowing for the reactive conditions and the presence of other formed products during the roasting process. On the basis of the chemical reactivity, an attempt is being made to thus explain, on the one hand the structure of the fifty odd furanic constituents already identified and on the other, their transformation into other heterocyclic substances already identified or still undefined.

The second part of this paper is more especially devoted to the structural study of the furanic constituents, to their spectroscopical characteristics (IR, UV, RMN) and to their fragmentation in mass spectrometry.

FLAMENT (I.), GAUTSCHI (F.), WINTER (M.), WILLHALM (B.), STOLL (M.),. — **Die Furankomponenten des Kaffeearomas : einige chemische und spektroskopische Gesichtspunkte.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 197-215, fig., tabl., réf.

Nach einer Darlegung der durchschnittlichen Röstungsbedingungen (Vorläufer, Temperatur, Dauer, Druck...) werden die wesentlichen Aromabestandteile des Röstkaffees geprüft. Sodann werden die verschiedenen Entstehungsweisen des Furanzyklus unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen und der Gegenwart von anderen Röstprodukten untersucht. So wird auf der Grundlage der chemischen Reaktionsfähigkeit versucht einerseits die Struktur von etwa fünfzig identifizierten Furankomponenten und anderseits ihre Verwandlung in andere heterozyklische teils identifizierte teils noch hypothetische Produkte zu erklären.

Im zweiten Teil des Berichts werden ganz besonders die Struktur der Furankomponenten, ihre spektroskopischen Eigenschaften (IR, UV, RMN) und ihre massenspektrometrische Fragmentierung erörtert.

DISCUSSION

M. STREULI : Erlauben Sie mir eine kleine historische Anmerkung. Es ist interessant, dass unter den Verbindungen die seinerzeit schon Staudinger und Reichstein gefunden hatten, schon Staudinger vor nun 40 Jahren die Bedeutung dieser Thiocarbonsaüren aufmerksam gemacht hat. Reichstein und Staudinger haben solche Verbindungen auch verwendet in künstlichen Aroma das sie später in einer deutschen Firma hergestellt haben.

Herr Dr. Flament, könnten Sie uns etwas sagen über die Bedeutung dieser Thiocarbonsaüren für den Geruch, für den Geschmack des Kaffeearomas ?

M. FLAMENT : Des thioesters ont effectivement été identifiés dans l'arôme du café ; citons par exemple le thioacétate de furfuryle et le thiofuroate de méthyle. En ce qui concerne leurs propriétés organoleptiques, il m'est difficile de vous renseigner. Ils ne sont cependant certainement pas aussi typiques que le furfurylmercaptan découvert par Reichstein et Staudinger.

GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON COFFEIN IN COFFEINFREIEM KAFFEE-EXTRAKT

O. G. VITZTHUM
HAG Aktiengesellschaft, Bremen

Zur Bestimmung von Coffein in Kaffee sind bisher mehr als 100 Analysenmethoden publiziert worden. Der Coffeingehalt wurde hierbei — nach dem Aufschluss der Kaffeeproben — u. a. gravimetrisch (1, 2), durch Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL (3-5), spektralphotometrisch (6-14), jodometrisch (15-20), colorimetrisch (21), mit Hilfe radiochemischer Methoden und durch azeotrope Extraktion (24) bestimmt.

Die Zahl der möglichen Analysenverfahren vermindert sich jedoch, wenn man die Restcoffeinmengen in entcoffeinierten Kaffeeprodukten messen will. Für diese Kaffeesorten darf der Coffeingehalt in Deutschland bei Bohnenkaffee 0,08 % und bei löslichem Kaffee 0,32 % nicht überschreiten. Um derartige geringe Coffeinmengen quantitativ gut messen zu können, bedarf es relativ langwieriger Reinigungs- und Anreicherungsprozesse sowie empfindlicher « Detektoren ».



Das Ziel unserer Bestrebungen war, eine schnelle Bestimmungsmethode für coffeinfreien löslichen Kaffee zu entwickeln. Als neues Verfahren setzten wir hierfür die Gaschromatographie ein, die unseres Wissens bisher noch nicht zur Coffeinbestimmung in Kaffee vorgeschlagen worden ist.

Die Gaschromatographie kann als moderne leistungsfähige Analysenmethode immer dann benutzt werden, wenn Stoffgemische mit Siedepunkten bis zu 500° C unzersetzt verdampfbar sind. Durch Anwendung einer richtigen Trenntechnik und geeigneter Säulen lassen sich die Substanzen im mg-Bereich und darunter quantitativ auftrennen ; mit Hilfe hochempfindlicher Detektoren können noch 10^{-12} bis 10^{-15} g erfasst werden.

Coffein schmilzt bei 237° C ; es beginnt jedoch schon ab 150° C zu sublimieren ; es ist thermostabil und geht unzersetzt in die Gasphase über, eine Voraussetzung, welche, wie erwähnt, für die Anwendung der Gaschromatographie gefordert wird.

Die gaschromatographische Bestimmung von Coffein in Arzneimitteln haben bereits REISCH (25), HOFFMANN (26) und KOLB (27) beschrieben. Als Trennsäulenfüllung benutzten sie die für höhere Arbeitstemperaturen einsetzbaren Silikon-Öl- und Silikon-Gummi-Phasen DC 200, SE 52 und XE 60 auf Chromosorb, einer Kieselgursorte.

Will man das polare Coffein an einer unpolaren Silikon-Gummi-Phase trennen, so ist der Coffein-Peak im Gaschromatogramm meist mit einem starken, sog. Tailing, behaftet (Abb. 1) :

Wir haben hier Coffein in Lösung durch eine derartige unpolare Silikon-Gummi-Säule — 2,5 % SE 30 auf Chromosorb — geschickt, und die Registrierung im Flammenionisationsdetektor des Gaschromatographens durchgeführt. Die für eine quantitative Auswertung lästige Asymmetrie des Coffein-Peaks ist deutlich zu erkennen.

Die tiefere Ursache des Tailings ist darin zu suchen, dass die unpolare Trennphase restliche aktive Zentren

des festen porösen Trägermaterials nicht desaktivieren kann, so dass Adsorptionskräfte zwischen Coffein und dem festen Träger wirksam werden. Das Coffein wird daher vom strömenden Trägergas unsymmetrisch eluiert.

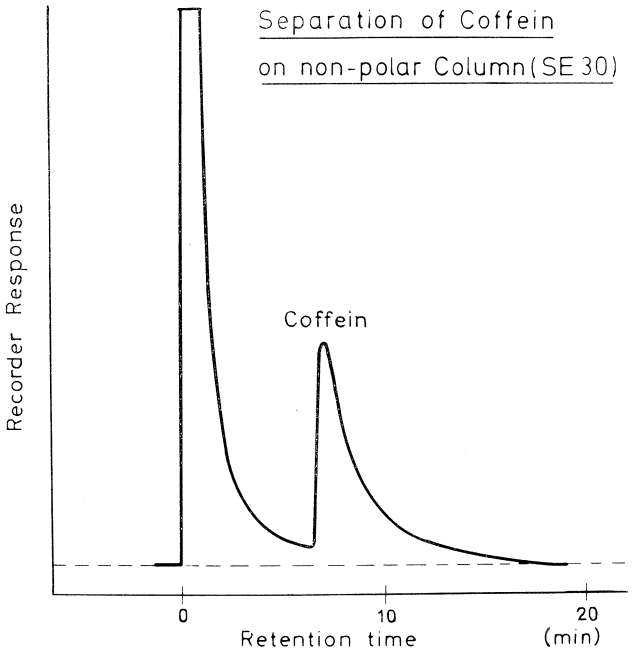
Die aktiven Zentren — es handelt sich meistens um freie Hydroxylgruppen an der Kieselguroberfläche, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen begünstigen — kann man teilweise blockieren durch « Silanisieren ». So lassen sich diese Hydroxylgruppen umsetzen mit Dimethyldichlorsilan oder nach KISELEV (28) besser mit Trimethylchlorsilan sowie mit Hexamethyldisilazan ; die Kieselguroberfläche wird dadurch mit hydrophoben Trimethylsilylresten beschichtet. KOLB (27) erzielte damit eine verbesserte Symmetrie des Coffeinpeaks.

Will man hochsiedende Komponenten, wie die Alkaloide, bei nicht zu hohen Temperaturen rasch auftrennen, so muss man niedrig belegte Säulen verwenden. Ein dünner Film von stationärer Phase auf dem festen Träger ergibt kurze Retentionszeiten. Die Porenstruktur der meisten Trägermaterialien wirkt sich bei niedriger Belegung nachteilig aus, denn die längeren Diffusionswege in den mit stationärer Phase gefüllten Poren können zusätzliches Tailing und eine Bandenverbreiterung bewirken.

Um alle diese störenden Effekte möglichst niedrig zu halten, benutzten wir als festes Trägermaterial für die Coffeintrennung die von LITTLEWOOD (29) eingeführten Mikroglasperlen (micro glass beads). Sie haben eine kleine, aber sehr homogene Oberfläche mit wenig aktiven Zentren, sind nicht porös und können daher nur mit 0,1 bis 1 % flüssiger Phase belegt werden. Polare hochsiedende Verbindungen werden auch an mit polaren Phasen imprägnierten Mikroglasperlen rasch und trotz des dünnen Flüssigkeitsfilmes symmetrisch eluiert. Einen vielfachen Einsatz haben derartige Säulen in der Gaschromatographie hochsiedender Komponenten bei Apparate-Temperaturen von bis zu 200° C unterhalb der Siedepunkte der Substanzen gefunden.

Abb. 2 zeigt ein Chromatogramm von Coffein, das wir an einer 2 m langen Mikroglasperlensäule, belegt mit 0,2 % Carbowax 20 M, erhielten. Coffein wurde hierbei in alkoholischer Lösung injiziert. Der erste

Abbildung 1.



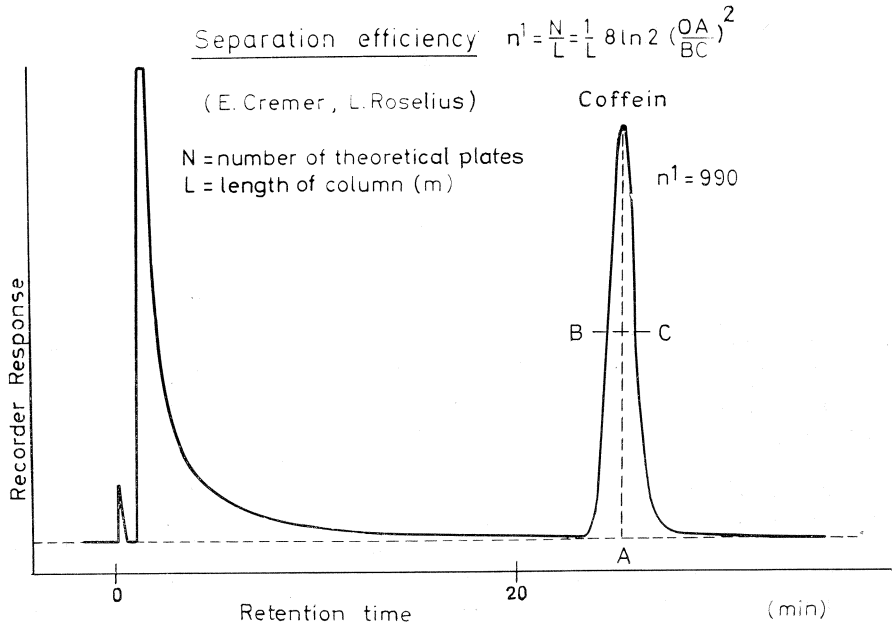


Abbildung 2.

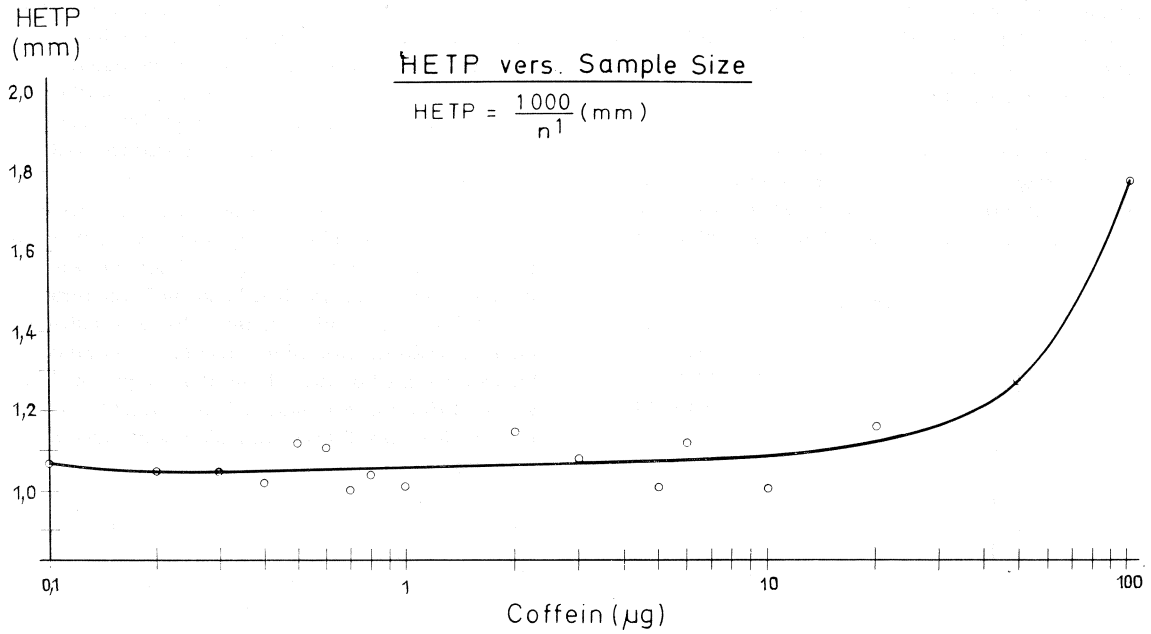


Abbildung 3.

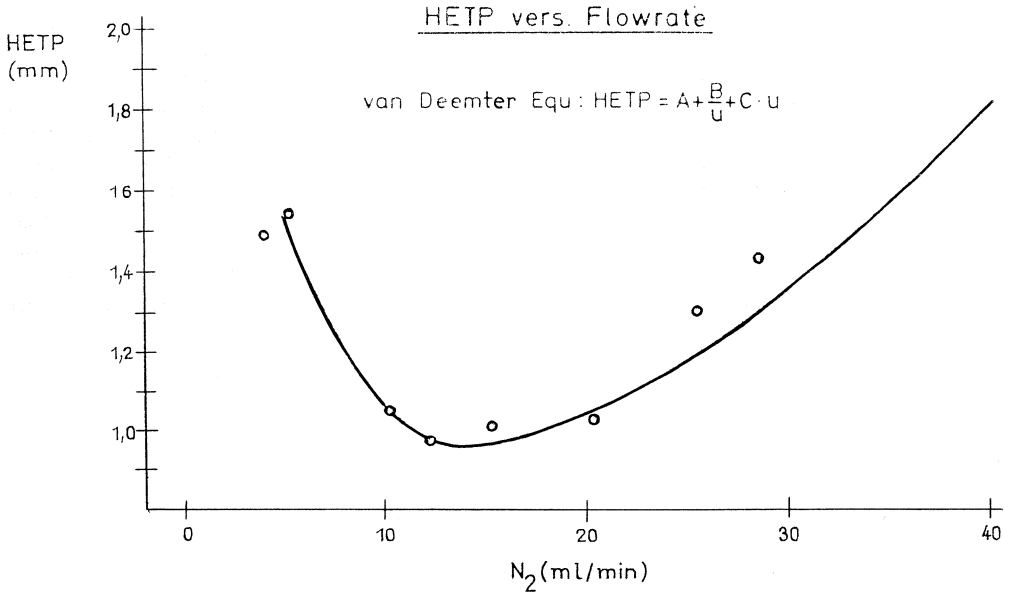


Abbildung 4.

grosse Peak stammt vom Lösungsmittel. Man erkennt, dass kein Tailing für Coffein mehr vorhanden ist ; der Peak ist symmetrisch. Nach der Formel von CREMER-ROSELIUS lässt sich die Trennleistung n^1 — das ist die auf die Säulenlänge von 1 m bezogene Trennstufenzahl N — aus der Gesamtretentionszeit und der Bandenbreite in halber Höhe errechnen.

Wir haben diese Trennleistung für verschiedene Coffeinmengen bestimmt. Ihr Verlauf ist aus Abb. 3 ersichtlich. Auf der Abszisse ist logarithmisch die absolute Coffeinmenge, auf der Ordinate die theoretische Bodenhöhe, der HETP-Wert, aufgetragen. Der HETP-Wert ist der reziproke Wert der Trennleistung n^1, wie aus der um die Dimension korrigierten Beziehung hervorgeht. Wir erkennen aus der Abbildung, dass ab etwa 10 µg Coffein ein deutlicher Anstieg der theoretischen Bodenhöhe, also eine Verschlechterung der Trennleistung eintritt.

Diese Verschlechterung ist bedingt durch die niedrige Belegung der Säule mit stationärer Phase ; die Säule wird dann überlastet. Für die Anzeige derart geringer Substanzmengen kann selbstverständlich nur ein Flammenionisationsdetektor verwendet werden.

In Abbildung 4 ist — ebenfalls für Coffein — die Ab-

hängigkeit des HETP-Wertes von der Strömungsgeschwindigkeit u in der Säule aufgetragen. Man findet beim Minimum für HETP von etwa 1 mm das Optimum der Strömungsgeschwindigkeit von 15 ml Stickstoff/min. Die Kurve der HETP/u-Abhängigkeit hat die Form einer Hyperbel. Man erhält sie auch mathematisch nach VAN DEEMTER : Die Beziehung

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

stellt als Funktion die Gleichung einer Hyperbel dar. Legt man an den rechten Schenkel die Asymptote so schneidet diese die HETP-Achse bei Wert A. Dieser Wert A, den man auch als Streudiffusion bezeichnet, beinhaltet die statistische Unregelmässigkeit der Packung. A ist besonders klein bei den geometrisch optimal gestalteten, kugelförmigen Mikroglasperlen.

Für die gaschromatographischen Versuche zur Coffeintrennung verwendeten wir die beschriebene Mikroglasperlensäule mit Carbowax-Imprägnierung. Das Gaschromatogramm einer alkoholischen Lösung von Coffein und des als inneren Standard zugesetzten Pyrens ist in Abb. 5 zu sehen. Der Lösungsmittel-Peak ist aufgrund der durch die geringen Substanzkonzentrationen bedingten erhöten Detektorempfindlichkeit verbreitert. Pyren hatten wir präparativ gereinigt durch Säulenchromatographie an aktivem basischem Aluminiumoxyd (bas. Al_2O_3 Akt. I, Fa. WOELM, D-344 Eschwege). Der Pyrenpeak erscheint kurz hinter dem Coffein, jedoch völlig getrennt von diesem ; Pyren ist daher gut als Standardsubstanz — zur Eliminierung möglicher Dosierfehler — verwendbar.

Vor Beginn der Messungen wird jeweils eine bekannte Mischung Coffein/Pyren injiziert und daraus der Standardkorrekturfaktor bestimmt. Diesen erhält man als Quotienten aus den Flächen von Pyren und Coffein bei gleichen eingesetzten Mengen.

In Abb. 6 ist das Gaschromatogramm eines alkoholischen Extraktes aus löslichem entcoffeinierten Kaffee zu sehen. Wir extrahierten den löslichen Kaffee durch Erhitzen mit 96 % igem Alkohol am Rückfluss und injizierten davon eine Probe nach Filtration und Zugabe von Pyren als Standard direkt in den Gaschromatographen. Mit Hilfe des vorher ermittelten Standardkorrekturfaktors konnte dann nach Ausmessung der Coffein- und Pyrenflächen sowie Einbeziehung der bekannten Pyrenmenge die unbekannte Coffeinmenge errechnet werden. Die Flächenbestimmung führten wir mit einem Planimeter und einem elektronischen Integrator durch, wobei letzterer einen grösseren Fehler aufwies, da er ohne Null-Linien-Drift-Korrektur arbeitete.

Um die Gültigkeit der so erhaltenen Ergebnisse vergleichen zu können, führten wir mit der gleichen Kaffeesorte noch Coffeinbestimmungen nach zwei anderen Methoden durch :

Wir verglichen mit der Mikro BAILEY-ANDREW- (30) und der LEVINE-Methode (8).

Bei BAILEY-ANDREW werden nach dem Aufschluss die störenden Begleitstoffe durch Kochen mit MgO entfernt, das Coffein mit Chloroform ausgeschüttelt und eine Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL durchgeführt. LEVINE gibt die Aufschlusslösung auf eine basische Celite-Säule, eluiert mit Äther in eine zweite schwefelsaure Celite-Säule, von welcher das Coffein mit Chloroform desorbiert und anschliessend im UV-Spektralphotometer vermessen wird.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zu sehen. In den einzelnen Spalten sind für die drei Analysenmethoden die Messwerte, die Anzahl der Analysen, die korrespondierenden Mittelwerte und die Werte der Näherungs-

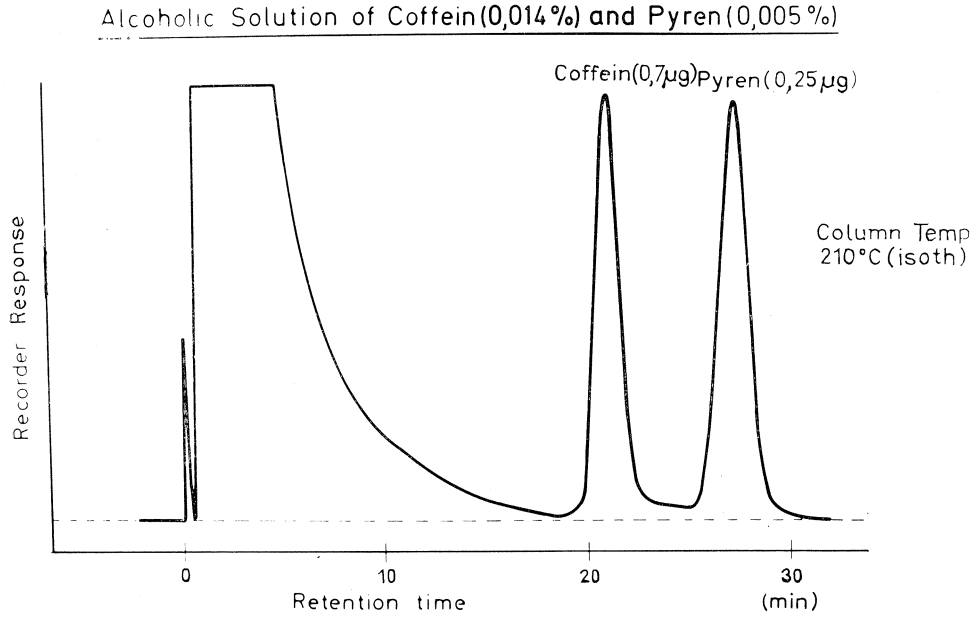


Abbildung 5.

TABELLE 1

Different Methods of Coffein-Analysis of one Standard Sample of Decaffeinated Soluble Coffee

Coffein-Method	Values X_i (%)	Number of Analysis N	Average Value $\bar{X} = \frac{\Sigma X_i}{N}$ %	Standard Deviation $S = \sqrt{\frac{\Sigma(X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$
Gaschromatography	0.074 0.086 0.074 0.072 0.072 0.076	6	0.076	± 0.005
Levine-Method UV-Spectrometry	0.081 0.088 0.087 0.084 0.081 0.082	6	0.084	± 0.003
Bailey-Andrew-Method Kjeldahl-Determination	0.135 0.139 0.128 0.122 0.128 0.132	6	0.131	± 0.006

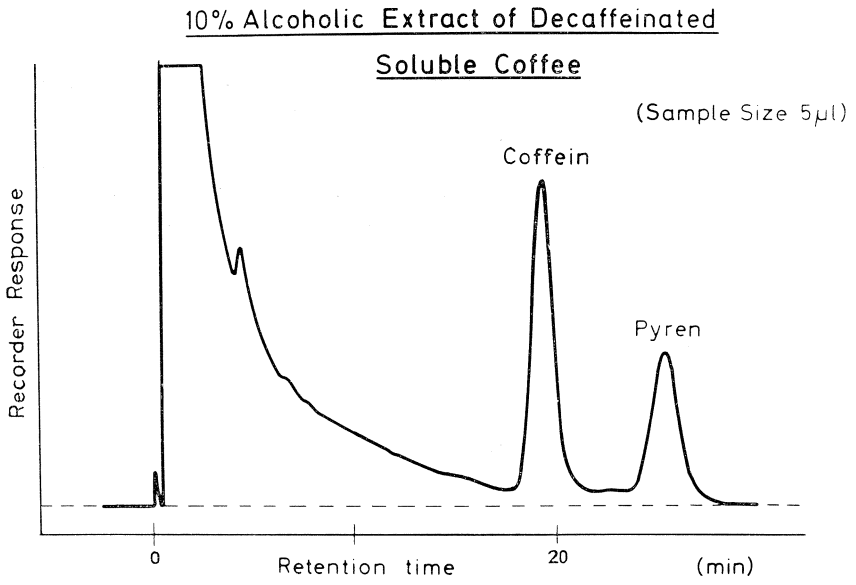


Abbildung 6.

Standardabweichung aufgeführt. Es wurden jeweils sechs Analysen angefertigt und nach Auswertung die Fehlerabweichung ermittelt. Die genauesten Messungen ergab die LEVINE-Methode mit einer Abweichung von ± 0,003 %. Erstaunlich waren die unterschiedlichen Messergebnisse zwischen der LEVINE und der gaschromatographischen Bestimmung einerseits und der BAILEY-ANDREW-Bestimmung andererseits.

Um diese Differenzen näher zu prüfen, hatten wir die verschiedenen Aufschluss- bzw. Anreicherungsmethoden mit verschiedenen « Coffeindetektoren » — der KJELDAHL-Titration, UV-Spektralphotometrie und Gaschromatographie — kombiniert. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 zusammengefasst.

Es wurden wieder die gleichen Standard-Kaffeeproben genommen ; die Pfeile geben die Analysenrichtung an. Für die jeweilige Analysenrichtung sind die Mittelwerte nebst Fehlergrenze angegeben. Die Anzahl der Analysen schwankte zwischen sechs und acht. Aus der Tabelle ist zu entnehmen :

— Die gaschromatographisch und nach der Methode von LEVINE erhaltenen Werte liegen innerhalb der beiderseitigen Fehlergrenze.

— Die BAILEY-ANDREW-Methode liefert zu hohe Werte. Dass es nicht an der KJELDAHL-Bestimmung liegt, zeigt die Stickstoffbestimmung der nach LEVINE angereicherten Proben (0,078 %). Wie amerikanische Arbeiten von YERANSIAN (12) und BORKER (13) zeigten, scheinen stickstoffhaltige, Nicht-Coffeinsubstanzen die Ursache zu sein. Es dürfte sich vorwiegend wohl um

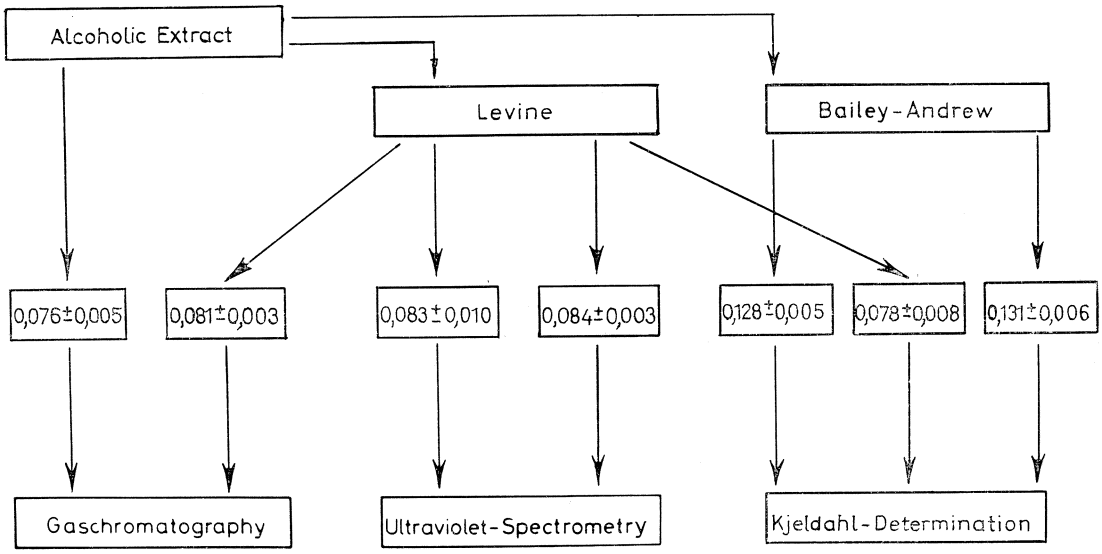


Abbildung 7.

Aminosäuren oder deren Röstreaktionsprodukte mit Zuckern handeln, wobei sich stickstoffhaltige Heterocyclen bilden können, die den erhöhten Wert der KJELDAHL-Bestimmung verursachen. Diese stickstoffhaltigen Komponenten werden auch von Alkohol extrahiert, wie die BAILEY-ANDREW-Analyse der Alkoholextrakte zeigt (0,128 %).

— Die Reinigung der Extrakte nach der LEVIN'SCHEN Methode darf als gut bezeichnet werden, da die daraus mit Hilfe der Gaschromatographie, KJELDAHL-Bestimmung und UV-Messung erhaltenen Coffeinwerte gut übereinstimmen.

Zusammenfassend zur Tabelle lässt sich sagen : Die Mikro-BAILEY-ANDREW-Methode kann **nicht** für die Analyse von coffeinfreiem löslichem Kaffee empfohlen werden. Die gaschromatographische Methode eignet sich gut als Schnellmethode (50 Min.). Die LEVINE-Methode liefert die zuverlässigsten Werte.

LITERATUR

1. GROSSFELD, J. — *ZUL*, **61**, 38-56 (1931).
2. GOBERT, S. — *Ann. Falsif. Fraudes*, **29**, 417-20 (1936).
3. BOWER, R. S. — *Anal. Chem.*, **22**, 1056-58 (1950).
4. BORKER, E. — *J. A. O. A. C.*, **43**, 3, 620-22 (1960).
5. ALBANESE, F. — *Café, Cacao, Thé*, **7**, 3, 237-39 (1963).
6. HADORN, H. — *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **55**, 379-405 (1964).
7. HADORN, H. — *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **56**, 17-28 (1965).
8. LEVINE, J. — *J. A. O. A. C.*, **45**, 2, 254-55 (1962).
9. KUM-TATT, L. — *Analyst*, **86**, 825-28 (1961).
10. SMITH, R. F. — *Analyst*, **89**, 146-47 (1964).
11. BORKER, E. — *J. A. O. A. C.*, **46**, 2, 319-20 (1963).
12. YERANSIAN, J. A. — *J. A. O. A. C.*, **46**, 2, 315-19 (1963).
13. BORKER, E. — *J. A. O. A. C.*, **48**, 4, 705-09 (1965).
14. BARBERA, C. E. — *ZUL*, **117**, 6, 483-87 (1962).
15. PUTZE, F. — *Mitteilungsblatt Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie*, **12**, 4, 49-51 (1958).
16. PFANDL, K. — *Deutsche Apotheker-Zeitung*, **99**, 141-43 (1959).
17. PRANGE, G. — *ZUL*, **104**, 4, 261-66 (1956).
18. HASE, K. — *Mitteilungsblatt Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie*, **14**, 10, 218 f (1960).
19. HORBASZEWSKI, A. — *Przemyl Spozywczy*, **12**, 316 (1958).
20. KOTIDI, E. P. — *Konserv. Ovashchesshil. Brom.*, **13**, 7, 41-42 (1958).
21. WACHSMUTH, H. — *J. Pharmac. Belgique*, **14/41**, 79-81 (1959).
22. MELLO FONTES, D. — *Ann. Fac. Farmác. Univ. Recife*, **V.IV**, 39-60 (1961),
23. CIRANNI, G. — Centro di Chimica Nucleare del C. N. R., 646-68 (1957).
24. IFCC (Paris). — Second Col. Int. Sur la Chimie du Café, (1965) 98.
25. REISCH, J. — *Die Pharmazie*, **21**, 8, 467 f (1966).
26. HOFFMANN, A. J. — *J. Pharm. Sci.*, **52**, 305-06 (1963).
27. KOLB, B. — *Arzneimittelforschung*, **15**, 924-27 (1965).
28. KISELEV, A. V. — Gas Chromatographie 1961, Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften, S. 207.
29. LITTLEWOOD, A. B. — Gas Chromatography 1958. Symposium Amsterdam. Ed. Desty, D. H., Published by Butterworth 1958, p. 23-33.
30. Official Methods of Analysis of the Assoc. Off. Agr. Chem. 1960, 9. Auflage, p. 183.

VITZTHUM (O. G.). — **Dosage de la caféine par chromatographie en phase gazeuse dans des extraits de café décaféiné.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 216-222, fig., tabl., réf.

Afin d'obtenir des pics de caféine symétriques pouvant être estimés à l'aide d'un intégrateur, la séparation de la solution a été effectuée sur une colonne faiblement polaire. Les billes de verre imprégnées de Carbowax-20M conviennent bien au remplissage de la colonne selon la méthode de Littlewood.

Les substances sont mises en évidence par un détecteur à ionisation de flamme. L'estimation quantitative est effectuée avec le pyrène comme standard interne. Du fait de sa durée (40 mn), cette méthode convient bien à l'analyse industrielle.

VITZTHUM (O. G.). — **A study of the application of gas chromatography for measuring the quantity of caffeine in the extracts of decaffeinated coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 216-222, fig., tabl., réf.

In order to obtain the symmetrical peaks of caffeine (which can be calculated using an integrator), the separation of the solution was carried out on a column of weak polarity. Glass beads impregnated with Carbowax-20 m are very suitable for filling the column, using Littlewood's method.

The substances are shown up by a flame-ionisation detector. The quantitative analysis is carried out with pyrene as the internal standard. Because of its short duration (40 mn) this method is very suitable for analysis on an industrial scale.

VITZTHUM (O. G.). — **Gaschromatographische Bestimmung von Coffein in coffeinfreiem Kaffee-Extrakt.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 216-222, fig., tabl., réf.

Die Gaschromatographie wurde als Analysenmethode für die Bestimmung von Coffein in coffeinfreien Kaffee-Extrakten untersucht.

Um symmetrische mit Hilfe eines Integrators auswertbare Coffein-Peaks zu erhalten, wurde die Auftrennung der Aufschlusslösung in einer niedrig belegten polaren Säule durchgeführt. Gut geeignet als Säulenfüllung erwiesen sich nach der Methode von Littlewood mit Carbowax 20-M imprägnierte Glaskügelchen (glass beads).

Angezeigt werden die Substanzen in einem FJD. Die quantitative Auswertung erfolgt mit Pyren als innerem Standard. Wegen des Zeitaufwands (40 Min.) ist diese Methode für die Betriebsanalyse gut geeignet.

DISCUSSION

M. REES : I have two questions :

Firstly, I did not fully follow the reasons for your using finally a column containing coated glass beads. These columns usually have low HETP values and deteriorate quickly due to the inability of the glass beads to retain the stationary phase strongly. I myself have obtained symmetrical peaks for caffeine using Chromosorb coated with SE 30, the heights of which (relative to an internal standard) were linear to caffeine concentrates. My suggestions for your obtaining unsymmetrical peaks with this type of column are either a) *you did not remove the fines from the support,* b) *you did not silanize the support, or* c) *you did not do on-column sampling.*

— Secondly, have you any knowledge whether the electron capture or the thermoionic detector is more sensitive than the FID to caffeine.

M. VITZTHUM : Mit dem thermionischen Detektor haben wir keine Erfahrungen. Die Verwendung eines Electron-Capture-Detektors kann nicht empfohlen werden, da eine zu rasche Verschmutzung des Detektors eintritt. Die als Strahlenquelle eingebaute Tritiumfolie erlaubt nur Arbeitstemperaturen unter 150 °C. Für die Coffeinbestimmung reicht die Empfindlichkeit des Flammenionisations-Detektors aus.

Die Retention sowie Symmetrie des Eluierungspeaks sind an einer Carbowax-Phase grösser als an einer unpolaren Silicongummiphase (SE 30). Beides sind Voraussetzungen für die gaschromatographische Coffeinbestimmung aus verdünnten Lösungen.

THE SEPARATION AND DETERMINATION OF MONO- AND DI-CAFFEOYLQUINIC ACIDS IN COFFEE BY GAS CHROMATOGRAPHY OF THEIR TRIMETHYLSILYL DERIVATIVES

J. T. KUNG, W. S. RYDER, J. R. FELDMAN

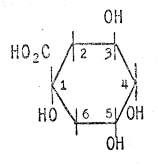
Technical Center, General Foods Corporation, White Plains

It has been observed that acidity in coffee beverages varies with the varieties of coffee beans and roasting conditions. The acid taste is considered to be one of the important attributes of the flavor of coffee beverages. Since the caffeoylquinic acids are found to be the major acid components, the determination of these acids would serve as an index for the characterization of green and roasted coffee, and perhaps contribute to a better understanding of the chemical changes produced during roasting.

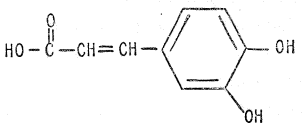
In 1961, SONDHEIMER, SZYMANSKI and CORSE (1) presented a method for the sequential isolation of isochlorogenic, chlorogenic and neochlorogenic acids, and another isomer designated as « Band 510 » from coffee beans. Isochlorogenic acid was removed first by extraction with butyl acetate, chlorogenic acid was then precipitated as the caffeine complex, and neochlorogenic acid and « Band 510 » were separated by silicic acid column chromatography. SCARPATI et al (2) reported that isochlorogenic acid in coffee existed as a mixture of three di-caffeoylquinic acids, which were separated by paper chromatography and counter-current extraction. They also identified neochlorogenic acid and the compound « Band 510 » as 5- and 4-caffeoylquinic acids respectively (3). The isomer, 3-caffeoylquinic acid, has been known as chlorogenic acid since 1932 (4). Recently, CORSE and his co-workers confirmed the chemical structures of the three mono-caffeoylquinic acids (5, 6) and determined the chemical structures of isochlorogenic acids to be 4,5-, 3,4- and 3,5-dicaffeoylquinic acids by NMR (6, 7).

The techniques of counter-current extraction, chemical precipitation and column chromatography are excellent for isolation and identification work but unsuitable for repetitive analyses. A gas chromatographic method was therefore developed for this purpose.

The caffeoylquinic acids in coffee



QUINIC ACID



CAFFEIC ACID

3 - CAFFEOYLQUINIC ACID = CHLOROGENIC ACID
4 - CAFFEOYLQUINIC ACID = CRYPTOCHLOROGENIC ACID
5 - CAFFEOYLQUINIC ACID = NEOCHLOROGENIC ACID
3, 4 - DICAFFEOYLQUINIC ACID = ISOCHLOROGENIC ACID "a"
3, 5 - DICAFFEOYLQUINIC ACID = ISOCHLOROGENIC ACID "b"
4, 5 - DICAFFEOYLQUINIC ACID = ISOCHLOROGENIC ACID "c"

RESULTS AND DISCUSSION

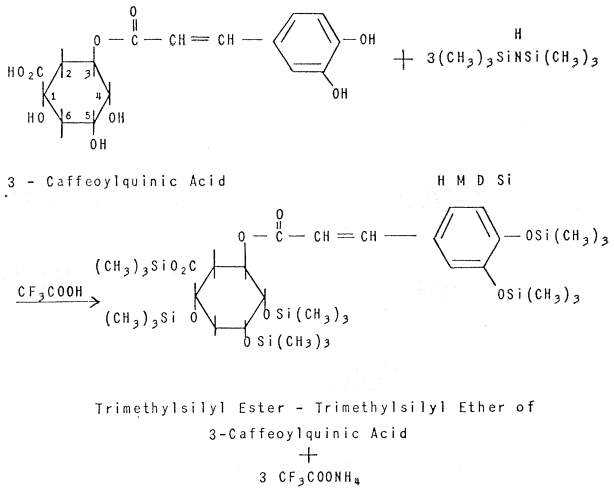
With the advent of the silylation techniques, it is now possible to convert high-melting compounds to volatile liquids which therefore can be analysed by gas chromatography. The silylation reaction involves the substitution of active hydrogen in compounds such as carboxylic acids, alcohols, phenols, amines, etc. by a trimethylsilyl group to render compounds more volatile and thermally stable. Hexamethyldisilazane (HMDSi) has been used for the preparation of silyl derivatives of carbohydrates (8,12), phenols (13), Krebs cycle acids (14), simple phenolic acids (15), alcohols and amines (16). A more reactive silyl donor, bis (trimethylsilyl) acetamide (BSA) was first used successfully by KLEBE and his co-workers (17) for quantitative conversion of amines, amino acids, peptides, phenols, enols and carboxylic acids to their silyl derivatives. We have found that both reagents can be used satisfactorily for silylating the mono-caffeoylquinic acids. However, only BSA gave complete silylation for di-caffeoylquinic acids. The products of incomplete silylation have higher boiling points and are thermally less stable as indicated by the smaller peaks and longer retention times in gas chromatograms than those of completely silylated products.

For the determination of the mono-caffeoylquinic acids, the freeze dried water extracts of coffee were directly silylated with either HMDSi or BSA. After standing at room temperature for at least 3 hours, the silylated mixture was analyzed by gas chromatography. The typical gas chromatograms of green and roasted Santos coffee are shown in figures 1 and 2 respectively. Due to the complexity of the chromatograms, the attenuations of the peaks are not given.

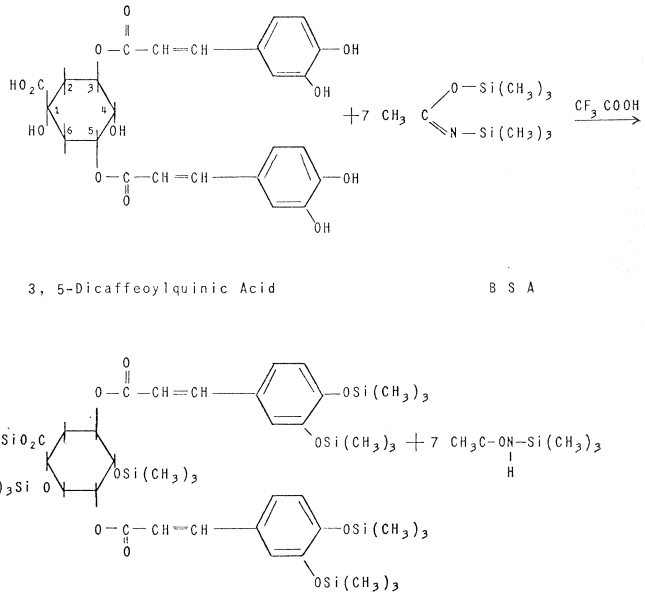
On account of their low concentrations in coffee, the di-caffeoylquinic acids were determined in the coffee extracts from which the high molecular weight materials had been removed by precipitation with 2-propanol. This increased their concentration by about twofold. The 2-propanol treated coffee extracts were then silylated with BSA. After standing at room temperature overnight, the silyl derivative samples were then analysed by gas chromatography. The typical gas chromatograms of green and roasted Santos coffee are shown in figures 3 and 4 respectively.

Gas chromatographic operating conditions are given in the experimental section. Under these conditions, the mono- and di-caffeoylquinic acids gave sharp and symmetrical peaks with no thermal decomposition as indicated by straight base lines. A stainless steel capillary column 0.025 inch i. d. and 100 feet long, coated with a polar silicone gum rubber (SE-54), was used in this study. This column gives better resolution and less column bleeding at high temperatures than packed columns.

Since the diameter of the capillary column is relatively large, it is possible to inject the entire sample into the



Reaction of hexamethyldisilazane (HMDSi) with mono-coffeoylquinic acids



Reaction of bis (trimethylsilyl) acetamide (BSA) with di-caffeoylquinic acid

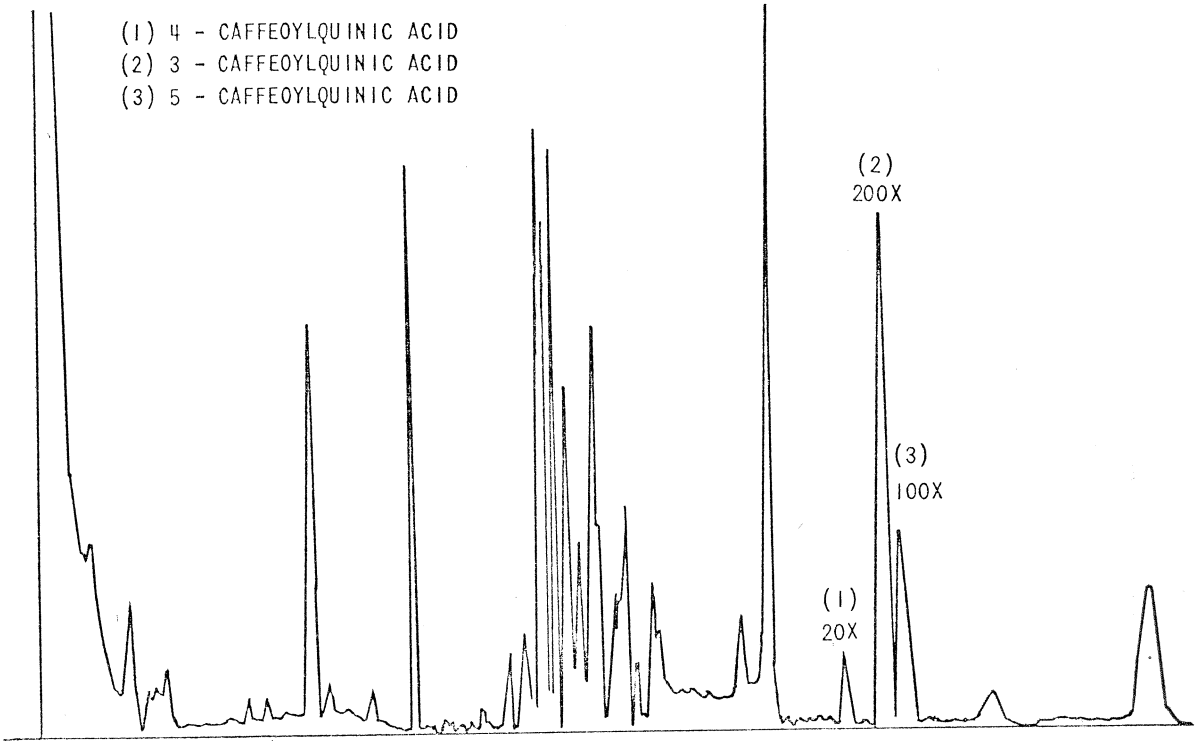


Fig. 1. — *Gas chromatographic separation of the trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ether derivatives of the mono-caffeoylquinic acids in* **green** *coffee on* 0.025'' *i. d.*, 100 *ft. capillary column coated with SE-*54, *with temperature programming from* 70° *to* 300° *at* 12.5°/*minute*

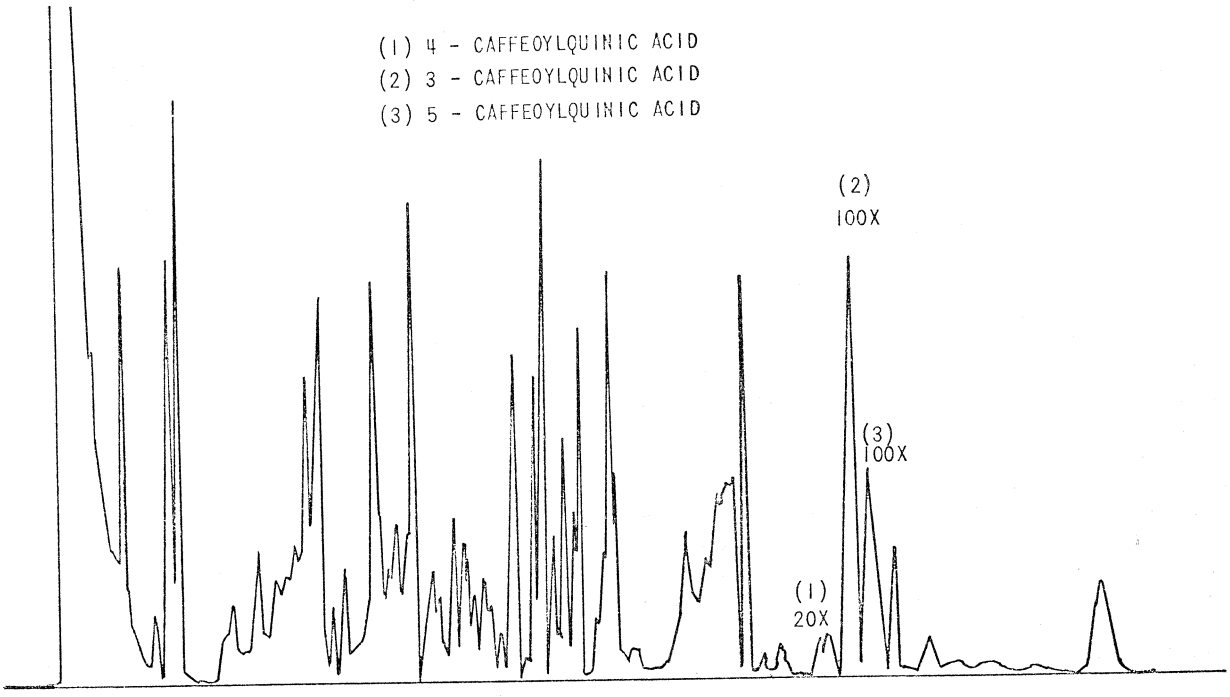


Fig. 2. — *Gas chromatographic separation of the trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ether derivatives of the mono-caffeoylquinic acids in* **roasted** *coffee on* 0.025'' *i. d.*, 100 *ft. capillary column coated with SE-*54, *with temperature programming from* 70° *to* 300° *at* 12.5°/*minute*

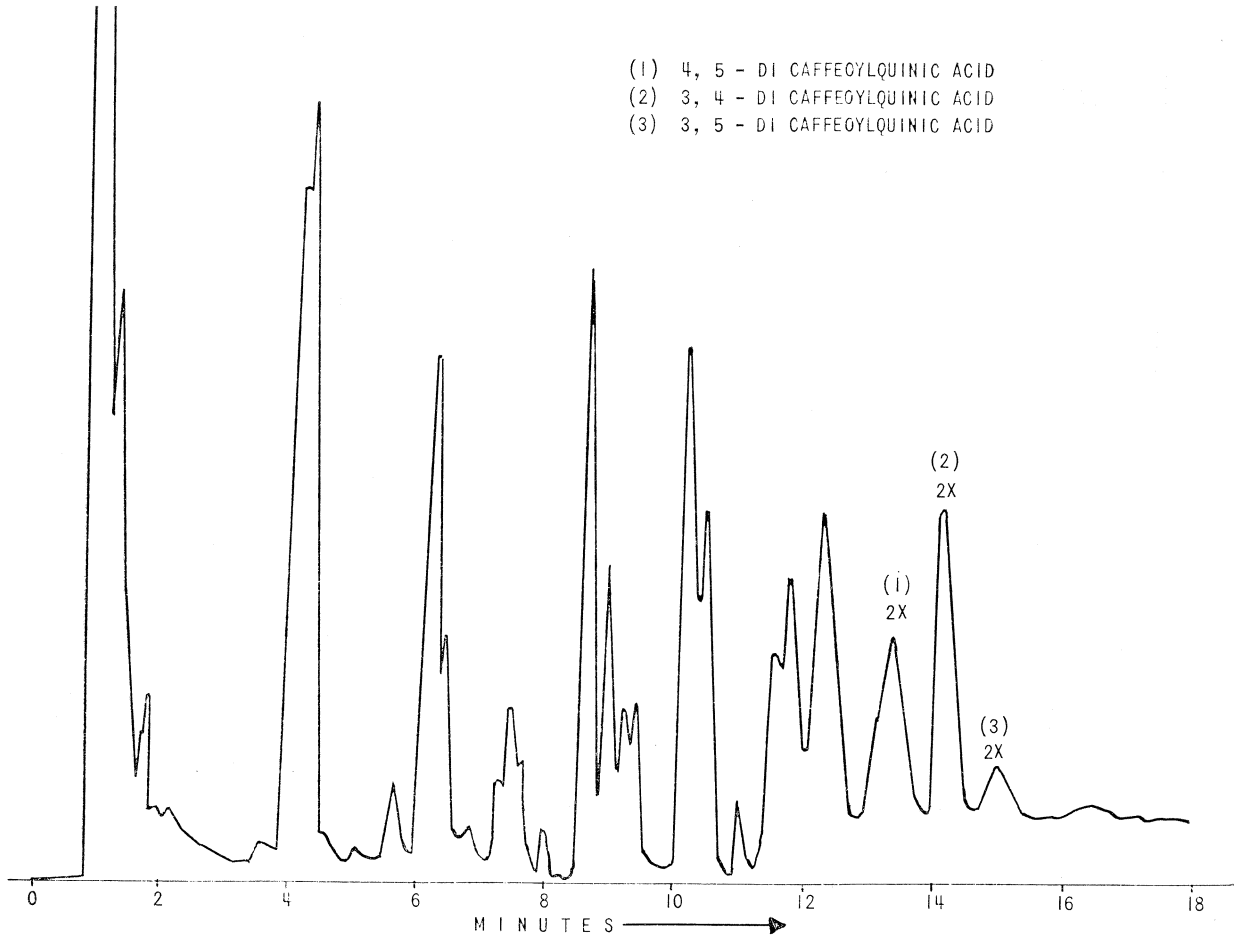


Fig. 3. — *Gas chromatographic separation of the trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ether derivatives of the di-caffeoylquinic acids, in* **green** *coffee on 0.025'' i. d., 100 ft. capillary column, coated with SE-54, with temperature programming from 250° to 300° at 20°/minute*

column without splitting, thus permitting a more quantitative determination. It was necessary to chromatograph the mono- and di-caffeoylquinic acids at different column temperatures. The mono-caffeoylquinic acids give a much better separation at lower temperatures and the di-caffeoylquinic acids require a higher temperature in order to obtain good resolution. Peak assignments were made by comparing the retention times of unknowns with silyl derivatives of known pure compounds.

The pure mono- and di-caffeoylquinic acids were kindly supplied by Dr CORSE of the Western Regional Research Laboratory, Albany, California. Further confirmation of the identified peaks was made by adding known derivatives one at a time to the sample ; the peak with increased size was considered to be the known compound. This method of identification is termed peak reinforcement and is reasonably reliable with sharp and clearly resolved peaks.

Calibration curves of known acids were plotted for quantitative determination, peak heights versus concentrations for the mono-caffeoylquinic acids and peak areas versus concentrations for the di-caffeoylquinic acids. In order to simulate natural coffee as close as possible, mixtures of the above compounds were prepared covering their respective concentration ranges and were used as calibrating standards.

Samples of Santos coffee were roasted to a degree of roast median for U. S. A. products. Each sample was analysed in triplicate. The results obtained for a series of samples of Santos coffee beans are given in the table 1. All mono- and di-caffeoylquinic acids, with the exception of 5-caffeoylquinic acid, decreased on roasting with respect to their concentrations in the green extract. The 5-caffeoylquinic acid isomer increased slightly in the roasted sample. Further investigation showed that 5-caffeoylquinic acid diminished in darker roast samples. This somewhat anomalous behavior of 5-caffeoylquinic acid was also observed to occur in extracts prepared by identical procedures from Colombian coffee beans.

As indicated in the last column of table 1, 4-caffeoylquinic acid appears to be more thermally stable than 3-caffeoylquinic acid, and 3,5-di-caffeoylquinic acid is more stable than its two isomers.

This gas chromatographic method for the determination of chlorogenic and isochlorogenic acids has the advantages of being simple, rapid and reliable. The reproducibility of the method at the 95 % confidence level for a single analysis is shown in table 1.

This method has application to the determination of other phenolic compounds, carbohydrates, amino acids, peptides, etc. in coffee. New liquid phases, such as OV-1 and OV-17, have recently become available which show greater thermal stability than SE-54.

TABLE 1

Mono-and di-caffeoylquinic acids in green and roasted Santos coffee

	Green		Roasted		Ratio roasted/ green
	% (1)	95 % confidence	% (1)	95 % confidence	
3-caffeoylquinic acid (chlorogenic)	5.56	± 0.09	1.96	± 0.05	0.35
4-caffeoylquinic acid (crypto-chlorogenic)	0.41	± 0.04	0.24	± 0.04	0.58
5-caffeoylquinic acid (neo-chlorogenic)	0.88	± 0.05	1.02	± 0.07	1.16
isochlorogenic acids (A) 3,4-di-caffeoylquinic acid	0.28	± 0.05	0.010	± 0.003	0.036
isochlorogenic acids (B) 3,5-di-caffeoylquinic acid	0.21	± 0.05	0.092	± 0.004	0.45
isochlorogenic acids (C) 4,5-di-caffeoylquinic acid	0.11	± 0.04	0.010	± 0.003	0.09

Note : (1) Percent on dry coffee beans basis.

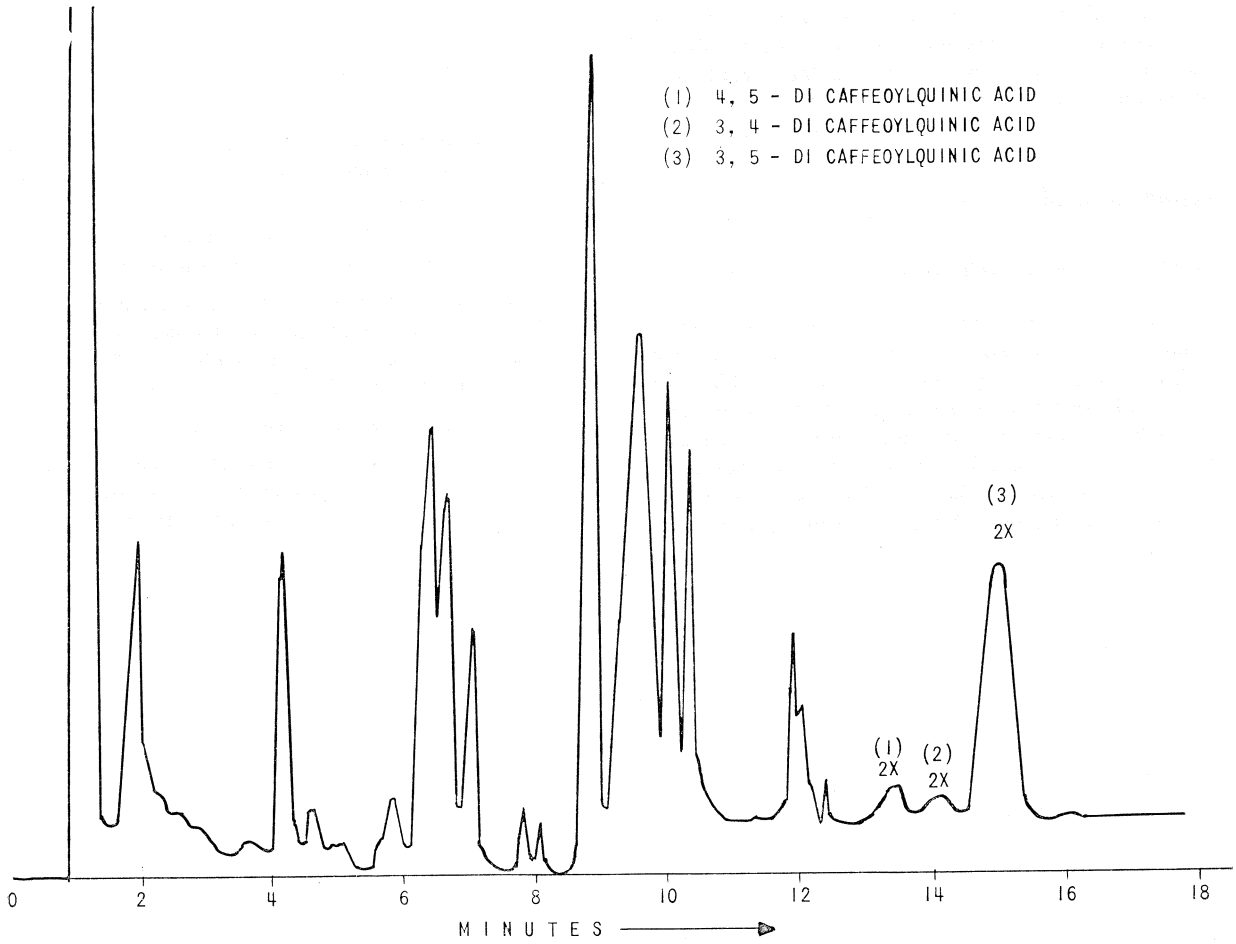


Fig. 4. — *Gas chromatographic separation of the trimethylsilyl ester-trimethylsilyl ether derivatives of the di-caffeoylquinic acids in* **roasted** *coffee on* 0.025'' *i. d.*, 100 *ft. capillary column, coated with SE-54, with temperature programming from* 250° *to* 300° *at* 20°/ *minute*

EXPERIMENTAL

Sample preparation

Santos coffee beans were ground (drip grind) before extraction with water. Four successive portions of 940 ml of boiling deionized water were passed through 57 g of ground roasted coffee in a coffee maker. Green beans were frozen in liquid nitrogen before grinding. They were extracted twice with 940 ml portions of cooled deionized water and three times with the same amounts of boiling water. The extracts were then frozen in slabs of uniform thickness and lyophilized. The yield of the soluble solids thus prepared was reproducible for each sample.

One gram of the freeze dried soluble solids was dissolved in 10 ml of deionized water and treated with 3 volumes of 2-propanol in order to precipitate the high molecular weight materials. The precipitate was removed by centrifugation and washed twice with a few ml of 90 % 2-propanol. The combined supernatants were vacuum distilled on a rotary evaporator at 40° C to remove 2-propanol. The concentrated extract was then lyophilized and weighed accurately.

Preparation of trimethylsilyl derivatives

SILYLATION WITH BIS-(TRIMETHYLSILYL) ACETAMIDE (BSA)

About 100 mg of the freeze dried material was exactly weighed and dissolved in 0.1 ml of formic acid in a small ground glass stoppered tube. One ml of BSA was then added, followed by 0.1 ml of trifluoro-acetic acid as a catalyst. A complete silylation of the mono-caffeoylquinic acids required 1/2 hour, and at least 3 hours for the di-caffeoylquinic acids. The BSA solution of the derivatives was injected directly into the gas chromatograph.

SILYLATION WITH HEXAMETHYLDISILAZANE (HMDSi)

Since this reagent is not as reactive as BSA, it is used only when the determination of di-caffeoylquinic acids is not required. The following procedure is for the determination of mono-caffeoylquinic acids in the water soluble extracts which were not treated with 2-propanol.

100 mg of untreated soluble solids was dissolved in 2 ml of pyridine, followed by adding 0.9 ml of HDMSi and 0.1 ml trifluoroacetic acid. After standing at room temperature for at least 1/2 hour, the silyl solution was analysed.

A mixture of known mono-and di-caffeoylquinic acids, with concentration levels similar to those in the coffee samples, was silylated as above and used to standardize the gas chromatographic analyses.

Gas chromatography

Gas chromatograph — A Perkin Elmer Model 800 with a flame ionization detector connected to a Barber Colman 5 millivolt recorder.

Column — 0.025" i. d. X 100' capillary stainless steel tubing coated with silicone gum rubber SE-54.

Column temperature — (a) for mono-caffeoyl acids : 70° for 2 minutes then programmed to 300° at 12.5° per minute, (b) for di-caffeoylquinic acids : 250° for 1 minute then programmed to 300° at 20° per minute.

Injection port temperature — 300°

Flow rates of gases — Helium 16 ml per minute at room temperature, air 350 ml per minute, hydrogen at 54 p. s. i. against a factory supplied restrictor.

Sample size — 1 µl

REFERENCES

1. SONDHEIMER, E., SZYMANSKI, C. D. and CORSE, J. — *J. Agric. & Food Chem.*, **9**, 146 (1961).
2. SCARPATI, M. L. and GUISO, M. — *Ann. Chem.* (Rome), **53**, 1315 (1963).
3. SCARPATI, M. L. and ESPOSITO, P. — *Ibid.*, **54**, 35 (1964).
4. FISCHER, H. O. L. and DANGSCHAT, G. — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65**, 1037 (1932).
5. WAISS, A. C., Jr., LUNDIN, R. E., and CORSE, J. — *Chem. and Ind.*, 1984 (1964).
6. CORSE, J., LUNDIN, R. E., SONDHEIMER, E. and WAISS, A. C., Jr. — *Phyto-Chemistry*, **5**, 767 (1966).
7. CORSE, J., LUNDIN, R. E. and WAISS, A. C., Jr. — *Phyto-Chemistry*, **4**, 527 (1965).
8. SPRUNG, M. M. and NELSON, L. S. — *J. Org. Chem.*, **20**, 1750 (1955).
9. HEDGLEY, E. V. and OVEREND, W. G. — *Chem. Ind.* (London), 378 (1960).

10. HENGLEIN, F. A., ABELSNES, G., HENEKA, H., LIENHARD, K., NAKHRE, P. and SCHEINOST, K. *Makromol. Chem.*, **24**, 1, (1957).
11. FERRIER, R. J. and SINGLETON, M. F. — *Tetrahedron*, **18**, 1143 (1962).
12. SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELS. W. W. — *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
13. FRIEDMAN, S., ZAHN, C., KAUFMAN, M. and WENDER, I. — *Bur. of Mines Bull.*, 609 (1963).
14. HORII, Z., MAKITA, M. and TAMURA, Y. — *Chem. Ind.* (London), 1494 (1965).
15. BLACKLEY, E. R. — *Anal. Biochem.*, **15**, 350 (1966).
16. LANGER, S. H., CONNELL, S. and WENDER, I. — *J. Org. Chem.*, **23**, 50 (1958).
17. KLEBE, J. F., FINKBEINER, H. and WHITE, D. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3390 (1966).

KUNG (J. T.), RYDER (W. S.), FELDMAN (J. R.). — **Séparation et détermination par chromatographie en phase gazeuse des acides mono- et di-caffeoylquiniques du café ainsi que de leurs dérivés triméthylsilylés.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 223-230, fig., tabl., réf.

Une méthode sensible et rapide par chromatographie en phase gazeuse a été mise au point pour séparer et déterminer quantitativement les acides non volatils du café.

Les composants acides du café les plus abondants ont été identifiés comme étant les acides 3- et 5-caffeoylquiniques, les acides chlorogénique et isochlorogénique. Les moins abondants sont l'acide 4-caffeoylquinique et les isomères, acides isochlorogéniques, acides 3,4- 3,5- et 4,5-dicaffeoylquiniques.

La détermination de ces acides pourrait servir à contrôler la qualité du café vert et celle du café torréfié, et peut-être contribuer à une meilleure compréhension des modifications chimiques qui ont lieu au cours de la torréfaction. Les résultats présentés dans cette étude ne se rapportent qu'aux acides mono- et di-caffeoylquiniques. Cette méthode comporte la neutralisation du café boisson par un alcali, la précipitation des matières à poids moléculaire élevé par l'isopropanol et la lyophilisation du liquide surnageant.

Le produit sec est acidifié par l'acide formique et silylé soit par l'hexaméthyldisilazane, soit par l'acétamide bistriméthylsilyl, et le produit est analysé par chromatographie en phase gazeuse.

En utilisant un chromatographe à température programmée, équipé d'un détecteur à flamme, d'une colonne capillaire de 0,025 '' et de 100 fts, recouverte de SE-54, les différents isomères des acides mono- et di-caffeoylquiniques ont aisément été séparés : ils forment des pics pointus et symétriques.

KUNG (J. T.), RYDER (W. S.), FELDMAN (J. R.). — **The separation and determination of mono- and di-caffeoylquinic acids in coffee by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 223-230, fig., tabl., réf.

A sensitive and rapid gas chromatographic method was developed for the separation and quantitative determination of non-volatile acids in coffee.

The major acidic components in coffee were identified as 3-caffeoyl- and 5-caffeoyl-quinic acids, chlorogenic and neochlorogenic acids respectively. The less abundant acids were 4-caffeoylquinic acid and the isomeric « isochlorogenic acids » 3,4- 3,5- and 4,5- dicaffeoylquinic acid.

The determination of these acids could serve as a quality control method for green and roasted coffee, and perhaps contribute to a better understanding of the chemical changes occurring during roasting. The data presented in this paper will be limited to the analysis of the mono- and di-caffeoylquinic acids.

The method involves the neutralization of the coffee beverage with alkali, precipitation of high molecular weight materials with isopropanol and lyophillization of the supernatant liquid. The dried product is acidified with formic acid, silylized with either hexamethyldisilazane or bis (trimethylsilyl) acetamide and the product analysed by gas chromatography. By using a temperature programmed gas chromatograph equipped with a flame detector, a 100 ft. of 0.025 '' capillary column coated with SE-54, the various isomers

KUNG (J. T.), RYDER (W. S.), FELDMAN (J. R.). — **Gaschromatographische Trennung und Bestimmung der Mono- und Di-caffeoylchinasäure sowie ihrer Trimethylsilylderivate.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 223-230, fig., tabl., réf.

Es wurde eine empfindliche und schnelle gaschromatographische Methode zur Trennung und quantitativer Bestimmung der nicht flüchtigen Säuren des Kaffees fertiggestellt.

Die reichhaltigsten Säurekomponenten des Kaffees wurden als 3- und 5-Caffeoylchinasäure, Chlorogensäure und Isochlorogensäure gekennzeichnet. Bei den weniger reichhaltigen Säuren handelt es sich um 4-Caffeoylchinasäure und die Isomere, Isochlorogensäuren, 3,4- 3,5- und 4,5- Di-caffeoylchinasäuren.

Die Bestimmung dieser Säuren konnte zur Kontrolle der Qualität des Roh- und des Rostkaffees dienen und vielleicht zu einem besseren Verständnis der im Verlauf der Röstung vorsichgehenden chemischen Veränderungen führen. Die in gegenwärtiger Arbeit aufgeführten Ergebnisse beziehen sich nur auf die Mono-und Di-caffeoylchinasäuren. Diese Methode umfasst die Neutralisierung des Kaffeegetränks durch ein Alkali, die Fällung durch das Isopropanol der Stoffe mit hohem Molekulargewicht und die Gefriertrocknung der oben aufschwimmenden Flüssigkeit.

Die Trockensubstanz wird durch die Ameisen- und Silylsäure oder durch das Hexamethyldisilazan oder das Azetamid bis- trimethylsilyl angesäuert und das Produkt gaschromatographiert.

Die Verwendung eines temperaturprogrammierten Chromatographen der mit einem Flammenionisationsdetektor und einer mit SE-54 bedeckten Kapillarkolonne von 0,025 Inches und 100 Fts versehen war ermöglichte eine leichte Trennung der verschiedenen Isomere der Mono- und Di-caffeoylchinasäuren : sie bilden spitze und symetrische Peaks.

Im Verlauf der Analyse wurde keine Zersetzung durch die Wärme festge-

Aucune décomposition thermique n'a été observée au cours de l'analyse, comme le prouve la ligne de base continue. Les déterminations quantitatives ont été calculées à partir de la courbe de calibration de la hauteur des pics, comparée à la concentration des acides purs.

La concentration minimum de ces acides qui peut être détectée est environ 100 ppm de l'échantillon.

L'analyse requiert moins d'une heure après que l'échantillon ait été préparé.

of mono- and di-caffeoylquinic acids were easily separated as sharp symmetrical peaks. No thermal decomposition was observed during the analysis as evidenced by a steady base line. Quantitative determinations were calculated from a calibration curve of peak height vs. concentration of pure acids. The minimum detectable concentration of these acids is about 100 ppm of the sample.

The analysis requires less than one hour after sample preparation.

stellt, wie die kontinuierliche Grundlinie beweist. Die quantitativen Bestimmungen wurden von der Kalibrierungskurve der Höhe der Peaks, verglichen mit der Konzentration der reinen Säuren, ausberechnet.

Die Minimalkonzentration dieser Säuren, die detektiert werden konnte, beläuft sich auf ungefähr 100 ppm der Probe.

Es bedarf weniger als einer Stunde zur Analyse nach der Zubereitung der Probe.

REMARQUE

M. NAVELLIER : Je voudrais faire une remarque ayant trait à l'expression des résultats : dans le rapport qui vient de nous être présenté, tous les résultats ont été rapportés au café vert sec mis en œuvre et on nous a montré que presque tous les acides chlorogéniques diminuaient sous l'effet de la torréfaction, ce que l'on savait déjà, mais que par contre l'acide caféoïlquinique n° 5 augmentait légèrement. Ce phénomène, qui d'après ce que j'ai compris est dû à la stabilité de cet acide et à une isomérisation probable, serait passé inaperçu s'il n'y avait pas eu cette expression rationnelle de résultats, et je tiens à le souligner pour l'intérêt de nos études.



M. LEVENSON présentant l'exposé de M. KUNG

ACID HYDROLYSIS OF THE COFFEE GRAIN

C. ROLZ, P. SOLÉ, F. AGUIRRE B.
Central American Research Institute for Industry (ICAITI), Guatemala



P. SOLÉ

INTRODUCTION

The acid hydrolysis of the coffee grain has been studied as a part of a general process to transform green coffee into valuable by-products (2). The chemical compounds present in green coffee that are subject to chemical attack are (19) : polysaccharides, nitrogen containing compounds, natural triglycerides and polyphenolic compounds.

Under the reaction conditions employed in this work, 1-10 % HCl (by volume) and 60 ± 5° C temperature, the hydrolysis is « mild » and the chemical attack is focused on the polysaccharides, mainly on the starch and hemicellulose molecules (24, 5) and the polyphenolic compounds (1). In this work the acid catalyzed decomposition of the polysaccharides has been the main concern.

According to MELLER (13) a considerable amount of work has been devoted to the kinetics of the acid hydrolysis of polysaccharides, in particular of cellulose and of starch ; however, there is no accepted molecular mechanism to explain the hydrolysis of polysaccharides in acid media.

J. HOLLÓ and J. SZEJTLI (9) (10) studied the acid hydrolysis of starch and found that the glycosidic linkages are cleaved at different rates, depending on whether they are nonterminal or terminal bonds in the amylopectin-amylose chain. Both mechanisms have been characterized by first order kinetics, the rate constant of the latter being higher than that of the former. Nonetheless, the first order kinetics plot shows a marked inflection point. SALOMAA and LINNANTIE (18) attribute this to competing reaction mechanisms (one unimolecular and the other bimolecular) to the acid-catalyzed hydrolysis reaction and, moreover, they caution that the use of Hammett acidity function, Ho, to correlate rate constants, may lead to fallacious results.

SPRINGER et al (21) (22) and NOVIKOVA and KONKIN (17) studied the acid hydrolysis of xylan, a polysaccharide which constitutes large part of vegetable hemicellulose (24). They showed that the removal of the first 60 % of the xylan followed first order kinetics and correlated the rate constants with the acidity function obtaining straight lines of slope very near unity.

MELLER (14) studied the hydrolysis of cellulose fibres and found three different steps in the reaction history that could be represented by first order kinetics. DARUWALLA and NARSIAN (6) showed that the kinetics of the hydrolysis of cellulose substances could best be presented by two rates of reaction, both first order, the initial rate being higher than the second.

All the references quoted refer to reaction conditions close to ours, that is 1-10 % HCI and a temperature close to 60 ± 5° C.

EXPERIMENTAL

Raw materials

Two different kinds of coffee, green and washed, of the *C. bourbon* variety and classified as semi-hard, were used. The dry coffee seed without pulp and parchment is called « green coffee » while the wet seed without pulp but still with parchment is named « washed coffee ».

The following samples were hydrolised :

a) Whole green coffee (COE)
b) Cracked green coffee (COM)
c) Whole washed coffee (CLE)
d) Cracked washed coffee (CLM)

Particle size for both coffee types are shown in tables 1 and 2. Moisture contents are, 10.2 % for COE and COM, and 52.3 % for CLE and CLM, determined by drying at 110° C until constant weight. Starch, hemicellulose and carbohydrate contents are 51.5 % for COE and COM, and 29.0 % for CLE and CLM (1).

TABLE 1

Sieve analyses of COM and CLM

Mesh	Retained weight %	
	COM	CLM
3 1/2	4.0	10.6
6	90.0	87.0
7	2.5	1.1
8	1.5	0.5
10	1.5	0.4
14	0.5	0.4

TABLE 2

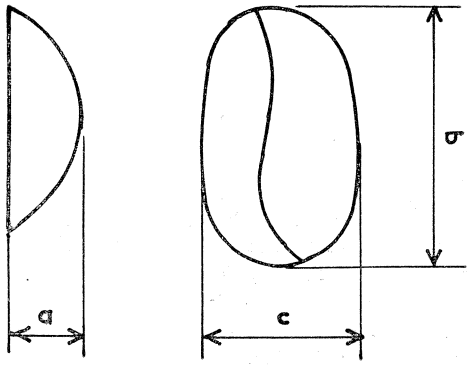
Physical dimensions of the whole coffee particle (inches)

	COE	CLE
a	0.162	0.210
b	0.405	0.525
c	0.279	0.336
Standard deviation		
a	0.014	0.006
b	0.014	0.031
c	0.015	0.022

Equipment and method

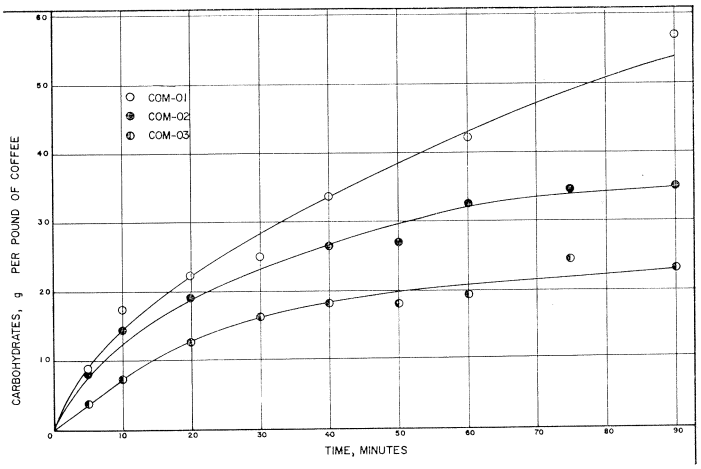
The laboratory set-up consisted of a 4 l beaker, a hot plate and an electric stirrer. The temperature was read with a thermometer and controlled manually to 60 ± 5° C. The stirrer was placed near one edge and bottom of the beaker to avoid vortices and assure good vertical mixing.

In a typical run, 2 l of water were heated to the desired temperature and a known amount of HCl and 1 lb of coffee were added. Three acid concentrations were used ; 1,5 and 10 % v/v of water used. Liquid samples were taken at 5, 10 and every 10 minutes up to 1 hour, then every 15 minutes up to 2 hours. The samples were neutralized to pH 7 with 0.1 N NaOH, using a Beckman Automatic Titrator Model K, then filtered through Whatman n° 5 paper and taken to a known volume. Total carbohydrates were analyzed with a Bausch & Lomb « Spectronic 20 » using the phenol-sulfuric acid method (8). A standard calibration curve using a mixture of sucrose, maltose, xylose, dextrose and arabinose (1 : 1 : 1 : 1 : 1 : weight) was obtained and the total carbohydrates are reported on this basis. This combination of carbohydrates is close to that reported for hydrolisis of coffee (25). Similar runs were performed without acid, to get the solubility of the natural carbohydrates found in green coffee.



RESULTS

The experimental results have been summarized in figures 1, 2 and 3, which show total carbohydrates and soluble carbohydrates vs. time. The curves were obtained by least squares analysis (16).

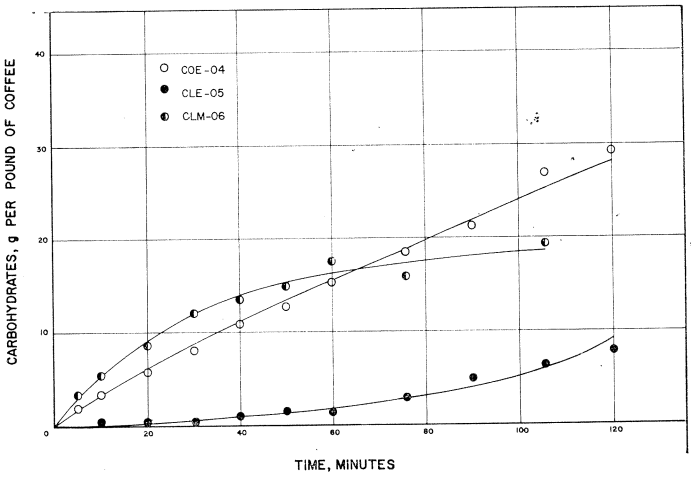


1

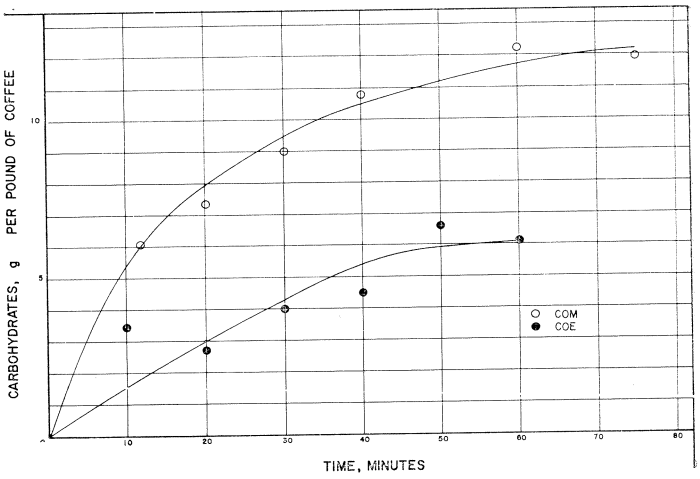
Fig. 1 and fig. 2. — *Experimental hydrolisis data*

Fig. 3. — *Experimental solubility data*

2



3



CALCULATIONS

The experimental data were tested for irreversible, first, zero and fractional order kinetics. The general reaction considered was :

Polysaccharides ——→ Carbohydrates —— (1)

or

A ——→ Products —— (2)

The integrated rate equations (12) for first, zero and fractional irreversible kinetics are equations (3), (4) and (5).

$$-\ln \frac{C_A}{C_{A_0}} = kt \qquad \text{——— (3)}$$

$$C_{A_0} - C_A = kt \qquad \text{——— (4)}$$

$$C_A^{1-n} - C_{A_0}^{1-n} = (n-1)\,kt \qquad \text{——— (5)}$$

$0 < n < 1$

The experimental data were transformed into unreacted polysaccharide after allowing for soluble monosaccharides and the results are shown in table 3.

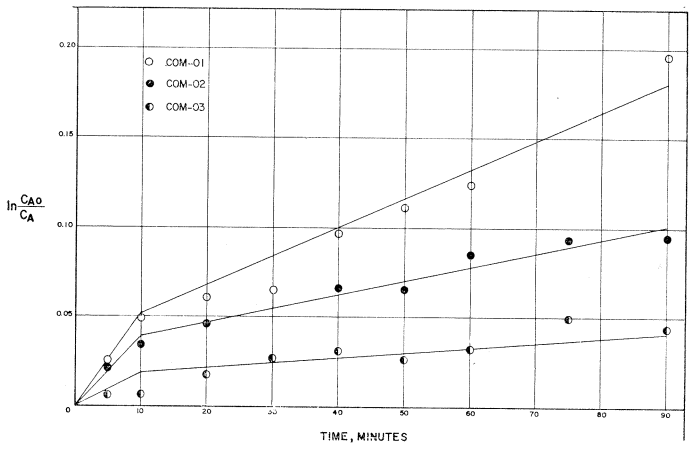
With these data and equations (3) and (4), first and zero order plots were drawn : figures 4, 5, 6, and 7. For first order kinetics there seem to be inflection points at 10 minutes for cracked coffee and at 40 minutes for whole coffee. The best straight lines were obtained by least squares (20), neglecting the points before the inflections. The resulting slopes and their confidence limits (4) are shown in table 4. For zero order kinetics cracked coffee data shows inflections at 10 minutes, however, there is no inflection for the whole coffee grain. The value of these slopes and their confidence limits are shown in table 4.

TABLE 3

Experimental data

Run	HCl (% vol.)	Time, minutes											
		0	5	10	20	30	40	50	60	75	90	105	120
		Unreacted polysaccharide, g											
COM-01	10	227.0	221.33	216.59	213.60	212.85	205.92	203.09	199.55	—**	186.61	—*	—*
COM-02	5	227.0	222.24	219.09	216.74	—**	212.48	212.81	208.65	206.71	206.53	—*	—*
COM-03	1	227.0	225.73	225.55	222.92	220.78	220.01	221.01	219.93	216.08	217.36	—*	—*
COE-04	5	227.0	225.94	225.33	224.22	223.50	222.52	220.69	218.62	215.52	213.24	207.88	205.94
CLE-05	5	128.48	—**	128.06	128.06	128.00	127.44	126.97	127.06	125.77	124.17	122.84	121.34
CLM-06	5	128.48	127.85	—**	128.00	126.12	125.92	125.14	123.19	125.23	—**	122.55	—**

* Samples were not taken.
** Samples lost in manipulation.



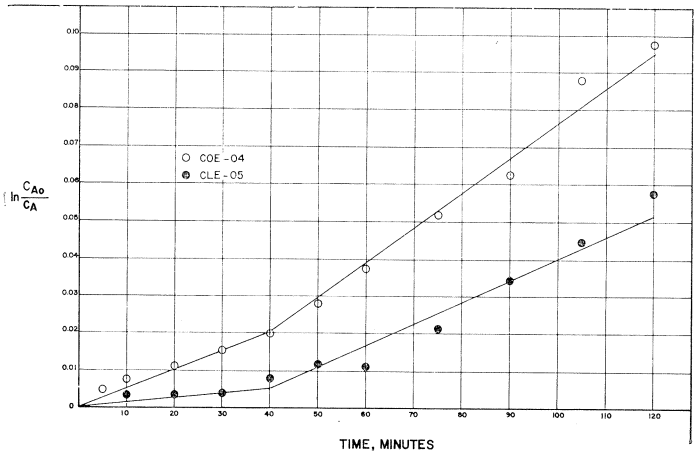
4

The procedure to solve equation (5) with the experimental data is to select a value of n and calculate k for each experimental point ; the value of n that minimizes the variation in k is the empirical rate order. A Fortran program was designed and run in an IBM 1620 digital

Fig. 4 and fig. 5. — *First order kinetics plots*

Fig. 6. — *Zero order kinetics plots*

5



6

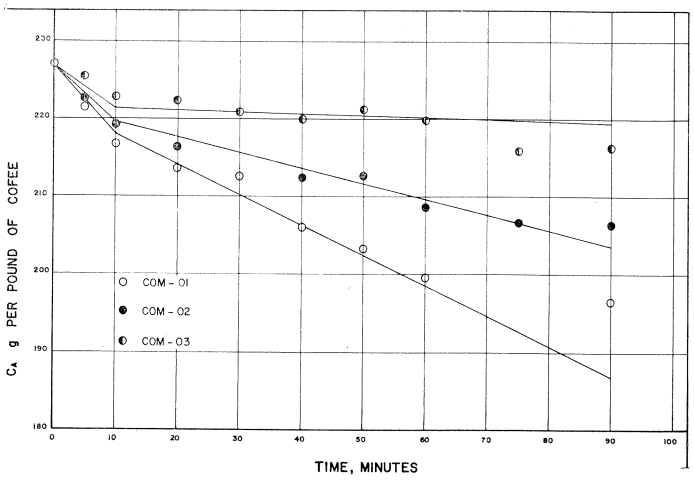


TABLE 4

Rate constants

Run	First order	Zero order
	k, confidence limits[c]	k × 10, confidence limits[c]
COM-01	(1.606[a] ± 0.390) × 10^{-3}	(— 3.799[d] ± 0.558) × 10^{-1}
COM-02	(0.781[a] ± 0.282) × 10^{-3}	(— 1.658[d] ± 0.378) × 10^{-1}
COM-03	(0.257[a] ± 0.370) × 10^{-3} f	(— 0.121[d] ± 1.110) × 10^{-1}
COE-04	(0.947[b] ± 0.275) × 10^{-3}	(— 1.786[e] ± 0.386) × 10^{-1}
CLE-05	(0.583[b] ± 0.358) × 10^{-3}	(— 0.596[e] ± 0.363) × 10^{-1}

a From t = 10 minutes to end of run
b From t = 40 minutes to end of run
c Student « t » distribution with 95 % confidence limits
d From t = 20 minutes to end of run
e All data included
f Not significantly different from zero at the 95 % level

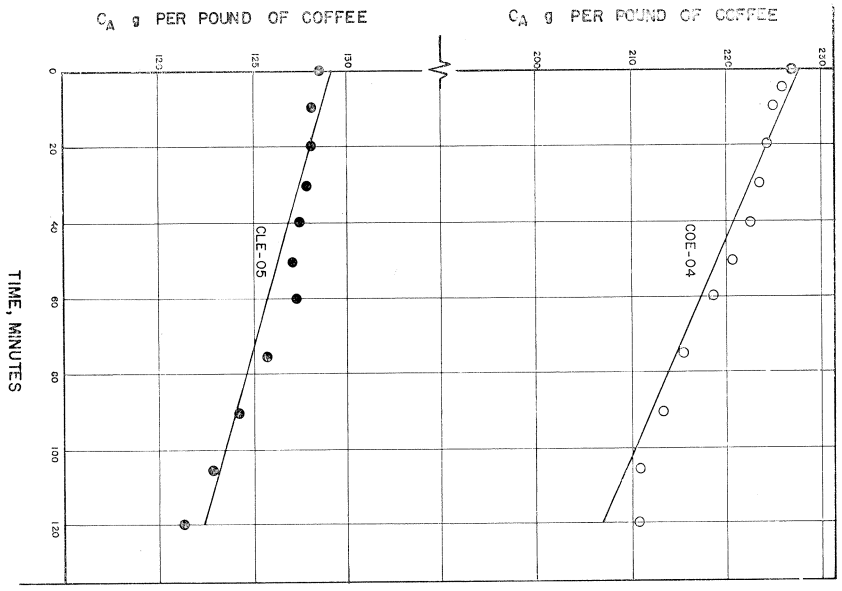
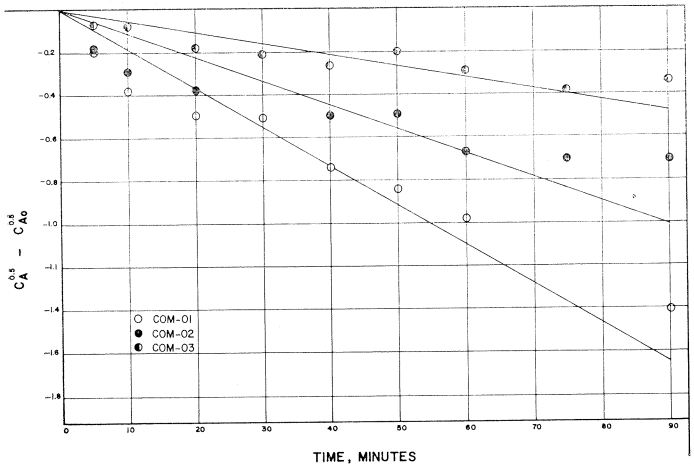


Fig. 7. — *Zero order kinetics plots*

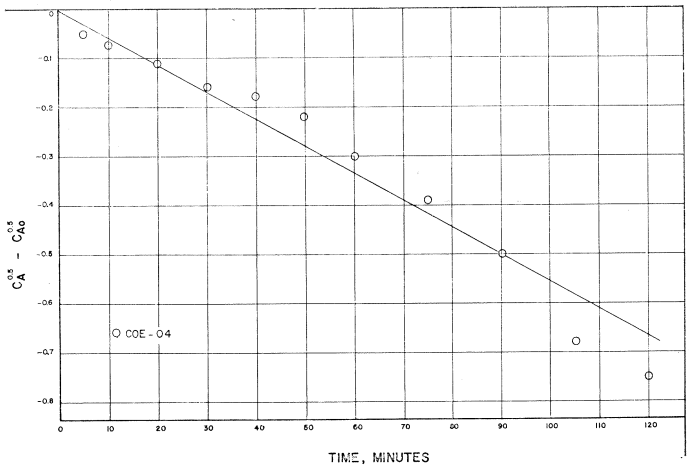
Fig. 8 and fig. 9. — *Fractional order kinetics plots*

7

8



9



computer for the purpose. The results are shown in table 5, where it is possible to see that for cracked coffee the empirical order is 0.5 (although, 0.6 is the order shown for COM-02, the variance obtained with an order of 0.5 is comparable). Being 0.5 for whole green dry and 0.2 for whole washed coffee. In figures 8 and 9 the results are plotted as $(C_A^{0.5} - C_{A_0}^{0.5})$ vs. time for COM-01, 02, 03 and COE-04. The 0.2 dependence for CLE-05 makes the slope of the line very small, introducing large errors in the calculation. The constants calculated from the slopes are shown in table 5. For first order kinetics the Hammett acidity function correlation was also texted. The values of Hammett's acidity function (Ho) corresponding to 1-5 and 10 % HCl are 0.52, —0.40 and —1.01, respectively (3). A plot of these values against the corresponding first order rate constants is shown in figure 10.

TABLE 5

Nth order empirical kinetics

Run	Empirical order	Variance	k, confidence limits
COM-01 ...	0.5	.376	(.036 4 ± 0.006 9)
COM-02 ...	0.6	.416	(.022 4 ± 0.043 5) a
COM-03 ...	0.5	.325	(.010 6 ± 0.002 7)
COE-04 ...	0.5	.194	(.011 2 ± 0.001 6)
CLE-05	0.2	.294	— —

a : Not significantly different from zero at the 95 % level.

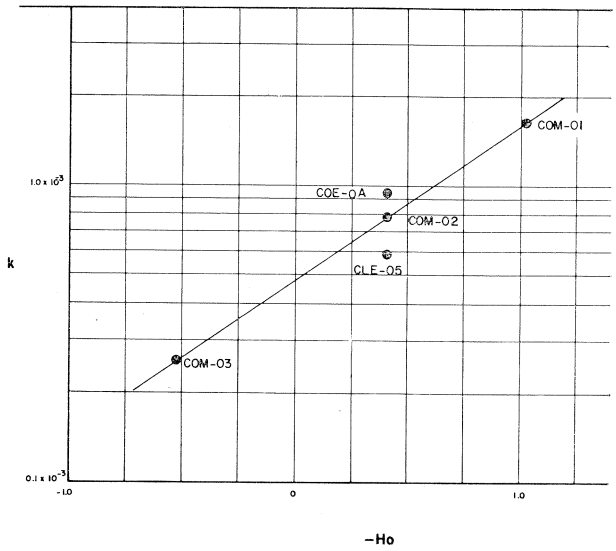


Fig. 10. — *Logarithm of the rate constant vs. acidity function*

DISCUSSION

The effect of the experimental variation of ± 5° C on the value of k may be calculated by Arrhenius equation with the values of the pre-exponential factor and activation energies. From the work of KONKIN and SHUKALOVA (11), and that of MOELWYN-HUGHES (15), the following values were taken : E = 30.7 kcal/mole and A = 4.6×10^{-6}, min^{-1}. A simple calculation shows that a ± 5° C variation results in a ± 8.45 % change on the value of k. This figure would give values of k within the confidence limits of the first order correlation for k, but undoubtedly is one of the contributions to the scatter of the data.

The first oder plots show the characteristic inflection points, and for cracked coffee the trend of the curves is similar to reported work by other authors in that the initial rate is faster than the final ; however this order is reversed for whole coffee where the reaction appears to gain momentum as time proceeds. A chemical explanation for this behavior is to recognize competing reaction mechanisms governing the reaction at different stages (9), (10), (18) ; however, in this particular case a physical explanation is also possible and could be as follows : for cracked coffee reaction starts in the surface of the grain itself and this facilitates a) the penetration and reaction inside the grain, and b) the breakage of the particles, due to mixing, exposing new available surface for reaction as time proceeds. For whole coffee, the parchment presents an additional resistance which causes a slow initial rate or direct chemical attack of the parchment itself, followed by an increase in reaction rate as soon as the grain surface is exposed to the acid media.

ZAKHAR'EVSKII and VASILENKO (26) proposed a mechanism for the acid catalyzed polysaccharide hydrolysis, which fits into the general acid catalysis scheme discussed by GOULD (7), and it is as follows:

$$(PS) + (H^+) \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (PSH)^+$$

$$(PSH)^+ + (H_2O) \xrightarrow{k_3} 2\,(MS) + (H)^+ \qquad (6)$$

Applying the steady state principle (12), the rate of polysaccharide consumption is

$$\frac{d\,(PS)}{dt} = \frac{k_2 k_1\,(PS)}{k_2 + k_3\,(H_2O)} - k_1\,(PS)\,(H^+) \qquad (7)$$

expression that can be reduced to

$$-\frac{d\,(PS)}{dt} = k_1\,(PS)\,(H^+) \qquad (8)$$

when $k_1 \gg k_2$ or $k_3 \gg k_1 \gg k_2$

Equations (8) gives the rate of polysaccharide consumption as first order dependent with respect to polysaccharide and acid, but does not tell anything about the inflection point. It seems that this mechanism can be applied only to either part of the reaction, but not to both.

The zero order plots show inflection points for cracked coffee, but it is possible to fit a general correlation for whole coffee. This agrees with STEWART and WILLIAMS (23), who found a zero order dependence.

The fractional order correlations prove to be more valuable for engineering calculations as they cover the whole reaction time span with the same expression. The main idea is to obtain the best fit. In table 5 the fractional order k values are seen to be significantly different from zero at the 95 % level, except for COM-02, for which the scatter is highest.

CONCLUSIONS

The first order analysis of the acid catalyzed hydrolysis of the coffee grain presents the same characteristics found by previous authors with different polysaccharide substances, that is, inflection points in the reaction rate vs. time plots. The situation does not improve by a zero order analysis, however, it is possible to fit the data with a fractional order analysis and obtain a correlation within the same confidence limits.

MOMENCLATURE USED

C_A = Concentration of polysaccharide at time t, g per pound of coffee
C_{A_0} = Concentration of polysaccharide at t = 0, g per pound of coffee
k = First order rate constant, min^{-1}
t = Time, min
n = Reaction order
PS = Polysaccharide
$(PSH)^+$ = Acid complex
MS = Monosaccharide

LITERATURE CITED

1. AGUIRRE, F. — « Utilización industrial del grano y los subproductos del café », *Investigaciones Tecnológicas del ICAITI*, nº 1, 1966.
2. AGUIRRE, F., SOLÉ, P., and ROLZ, C. — « Coffee Products Diversification ». To be published.
3. ARNETT, E., and MACH, G. — *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (6) 1177, 1966.
4. BENNETT, C. A., and FRANKLIN, N. L.. — « Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry », John Wiley & Sons, Inc., New York, 1963.
5. CALLE, H. — *Cenicafé*, **9** (9-10), 225, 1958.
6. DARUWALLA, E. H. and NARSIAN, M. G. — *Tappi*, **49** (3) 106, 1966.
7. GOULD, E. S. — « Mechanism and Structure in Organic Chemistry », Holt, Reinhart and Winston, New York, 1959.
8. HODGE, J. E., and HOFREITER, B. T. — *in* WHISTLER, R. L. and WOLFRAM, M. L. « Methods in Carbohydrate Chemistry », Academic Press, vol. 1, p. 386, New York, 1962.
9. HOLLÓ, J. and SZEJTLI, J. — *Staerke*, **11**, 239-246, 1959 (*C. A.*, **54**, 5138c, 1960).
10. HOLLÓ, J. and SZEJTLI, J. — *Staerke*, **13**, 327-331, 1961 (*C. A.*, **56**, 10432i, 1961).
11. KONKIN, A. A. and SHUKALOVA, E. A. — *Zhur. Priklad. Khim.*, **32**, 1076, 1959 (*C. A.* **53**, 15725i, 1959).
12. LEVENSPIEL, O. — « Chemical Reaction Engineering », J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1962.
13. MELLER, A. — *J. of Polymer Science*, *C* (2), 97-107, 1963.
14. MELLER, A. — *J. of Polymer Science* 10, 213-22, 1953 (*C. A.* 5113a, 1953).
15. MOELWYN-HUGHES, E. A. — *Trans. Faraday Soc.*, **24**, 309 (1928) ; *ibid.*, **25**, 81, 503 (1929).

16. NORTON, W. A. — « Three-in One Curve Fits, Hyperbolic, Exponential Power Function », IBM Reference Library, July 1962.
17. NOVIKOVA, L. A. and KONKIN, A. A. — *Zh. Prikl. Khim.*, **32,** 1105, 1959 (*C. A.* **53,** 15726b, 1959).
18. SALOMAA, P., and LINNANTIE, R. — *Acta Chem. Scand.*, **12,** 2051-2, 1958 (*C. A.*, **54,** 1910b, 1960).
19. SIVETZ, M. — « Coffee Processing Technology », The Avi Publishing Co., Inc., vol. II, p. 165, Westport, 1963.
20. SOCKS, B. J. — « Linear Regression », IBM Reference Library, December 1961.
1. SPRINGER, E. L. — *Tappi*, **49** (3), 102, 1966.
22. SPRINGER, E. L., HARRIS, J. F. and NEILL, W. K. *Tappi*, **46** (9), 351, 1963.
23. STEWART, C. M. and WILLIAMS, E. J. — *Chem. & Ind*, 1350, 1955 (*C. A.*, **50,** 12612e, 1956).
24. WHISTLER, R. L. and SMART, C. L. — « Polysaccharide Chemistry », Academic Press, Inc., p. 140-156, 268-270, New York, 1953.
25. WOLFRAM, M. L., PLUNKETT, R. A. and LAVER, M. A. — *J. Agr. and Food Chem.*, **8** (1), 58, 1960.
26. ZAKHAR'EVSKII, M. S. and VASILENKO, K. M. — *Zhur. Obshchei. Khim.*, **26,** 2304, 1956 (*C. A.* **51,** 6520d, 1957).

ROLZ (C.), SOLÉ (P.), AGUIRRE (F.). — **Hydrolyse acide du grain de café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 231-239, fig., tabl., réf.

L'hydrolyse acide du grain de café est décrite en tant qu'étape d'un processus d'obtention de produits autres que la boisson à partir du café.

Des expériences réalisées dans différentes conditions opératoires et sur du café en parche ou déparché, sous forme de grains entiers ou cassés, sont rapportées.

Les corrélations de vitesses de réactions irréversibles, unimoléculaires, d'ordre 1,0 et fractionnaire sont présentées, discutées et comparées aux expériences antérieures sur le clivage des polysaccharides.

La large dispersion des données ne permet pas de choisir entre les ordres des différentes réactions.

ROLZ (C.), SOLÉ (P.), AGUIRRE (F.). — **Acid hydrolysis of the coffee grain.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 231-239, fig., tabl., réf.

The acid hydrolysis of the coffee grain is described as part of a process for the obtention of products other than beverages from coffee. Experimental runs at different operating conditions and with coffee at various stages is presented. First, zero and fractional unimolecular, irreversible rate correlations are presented, discussed and compared with previous experiments on polysaccharide cleavage. Large scatter of data makes it impossible to select between the different reaction orders.

ROLZ (C.), SOLÉ (P.), AGUIRRE (F.). — **Die säure Hydrolyse der Kaffeebohne.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 231-239, fig., tabl., réf.

Die säure Hydrolyse der Kaffeebohne wird als eine Zwischenstufe bei der Gewinnung anderer Erzeugnisse als das Getränk auf der Grundlage des Kaffees beschrieben.

Es wird über Versuche berichtet die unter verschiedenen Verfahrensbedingungen und mit nach verschiedenen Arten zubereitetem Kaffee in Form von ganzen Bohnen oder zerkleinerten Bohnen verwirklicht wurden.

Die Geschwindigkeitskorrelationen von irreversibelen einmolekularen Reaktionen der Ordnung 1,0 und Bruchordnung werden erörtert und mit den vorherigen Untersuchungen über die Spaltung der Polysacchariden verglichen.

Die ausgedehnte Verstreuung der Daten lässt eine Wahl zwischen den Ordnungen der verschiedenen Reaktionen nicht zu.

DISCUSSION

M. LEVENSON : Have you measured temperature dependence or estimated the activation energy ?

M. SOLÉ : We did not estimate the activation energy. We operated at 60 °C in what we have considered a very preliminar experiment, and the variation that we have found was just about 5 °C. So we have not really a temperature which gives us a basis to estimate an activation energy.

After this preliminary experiment, we have been aware of the fact that the products that we should obtain would not be marketable because of the price. So we decided to abandon the matter at the time being. If we resume the work, we shall use more elaborate methods.

M. REYMOND : Have you checked whether amino-acids were also liberated during the mild acid hydrolysis ?

M. SOLÉ : We did not check that, but we are positive that even in the mild hydrolysis conditions there might be a number of other reactions.

We found that the amount of proteins present in the beans was important enough to be taken into account for a possible use in some foods.

M. WOODMAN : I think that it is clear that the interpretation of kinetic results obtained from a system where neither the reactants nor the products are defined chemical entities will always present difficulties.

The usual way of dealing with such data is to assess dP/dt from hand drawn tangents to the P-t curve. I would like to ask if such a procedure has been used to measure the instantaneous rate at the various stages of the reaction and, if so, whether these data were helpful in assessing the effect of such factors as (1) the influence of the particle size as it changes during the reaction, (2) the changing nature of the surface of the particles, (3) the nature of the various reactions which could have predominance at the different stages during the progress of the hydrolysis ?

M. SOLÉ : We have not carried out this work ; I don't believe that the accuracy of our data is good enough to get for instance reaction rate from them. It is possible that by a numerical treatment we could get some sort of information.

I would say however that it is a rather complex system ; there is time required for the acid to reach the polysaccharide, hemi-cellulose molecules and then there is time required for the diffusion out through the grain.

EFFECT OF DECAFFEINATION ON THE COFFEE COMPONENTS

I. CARBOHYDRATES (*)

C. CALZOLARI, L. COASSINI LOKAR
Istituto di Merceologia, Università di Trieste

In previous papers we reported experimental work done on green coffee qualitative and quantitative composition (1) (2) (3) (4) (5) and component variation which may occur in the roasting process (6) (7) (8) (9) (10).

The present communication deals with the roasting and decaffeination influence on the free carbohydrate composition of coffee.

Namely, it is known that the carbohydrates of green and roasted coffees originate from the bean cellular membrane which contains mainly mannans, cellulose, galactans and other high polymeric substances of more or less complex structure and some free sugars too (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20).

In the roasting process a part of the bean weight is lost, gaseous products and smokes are developed along with remarkable chemical modifications which cause the characteristic flavour and colour of roasted coffee. The carbohydrates which abound in green coffee may contribute to this aromatic and chromatic character, though their contribution to the basical properties of the cup may not be considered as fundamental.

The most abundant soluble sugar present in coffee is sucrose (2-8 %), while other reducing sugars are found only in traces if any acid or enzymatic hydrolysis is avoided (21). These compounds are decomposed to a high degree during the roasting process, while some new carbohydrates may appear as a consequence of complex polysaccharide degradation (13) (22) (23).

Therefore the purpose of this work is mainly the identification and determination of free carbohydrates extracted by cold hydroalcoholic solutions from green and decaffeinated Santos coffee, roasted at 180° and 240° C by a laboratory procedure. Moreover an acid hydrolysis is carried out on the hydroalcoholic extracts in order to determine the presence of glucides deriving from glucosides and polysaccharides which are not completely precipitated by the lead clarification method.

EXPERIMENTAL

Materials

1. Coffee samples

Santos commercial green coffee.
Santos commercial decaffeinated green coffee.

2. Pure sugar samples for analysis

Aldoses : glucose, galactose, mannose (C. Erba).
Ketohexoses : fructose, sorbose (C. Erba).
Pentoses : arabinose, xylose, ribose (C. Erba).
Methylpentoses : rhamnose (C. Erba).
Disaccharides : sucrose, lactose, maltose (C. Erba), trehalose, cellobiose, melibiose (Fluka A. G. puriss.).
Trisaccharides : stachyose (Calbiochem, B. grade).
D-glucose-1-phosphate disodium salt (Fluka A. G. puriss.).
D-fructose-1,6-diphosphate barium salt (Fluka A. G. puriss.).

(*) Research carried out with the contribution of C. N. R. - Italy.

Methyl-D-glucopyranoside (C. A. R.).
Glucuronic acid (Fluka A. G. puriss.).
Galacturonic acid (Fluka A. G. puriss.).

10-20 λ of 1 % aqueous solutions of the sugars were placed on the chromatographic paper strips.

3. Pure solvents for analysis R. P. C. Erba.

4. Solvent mixtures

1) Ethylacetate - acetic acid - formic acid - water (10-3-1-4) (v/v).
2) Ethylacetate-pyridine-water (10-4-3) (v/v).
3) n-butanol-ethanol-water (40-11-19) (v/v).
4) n-butanol-acetic acid-water (2-1-1) (v/v).
5) acetone-n-butanol-water (5-3-2) (v/v).
6) ethylacetate-acetic acid-water (3-3-1) (v/v).

5. Chromatographic tanks (60 × 20 × 40 cm) with teflon and glass supports.

6. Calibrated micropipettes (5 and 10 λ).

7. Whatman n° 1 chromatographic paper (22 × 46 cm)

Cut according to fiber direction and saturated 24 hours by the stationary phase before use.

8. Thermostatic drier with air circulation.

9. Revelation spray for sugar spots.

β-naphthylamine solution (100 ml n-butanol + 0.1 g β-naphthylamine + 0.05 g phthalic acid). The sprayed chromatograms were heated at 120° for 5 minutes.

10. R_{NF} reactive

a. β-naphthylphthalic acid solution (0.291 g of β-naphthylphthalic acid + 100 ml water saturated n-butanol). For the β-naphthylphthalic acid preparation we refer to the detailed description in a previous publication (24).

b. Phthalic acid solution (0.415 g of phthalic acid + 100 ml of water saturated n-butanol).

11. Paraffin oil thermostatic bath.

12. Spectrophotofluorimeter C. G. A. mod. DC/3000 with 1 cm silica cells.

The fluorescence intensity values of the examined products were corrected by a quinine sulphate standard solution (1 γ/ml in 0.1 N H_2SO_4) (24) (25).

13. Neutral lead acetate solution (10 % in water). The excess of Pb^{++} is removed by a 15 % Na_2HPO_4 aqueous solution.

TABLE 1

Average Rf values for various types of saccharides in some solvent combinations
Temperature 21 ± 1° C. Whatman n° 1

	Eluents					
	1 8 hrs.	2 7 hrs.	3 8 hrs.	4 23 hrs.	5 8 hrs.	6 7 hrs.
Raffinose	0.086	0.086	0.032	0.166	0.071	0.069
Sorbose	0.100	0.261	0.215	0.332	0.326	0.310
Ribose	0.183	0.388	0.320	0.423	0.430	0.409
Sucrose	0.003	0.159	0.106	0.299	0.183	0.206
Maltose	0.014	0.129	0.097	0.190	0.136	0.131
Lactose	0.011	0.067	0.063	0.165	0.129	0.072
Glucose	0.066	0.202	0.185	0.329	0.246	0.254
Arabinose	0.123	0.262	0.211	0.392	0.314	0.334
Mannose	0.090	0.244	0.225	0.374	0.304	0.293
Rhamnose	0.219	0.409	0.401	0.497	0.482	0.489
Fructose	0.088	0.256	0.203	0.395	0.301	0.359
Xylose	0.145	0.328	0.278	0.449	0.359	0.351
Galactose	0.055	0.199	0.159	0.314	0.225	0.240
Cellobiose	0.022	0.135	0.067	0.189	0.022	0.099
Stachyose	0.055		0.090	0.235	0.119	0.129
Gentiobiose	0.024	0.080	0.053	0.152	0.092	0.102
Glucose 1-PO_4	0.017	0.041	0.000	0.134	0.014	0.081
Melibiose	0.028	0.074	0.048	0.170	0.084	0.111
Galacturonic acid	0.100	0.015	0.018	0.232	0.052	0.179
Glucuronic acid	0.110	0.024	0.017	0.270	0.080	0.114
Melezitose	0.011	0.077	0.068	0.158	0.008	0.100
Fructose-1,6-Di-PO_4		0.000	0.000		0.000	0.052
Trehalose					0.031	
Methyl-β-D-glucopyranoside			0.525		0.632	

Methods

a) SAMPLE PREPARATION

The water content of the green coffee samples was determined before and after decaffeination and yielded the following results :

	Moisture
Green Santos	8.31 %
Decaffeinated green Santos	6.16 %

Afterwards, both samples were roasted by laboratory equipment at 180° and 240° C in a three necked flask with stirrer and water cooler. The following yield was obtained :

	Roasting	
	180° C	240° C
100 g green coffee	87.5 g	83.5 g
100 g decaffeinated green coffee	93.0 g	89.0 g

The decaffeination loss represents a rate of 5.6 % of the normal green coffee weight.

100 g of finely ground green and roasted coffees from every sample before and after decaffeination, were extracted at room temperature by means of a hydroalcoholic mixture ($CHCl_3$ + CH_3OH + H_2O : 475.0 ml + 272.0 ml + 163.0 ml). After two hours the solution was filtered at reduced pressure and stored in a separatory funnel for 24 hours. The hydroalcoholic stratum containing the soluble carbohydrates, glycosides and other substances of high molecular weight (as for instance proteins) was collected and concentrated at 40° C in a Rotovapor device and purified both from proteic substances and high polymeric carbohydrates. For this purpose two procedures were adopted : the interfering substances were removed either a) by absolute ethanol precipitation or b) by neutral lead acetate precipitation (in this second case the solution was treated afterwards by Na_2HPO_4 to remove the lead acetate excess). Then the purified extract was again clarified by decolorizing charcoal, concentrated by Rotovapor and diluted in a 100 ml volumetric flask to mark.

The comparison of the applied purification methods shows almost the same yield although the lead acetate procedure seems time-saving in respect to the absolute ethanol precipitation.

b) FREE SUGAR DETERMINATION

In order to identify the carbohydrates in the roasted and green coffee extracts a descending paperchromatographic technique was adopted, using six different solvent mixtures.

After elution the paper strips were dried at room temperature, sprayed with a specific reactive (β-naphthylamine solution in n-butanol) (see « Materials », § 9) and dried at 120°-130° C for 5 minutes.

Thus, the carbohydrates appear as brown or reddish-brown spots on bright yellow ground (or yellow-brown fluorescent spot when observed by the Wood light).

Hence, each spot was characterized by its Rf value and identified by comparison with a known sugar standard spot included in the chromatographic run.

The average Rf values of the pure standard sugars, the elution times and the development temperatures are shown in table 1, while table 2 shows the qualitative carbohydrate composition of the various coffee species investigated in the present research.

c) QUANTITATIVE DETERMINATION OF CARBOHYDRATES

In order to determine the quantity of the identified sugars in the coffee extracts and hydrolysates, a spectrophotofluorimetric technique set up in former work (24) (25) was used. It is based on a reaction which occurs between sugars and aniline, β-naphthylamine, anilinphthalic acid and β-naphthylphthalic acid. These compounds give rise to some fluorescent sugar derivatives which are suitable for very sensitive microquantitative carbohydrate determinations (24) (25). Among the above mentioned reactives, β-naphthylphthalic acid was chosen for coffee carbohydrate determinations. The sensitivity limit of the derived compound with a fluorescence maximum at 520 mμ and excitation at 420 mμ reaches 0.5 γ/ml of carbohydrate.

The various sugars present in the coffee hydrolysates and extracts were previously separated by the described chromatographic technique using eluent n. 4 and a former set up method (26). A 20 λ sample of extract or hydrolysate was then applied on each paper strip ; and successively a 20 λ spot of the standard sugar mixture to be run parallel was added on the same strip. After elution the strip with the standard was sprayed, thus determining the extract sugar position. Hence, the paper zones corresponding to each sugar, were cut off and extracted in a microextractor with 10 ml of distilled water for four hours. Afterwards each extract was concentrated at reduced pressure and filled to mark with n-butanol in a 10 ml flask. Then 5.0 ml of the R_{NF} reactive and 5.0 ml of the phthalic acid solution were added to each sample and the mixture was refluxed for three hours at 160° C in a paraffin oil bath. After cooling, the samples were brought quantitatively in a 25 ml volumetric flask and filled to mark. Finally the fluorescence intensity of the solutions was measured against a blank and against the quinine sulphate standard (1 γ/ml in 0.1 NH_2SO_4) by means of the spectrophotofluorimeter.

TABLE 2

Qualitative analysis of carbohydrates in hydroalcoholic coffee extracts by paper chromatography

Sugar	Solvent mixtures	Normal coffee						Decaffeinated coffee					
		Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C		Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C	
		Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.
Galacturonic acid	1												
	2		+		+				+	+			
	3						+			+			
	4		+				+						
	5		+	+					+				
	6		+		+								
Melibiose	1												
	2	+	+										+
	3												
	4								+				
	5		+										
	6		+										
Cellobiose	1												
	2	+	+										
	3		+										+
	4								+	+			+
	5								+				
	6		+			+							+
Stachyose	1			+				+					
	2			+				+		+		+	
	3									+			
	4					+		+				+	
	5			+				+		+			
	6			+				+		+			
Raffinose	1			+									
	2	+		+				+		+		+	
	3							+		+			
	4	+		+		+		+				+	
	5	+		+						+			
	6	+		+		+		+		+		+	
Sucrose	1	+		+		+		+		+		+	
	2	+		+		+		+		+		+	
	3	+		+		+		+		+		+	
	4	+		+		+		+		+		+	
	5	+		+		+		+		+		+	
	6	+		+		+		+		+		+	
Galactose	1		+		+		+		+		+		+
	2		+	+	+		+		+		+		+
	3						+		+				+
	4		+	+	+		+		+		+		+
	5		+	+	+		+		+		+		+
	6		+	+	+						+		+
Glucose	1	+	+		+			+	+	+	+		+
	2	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+
	3		+		+		+	+	+	+	+		+
	4	+	+		+		+	+	+	+	+		+
	5		+		+		+	+	+	+	+		+
	6	+	+		+			+	+	+	+		+

(continuation overleaf)

TABLE 2 (Continuation)

Sugar	Solvent mixtures	Normal coffee						Decaffeinated coffee					
		Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C		Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C	
		Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.
Fructose	1	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3		+	+	+		+	+	+	+	+		+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+			+	+		+	+
Mannose	1												
	2			+	+								
	3			+									
	4			+									
	5												
	6												
Xylose	1			+					+				
	2								+		+		+
	3		+										
	4								+		+		+
	5								+		+		+
	6								+		+		+
Rhamnose	1			+	+	+	+		+			+	+
	2		+	+	+		+		+	+	+		+
	3		+	+	+		+					+	+
	4		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	5					+	+		+	+	+	+	+
	6		+	+		+	+			+	+	+	+

TABLE 3

Spectrofluorimetric quantitative determination of reducing and non reducing carbohydrates

	Normal coffee						Decaffeinated coffee					
	Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C		Green		Roasted at 180° C		Roasted at 240° C	
	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.	Extr.	Hydrol.
Galacturonic acid		375.00										
Melibiose ..								45.00				
Cellobiose ..								262.00		59.33		
Stachyose ..			168.43				156.25		130.83			
Raffinose....			134.74				89.03		69.03			
Sucrose.....	1,796.87		781.25		520.83		2,187.50		1,078.89		737.50	
Galactose ..		431.25	67.37	269.49		131.25		600.00		365.14		347.50
Glucose ...	162.50	1,237.50		889.31		450.00	437.50	2,850.00	101.56	960.06		206.25
Fructose ...	187.50	1,132.80	179.82	808.46	84.00	243.75	1,062.50	2,337.50	224.57	987.57	107.66	337.66
Xylose.....								375.00		148.35		93.75
Rhamnose ..		487.50	224.57	328.50	125.00	206.25		395.75	206.27	285.05	187.50	225.00
Total mg %.	2,234.36	3,664.05	1,556.18	2,295.76	729.83	1,031.25	3,932.78	6,865.25	1,811.15	2,805.50	1,032.66	1,210.16

Each fluorescence value determined by this method was corrected by a factor f_c calculated for our spectrophotofluorimetric device and by a second factor f_e calculated in order to compensate the extraction error from the chromatographic paper. By means of the calibration curves established in former work (25) the corrected fluorescence intensity values (expressed in T %) have allowed to determine for each sugar the γ/ml concentration, from which the percent quantity in grams is obtainable. The results are shown in table 3.

DISCUSSION

The obtained data show some remarkable differences in the qualitative and quantitative free carbohydrate composition extracted from coffee beans by a hydroalcoholic solution before and after roasting and decaffeination.

The qualitative paperchromatographic research carried out on decaffeinated and non-decaffeinated Santos coffee before and after roasting leads to the conclusion of high carbohydrate composition dependence on roasting.

In fact, while in green coffee only sucrose, glucose and fructose are present, in the extract roasted at 180° C besides sucrose and fructose (glucose is absent), stachyose, raffinose, galactose and rhamnose have been identified, while in the extract roasted at 240° C only sucrose, fructose and rhamnose are found.

The hydrolysates of the three types of coffee contain galactose, glucose, fructose and rhamnose, but galacturonic acid was identified in the green coffee hydrolysate and in the coffee roasted at 180° C too. Therefore, a first consideration regards the remarkable dependence on temperature and roasting of the qualitative coffee extract composition, while the hydrolysate qualitative composition shows little variation because of these factors.

As a matter of fact, already roasting at 180° C causes the disappearance of glucose in the extracts, while galactose appears. This compound may derive from stachyose and raffinose and from mucilages, arabinogalactan and galactomannan due to incomplete clarification of the extracts.

The decaffeination process produces high qualitative differences.

In the extract of decaffeinated green and roasted coffee at 180° C, stachyose, raffinose, sucrose, glucose and fructose were present, while rhamnose was found in the extract of decaffeinated and roasted coffee at 180° C and 240° C and in the corresponding hydrolysates. The extract of decaffeinated coffee roasted at 240° C contains only sucrose, fructose and rhamnose while the disappearance of stachyose, raffinose and glucose is noticed. In the hydrolysates of several decaffeinated coffee samples galactose, glucose, fructose, xylose, rhamnose and galacturonic acid were identified ; melibiose was seen only in the hydrolysates of coffee roasted at 180° C and in green coffee ; celibiose in green coffee only.

The presence of xylose in decaffeinated coffee hydrolysates may depend on pentosane or mucilage hydrolysis.

Therefore it is observed that the qualitative composition of the free carbohydrates remarkably depends on the roasting process, either in decaffeinated or normal coffee.

Also the decaffeination process seems to influence the coffee composition. The differences which occur seem insufficient to permit an evaluation or recognition between these commercial coffee types.

In fact, only xylose which has been identified in all hydrolysates of the decaffeinated coffee samples is never present in the normal coffee and the same is true for celibiose and melibiose identified in the hydrolysate of green decaffeinated coffee and coffee roasted at 180° C.

Further evidence regarding the decaffeination process influence on the coffee quality is given by the quantitative results. The spectrophotofluorimetric carbohydrate determination shows (table 3) that sucrose (as already stated by other Authors) is the most frequent sugar. Beside sucrose, stachyose and raffinose are not always present [as other Authors have stated (17)] or at least not in quantities which are noticeable by the applied paperchromatographic technique. However if they are present, the former is always quantitatively larger than the latter, thus confirming previous work on this problem (18). The minor quantity of raffinose may be partially explained by its transformation into stachyose.

The roasting process diminishes the total sugar quantity in decaffeinated and normal coffee, but this reduction is particularly remarkable for some sugars as for instance sucrose, glucose and fructose. With a roasting at 240° C glucose disappears completely. The comparison of the quantitative data for normal green and decaffeinated green coffee shows that the total sugar quantity in both extract and hydrolysate of decaffeinated green, is twice as large as in normal coffee and this rate persists though in smaller proportions after roasting at 180°C and 240° C. The enrichment may not be justified by the decaffeination weight loss alone, which reaches 5.6 % of the weight, as it was already stated.

Moreover, it is noted that the total free sugar amount in the green coffee decaffeinated extracts corresponds closely to the same value of the normal green hydrolysates. This situation is also repeated after the roasting process at 180° C and 240° C.

Therefore, the supposition may be expressed, that the decaffeination effect on the quantitative free carbohydrate composition is similar to a hydrolysis.

These interesting data regarding the influence of the decaffeination process on the qualitative and quantitative free sugar composition in coffee consent a further extension of the present investigation in order to examine other commercial coffee types, decaffeinated with various processes and patents, to confirm the obtained results and to reach a more general evaluation of the quality of decaffeinated coffee.

REFERENCES

1. CALZOLARI C., FURLANI DONDA A. — *Annali di Chimica*, vol. 47, 1256 (1957).
2. FURLANI DONDA A. — Pubbl. Univ. di Trieste, Istituto di Merceologia, n° 9, 1958.
3. CALZOLARI C., FURLANI DONDA A. — *Annali di Chimica*, vol. 48, 1267 (1958).
4. CALZOLARI C., FURLANI DONDA A. — *Annali di Chimica*, vol. 47, 1267 (1957).
5. CERMA E. — *Quaderni di Merceologia*, vol. 3, 1964 (fasc. 1), Università di Trieste.
6. FURLANI DONDA A. — Pubbl. Univ. di Trieste, Istituto di Merceologia, n° 12 (1959).
7. CALZOLARI C., CERMA E. — *Riv. Italiana delle Sostanze Grasse*, vol. 40, n° 4, 176 (1963).
8. CERMA E., MERLI C. — Atti del III Convegno sulla Qualità, Perugia 25-27 maggio 1964 (p. 319).
9. PERTOLDI MARLETTA G. — Atti del IV Convegno della Qualità, Trieste, 10-12 settembre 1965.
10. CERMA E., PERTOLDI MARLETTA G. — Atti del V Convegno della Qualità, Messina, 9-12 settembre 1966.
11. THALER H. — *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, vol. 7, 146-148 (1957).
12. WOLFRAM M. L., PLUNKETT R. A., LAVER M. L. — *J. of Agr. & Food Chemistry*, vol. 8, n° 1, 58 (1960).
13. THALER H. — *Z. Lebensmittel-Unters. und Forschung*, vol. 106, n° 2, 128-132 (1957).
14. TERRIER J. — *Mitt. aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, vol. 43, fasc. 4 307-314 (1952).
15. TERRIER J. — *Mitt. aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, vol. 43, fasc. 4, 323-334 (1952).
16. THALER H. — *Z. Lebensmittel-Unters. und Forschung*, vol. 110, n° 6, 442-449 (1959).
17. GLOMAUD J. C., PERCHERON F., COURTOIS J. E. — Premier colloque international sur la chimie des cafés verts torréfiés et leurs dérivés, Paris, 20-22 maggio 1963, 39-43.
18. COURTOIS J. E., PERCHERON F., GLOMAUD J. C. — Idem, 63-69 (1963).
19. ALBANESE F. — Idem, 103-107 (1963).
20. THALER A. — Idem, 72-76 (1963).
21. NAVELLIER P. — *Acta Chim. Hung.*, vol. 23, 303-312 (1960).
22. NATARAJAN C. P., URS K. M., BATHIA D. S. — *J. Indian Chem. Soc. and News*, vol. 18, 9 (1955).
23. HADORN H., SUTER H. — *Mitt. Lebensm. Hyg.*, vol. 47, 33 (1956).
24. LOKAR COASSINI L. — Istituto di Merceologia, Pubbl., n° 27, Università di Trieste (1966).
25. LOKAR COASSINI L. — Istituto di Merceologia, Pubbl., n° 25, Università di Trieste (1965).
26. LOKAR COASSINI L. — Atti del V Convegno della Qualità, Messina, 10-12 settembre 1966.

CALZOLARI (C.), COASSINI LOKAR (L.). — **Effet de la décaféination sur les composants du café. I. Les glucides.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 240-247, tabl., réf.

Les auteurs montrent l'influence de la torréfaction et de la décaféination sur la composition qualitative et quantitative des glucides du café commercial.

CALZOLARI (C.), COASSINI LOKAR (L.). — **Effect of decaffeination on the coffee components. I. Carbohydrates.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 240-247, tabl., réf.

The present paper points out the influence of roasting and decaffeination process on the qualitative and quantitative composition of the carbohydrates in commercial coffee.

CALZOLARI (C.), COASSINI LOKAR (L.). — **Wirkung der Entkoffeinierung auf die Kaffeekomponenten I. Die Kohlenhydrate.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris), 1968, p. 240-247, tabl., réf.

Es wird der Einfluss der Röstung und der Entkoffeinierung auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Kohlenhydrate des handelsüblichen Kaffees gezeigt.

Dans ce but, les glucides ont été identifiés et déterminés dans des échantillons de café vert et de café torréfié à 180° C et 240° C par une technique de laboratoire, et dans des échantillons de café torréfié et décaféiné.

La séparation des glucides a été effectuée par chromatographie sur papier avec une série d'éluants tandis que l'analyse quantitative en était réalisée par une méthode spectrofluorimétrique, basée sur les dérivés de l'acide β-naphtylphtalique, dont les conditions d'emploi ont été fixées dans un précédent article.

L'étude a mis en évidence d'intéressants aspects de la composition des glucides dans les différents échantillons et l'influence des procédés de torréfaction et de décaféination sur la qualité du café.

Therefore the carbohydrates were identified and determined in samples of green coffee, in samples of coffee roasted by a laboratory technique at 180° C and 240° C, and in samples of decaffeinated and roasted coffee.

The separation of the carbohydrates was effected by a paper-chromatographic technique with a series of eluents, whereas the quantitative analysis of the same components was done by a spectrofluorimetric technique based on derivatives of β-naphthylphthalic acid, the employment conditions of which have been fixed in a previous paper.

The procedure showed some interesting aspects as to carbohydrate composition in the various samples and the influence of the roasting and decaffeination process on the quality of coffee.

Zu diesem Zweck wurden die Kohlenhydrate in Stichproben von Rohkaffee und von nach einer Labortechnik bei 180° C und 240° C geröstetem Kaffee sowie in Stichproben von geröstetem und koffeinfreiem Kaffee identifiziert und bestimmt.

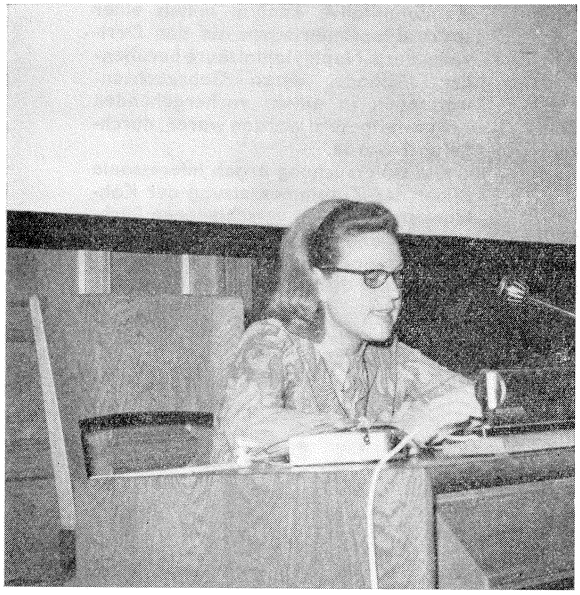
Die Trennung der Kohlenhydrate erfolgte papierchromatographisch mit einer Reihe Elutionsmitteln während die quantitative Analyse mittels einer spektralfluorimetrischen auf den Derivaten der β-Naphtylphtalsäure beruhenden Methode, deren Gebrauchsanweisungen in einem vorhergehenden Artikel festgesetzt worden waren, durchgeführt wurde.

Die Untersuchung ergab interessante Bilder der Zusammensetzung der Kohlenhydrate in den verschiedenen Stichproben und zeigt den Einfluss des Röstungs- und des Entkoffeinierungsverfahrens auf die Qualität des Kaffees.



Le Professeur CALZOLARI au cours d'une intervention

EFFECT OF DECAFFEINATION ON THE COFFEE COMPONENTS



Mrs. G. PERTOLDI MARLETTA

II. POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (*)

C. CALZOLARI, G. PERTOLDI MARLETTA

Istituto di Merceologia, Università di Trieste

In a previous paper (1) the problem of the separation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons has been studied in order to collect all the information necessary to develop a method for their spectrophotofluorimetric quantitative determination in coffee roasted at various temperatures as well as in the fumes formed during the roasting process. This problem had already been investigated by several authors who pointed out that polycyclic aromatic hydrocarbons are formed when food of various kinds, such as grilled meat or fish (2, 3), are strongly heated and are also found in tobacco smoke (4) and in the atmosphere of cities (5) as a consequence of the incomplete combustion of various organic matters. Roasted coffee has also been studied by some Japanese authors (6, 7) who described a rather complicated and time-consuming method for the determination of the above compounds in coffee and by French authors (8) who discussed the determination of 3,4-benzopyrene in green and roasted coffee.

The problem of the separation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons is of particular interest because these compounds often show carcinogenic action ; among them 3,4-benzopyrene was proved to be the most active in this respect.

In this work the brands of coffee investigated were submitted to different degrees of roasting, so that the influence of temperature on the formation of the above compounds in roasted coffee as well as in fumes could be pointed out both from a qualitative and a quantitative standpoint. The investigation was also extended to samples of decaffeinated coffee.

EXPERIMENTAL

Instruments and methods

The separation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and fumes was carried out by column chromatography and the separated compounds were then identified by spectrophotofluorimetric analysis.

The samples of coffee were extracted with petroleum ether ; from the thus obtained extract the unsaponifiable matter was separated and analysed by column chromatography followed by spectrophotofluorimetric

(*) Research carried out with the contribution of C.N.R. - Italy.

analysis. The fumes resulting from the roasting process were trapped in benzene and also analysed.

In order to develop and standardize the method, experiments were performed with the following pure compounds : pyrene, fluoranthene, 1,2-benzopyrene, 1,2-benzoanthracene, 3,4-benzopyrene, 3,4-benzofluoranthene, chrysene and perylene.

The experiments were carried out on the following brands of coffee :

Columbia M. E., Haiti XX, two samples of commercial decaffeinated and not decaffeinated Santos coffee of different origin, which will be hereafter designated as Santos A and Santos B.

The polycyclic aromatic hydrocarbons were extracted from coffee with petroleum ether 40-70° C and the extract was saponified with 2N KOH. The polycyclic aromatic hydrocarbons extracted from coffee were separated chromatographically on a Merck Al_2O_3 column using petroleum ether, petroleum ether and benzene, benzene as solvents.

The separated hydrocarbons were determined quantitatively by means of a spectrophotofluorimeter C. G. A. Mod. DC/3000 Ciampolini (Firenze, Italy), equipped with two quartz prism monochromators and silica cells of 1 ml.

All the values of intensity of fluorescence obtained at the characteristic wavelength for the compound under investigation were corrected using a solution of quinine sulphate in N/10 sulfuric acid as a reference standard. For the correction of the fluorescence spectra the reader may refer to the papers dealing with this subject (1, 9, 10).

Experimental measurements

The analyses were performed in the laboratory by roasting the samples in a three-necked flask equipped with a stirrer, a thermometer and a condenser for the collection of the fumes which were then bubbled through benzene. Three roasting temperatures were selected, i. e., 240° C, 210° C and 180° C, and the roasted samples of coffee weighed 1.000 g each. The weight losses after roasting are reported in table 1.

TABLE 1

Brand	Green coffee, g	Roasted coffee, g 240 °C	Roasted coffee, g 210 °C	Roasted coffee, g 180 °C
Columbia M. E..	1.000	833	851	875
Haiti XX	1.000	829	850	876

After roasting the samples were ground and then extracted for twelve hours in a Soxhlet apparatus, using petroleum ether 40-70° C as solvent. Table 2 lists the yields of extract (in weight) at each roasting temperature.

TABLE 2

Brand	Roasting temperature °C	Extract g/1,000 g of green coffee
Columbia M. E.....	240	115.6
	210	102.1
	180	98.0
Haiti XX	240	118.3
	210	105.9
	180	101.3

After removal of the solvent, the extracts were saponified with alcoholic 2N KOH and the solution was refluxed for 1 hour. The unsaponifiable matter was extracted five times with 100 ml portions of petroleum ether ; the extract was treated twice with 100 ml of N/10 sulfuric acid and then with distilled water. After removal of the solvent, the extract was finally chromatographed on a column of Al_2O_3. Table 3 shows the yields of unsaponifiable matter (wt, g) obtained from the two brands of coffee at the three roasting temperatures.

TABLE 3

Brand	Roasting temperature °C	Unsaponifiable matter g/1,000 g of green coffee
Columbia M. E.....	240	7.8
	210	3.1
	180	0.9
Haiti XX	240	8.2
	210	2.9
	180	1.1

The fumes resulting from the samples roasted at the three different temperatures were collected in three traps containing benzene connected with each other. After evaporation of the solvent, the residue fixed in benzene was also analysed by column chromatography. The yields of residue (wt, g) obtained at the three roasting temperatures are shown in table 4. These data are merely indicative and regard the volatile products emanating during the roasting and not the soots which deposit on the industrial roasting machines.

TABLE 4

Brand	Roasting temperature °C	Residue fixed in benzene g/1,000 g of green coffee
Columbia M. E.....	240	4.8
	210	1.6
	180	0.2
Haiti XX	240	4.4
	210	1.3
	180	0.2

Column chromatography and spectrophotofluorimetric analysis

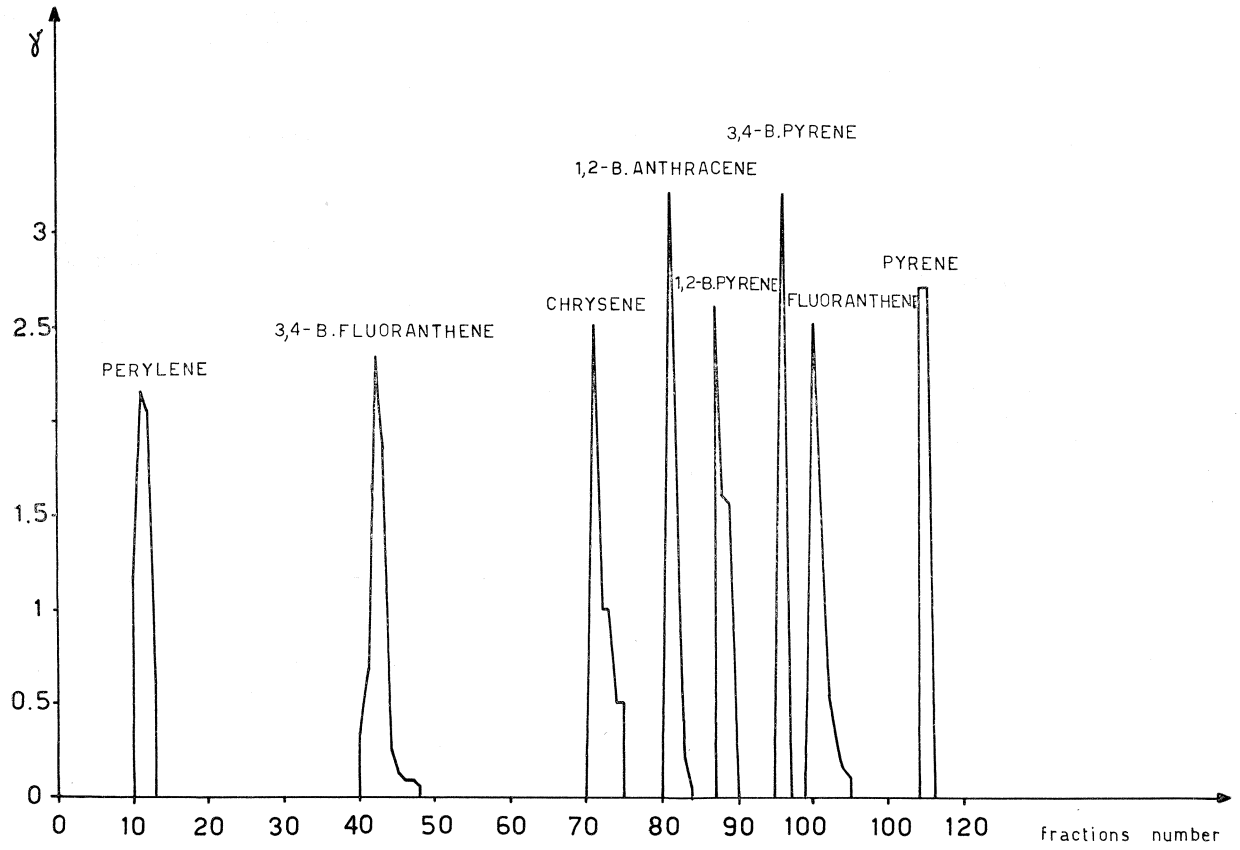
In order to investigate the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by column chromatography, preliminary experiments were performed on mixtures of pure compounds containing all the eight hydrocarbons in question. For this purpose various experiments were carried out with solutions containing 20 γ/ml to 0,2 γ/ml of each hydrocarbon.

2 to 10 ml of each of these solutions were placed on the column.

Figure I shows the elution curve for a solution containing 2 γ/ml of each polycyclic aromatic hydrocarbon. The solvent used to prepare the solutions was petroleum ether. They were chromatographed on a column of Al_2O_3 Merck activated in an oven at 120° for 12 hours. 120 fractions were collected and optimal elutions were obtained when the solvents used were petroleum ether petroleum ether and benzene, benzene.

The collected fractions, of 5 ml each, were analysed spectro-photofluorimetrically. All the values of fluorescence intensity were corrected with quinine sulfate. The fluorescence maximum was determined for each of the hydrocarbons investigated prior to these analyses. It was also checked whether a linear relationship between concentration and fluorescence intensity existed for all of them. This proved to be the case in the concentration range 0.1 γ/ml to 0.75 γ/ml for each compound. Then the average possible errors in these measurements were estimated by the method of the least squares. For this purpose the deviations between the experimental points and the corresponding points on the regression line were determined in terms of percentage. The average error involved was 3 %.

Fig. I. — Elution curve for a solution containing 2 γ/ml of each polycyclic aromatic hydrocarbon



As to the experimental error stemming from the elution of each hydrocarbon from the column, for total concentrations of 20 γ/ml of each compound, this lies within the limits of the experimental error involved in the estimation of the functional relationship between the concentration and the previously calculated fluorescence intensity. For the minimum concentration of 0.2 γ/ml of each hydrocarbon the error is higher than the average values of the error involved in the estimation of the above relationship. Therefore, in all the practical analytical determinations care has been taken that the concentration of the samples investigated should be within the limits of the above reported average experimental errors.

The concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (in γ/1 000 g of green coffee) in the brands Columbia M. E. and Haiti XX and in the fumes derived from their roasting are reported in tables 5 and 6.

The diagrams in fig. II, III and IV show the elution curve of the Columbia coffee at the roasting temperatures of 240° C, 210° C and 180° C, respectively.

After the determinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons in the two brands of coffee Columbia M. E. and Haiti XX, we have extended our investigation to two samples of commercial Santos coffee (Santos A and Santos B), before and after decaffeination. We have also examined the fumes produced during the roasting process, with a view to pointing out the possible influence of the decaffeination process upon the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during the roasting. The samples of Santos coffee, decaffeinated and non-decaffeinated, were roasted in the laboratory only at 240° C, as it had been previously observed that this temperature corresponds to the maximum formation of polycyclic hydrocarbons. The analysed coffee samples weighed 1, 000 g each.

Table 7 and 8 summarize the data obtained in the analysis of the two Santos samples, before and after decaffeination.

Figures V and VI show the elution curve for Santos A before and after decaffeination.

TABLE 5

Hydrocarbons	Roasted coffee					
	240° C		210° C		180° C	
	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g
Perylene	0.93	0.86	0.56	0.37	—	—
3,4-benzofluoranthene	9.00	10.16	5.06	4.56	0.36	0.40
Chrysene	6.10	6.00	3.86	3.23	—	—
1,2-benzoanthracene	7.93	6.96	3.03	3.16	—	—
1,2-benzopyrene	5.86	6.60	0.43	0.30	—	—
3,4-benzopyrene	5.23	4.86	—	—	—	—
Fluoranthene	0.50	0.60	0.30	0.23	—	—
Pyrene	3.00	3.83	2.00	2.10	—	—

TABLE 6

Hydrocarbons	Fumes					
	240° C		210° C		180° C	
	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g	Columbia γ/1,000 g	Haiti γ/1,000 g
Perylene	—	—	—	—	—	—
3,4-benzofluoranthene	4.10	3.66	1.56	1.05	—	—
Chrysene	—	—	—	—	—	—
1,2-benzoanthracene	3.66	2.83	1.03	1.16	—	—
1,2-benzopyrene	0.66	0.41	0.30	0.38	—	—
3,4-benzopyrene	0.76	1.20	—	—	—	—
Fluoranthene	0.46	0.53	0.10	0.23	—	—
Pyrene	—	—	—	—	—	—

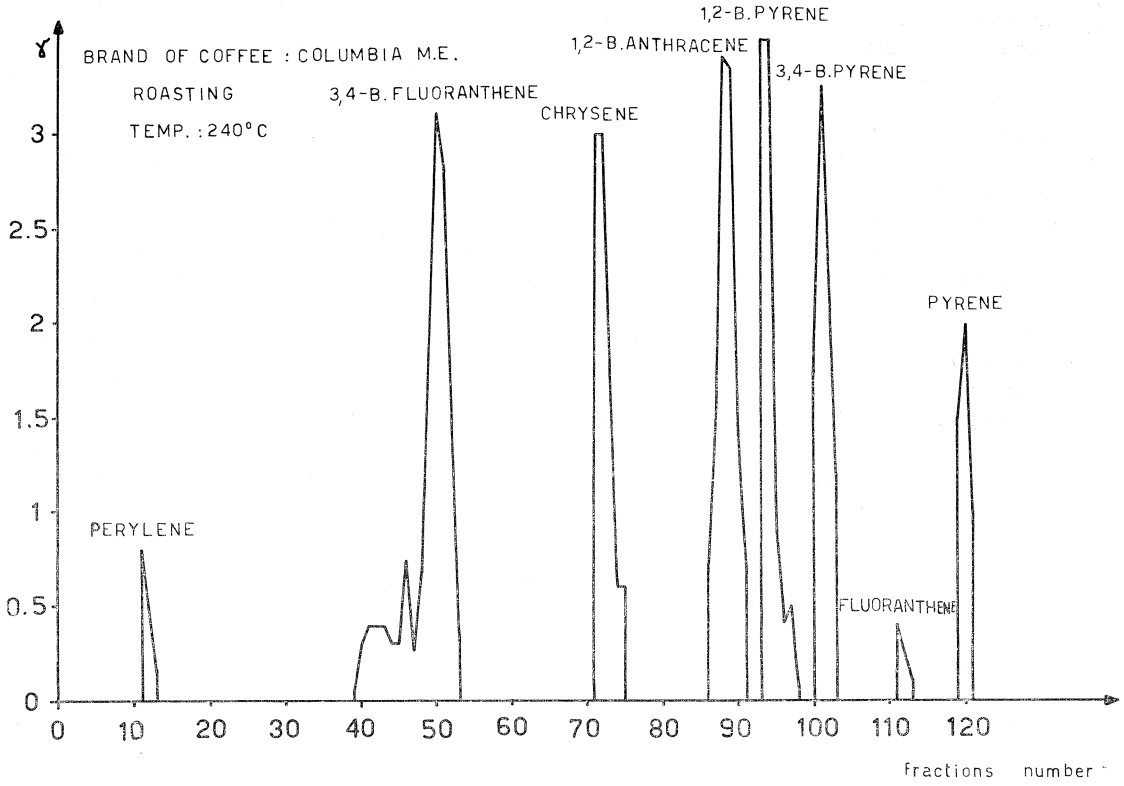


Fig. II. — Elution curve of the Columbia coffee at the roasting temperature of 240°C

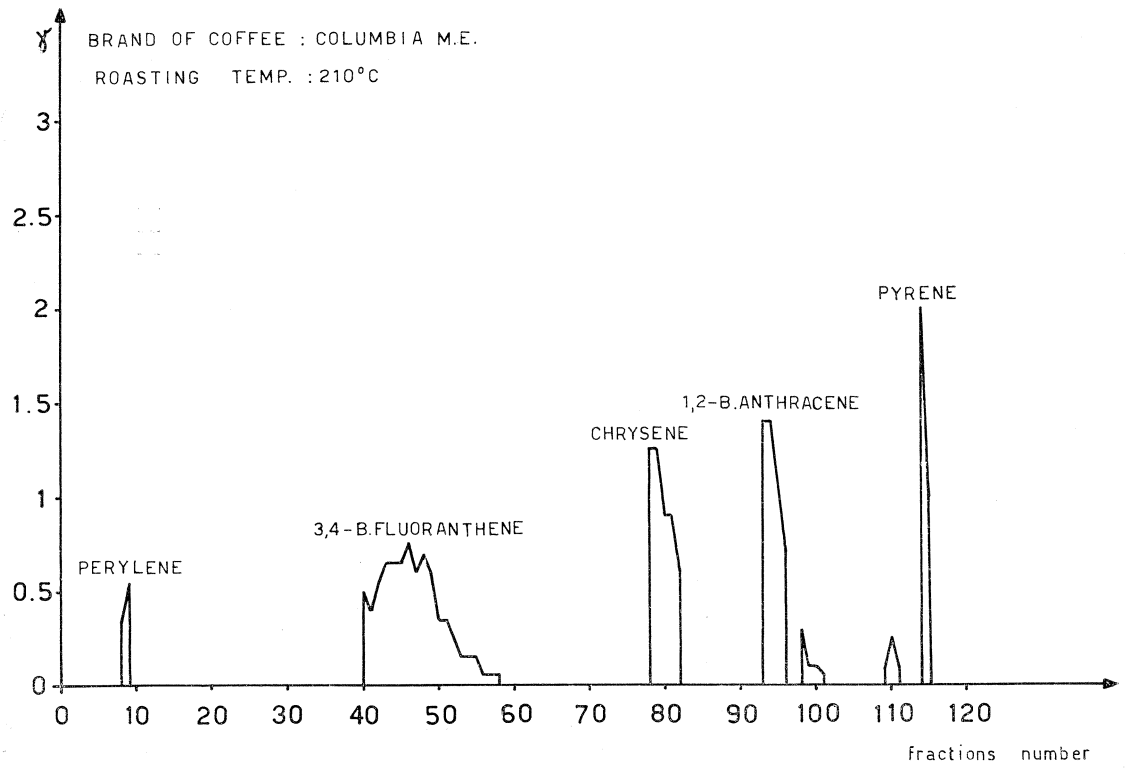


Fig. III. — Elution curve of the Columbia coffee at the roasting temperature of 210°C

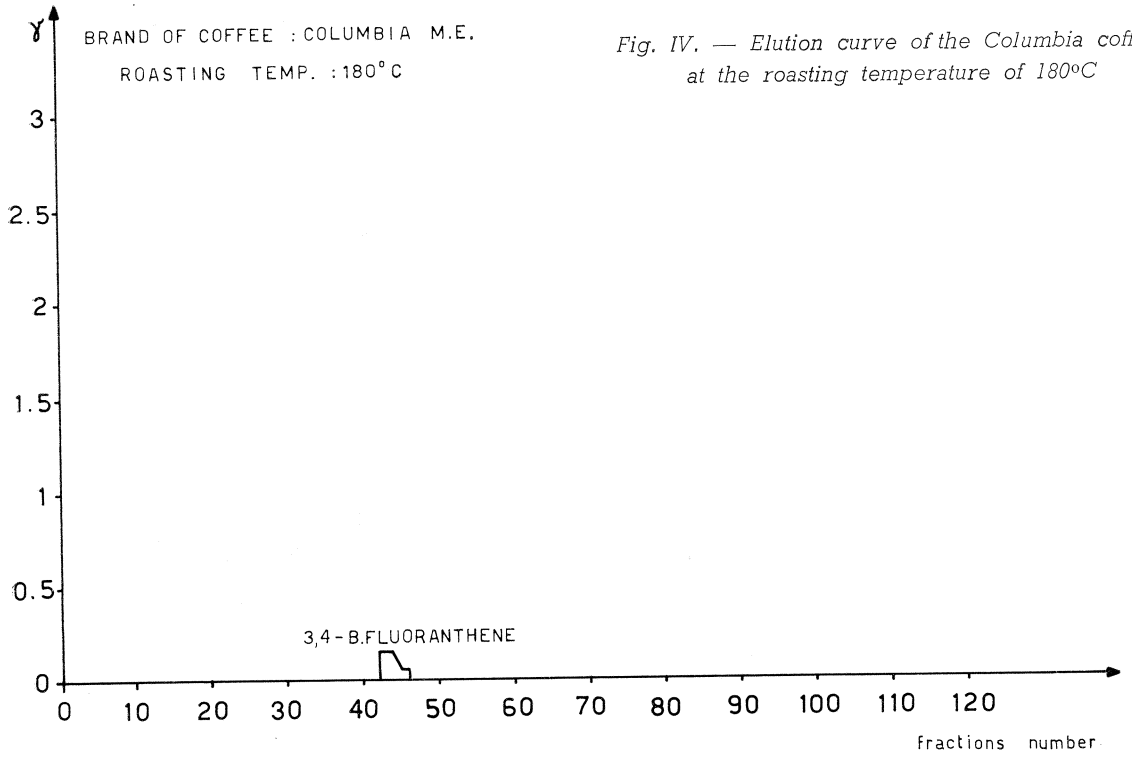


Fig. IV. — Elution curve of the Columbia coffee at the roasting temperature of 180°C

TABLE 7

Brand	Green, g	Roasted, g	Extract, g	Unsaponifiable, g	Residue fixed in benzene, g
Santos A	1,000	827	109.3	7.5	3.9
Santos B.....	1,000	849	114.5	7.9	4.1
Santos A decaffeinated	1,000	870	112.9	6.4	3.4
Santos B decaffeinated	1,000	900	118.2	6.5	2.8

TABLE 8

Hydrocarbons	Roasted coffee 240° C				Fumes			
	Santos A γ/1,000 g	Santos A decaffeinated γ/1,000 g	Santos B γ/1,000 g	Santos B decaffeinated γ/1,000 g	Santos A γ/1,000 g	Santos A decaffeinated γ/1,000 g	Santos B γ/1,000 g	Santos B decaffeinated γ/1,000 g
Perylene	1.50	0.90	4.65	2.45	0.45	0.15	1.35	0.37
3,4-benzofluoranthene ...	10.20	6.32	4.32	3.26	3.85	2.75	2.10	1.05
Chrysene.....	6.80	3.58	2.00	1.25	—	—	—	—
1,2-benzoanthracene.....	9.58	7.24	7.90	4.66	2.98	1.65	3.80	2.10
1,2-benzopyrene	7.60	4.67	7.85	4.95	1.25	1.90	0.95	0.90
3,4-benzopyrene	6.90	4.28	4.38	2.97	0.85	0.42	2.30	1.75
Fluoranthene	1.25	0.95	3.20	1.93	0.22	0.19	—	—
Pyrene	3.45	1.25	1.38	0.48	—	—	—	—

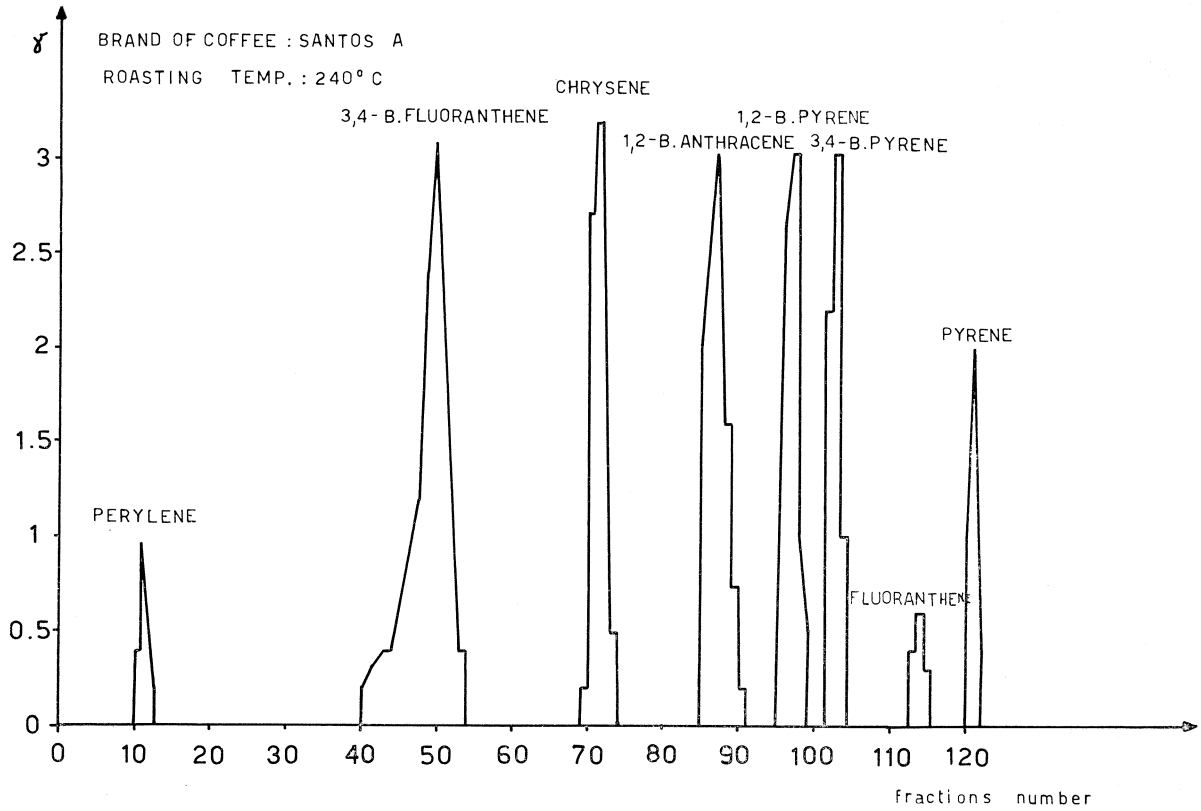


Fig. V. — Elution curve of the Santos A before decaffeination

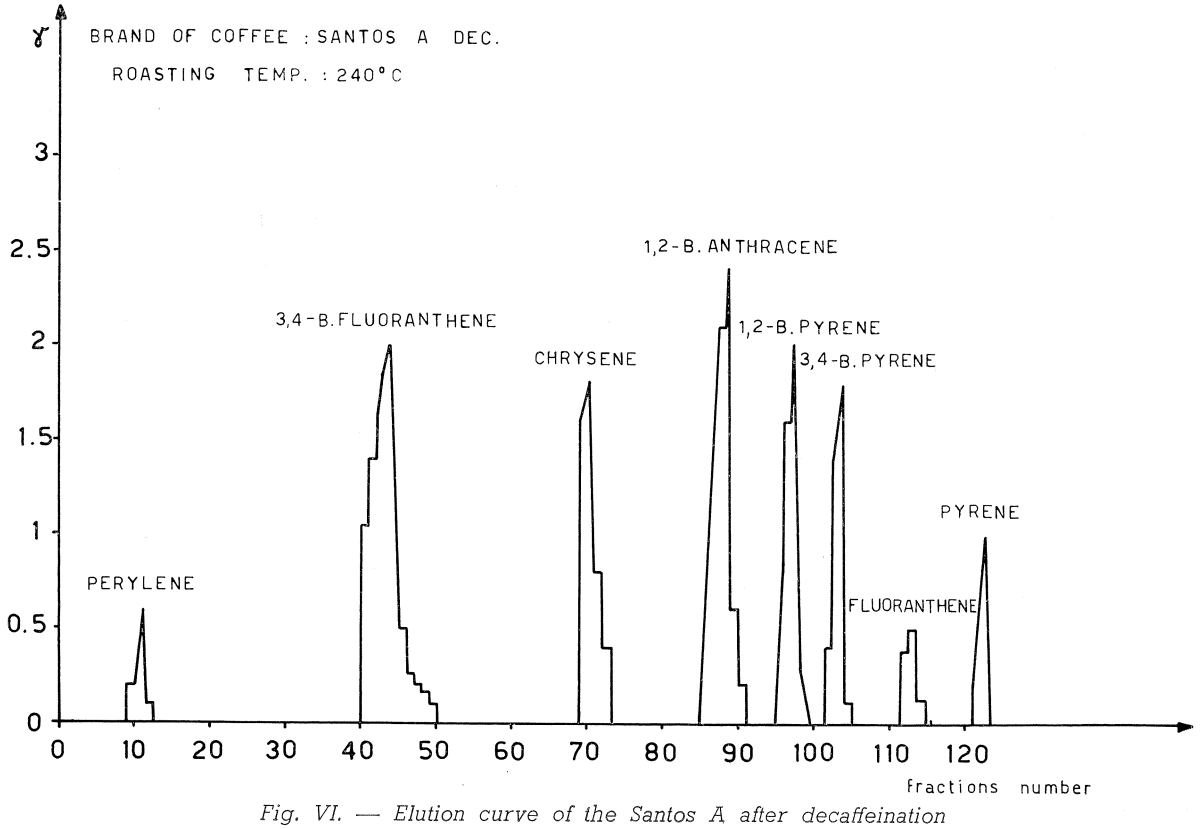


Fig. VI. — Elution curve of the Santos A after decaffeination

CONCLUSIONS

The studies made until the present time on the carcinogenic action of polycyclic aromatic hydrocarbons show the difficulties of evaluating both their acute and chronic toxicity objectively, because several factors contribute to its increase and decrease. Tests performed on animal and clinical experiments on man demonstrate that the oncogenic action is favoured by an optimal nutritional state of the individual and, therefore, the growth of tumours is favoured by various environmental factors such as food, food additives, products derived from degradation processes due to the action of heat (e. g. organic peroxides), the type of the commonly breathed atmosphere, etc. All these exogenous factors play vital roles because of their synergic action in relation to the primary carcinogens in the genesis of neoplasms.

Another significant problem is that not all the primary carcinogens are certainly toxic as in the case of 3,4-benzopyrene. There are the weak carcinogens which exert their toxic action over long periods of time ranging from 15 to 30 years, thus representing a characteristic example of chronic toxicity.

Besides, the action mechanism of the carcinogenic substances should not be underestimated in evaluating toxic doses.

The quantities of polycyclic aromatic hydrocarbons determined in the present work and related to the whole original coffee already appear very low in comparison to the average lethal dose values reported by R. TRUHAUT (11) for 3,4-benzopyrene.

It should further be stressed that the quantities detected in this work are present in coffee potentially because, to be significant, they must be related to the infusion we drink.

REFERENCES

1. G. PERTOLDI MARLETTA. — Atti del I Convegno Regionale dell'alimentazione e del IV Convegno Nazionale della Qualità, Trieste — Universita degli Studi — 11, 12 sett. 1965.
2. W. LIJNSKY, B. SHUBIK. — *Science*, **145** (3627), 53-5, 1964.
3. P. P. DIKUN. — *Vopr. Onkol.*, **11** (2), 77-84, 1965.
4. G. SCASSELATI SFORZOLINI, A. MARIANI. — *Ricerca scientifica*, anno. 31°, vol. I, pt. II B, n° 2, 1961.
5. B. T. COMMINS. — Symposium on the Analysis of Carcinogenic Air pollutants, Cincinnati, Ohio, August 29-31, 1961.
6. M. KURATSUNE, W. C. HUEPER. — *J. of the National Cancer Institute*, vol. 20, n° 1, January 1958.
7. M. KURATSUNE, W. C. HUEPER. — *J. of the National Cancer Institute*, vol. 24, n° 2, February, 1960.
8. F. CHASSEVENT, M. HEROS. — *Café, Cacao, Thé*, vol. VII, n° 4, oct.-déc. 1963.
9. C. A. PARKER, N. T. REES. — *Analyst*, **85**, 587, 1960.
10. W. M. MELHUISCH. — *J. Phys. Chem.* **64**, 762, 1960.
11. R. TRUHAUT. — *Actualités Pharmacologiques*, 15 a série, 1963.

CALZOLARI (C.), PERTOLDI MARLETTA (G.). — **Effet de la décaféination sur les composants du café. II. Hydrocarbures polycycliques aromatiques.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 248-256, fig., tabl., réf.

Une étude a été entreprise sur quelques échantillons de café du commerce après torréfaction et après décaféination et torréfaction pour certains d'entre eux.

Pour mettre en évidence la formation d'hydrocarbures polycycliques aromatiques au cours de la torréfaction, les échantillons furent torréfiés en laboratoire à trois températures différentes : 180° C, 210° C et 240° C. On a de plus

CALZOLARI (C.), PERTOLDI MARLETTA (G.). — **Effect of decaffeination on the coffee components. II. Polycyclic aromatic hydrocarbons.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 248-256, fig., tabl., réf.

A study was performed on some samples of commercial green coffee after roasting, out of which two samples have been decaffeinated before roasting.

With the view of emphasizing the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from roasting process, the samples of coffee were roasted in our laboratory at three different temperatures 180° C, 210° C and 240° C.

CALZOLARI (C.), PERTOLDI MARLETTA (G.). — **Wirkung der Entkoffeinierung auf die Kaffeekomponenten. II. Die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe.** Troisième Colloque international sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 248-256, fig., tabl., réf.

Einige Kaffeeproben aus dem Handel wurden nach ihrer Röstung und nach der Entkoffeinierung und der Röstung gewisser von ihnen untersucht.

Um die Bildung im Verlauf der Röstung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen nachzuweisen, wurden die Stichproben im Labor bei drei verschiedenen Temperaturen : 180° C, 210° C und 240° C

examiné l'influence possible de la décaféination sur le développement de ces hydrocarbures.

L'insaponifiable fut séparé de chaque type de café torréfié par extraction à l'éther de pétrole (40-70° C), puis analysé par chromatographie sur colonne et ensuite par une méthode spectrofluorimétrique, dans le but de séparer et d'évaluer les hydrocarbures polycycliques aromatiques. Les fumées émises au cours de la torréfaction ont également été examinées.

A 240° C on note la plus importante formation d'hydrocarbures polycycliques parmi lesquels le 3,4-benzopyrène, considéré comme cancérigène. Par contre, à 210° C, le 3,4-benzopyrène n'était pas observé et à 180° C d'autres hydrocarbures avaient également disparu. Un phénomène analogue a été observé dans les fumées des trois types de torréfaction.

Enfin, on a remarqué que dans les échantillons de cafés décaféinés, torréfiés uniquement à la température maximum de 240° C, il se formait moins d'hydrocarbures cancérigènes que dans les échantillons de même origine, non décaféinés.

Furthermore the possible influence of decaffeination process on the development of the above compounds was examined.

The unsaponifiable matter was separated from each type of roasted coffee extracted by means of petroleum ether (40-70° C). The unsaponifiable matter was analysed by column chromatography and subsequently by spectrofluorimetric method in order to separate and estimate the polycyclic aromatic hydrocarbons. In the meantime the fumes emanating during roasting process have been examined.

At 240° C it was noted the maximum development of polycyclic hydrocarbons, among which the 3,4-benzopyrene known as cancerigen. On the contrary at 210° C, the 3,4-benzopyrene was not noted and at 180° also some other hydrocarbons disappear. A similar behaviour was ascertained also in the fumes deriving from the above three roasting processes.

Finally it was noted that in the samples of decaffeinated coffee, roasted only at the maximum possible roasting temperature of 240° C, the development of cancerigen hydrocarbons was lower than in the undecaffeinated samples of the same origin.

geröstet. Es wurde ausserdem die mögliche Wirkung der Entkoffeinierung auf die Entwicklung dieser Kohlenwasserstoffverbindungen untersucht.

Das Unverseifbare wurde von jeder Sorte geröstetem Kaffee durch Extraktion mit Petroläther (40-70°) getrennt und sodann durch Säulenchromatographie und weiter durch eine spektralfluorimetrische Methode analysiert, um die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen zu trennen und zu bewerten. Der im Verlauf der Röstung ausgelöste Rauch wurde ebenfalls geprüft.

Bei 240° C wurde eine bedeutende Bildung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen festgestellt, darunter das als krebserregende geltende 3,4 Benzopyren. Bei 210° C dagegen konnte kein 3,4 Benzopyren festgestellt werden und bei 180° C waren weitere Kohlenwasserstoffe verschwunden. Eine ähnliche Erscheinung wurde bei dem Rauch der drei Röstungsarten beobachtet.

Schliesslich wurde noch bemerkt, dass sich bei den koffeinfreien Proben, die nur bei Höchsttemperatur von 240° C geröstet wurden, weniger krebserregende Kohlenwasserstoffverbindungen bildeten als bei den Stichproben der selben Herkunft, die nicht koffeinfreiwaren.

DISCUSSION

M. KENSLER : 3,4 benzopyrene is formed during pyrolysis of vegetable and animal material. It would be expected that some could be found in roasting coffee as in broiling steaks or burning toast. The important question is « does any 3,4 benzopyrene get into the beverage as it is consumed ? ». As I understand it, you have not shown it to be present in coffee beverages.

Mme PERTOLDI MARLETTA : Le nostre prove sono state eseguite seul caffè tostato intero e non sull'infuso. Io presuppongo che nell'infuso la quantità sia ancora minore rispetto alle quantità da noi riscontrate.

M. KENSLER : In terms of cigarettes there are about 5 micrograms of 3,4 benzopyrene for 100 g of tobacco. I suspect that any amount would be questioned so I think that it is important to establish whether any quantity is present in the beverage or not.

Mme PERTOLDI MARLETTA : Ho potuto vedere un lavoro italiano nel quale sono stati determinati gli idrocarburi cancerigeni anche nell'infuso e quindi penso che la loro presenza sia ugualmente riscontrata anche nell'infuso. Questo sarebbe un campo di studio molto interessante.

M. CALZOLARI : Voglio sottolineare che gli idrocarburi aromatici policiclici sono stati determinati nel caffé tostato e che non abbiamo affrontato il problema della loro presenza nell'infuso.

M. ILLY : On remarque que la quantité de 3,4 benzo-pyrène est négligeable dans un café torréfié à 240 °C ; or une telle température n'est jamais atteinte au cours de torréfactions industrielles ; en Italie, les températures maxima sont de l'ordre de 233-235 °C et normalement on torréfie à 222-227 °C.

D'autre part, dans l'étude rapportée, le café a été torréfié en laboratoire ; avec ce matériel, il peut y avoir apparition de points chauds où la formation de 3,4 benzo-pyrène est plus facile. Dans les appareils de torréfaction industriels, la température est plus homogène. On peut conclure que dans les cafés du commerce, la présence d'hydrocarbures cancérigènes est exclue.

DETERMINATION OF CAFFEINE IN GREEN COFFEE BY POTENTIOMETRIC ACID-BASE TITRATION IN NON-AQUEOUS SOLVENTS (*)

C. CALZOLARI, L. FAVRETTO GABRIELLI

Istituto di Merceologia, Università di Trieste

Various extraction and determination procedures are described in the methods proposed for the analysis of the caffeine content in coffee. In most of the extraction methods, an aqueous clarified extract is obtained, from which the caffeine is extracted by chloroform and determined by various procedures such as gravimetric, volumetric, spectrophotometric and others. The Association of Official Agricultural Chemists recommends the micro-Kjeldahl and spectrophotometric methods, the latter for decaffeinated coffee extract which is suitably clarified. Reviews of most commonly employed procedures have been published (1, 2).



Mrs. L. FAVRETTO GABRIELLI

Recently, in drug analysis, the acid-base titration of caffeine has been frequently applied, profiting by the fact that, in non-aqueous solvents, this substance can easily be titrated with a strong acid, such as perchloric acid. For the end-point determination, the visual estimation (3-11) or, more accurately, a spectrophotometric titration (12-15) with a suitable indicator as well as a potentiometric procedure can be applied (16-21).

The main advantage of the potentiometric end-point is its applicability to the titration of very weak base mixtures after a suitable solvent choice (21-22). It is interesting to note that as indicator electrode the glass electrode can be used, which gives reproducible measures and is convenient to use.

Until now, the potentiometric acid-base titration of caffeine has not been applied for determining caffeine in coffee. Therefore the titration of caffeine in the chloroform extract of coffee has been investigated. For this purpose the most suitable solvent was chosen. In order to confirm the sensitivity and precision of the method, the confidence limits of indeterminate errors in caffeine samples of various sizes were evaluated.

In the present paper a tentative method for the determination of caffeine in green decaffeinated coffee is proposed. As extraction method the one already employed by BOWER, ANDERSON and TITUS (23), BARBERA (24) and SMITH (25, 26) was adopted. Further studies now in progress will be reported in a future work on roasted coffee.

(*) Research carried out with the contribution of C.N.R. - Italy.

EXPERIMENTAL

Apparatus

An automatic titrator AMEL, model 333, equipped with a 2 ml glass syringe was used in all titrations. The plunger of the syringe was activated by a motor-driven micrometer screw and the volume delivered was determined with a simple revolution counter. The device has been found to deliver volumes with an accuracy of about $\pm$ 1 μl.

The potentiometer guaranteed a lecture precision of about $\pm$ 2 mV. A glass electrode (Universal Jaener Glas Type V) was used as indicator electrode. Before each titration, it was immersed for a few minutes in distilled water as suggested by BATES (27). For the titration in acetic anhydride solvent mixtures, the reference electrode (sleeve-type saturated calomel electrode Beckman) was modified by inserting a non-aqueous bridge formed by a 0.1 M solution of lithium perchlorate in acetic anhydride (22, 28). With this experimental device the liquid junction potential has been proved to be sufficiently constant for electrode potentials in the non-aqueous solutions to be measured with a precision comparable to the instrumental one.

Spectrophotometric measures were obtained with a spectrophotometer UNICAM SP 500 ; 1-cm fused silica cells were used.

Reagents and solutions

Caffeine B. D. H. standard aqueous solution (1×10^{-2} M) was prepared from the substance dried at 80° for six hours.

Perchloric acid 70 % Allied Chem. A. C. S., 0.1 M solution in glacial acetic acid-acetic anhydride was prepared as described by WIMER (22). It was standardized by titrating with a potassium acid phthalate in glacial acetic acid solution (29).

Acetic anhydride Erba RP.

Lithium perchlorate dried B. D. H.

Magnesium oxide Erba RS for chromatography.

Chloroform Erba RP, stabilized with 0.5 % anhydrous ethanol.

Methyl violet Erba 0.1 % indicator solution in glacial acetic acid-acetic anhydride 95 : 5 v/v.

Other reagents are Erba RP.

PRELIMINARY TESTS ON PURE CAFFEINE

Choice of solvent mixture

In a series of preliminary experiments the most suitable non-aqueous solvent to carry out caffeine titration was chosen, bearing in mind that chloroform is the best solvent for caffeine extraction.

In previous studies various solvents were employed as titration solvents in the analysis of caffeine. These included : acetic acid, formic acid (30), propionic acid (14), acetic anhydride (21) and propionic anhydride (14), and other aprotic solvents such as benzene and carbon tetrachloride.

As the largest potential change in the region of the equivalence point has been observed in acetic anhydride, this solvent has proved useful for the potentiometric titration (21). In the present study chloroform-acetic anhydride solvent mixtures were employed, as the addition of acetic anhydride to chloroform arising from aqueous phase extraction dehydrates the titration medium.

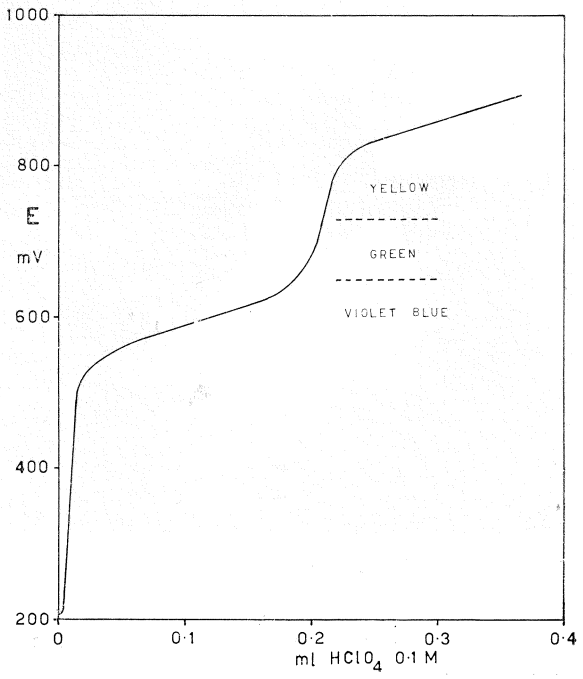


Fig. 1. — *Titration curve of 3.88 mg of caffeine in 30 ml of solvent mixture ($CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 v/v). The colour change of methyl violet is reported.*

Figure 1 presents the titration curve of 3.88 mg of caffeine dissolved in 30 ml $CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 v/v, with perchloric acid 0.1 N. The titration curve shows two inflection points. The inflection at the potential of about + 350 mV is due to a basic impurity contained in the acetic anhydride used as solvent. The second inflection, at a potential of about + 740 mV, corresponds to the equivalence point of caffeine.

In spite of the presence of basic impurities it is possible to carry out a differentiating titration of caffeine with remarkable precision. As this impurity is contained in variable but always very small amount (less than 5 µl 0.1 N $HClO_4$ for 10 ml Ac_2O), it is necessary to carry out accurate blank determinations in order to ascertain the impurities in every solvent lot, or to plot accurately also the first part of titration curve. So far systematic research for identifying the nature of basic impurities have not been carried out, nor has a suitable purification been tried.

As for the potential change corresponding to the titration of caffeine, it is important to note that the molar combination ratio is 1 : 1. Therefore the curve is symmetrical around the equivalence point and the inflection point of the curve corresponds to the end-point. This can be accurately derived from the incremental ratio $\Delta E/\Delta V$, provided that equal increments of titrant are added in the vicinity of the end-point ($\Delta V = 2.5$ µl).

In figure 1 the visually observed colour changes of methyl violet, already used as indicator in macro-titration (4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15) are reported. With $CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 v/v as solvent mixture, the change of the colour begins at about + 630 mV and varies from green to yellow in proximity of the equivalence point.

Figure 2 reports the potential change, which was measured in the range ± 5 % from the equivalence point and observed in the titration of an equal amount of caffeine (3.88 mg) dissolved in 30 ml various Ac_2O-$CHCl_3$ mixtures. The largest potential change is observed in acetic anhydride, whereas increasing amounts of chloroform cause a progressive decreasing of the change.

In this research $CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 v/v mixtures were employed ; these mixtures can be obtained by addition of acetic anhydride to chloroform extract. By using this solvent mixture the potential change is about 120 mV, such as to permit the evaluation of the end point with a remarkable precision.

Evaluation of the analytical precision

Two series of analyses on pure caffeine samples were carried out in order to estimate the total precision and accuracy of the method used for the determination of caffeine by non-aqueous potentiometric titrimetry. In the first series of analyses, a known amount of caffeine obtained by evaporation of an aqueous standard solution was titrated. By these analyses the existence of possible determinate error was investigated ; by repeated analyses, the dispersion of the values around the mean was estimated. The second series of analyses was carried out on standard samples of caffeine obtained from the same aqueous standard solution and treated with the same procedure used for the aqueous filtered solutions extracted from coffee. Namely, the standard amount of caffeine was diluted to a volume of 250 ml and evaporated to about 100 ml after addition of 3 ml H_2SO_4 1 N. Then this solution was extracted five times with 20 ml $CHCl_3$, as described in the method proposed for the determination of caffeine in decaffeinated green coffee. With these analyses the presence of determinate errors due to an incomplete extraction was investigated and the data dispersion was compared with that obtained from direct caffeine analysis.

The two series of analyses were carried out in samples of various sizes in order to evaluate the precision of the method as a function of the amount of titrated substance.

The results are shown in table 1, in which the mean ($\bar{x}$) of four determinations with the standard error (s) and the confidence limits for a probability level P = 99 % are reported. Although the number of observations (n) is low, from the data of the table the following conclusions can be drawn :

a) in both series of analysis the relative standard errors are always less than 2 %. Even in samples of very small size, the standard error is so low that it is possible to determine 2 mg of caffeine with a relative standard error of less than 2 %.

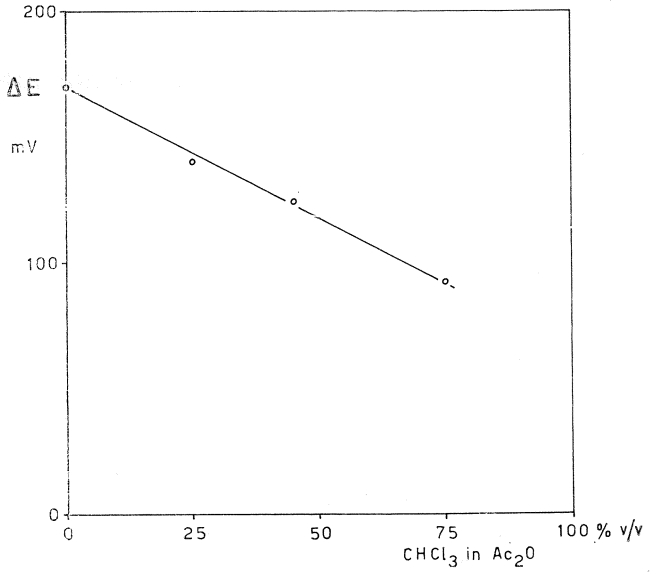


Fig. 2. — *Plot of potential change in the range ± 5 % from the equivalence point, as a function of the volume of $CHCl_3$ in Ac_2O. Titration of 3.88 mg of caffeine in 30 ml of solvent mixture.*

TABLE 1

Confidence limits of indeterminate errors for various sample sizes

Weight of sample (mg)	Weight found (mg)					
	After evaporation			After extraction with $CHCl_3$		
	n	$\bar{x} \pm s$	Confidence limits ($P = 0.99$)	n	$\bar{x} \pm s$	Confidence limits ($P = 0.99$)
1.94	4	1.967 ± 0.022	± 0.064	4	1.932 ± 0.029	± 0.085
3.88	4	3.897 ± 0.039	± 0.114	4	3.867 ± 0.076	± 0.22
7.77	4	7.780 ± 0.052	± 0.152	4	7.752 ± 0.043	± 0.125
9.71	4	9.720 ± 0.104	± 0.31	4	9.64 ± 0.033	± 0.097
19.42	4	19.430 ± 0.029	± 0.084	4	19.397 ± 0.048	± 0.14

b) the means of the direct determinations of caffeine samples obtained by evaporation are practically coincident with the accepted values. These are largely within the confidence limits. Therefore, there is no statistical evidence of the presence of determinate titration errors in the size range considered. Taking into account that the precision of the aliquot delivery was expressed by the last significant figure, it can be easily seen that the standard error of determination is of the same order of magnitude as the standard error of delivery.

c) the means of the determinations on extracted samples are systematically lower than the accepted values, but the dispersion of data is such that the confidence limits include also true values. Even in this case there is no statistical evidence for admitting the presence of a negative determinate error.

From the foregoing considerations, it is possible to conclude that the extraction procedure with chloroform gives accurate results the precision of which is at least comparable to that directly obtained from caffeine samples. Therefore the extraction procedure does not cause any appreciable sample loss.

DETERMINATIONS ON GREEN COFFEE

Proposed method

The proposed method employs the extraction procedure used by BOWER, ANDERSON and TITUS (23), BARBERA (24), and SMITH (25) ; the method can be applied for the determination of caffeine content in green decaffeinated coffee, as well as in non-decaffeinated coffee after suitably reducing the sample size and the amount of reagents.

Weigh 6-8 g of sample, ground and sieved through a n° 40 sieve, add 5 g of heavy magnesium oxide and 50 ml of boiling water. Heat on steam-bath for 30 minutes. Prepare a 40 mm diameter column with a sintered-glass disc (Jaener Glas G 2) and a suspension of 15 g of a mixture of heavy magnesium oxide and Celite in equal weights. Transfer the suspension containing the sample to the column and filter under 20 cm nitrogen pressure. Continue to wash the column with boiling water until at least 250 ml of filtrate have been collected. Acidify the filtrate with 3 ml 1 N H_2SO_4 and evaporate on steam-bath until the volume of liquid has been reduced to about 100 ml. In a separating funnel extract the aqueous phase five times, each time with 20 ml of chloroform. Deliver the chloroform carefully, drop by drop, in order to avoid the inclusion of part of aqueous solution in the solvent phase. Reduce the volume of the chloroform solution to 15 ml, add 15 ml of acetic anhydride and titrate with the equipment and procedure previously described.

Results and discussion

Figure 3 shows the titration curve of a chloroform extract of green coffee containing 1.65 mg of caffeine in 30 ml $CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 v/v. The chloroform extract of green decaffeinated coffee contains, besides caffeine, small amounts of a yellow substance. During the titra-

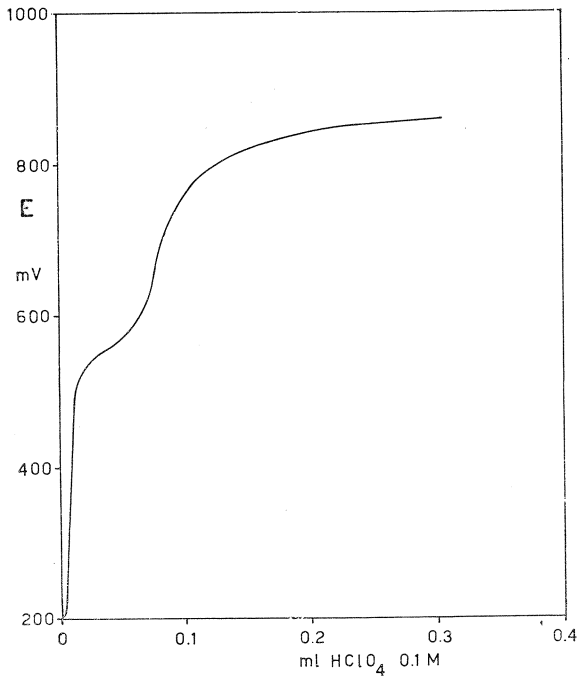


Fig. 3. — *Titration curve of green decaffeinated coffee extract* (1.65 *mg of caffeine in* 30 *ml of* $CHCl_3$-Ac_2O 1 : 1 *v/v*).

TABLE 2

Caffeine content (% on wet basis) found in coffee samples

	Caffeine content found by		
	Spectrophotometric methods		proposed method
	1	2	
Green coffee	1.11 1.04 1.06	1.10 1.09 1.08	1.11 1.09 1.08 1.10 1.09
Green decaffeinated coffee	0.034 0.031 0.030	0.049 0.047 0.045	0.028 0.029 0.028 0.029 0.030

1. — Absorbance measured at 273 mμ on aqueous solution of caffeine extracted with chloroform from the clarified water extract (24). Base-line correction applied to reading.

2. — Absorbance measured at 273 mμ both before and after extraction of caffeine from the clarified water extract with chloroform. Base-line correction applied to each reading (25, 26).

tion, this substance changes its colour from yellow to brown beyond the caffeine equivalence point. Nevertheless the titration curve corresponds to that one obtained with a pure caffeine solution.

Table 2 shows the results of the analysis of a series of separate samples of green and decaffeinated green coffee. As a comparison the table shows for the same samples the caffeine content which has been found with two different spectrophotometric methods proposed. The first method measures the absorbance at 273 mμ on aqueous solution of caffeine extracted with chloroform from the clarified water extract. As in this case interfering substances were extracted, the base-line correction was applied to reading. The second method measures absorbance at 273 mμ both before and after extraction of caffeine from the clarified water extract with chloroform. Base-line correction was applied to each reading (25, 26). It is to be noted that the purification procedure which was followed in the three methods was the same, as in the proposed method.

As for the precision of the data, the values concerning the caffeine content which were determined with the proposed method both on non-decaffeinated green and on decaffeinated green coffee are in accordance with each other.

As to the accuracy, the values which were obtained by both spectrophotometric methods, are systematically higher in green decaffeinated coffee than those obtained with the proposed method. This systematic deviation may be reasonably due to the presence of interfering substances. Although the foregoing conclusions have been drawn from a limited number of analysis, the precision of the analytical results of caffeine determination in green coffee is roughly of the same order of magnitude as that observed in pure caffeine analysis. Actually the highest deviation between the data is about 5 %. Finally, the precision of the data mainly depends on instrumental precision and, of course, on titrated amount. The accuracy should be increased as the potentiometric method seems to be independent of the presence of interfering substances, at least in the analysis of green coffee.

REFERENCES

1. P. NAVELLIER. — *In* R. Coste : Les caféiers et les cafés dans le monde, vol. I, 221 (Paris) 1959.
2. J. J. L. WILLEMS. — Deuxième Colloque sur la Chimie des Cafés, I. F. C. C. (Paris) 1966, 97-105.
3. O. KALEJS. — *Aptechnoe Delo* (Riga), **7,** nº 3, 63-6 (1958) ; *Chem. Abstr.* **53,** 18728 f (1959).
4. H. ELLERT, T. JASINSKI, I. PAWELEZAK. *Acta Polon. Pharm.*, **16,** 235-9 (1959) ; *Chem. Abstr.*, **54,** 1182 d (1960).
5. M. RINK, R. LUX. — *Deut. Apotheker-Ztg.*, **99,** 1051-4 (1959) ; *Chem. Abstr.*, **56,** 13013 b (1962).
6. F. D'ANGELI, L. JUSTIN. — Atti ist. veneto sci. lettere ed arti, classe sci. mat. nat. **116,** 123-30 (1958) ; *Chem. Abstr.*, **54,** 6032 g (1960).
7. M. RINK, R. LUX. — *Deut. Apotheker-Ztg.*, **101,** 911-18 (1961) ; *Chem. Abstr.*, **55,** 25167 c (1961).
8. M. RINK. — *Pharmazie*, **15,** 519-23 (1960) ; *Chem. Abstr.*, **56,** 11705 d (1962).
9. E. POSGAY-KOVACS. — *Gyogyszereszet*, **6,** 336-8 (1962) ; *Chem. Abstr.*, **60,** 5278 f (1964).
10. E. KONSTANTINOVA, K. BOICHINOV. — *Farmatsiya* (Sofia), **13** (4), 30-7 (1963) ; *Chem. Abstr.*, **60,** 2721 e (1964).
11. J. KREPINSKY, J. STIBOROVA. — *Cesk Farm.*, **15** (1), 25-33 (1966) ; *Chem. Abstr.*, **64,** 17355 e (1966).
12. H. ELLERT, T. JASINSKI, K. WECLAWSKA. — *Acta Polon. Pharm.*, **17,** 145-51 (1960) ; *Chem. Abstr.*, **54,** 20086 g (1960).
13. H. ELLERT, T. JASINSKI, K. MARCINKOWSKA. — *Acta Polon. Pharm.*, **17,** 29-39 (1960) ; *Chem. Abstr.*, **54,** 11806 i (1960).
14. T. JASINSKI, Z. SZPONAR. — *Chem. Anal.* (Warsaw), **10** (4), 665-9 (1965) ; *Chem. Abstr.*, **64,** 7349 c (1966).
15. T. JASINSKI, Z. SZPONAR. — *Chem. Anal.* (Warsaw), **10** (4), 619-24 (1965) ; *Chem. Abstr.*, **64,** 5760 e (1966).
16. TUN TAO, HSING-YUN YU. — *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **8,** 206-16 (1960) ; *Chem. Abstr.*, **56,** 7427 g (1962).
17. A. M. SHKODIN, L. J. KARKUZAKI. — *Zhur. Anal. Khim.*, **15,** 676-80 (1960) ; *Chem. Abstr.*, **55,** 18422 e (1961).
18. E. POGAY. — *Pharm. Zentralhalle*, **101,** 471-6 (1962) ; *Chem. Abstr.*, **58,** 6649 b (1963).
19. V. P. GEORGIEVS'KII, N. P. DZYUBA, N. A. IZMAILOV. — *Farmatsert. Zh.*, **18** (4), 27-31 (1963) ; *Chem. Abstr.*, **61,** 4156 d (1964).
20. R. C. PAUL, K. C. MALHOTRA, K. C. KHAMA. — *Indian J. Chem.*, **3** (2), 63-8 (1965) ; *Chem. Abstr.* **63,** 66 h (1965).
21. S. L. LIN, M. I. BLAKE. — *Anal. Chem.*, **38** (4), 549-52 (1966) ; *Chem. Abstr.*, **64,** 15676 b (1966).
22. D. C. WIMER. — *Anal. Chem.*, **30,** 77-80 (1958).
23. R. S. BOWER, A. D. ANDERSON. R. W. TITUS. — *Anal. Chem.*, **22,** 1056-58 (1950).
24. C. E. BARBERA. — *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **117,** 483-487 (1962).
25. R. F. SMITH. — Premier Colloque sur la Chimie des Cafés, I. F. C. C. (Paris) 1963, 223-30.
26. R. F. SMITH, D. I. REES. — *Analyst*, **88,** 310-13 (1963).
27. R. G. BATES. — The glass electrode. Reference Electrodes, Theory and Practice edited by D. J. Ives and G. J. Janz, 231-69 (1961).
28. G. J. HILLS. — Reference Electrodes in non-aqueous solutions. Reference Electrodes, Theory and Practice, edited by D. J. Ives and G. J. Janz, 433-63 (1961).
29. W. SEAMAN, E. ALLEN. — *Anal. Chem.*, **23** (4), 592-94 (1951).
30. A. I. POPOV, J. C. MARSHALL. — *J. Inorg. & Nuclear Chem.*, **19,** 340-7 (1961).

CALZOLARI (C.), FAVRETTO GABRIELLI (L.). — **Détermination de la caféine du café vert par titrage potentiométrique acide-base dans des solvants non aqueux.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 257-263, fig., tabl., réf.

Différentes méthodes ont été proposées par de nombreux auteurs pour déterminer la teneur en caféine du café vert et du café vert décaféiné.

Parmi plusieurs procédés suggérés pour extraire la caféine du café, le plus

CALZOLARI (C.), FAVRETTO GABRIELLI (L.). — **Determination of caffeine in green coffee by potentiometric acid-base titration in non-aqueous solvents.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 257-263, fig., tabl., réf.

Various methods have been proposed by many authors for determining the caffeine content of green and decaffeinated green coffee. Among several procedures suggested for the caffeine extraction from coffee, the simplest is based on water extraction, purification on magnesium oxide column and

CALZOLARI (C.), FAVRETTO GABRIELLI (L.). — **Bestimmung des Koffeins des Rohkaffees durch potentiometrische Titrierung Säure-Base in nicht wässrigen Lösungsmitteln.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 257-263, fig., tabl., réf.

Verschiedene Methoden zur Bestimmung des Koffeingehalts im Rohkaffee und im koffeinfreien Rohkaffee wurden von zahlreichen Autoren vorgeschlagen.

Das einfachste Verfahren das für die Extraktion des Koffeins vorgeschlagen wurde, besteht in einer wässri-

simple comprend une extraction aqueuse, une purification sur colonne d'oxyde de magnésium et une extraction au chloroforme. Ce procédé a été adopté dans la présente étude.

La détermination de la caféine peut être réalisée par différentes méthodes dont la spectrophotométrie qui est simple, rapide et précise bien qu'assez influencée par la présence de substances interférentes.

Dans le présent travail, le titrage potentiométrique acide-base de la caféine dans un extrait au chloroforme a été examiné en détail. On a trouvé que la présence d'autres substances extraites n'interférait pas et que l'emploi d'une micro-burette donnait une précision remarquable, convenant aux méthodes titrimétriques. La sensibilité est telle qu'il est possible de doser 2 mg de caféine avec une déviation standard inférieure à 2 %.

On propose une méthode de détermination de la caféine du café vert décaféiné dans laquelle le produit de titration est l'acide perchlorique et le solvant un mélange chloroforme-anhydride acétique dans les proportions 1 : 1 v/v.

extraction with chloroform. This procedure has been adopted in the present study.

The caffeine determination can be performed by several methods, among them the spectrophotometry is simple, rapid and sensitive, although markedly influenced by the presence of interfering substances.

In the present research the potentiometric acid-base titration of caffeine in chloroform extract has been considered in detail. It has been found that the presence of other extracted substances does not interfere, while the use of a micro-burette gives remarkable precision proper to titrimetric methods. In samples of various sizes the confidence limits of indeterminate errors have been estimated. The sensitivity is such that it is possible to determine 2 mg of caffeine with a standard deviation less than 2 %.

A method is proposed for the determination of caffeine in decaffeinated green coffee with perchloric acid as titrant, chloroform acetic anhydride 1 : 1 v/v as solvent mixture.

gen Extraktion, einer Reinigung auf einer Magnesiumoxydkolonne und einer Extraktion mit Chloroform. Dieses Verfahren wurde in gegenwärtiger Arbeit benutzt.

Die Bestimmung des Koffeins kann nach verschiedenen Methoden vollzogen werden, darunter die spektralphotometrische Methode, die einfach, schnell und präzis ist, obwohl sie etwas durch die Anwesenheit von Interferenzstoffen beeinflusst wird.

In gegenwärtiger Abhandlung wurde die potentiometrische Titrierung Säure-Base des Koffeins in einem Extrakt mit Chloroform ausführlich untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Anwesenheit anderer extrahierter Stoffe nicht interferiert und dass der Gebrauch einer Mikrobürette eine grosse den titrimetrischen Methoden angemessene Präzision ergibt. Die Empfindlichkeit ermöglicht 2 mg Koffein mit einer Standardabweichung unter 2 % zu bestimmen.

Für die Bestimmung des Koffeins des koffeinfreien Rohkaffees wird eine Methode vorgeschlagen, bei welcher die Überchlorsäure als Titrationsprodukt und eine Mischung Chloroform-Essigsäureanhydrid 1/1 v/v als Lösungsmittel dienen.

ESSAIS COMPARATIFS D'EXTRACTION DE LA CAFÉINE EN VUE DE SON DOSAGE

P. NAVELLIER, R. BRUNIN
Laboratoire municipal de Paris

A l'issue du premier colloque international sur la chimie des cafés en 1963, la commission des méthodes d'analyse, présidée par le Pr TELEGDY-KOVATS, avait mis à son programme l'étude du dosage de la caféine et le Dr Engel avait pris en charge le groupe de travail ainsi créé (1).

Un café vert, réparti par les soins de l'Institut Français du Café et du Cacao, fut donc examiné par quinze laboratoires ; vingt-et-une méthodes ont été utilisées. En présentant le rapport de cette chaîne d'analyses lors du second colloque en 1965 (2), WILLEMS a observé que les divers résultats concernant le même échantillon de café vert, étaient très dispersés : les chiffres extrêmes, exprimés en caféine pour 100 parties de matière sèche, étaient compris entre une valeur minimale de 1,156 et une valeur maximale de 2,70. Cette étude doit donc être poursuivie afin de parvenir à des résultats plus cohérents.

Par ailleurs, le sous-comité « stimulants » de l'Association Internationale de normalisation (ISO/TC34/SC8), réuni à Ankara en 1966, a abordé le problème du dosage de la caféine dans le café et dans le thé. Plusieurs délégations ont suggéré l'emploi de méthodes différentes pour effectuer ce même dosage dans ces divers produits. La délégation française a exprimé sa préférence pour le choix d'une méthode unique, et le sous-comité a décidé de mettre cette proposition à l'étude.

Or, une expérience déjà longue nous avait montré que la méthode de dosage de la caféine en usage au Laboratoire Municipal de Paris était applicable, avec de minimes modifications du mode opératoire, aux produits variés que nous avions eu l'occasion d'examiner : café vert, café torréfié, café décaféiné, extraits de café, café boisson, mélanges de café avec des succédanés et thé. De plus, en consultant les tableaux du rapport de WILLEMS (2), il apparaît que cette méthode donne des résultats parmi les plus élevés et les plus reproductibles, bien que le petit nombre d'essais effectués selon chacune des méthodes citées ne permette pas d'établir une interprétation statistique convaincante.

Il nous a toutefois paru utile de reprendre l'étude de cette méthode, dont le rapporteur avait courtoisement attribué la paternité à l'un de nous, mais qui est en fait l'aboutissement d'une expérience pratique de plus de trente années, au cours desquelles chaque opérateur avait apporté quelques modifications à la technique utilisée par son prédécesseur. Les procédés utilisés à l'origine étaient ceux de GROSSFELD et STEINHOFF (3) et de Mme GOBERT (4). Ces auteurs s'étaient proposé de doser la caféine dans le café, le café décaféiné, le thé et le maté : c'est un problème analogue qui nous occupe actuellement.

Avant d'exposer les critiques que nous adressons à notre mode opératoire habituel, et de suggérer de nouvelles modifications, il paraît utile de le décrire à nouveau, car il n'a guère été complètement publié que dans l'ouvrage de R. COSTE (5). Il comporte, comme la plupart des méthodes, d'abord la libération de la caféine des combinaisons dans lesquelles elle est engagée, puis son extraction, sa purification, et enfin son appréciation quantitative.

DOSAGE DE LA CAFÉINE : MÉTHODE GÉNÉRALE EN USAGE AU LABORATOIRE MUNICIPAL DE PARIS

1° Café en grains ou moulu, café décaféiné, mélange de café et de succédanés

a) LIBÉRATION DE LA CAFÉINE

Opérer sur l'échantillon pulvérisé et tamisé. Le passage au tamis d'ouverture de maille de 0,3 mm est suffisant. En peser 10 g s'il s'agit d'un café vert ou d'un café torréfié, ou 15 g s'il s'agit d'un café décaféiné ou d'un mélange de café et de succédanés. Les placer dans un bécher de 400 ml. Mesurer dans une éprouvette ou à l'aide d'une burette 1 ml de solution aqueuse ammoniacale au tiers (ammoniaque $d_{20} = 0{,}923$ 1 vol., eau 2 vol.) par gramme de prise d'essai. Verser peu à peu ce mélange sur le café, en brassant avec un agitateur de manière que la poudre s'humecte uniformément sans toutefois former de grumeaux. Si, avant que tout le

liquide n'ait été versé, les grains de poudre prennent un aspect nettement mouillé et tendent à s'agglomérer, cesser les affusions du mélange ammoniacal et poursuivre le brassage pendant quelques instants de manière à restituer au produit sa consistance pulvérulente ; si ce résultat indispensable ne peut être ainsi obtenu, ajouter par fractions successives 10 à 20 g de sable lavé et calciné et mélanger jusqu'à obtention d'une consistance pulvérulente (cet incident est particulièrement fréquent avec les mélanges de café et de succédanés). L'addition de quelques décigrammes de magnésie calcinée favorise l'obtention de la consistance requise. Laisser en contact pendant 1 heure au moins, le bécher étant couvert par un verre de montre.

b) EXTRACTION DE LA CAFÉINE

Après ce temps, brasser de nouveau, transvaser la poudre dans une cartouche de cellulose (modèle Durieux 37 × 130, par exemple). Entraîner la totalité de la poudre adhérant aux parois du bécher, en s'aidant de sable utilisé par petites portions, et l'introduire dans la cartouche contenant le café, en évitant de trop tasser la poudre. Recouvrir avec une nappe de coton hydrophile dégraissé, en glisser les bords entre la poudre et la paroi interne de la cartouche en s'aidant de la pointe d'un couteau. Introduire la cartouche dans un appareil à épuisement continu (Soxhlet ou extracteur B. B. S. par exemple). Epuiser au chloroforme pendant quatre à six heures. Eliminer le chloroforme d'abord par distillation, puis en plaçant un instant le ballon de l'appareil à épuisement sur un bain-marie bouillant. Laisser refroidir.

c) PURIFICATION DE LA CAFÉINE

Verser alors dans le ballon 2 ml de solution à 5 % d'acide sulfurique, et les répartir sur toute la surface du résidu en malaxant bien celui-ci avec l'extrémité d'une petite baguette de verre qu'on laissera dans le ballon. Ajouter 75 ml d'eau chaude, 2 g de paraffine en copeaux et porter à douce ébullition pendant 2 ou 3 mn. Agiter avec la baguette de verre et détacher les parcelles de résidu pouvant rester adhérentes aux parois. Laisser refroidir spontanément et reposer plusieurs heures (une nuit). La paraffine remonte à la surface et se solidifie en un gâteau qui rassemble les matières grasses et goudronneuses du café et emprisonne l'agitateur. Disposer au-dessus d'un bécher de 250 ml un entonnoir garni d'un filtre à filtration rapide de 110 à 155 mm de diamètre, mouillé. Y verser la solution aqueuse située sous la couche de paraffine, qu'il suffit de percer avec l'agitateur au ras de la paroi du ballon, sans l'en détacher entièrement. Laver à l'eau froide le ballon et le filtre, ainsi que la couche de paraffine, qui ne retient pas de quantité sensible de caféine. Il est toutefois recommandé de procéder à un nouveau lavage avec de l'eau bouillante qui, après refroidissement, sera réunie au filtrat précédent.

Alcaliniser légèrement le filtrat par addition ménagée de solution d'ammoniaque au tiers : la teinte du liquide vire lorsqu'il devient alcalin ; vérifier l'alcalinité par touche sur un papier de tournesol. Ajouter goutte à goutte, en agitant, une solution de permanganate de potassium à 5 % jusqu'à obtention d'une coloration violette, persistant pendant 15 minutes. A ce moment introduire dans le bécher, par affusions successives et en agitant, une solution aqueuse d'eau oxygénée à 12 volumes contenant 3 % d'acide acétique. Le dégagement gazeux provoque la formation d'une mousse plus ou moins abondante et le liquide brunit avec formation d'un précipité floconneux. Porter alors le bécher sur le bain-marie bouillant et poursuivre goutte à goutte les additions d'eau oxygénée acétique jusqu'à décoloration presque complète du liquide. Le milieu doit alors être légèrement acide. Eviter d'introduire un excès de réactif. L'opération de décoloration doit durer 15 mn au maximun. Filtrer sur un filtre plat à filtration rapide ; laver à l'eau chaude et refroidir rapidement le liquide clair, parfois jaunâtre, le transvaser dans une ampoule à décanter et l'épuiser à cinq reprises par 25, 20, 15, 10 et 10 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont réunies dans une seconde ampoule et lavées avec 2 ml d'eau distillée. Faire écouler la couche chloroformique dans un petit entonnoir dont la douille est garnie d'un très petit tampon de coton hydrophile dégraissé, mouillé de chloroforme, et disposé au-dessus d'un récipient taré. Prendre soin de ne pas mouiller le coton avec de l'eau. Laver l'ampoule, l'eau de rinçage et l'entonnoir avec 5 ml de chloroforme, utilisés en plusieurs fois.

d) APPRÉCIATION QUANTITATIVE DE LA CAFÉINE

Eliminer par distillation la plus grande partie du chloroforme et laisser l'évaporation s'achever lentement, de manière à pouvoir juger de la pureté de la caféine extraite d'après l'aspect des cristaux obtenus. Sécher une demi-heure à l'étuve sans dépasser la température de 100° C. Si le récipient utilisé est un ballon ou une fiole conique, il y a lieu de le coucher dans l'étuve pour assurer l'élimination complète des vapeurs denses de chloroforme. Refroidir au dessiccateur et peser. On obtient ainsi la teneur de la prise d'essai en caféine anhydre.

REMARQUE

Si la caféine paraît insuffisamment pure (teinte jaune) il y a lieu soit de la repurifier, soit de procéder au dosage de l'azote total.

Dans le premier cas, dissoudre la caféine dans 10 ml d'eau, ajouter deux gouttes de solution ammoniacale au tiers et deux ou trois gouttes de solution à 5 % de permanganate de potassium, et poursuivre la purification comme précédemment.

Dans le second cas, doser l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Soit M la masse d'azote total dans la prise

d'essai, la masse correspondante de caféine anhydre est M × 3,464.

2° Café boisson ou extrait liquide de café

Diluer l'extrait liquide de café avec de l'eau de manière à diminuer sa viscosité et l'amener à une concentration voisine de celle d'un café boisson.

Introduire dans un perforateur pour solvants denses, garni de chloroforme, 100 ml de café boisson ou de concentré dilué et 5 ml d'ammoniaque ($d_{20°} = 0,923$). Epuiser au chloroforme pendant 10 h, avec un chauffage modéré, pour éviter la formation d'une émulsion abondante et l'entraînement de liquide aqueux dans le ballon de l'appareil. Eliminer le chloroforme par distillation, et poursuivre l'opération comme il est indiqué en 1°).

Il est recommandé de soumettre la prise d'essai à un second épuisement par le chloroforme, pendant deux ou trois heures, pour s'assurer que l'extraction de la caféine a été satisfaisante.

3° Extraits de café en poudre soluble

Triturer dans un mortier une prise d'essai comprise entre 2 et 5 g d'échantillon, avec 5 g de magnésie calcinée, jusqu'à obtention d'un mélange convenable. Ajouter 20 g de sable lavé et calciné et triturer de nouveau. Verser alors goutte à goutte, et sans cesser de triturer, une solution aqueuse ammoniacale au tiers (ammoniaque $d_{20} = 0,923$ 1 vol., eau 2 vol.). Cesser cette affusion dès que le mélange prend une teinte brune et tend à s'agglomérer. Ajouter alors, tout en triturant, du sable et éventuellement de la magnésie en quantité suffisante pour restituer au produit une consistance nettement pulvérulente (les quantités nécessaires varient avec les échantillons). Couvrir le mortier, laisser au repos pendant une heure au moins et poursuivre le dosage comme il est indiqué en 1°).

REMARQUE

La prise d'essai peut également être dissoute dans l'eau, et la solution épuisée au perforateur comme il est indiqué en 2°).

REMARQUES SUR LA MÉTHODE DU LABORATOIRE MUNICIPAL ET MODIFICATIONS PROPOSÉES

La répétabilité des résultats est généralement satisfaisante. De plus, cette méthode permet de peser la caféine en nature et sa pureté est contrôlable : les erreurs par excès sont donc faibles. Elle aboutit en outre à des résultats élevés comparativement à la plupart des autres méthodes : les erreurs par défaut sont donc également faibles. Elle est applicable aux diverses plantes à caféine et à leurs dérivés : elle est donc générale. Ces critères lui confèrent, à notre avis, les principaux caractères requis pour une méthode de référence. Mais cette méthode est incontestablement longue et son exécution correcte est assez délicate ; il est tentant de chercher à la rendre plus rapide et plus pratique, sans nuire à ses qualités fondamentales.

Un moyen pour y parvenir a été proposé par d'ORNANO, CHASSEVENT et POUGNEAUD (6). Ce procédé consiste à remplacer l'opération d) (extraction liquide-liquide, évaporation du solvant et pesée de la caféine) par une mesure spectrophotométrique, en effectuant une correction de ligne de base pour tenir compte des substances perturbatrices. A la condition de confronter ces résultats avec ceux d'un étalonnage gravimétrique et, bien entendu, de disposer d'un spectrophotomètre approprié, cette variante se montre judicieuse.

Les essais dont nous parlerons maintenant ont consisté, au contraire, à modifier les opérations a, b et c (libération, extraction, purification), tout en conservant pour le moment l'appréciation gravimétrique de la caféine. Il ne s'agit pas d'une étude systématique des facteurs en cause, mais seulement d'essais comparatifs, effectués à l'occasion de nos analyses de routine : sur une partie de l'échantillon, la caféine est dosée selon notre procédé décrit précédemment ; sur une autre partie du même échantillon, une variante est essayée et les résultats sont comparés. Beaucoup d'essais portant sur des modifications du procédé de libération de la caféine (solutions ammoniacales de diverses concentrations, ou magnésie, ou solution d'acide sulfurique), ou sur le choix d'autres solvants d'extraction (acétate d'éthyle, tétrachlorure de carbone, etc...) se sont montrés décevants : résultats déficitaires, caféine impure, incidents divers au cours des manipulations, ou au mieux, résultats équivalents à ceux obtenus par notre méthode habituelle, dont la valeur est ainsi confirmée. Nous ne commenterons pas autrement ces échecs. En revanche, nous décrirons un mode opératoire qui nous paraît intéressant : l'extraction de la caféine par l'azéotrope méthylal-méthanol, solvant qui permet d'obtenir simultanément la caféine et la matière grasse du café, vert ou torréfié.

Intérêt présenté par le méthylal

Le procédé dont nous avons entrepris l'étude a pour origine un travail de MALANGEAU (7), qui avait appliqué

à l'extraction des alcaloïdes et des barbituriques un solvant peu usité, le méthylal, $CH_2(OCH_3)_2$. Le méthylal avait été utilisé antérieurement par ESPIL (8) pour extraire des acides organiques ; MALANGEAU a montré que ce corps possède des propriétés solvantes très intéressantes et insuffisamment exploitées en chimie analytique.

Ce solvant dissout fort bien les matières grasses et provoque même la rupture des cénapses lipido-protidiques. Toutefois, le coagulum protidique peut présenter une consistance visqueuse, qui gêne l'extraction des substances solubles.

DELSAL (9) a observé que l'addition de méthanol rend ce coagulum poreux et friable, et le mélange de quatre volumes de méthylal avec un volume de méthanol a permis à cet auteur d'extraire par centrifugation les lipides du sang. HELLEU (10) a pu obtenir, de manière analogue, les matières grasses contenues dans la gelée royale.

A notre tour, nous avons cherché à appliquer cette technique au dosage de la matière grasse du lait (11). Or, une circonstance fortuite nous a amenés à observer, au cours de nos essais, que le méthylal et le méthanol peuvent former un azéotrope et nous avons trouvé confirmation de ce fait dans les tables de HORSLEY (12).

Le méthylal bout à 42° C et le méthanol à 64° C. Le point d'ébullition de l'azéotrope est 41,8° C, donc voisin de celui du méthylal seul. Le mélange azéotropique se fait dans les proportions suivantes :

Méthylal.....	92,15 g
Méthanol.....	7,85 g

et sa densité à 20° C est 0,855.

Il est donc possible d'utiliser ce solvant azéotropique dans un appareil à épuisement continu, tel que Soxhlet, B.B.S., perforateur pour solvants légers, etc... Mais le méthanol est miscible à l'eau éventuellement contenue dans l'échantillon, en formant un mélange moins volatil, qui est retenu dans la fiole de l'appareil à extraction ; pour assurer la persistance de la distillation de l'azéotrope, il suffit d'enrichir en méthanol le mélange placé initialement dans cette fiole, et nous avons choisi les proportions que DELSAL avait préconisées pour l'épuisement à froid par centrifugation.

Il était tentant d'appliquer ce même procédé à l'extraction de la matière grasse du café ; l'expérience nous a montré que, non seulement ce solvant azéotropique convient pour cette extraction, mais encore qu'il entraîne également la caféine, qui peut être ensuite séparée de la matière grasse.

Nous avons donc cherché un procédé permettant d'envisager le dosage simultané de ces deux constituants du café, en nous attachant particulièrement au problème d'extraction de la caféine.

Après quelques tâtonnements, nous avons poursuivi nos essais en comparant à notre méthode habituelle le mode opératoire décrit ci-après.

EXTRACTION DE LA CAFÉINE PAR L'AZÉOTROPE MÉTHYLAL-MÉTHANOL (MÉTHODE A L'ESSAI)

Humecter 10 g de café pulvérisé avec 5 ml d'eau ammoniacale (2 + 1) dans les conditions indiquées précédemment (a), les introduire dans une cartouche en cellulose et placer celle-ci dans un appareil à épuisement continu (Soxhlet ou B. B. S.). Garnir la fiole avec un mélange de méthylal et de méthanol (4 + 1), porter à l'ébullition et prolonger l'épuisement pendant six à huit heures. Chasser le solvant. Reprendre le résidu, à plusieurs reprises, par de l'eau chaude et verser cette eau sur un double filtre mouillé, placé sur un entonnoir, en entraînant la matière grasse. Laver à l'eau chaude la fiole et le filtre. Ce dernier retient la matière grasse qui, après séchage, est extraite par l'éther éthylique.

La solution aqueuse contient la caféine, dont la purification et le dosage proprement dit peuvent être poursuivis selon les techniques c) et d) de notre méthode habituelle : traitement par le permanganate de potassium en milieu ammoniacal, puis par l'eau oxygénée acétique, extraction par le chloroforme au moyen d'une ampoule à décanter ou d'un perforateur pour solvants denses, évaporation du solvant et pesée de la caféine. Eventuellement, dosage d'azote, ou mesure spectrophotométrique de la caféine.

A titre d'exemple, nous citerons quelques-uns des résultats que nous avons obtenus :

	Méthode du Laboratoire Municipal	Extraction par l'azéotrope méthylal méthanol
Cafés verts		
Robusta	2,39	2,49
Arabica	1,12	1,17
Cafés torréfiés		
Robusta	2,19	2,69
Arabica	1,14	1,19
Cafés décaféinés torréfiés	0,108 0,039	0,122 0,054

Ces quelques essais comparatifs, réalisés en les incorporant dans notre travail quotidien, sont trop peu

nombreux pour qu'une analyse statistique permette d'apprécier la valeur d'un mode opératoire encore insuffisamment précisé. Mais les quantités de caféine extraites sont du même ordre de grandeur, souvent légèrement supérieures à celles obtenues par notre méthode de base. Et, comme le dosage de la matière grasse peut être réalisé au cours de la même opération, il nous a semblé opportun de signaler ces essais, à titre de contribution aux études sur l'extraction de la caféine en vue de son dosage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Premier Colloque International sur la chimie des Cafés, Paris 20-22 mai 1963, p. 98, IFCC éd., Paris.
2. WILLEMS (J. J. L.). — Survey of the results obtained in the determination of caffeine in a sample of raw coffee. Second Colloque International sur la chimie des Cafés, Paris 3-7 mai 1965, p. 97-105, IFCC éd., Paris.
3. GROSSFELD (J.), STEINHOFF (G.). — Über Coffeinbestimmungen in kaffee Tee und Mate, *Z. Untersuch. Lebensmittel*, **61** (1931), p. 38-56.
4. GOBERT (J.). — Dosage de la caféine dans les cafés, extraits de cafés, cafés décaféinés et thés. *Ann. Falsif. Fraudes*, **29** (1936), p. 417-420.
5. COSTE (R.). — Les caféiers et les cafés dans le monde, tome II, vol. 1, Ed. Larose, Paris (1959), p. 234-236.
6. ORNANO (M. d'). CHASSEVENT (F.), POUGNEAUD (S.). — La détermination spectrophotométrique de la caféine. Etude comparative d'une méthode fondamentale et d'une méthode pratique. *Café Cacao Thé*, 1967, n° 1, p. 14-30.
7. MALANGEAU (P.). — Emploi du méthylal au laboratoire d'analyses biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **5**, p. 233-235.
8. ESPIL (L.). — Sur l'emploi du méthylal comme solvant en chimie analytique. *Bull. Soc. Chim.*, 1934, **1**, p. 1502.
9. DELSAL (J. L.). — Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Applications au dosage du cholestérol total, des phosphoaminolipides et des protéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, p. 99-105.
10. HELLEU (C.). — Essai de détermination statistique des principales constantes physico-chimiques de la gelée royale et mise au point d'une méthode d'expertise. *Ann. Fals. Fraudes*, 1959, p. 162-183.
11. NAVELLIER (P.), BRUNIN (R.). — Emploi du méthylal pour le dosage de la matière grasse du lait. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique*, 1960, n° 619, p. 379-390.
12. HORSLEY (L. H.). — Azeotropic Data. American Chemical Society Ed., Washington, 1952.

NAVELLIER (P.), BRUNIN (R.). — **Essais comparatifs d'extraction de la caféine en vue de son dosage.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris) 1968, p. 264-268, tabl., réf.

Toutes les méthodes de dosage de la caféine du café comportent, sous divers aspects, les opérations suivantes : libération de la caféine des combinaisons dans lesquelles elle est engagée ; extraction ; purification ; appréciation quantitative de la caféine.

Cette dernière opération fait appel à des techniques variées : gravimétrie, volumétrie, dosage de l'azote total, spectrophotométrie, etc... ; elles ne sont pas discutées ici.

En revanche, diverses techniques d'extraction de la caféine sont examinées. Les essais ont porté sur des cafés verts ou torréfiés, décaféinés ou non.

Une attention particulière est apportée à l'azéotrope méthylal-méthanol, utilisé comme solvant d'extraction ; il permet, en une même opération, d'extraire la caféine et aussi la matière grasse du café.

NAVELLIER (P.), BRUNIN (R.). — **Some comparative experiments in caffeine extraction with the object of its quantitative analysis.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris), 1968, p. 264-268, tabl., réf.

All methods of quantitative analysis of the caffeine in coffee consists, in one form or another, of the following operations :

— freeing the caffeine from the elements with which it is combined,
— extraction,
— purification,
— quantitative assessment of the caffeine content of the coffee.

This latter operation calls for various techniques : gravimetry, volumetry, measurement of total nitrogen, spectrophotometry, etc. ; these are not discussed here. On the other hand, various extraction techniques of caffeine are examined. The experiments were carried out on green or roasted coffees, some decaffeinated others not.

Particular attention is given to the azeotrope methylal-methanol, used as the extraction solvent ; it makes it possible to extract in one operation both the caffeine and the fatty substances in the coffee.

NAVELLIER (P.), BRUNIN (R.). — **Vergleichende Extraktionsversuche des Coffeins im Hinblick auf seine Bestimmung.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 264-268, tabl., réf.

Alle Bestimmungsmethoden des Coffeins umfassen, unter verschiedenartiger Gestaltung, folgende Arbeitsvorgänge :

— Befreiung des Coffeins von seinen Verbindungen,
— Extraktion,
— Reinigung,
— quantitative Bewertung des Coffeins.

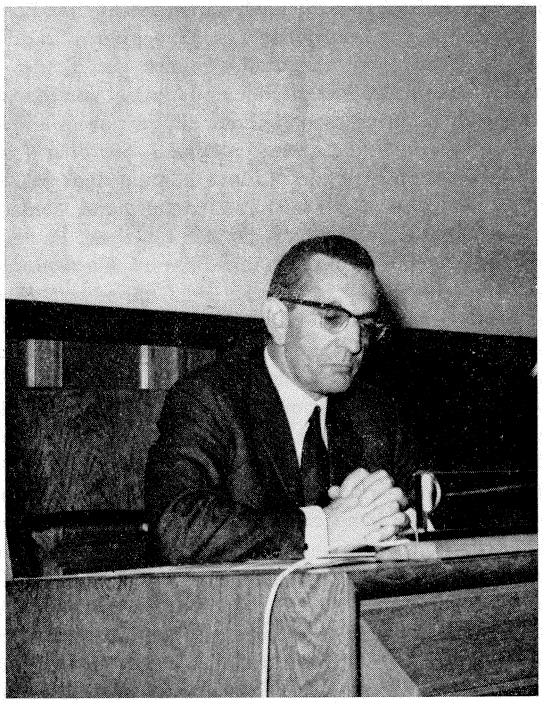
Dieser letztere Arbeitsvorgang vollzieht sich unter Verwendung verschiedener technischer Methoden : Gewichtsanalyse, massanalytische Bestimmung, Bestimmung des Gesamtstickstoffes, Spektralphotometrie, usw. Sie werden hier nicht erörtert

Dagegen werden verschiedene Verfahren zur Extraktion des Coffeins untersucht. Die Versuche bezogen sich auf entcoffeinierte oder coffeinhaltige Roh- oder Röstkaffees.

Besondere Aufmerksamkeit wird dem Azeotrop Methylalmethanol geschenkt, das als Extraktionslösemittel verwendet wird ; es ermöglicht in einem einzigen Arbeitsgang den Coffein sowie die Fettstoffe des Kaffees zu extrahieren.

DER KAFFEE UND SEINE PHYSIOLOGISCHEN WIRKUNGEN

G. CZOK,
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Mainz



Ihnen allen ist wahrscheinlich die berühmte Sage von der Entdeckung des Kaffees bekannt : Wie die Ziegen eines arabischen Hirten plötzlich anfingen auch des Nachts fröhlich herumzuspringen, anstatt zu schlafen, wie gelehrte Mönche herausfanden, dass es die Früchte des Kaffeestrauches waren, die die Tiere munter hielten, wie dann die Mönche ihre Entdeckung nutzten und auch sich selbst bei ihren nächtlichen Betstunden mit Kaffee erfrischten. So begann vor 700 Jahren der Siegeszug des Kaffees um die Welt.

Auch in Europa fand der Kaffee schnell Zuspruch. Aber er musste importiert werden, und er war nicht billig. Je mehr Menschen daher Kaffee trinken wollten, desto mehr Devisen wurden verschlungen. Ausserdem wurden dann dem Kaffee fast von seiner Geburtsstunde an immer wieder recht unschöne Wirkungen auf die menschliche Gesundheit und Leistungsfähigkeit in die Schuhe geschoben, und diese Vorwürfe fanden interessanterweise eifrige Verfechter gerade in den Staaten, deren Staatssäckel durch den Kaffee-Import belastet wurde. Ob es da ursächliche Zusammenhänge gegeben hat oder gar noch gibt, wollen wir dahingestellt sein lassen. Jedenfalls entbrannte im 18. Jahrhundert der Kampf gegen den Kaffee mit medizinischen Argumenten in besonderer Schärfe. Sogar der Tee — schliesslich wuchs er ja auch im Ausland — blieb nicht verschont. Das ging so weit, dass nicht mehr gefragt wurde, sind Kaffee und Tee schädlich oder gar giftig, nein es hiess : « Was ist tödlicher und giftiger, Kaffee oder Tee ? »

Der schwedische König Gustav III. wollte diese Frage dadurch klären, dass er die Hinrichtung von zwei zum Tode verurteilten Verbrechern mittels Kaffee und Tee beschloss. Der eine bekam daher täglich viele Tassen starken Kaffee, der andere aber starken Tee zu trinken. Ein Ärztekollegium hatte die beiden Delinquenten ständig zu beobachten und dem Konig über den Fortgang der Hinrichtung zu informieren. Die beiden Verurteilten wurden bei bester Gesundheit steinalt. Lange vor ihnen starben ihre Ärzte an Altersschwäche.

Mit der Entwicklung der modernen Naturwissenschaften erhob sich auch bald die Frage : « Durch welche Stoffe erzielt denn eigentlich der Kaffee seine vielfältigen Wirkungen, denen er seine Beliebtheit verdankt ? » Und bereits am Ausgang des 18. Jahrhunderts nahm sich die Chemie des Kaffees an. 1802 entdeckte CHENEVIX etwas, das er « einen den Eichengallen verwandten Gerbstoff » nannte. Es war offensichtlich eine verunreinigte Chlorogensäure. Und 1820 fand F. F. RUNGE die Substanz, die er nach dem Kaffee benannte und die zweifellos dessen wichtigster Inhaltsstoff ist, das Coffein.

Das Coffein erwies sich als eine stark wirksame Substanz. Seine Wirkungen stimmten mit denen des Kaffees weitgehend überein. Diese Feststellung führte

N.B. : cet exposé a été présenté au cours de la séance inaugurale.

zu der Auffassung, alle Wirkungen des Kaffees seien allein durch das darin enthaltene Coffein hervorgerufen. Im 19. Jahrhundert war es ohnehin die Lehrmeinung der Pharmakologie, die Wirkung einer Droge sei der eines oder allenfalls ganz weniger Inhaltsstoffe gleichzusetzen. Diese Coffeintheorie hat leider dazu geführt, dass die Erforschung der physiologischen Wirkungen des Kaffeegetränks, insbesondere unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Beteiligung anderer Kaffee-Inhaltsstoffe, für lange Zeit vernachlässigt wurde. Es gab allerdings immer Leute, die nicht glauben wollten, dass das Kaffeegetränk lediglich eine braun gefärbte Coffeinlösung sei. So waren z. B. die physiologischen Wirkungen der Chlorogensäure lange Zeit in der Diskussion, und auch den Röststoffen wurde immer wieder ein wesentlicher Einfluss zugeschrieben.

Erst 1940 gelang dann aber BEHRENS und MALORNY der experimentelle Beweis, dass die im Kaffee enthaltenen Röststoffe tatsächlich im Organismus bestimmte Wirkungen zu entfalten vermögen. Damit war erwiesen, dass das Coffein nicht die allein wirksame Substanz im Kaffeegetränk ist, und die Kaffeeforschung trat in ein neues Stadium. In der neueren Zeit wurden dann weitere Kaffee-Inhaltsstoffee auf ihre physiologische und pharmakologische Wirksamkeit geprüft. Hierbei ergab sich, dass auch die Chlorogensäure, das Trigonellin und das Kaffeeöl keineswegs als inerte Substanzen anzusehen sind, sondern im Tierexperiment und auch beim Menschen bestimmte Wirkungen entfalten können.

Im folgenden soll auf die wichtigsten physiologischen Wirkungen des Kaffeegetränks näher eingegangen und in diesem Zusammenhang auch die Frage erörtert werden inwieweit die zuletzt erwähnten Kaffee-Inhaltsstoffe, d. h. also die Röststoffe, die Chlorogensäure, das Trigonellin und das Kaffee-Öl an den verschiedenen Wirkungen des Kaffeegetränks beteiligt und daher von Wichtigkeit sind.

Am bedeutungsvollsten ist die Wirkung des Kaffees auf das **Zentralnervensystem**, und daher soll die Besprechung dieses Punktes an den Anfang meiner Ausführungen gestellt werden.

Die Wirkung des Kaffees auf das Zentralnervensystem besteht im wesentlichen in einer Stimulierung der Hirnrinde oder genauer ausgedrückt in einer Stimulierung derjenigen Funktionen, die für den reibungslosen Ablauf gewisser geistiger und auch psychischer Funktionen (Prozesse) wichtig sind. In Untersuchungen am Menschen und am Tier hat man dabei festellen können, dass nach Gabe von Kaffee ein rascherer Gedankenablauf auftritt. Ausserdem sollen noch einige der aktiven Hemmungsmechanismen eine Abschwächung erfahren, die für die Funktion des Zentralnervensystems von grosser Bedeutung sind und hauptsächlich im Hirnstamm, und zwar im intralaminaren mediothalamischen system ihre Lokalisation haben.

Aufgrund dieser zentralen Wirkungen erleichtert der Kaffee den Gedankenablauf, er vermehrt die Zahl der zur Verfügung stehenden Gedankenverbindungen, d. h. die Assoziationen, erleichtert das Einprägen von Zahlen und von nicht zu verwickelten Begriffen und Gedankenreihen, hemmt dabei aber schon vorher die gefühlsbetonten Handlungsimpulse, also das Willensleben.

Auf die Stimmung wirkt der Kaffee in der Regel im Sinne einer Erheiterung, einer Euphorie ; er ruft somit einen gesellschaftlichen Zustand hervor, der im modernen Gemeinschafts- und Gesellschaftsleben von grösster Bedeutung ist, in einer Zeit, da sich die Menschen, wie wir alle aus Erfahrung wissen, oft mit den Ellenbogen stossen.

Gut bekannt ist ferner die schlaf- und müdigkeitsverscheuchende Wirkung des Kaffees, die am Morgen nach dem Aufstehen oder nach einem reichlichen Essen im allgemeinen sehr erwünscht ist. Eine andere Frage ist aber die, inwieweit der Kaffeegenuss den Schlaf zu stören vermag. Die Reaktionen sind hierbei von Mensch zu Mensch recht unterschiedlich. Einige geben an, sie könnten keinen Schlaf finden, wenn sie nur eine Tasse Kaffee am Abend trinken, andere können dagegen am Abend mehrere Tassen Kaffee trinken und schlafen trotzdem schnell ein, sobald sie sich hinlegen. Es sei in diesem Zusammenhang zunächst darauf hingewiesen, dass ein schlechtes Einschlafen nicht unbedingt durch den vorherigen Kaffeegenuss ausgelöst sein braucht. Es sind hierbei noch eine Reihe weiterer Faktoren von Bedeutung, die berücksichtigt werden müssen, z. B. wieviel und was am Abend gegessen wurde, wieviel geraucht und vor allem, wie die Stunden vor dem Schlafengehen zugebracht wurden. Jede geistige Beschäftigung stört erfahrungsgemäss das Einschlafen, weil angeregte Gedanken sich nicht abstellen lassen, sondern weiterarbeiten, auch wenn kein Kaffee getrunken wird. Auch die Gewöhnung an Kaffee ist von Bedeutung für die Fähigkeit einzuschlafen. Bei Gewöhnung an Kaffee oder an Coffein kommt es, wie kürzlich durchgeführte Versuche von SCHMIDT und CZOK unter Verwendung von ^{14}C-Coffein zeigten, zu einem beschleunigten Umsatz von Coffein im Organismus und einem sehr raschen Abfall der Coffeinwerte im Serum, so dass insgesamt die Coffeinwirkungen auch schwächer ausfallen dürften. Hiernach wird also der an Kaffee Gewöhnte in seinem Schlaf sicher weniger gestört werden als der Kaffee-Ungewöhnte, wenn er abends Kaffee zu sich nimmt. Es sei in diesem Zusammenhang noch besonders darauf hingewiesen, dass durch den abendlichen Kaffeegenuss, wenn überhaupt, nur das Einschlafen selbst eine gewisse Verzögerung erfährt, während die Schlaftiefe im allgemeinen unbeeinflusst bleibt.

Die Beobachtung, dass manche Personen nach abendlichem Kaffeegenuss tatsächlich besser schlafen, ist auf folgende Weise zu erklären: Eine wesentliche Wirkung des Kaffees ist die Auslösung einer Euphorie, d. h. einer gehobenen und ausgeglichenen Stimmung. Es gibt nun aber Stimmungslagen wie z. B. Depressionen, pessimistische Gedanken, die auch das Einschlafen ausserordentlich stören können. Hier kann die Erzeugung

einer Euphorie von grossem Nutzen sein und auch das Einschlafen fördern.

Aufgrund seiner müdigkeitsverscheuchenden Wirkung vermag der Kaffee auch einen günstigen Einfluss auf körperliche und sportliche Leistungen auszuüben. Diese günstige Wirkung dürfte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die bei Ermüdung feststellbare Verschlechterung der Ökonomie durch den Kaffee deutlich verbessert wird. Die mitunter geäusserte Behauptung, durch Kaffee würden die letzten Leistungsreserven mobilisiert, dann aber käme es zu einer umso tieferen Erschöpfung, ist in dieser Verallgemeinerung sicher unzutreffend. So etwas wäre höchstens nach Verabreichung unverhältnismässig grosser Kaffeemengen zu erwarten. Die dabei auftretenden Fehlleistungen würden aber auch dann nicht durch eine Erschöpfung, sondern durch die beträchtlich gesteigerte Erregbarkeit verursacht sein.

Welche Substanzen bewirken aber nun die geschilderten zentralnervösen Wirkungen des Kaffeegetränks ?

Nach dem derzeitigen Stand unseres Wissens ist das Coffein sicher zum überwiegenden Teil daran beteiligt. Darüber hinaus dürften aber auch die Röststoffe des Kaffees bei diesen Wirkungen eine gewisse Rolle spielen. In diesem Sinne sprechen die folgenden Untersuchungsbefunde : In Versuchen an Ratten bezw. Mäusen zeigte nicht nur coffeinhaltiger, sondern auch coffeinfreier Kaffee eine zentrale Wirkung ; ausserdem war die zentrale Wirkung von Kaffee stärker als die einer Coffeinlösung, in der die entsprechende Coffeinmenge enthalten war. Der letzte Befund könnte ausserdem darauf deuten, dass auch die Chlorogensäure an der zentralen Wirkung des Kaffees beteiligt ist. Diese Vermutung hat auch deshalb einiges für sich, weil inzwischen die zentrale Wirksamkeit der Chlorogensäure von verschiedenen Autoren (CZOK, HEYL, KARGOSCHA) nachgewiesen worden ist. Da weiterhin auch nach eigenen Untersuchungen die Chlorogensäure etwa 1/6 der Coffeinwirksamkeit besitzt, dürften die im Kaffeegetränk enthaltenen Chlorogensäuremengen auch genügend gross sein, um eine zentrale Wirkung auszulösen. Trigonellin und Kaffee-Öl zeigen zwar im Tierexperiment ebenfalls eine zentrale Wirksamkeit, im Kaffeegetränk werden aber die dafür erforderlichen Schwellenkonzentrationen dieser Substanzen bei weitem nicht erreicht, so dass eine Mitwirkung dieser Stoffe an der zentralen Wirkung des Kaffees unwahrscheinlich ist.

Die Wirkung von Kaffee auf das **Herz- und Kreislaufsystem** wird nach dem derzeitigen Stand unseres Wissens weitgehend durch das im Kaffee enthaltene Coffein hervorgerufen. Es liegen allerdings verschiedene Beobachtungen vor, nach denen auch bei der Herz- und Kreislaufwirkung des Kaffees noch andere Kaffee-Inhaltsstoffe beteiligt sind.

Die Wirkungen von Kaffee auf Herz und Kreislauf sind komplexer Natur und dadurch gekennzeichnet, dass zentrale und periphere Effekte in wechselndem Umfang gleichzeitig in Erscheinung treten. Das im Kaffee enthaltene Coffein hat einmal einen Einfluss auf das in der Medulla oblongata gelegene Vagus- und Vasomotorenzentrum, was eine Abnahme der Pulsfrequenz und eine Kontraktion der peripheren Gefässe mit anschliessender Blutdrucksteigerung zur Folge hat. Zum andern greift das Coffein aber auch unmittelbar an den Gefässen an. Es kommt dabei zu einer Gefässerweiterung insbesondere in den Gefässen von Niere, Haut und Muskeln. Darüber hinaus hat das Coffein noch eine direkte Wirkung am Herzen, die darin besteht, dass die Herzkontraktionen schneller und kräftiger ablaufen und die Herzkranzgefässe erweitert werden.

Nach den üblichen Kaffeedosen lassen sich meist keine stärkeren Änderungen am Herz- und Kreislaufsystem nachweisen. Die Pulsfrequenz wird dabei in der Regel etwas verlangsamt, die ausgeworfene Blutmenge und der Blutdruck zeigen aber keine Änderung. Unangenehme Sensationen von Seiten des Herzens in Form von Herzklopfen und Druckgefühl in der Brust, können auch beim Gesunden dann auftreten, wenn zu grosse Kaffeemengen aufgenommen werden. Diese Erscheinungen verschwinden aber bei Verringerung der Dosis ohne irgendwelche Folgen.

Werden die Wirkungen des Kaffees auf das Zentralnervensystem und das Herz-Kreislaufsystem zum grossen Teil durch das darin enthaltene Coffein ausgelöst, so ergeben sich bei den Wirkungen des Kaffees auf den **Magendarmkanal** und das **Leber-Gallesystem** völlig andere Verhältnisse. Das Coffein entfaltet hier nur eine verhältnismässig geringe Wirksamkeit, während die Röststoffe in diesen Organsystemen offenbar eine besonders starke Wirkung aufweisen. Eine deutliche, aber wesentliche schwächere Wirksamkeit zeigt darüber hinaus auch die Chlorogensäure.

Es ist schon lange bekannt, dass nach Trinken von Kaffee die Sekretion und Salzsäurebildung im **Magen** gesteigert wird. Man verfiel allerdings einem grossen Irrtum, als man zunächst annahm, die Wirkungen des Kaffees auf den Magen seien als reiner Coffeineffekt anzusehen. Diese Annahme lag allerdings nahe, weil auch das Coffein entsprechende Wirkungen am Magen auszulösen vermag. Wegen dieser Wirkungen wird ja auch heute noch das Coffein als sogenannter « Coffeinprobetrunk » in der Klinik vielfach verwendet, um die Magenfunktion zu prüfen. Heute wissen wir, dass, wenn überhaupt, das Coffein nur in geringem Umfang an der Wirkung des Kaffees auf den Magen beteiligt ist. Wahrscheinlich beruht dies auf der gleichzeitigen Anwesenheit noch anderer und stärker wirksamer Kaffee-Inhaltsstoffe, welche die Coffeinwirkung zu überdecken vermögen. Stoffe von sehr starker Magenwirksamkeit finden sich aber unter den Röststoffen. BEHRENS und MALORNY haben Kaffeeröststoffe auf ihre Magenwirkung im Tierversuch eingehend geprüft und stellten fest, dass sie nach Verabreichung in höherer Dosierung eine starke Magenreizung und Erbrechen verursachten. Coffein, Trigonellin und die Salze der Chlorogensäure zeigten dagegen nicht diesen Effekt. Auch daraus

ergibt sich, dass von den Kaffee-Inhaltsstoffen offenbar die Röststoffe die stärkste Magenwirksamkeit besitzen und dadurch die Coffeinwirkung zu unterdrücken vermögen. Von den im Kaffee vorkommenden Röststoffen konnte für die folgenden eine starke Magenwirkung nachgewiesen werden : Furfurylmercaptan, Furfurylalkohol, Furfurol, 5-Hydroxymethyfurfurol, Brenzkatechin, Maltol, Acrolein.

Auch in eigenen Untersuchungen konnte der Nachweis für die starke Magenwirksamkeit der Röststoffe erbracht werden. Es wurde nämlich die Magensekretion von Ratten auch nach Gabe von coffeinfreiem Kaffee deutlich angeregt. Auch Untersuchungen am Menschen führten zu entsprechenden Ergebnissen. So konnte STIEVE feststellen, dass die mit der Heidelberger Kapsel im Magen gemessenen pH-Werte nach Gabe von coffeinfreiem Kaffee sogar stärker absanken als nach Gabe von coffeinhaltigem Kaffee, wobei sich die festgestellten Unterschiede als signifikant erwiesen.

Aus eigenen, an gesunden Versuchspersonen durchgeführten Untersuchungen ergab sich weiterhin, dass auch Chlorogensäure in einer Dosierung, wie sie auch im Kaffeegetränk zu erwarten ist, die Salzsäurebildung im Magen anzuregen vermag. Von den Spaltprodukten der Chlorogensäure war die Kaffeesäure ebenfalls wirksam, während die Chinasäure keine sichere Magenwirkung zeigte. Nach diesen Befunden könnte also auch die Chlorogensäure bei der Kaffeewirkung auf den Magen beteiligt sein.

Dass der Kaffee auch eine Wirkung auf den **Darm** entfaltet, ist gut bekannt. So wird von Vielen der Kaffee in der Frühe getrunken, um eine Anregung der Darmtätigkeit und einen normalen und regelmässigen Stuhlgang zu erzielen. Der Kaffee führt also zu einer Anregung der Darmtätigkeit, und es ist auch hier die Frage zu stellen, durch welche Kaffee-Inhaltsstoffe diese Wirkung ausgelöst wird.

Um dies zu klären, untersuchten wir die Darmperistaltik von Mäusen nach Gabe von coffeinhaltigem Kaffee, coffeinfreiem Kaffee und nach Coffein. Hierbei ergab sich nach coffeinhaltigem Kaffee die stärkste Wirkung auf die Darmperistaltik, nach coffeinfreiem Kaffee war die Wirkung etwas schwächer und nach Coffein am schwächsten. Nach diesen Befunden wird also die Wirkung von Kaffee auf den Darm zum überwiegenden Teil durch die Röststoffe und nur zu einem kleinen Teil durch das im Kaffee enthaltene Coffein hervorgerufen. Eine Anregung der Darmperistaltik war ausserdem auch nach Verabreichung von Chlorogensäure und Trigonellin festzustellen. Bei der Chlorogensäure lagen die wirksamen Schwellenkonzentrationen etwa in dem gleichen Bereich, wie sie auch im Kaffeegetränk zu erwarten sind. Bei dem Trigonellin wurden dagegen zur Auslösung einer Darmwirkung Substanzmengen benötigt, wie sie auch bei extrem hohem Kaffeekonsum niemals erreicht werden. Bei der anregenden Wirkung des Kaffees auf den Darm sind also offenbar mehrere Kaffee-Inhaltsstoffe beteiligt, wobei den Röststoffen die Hauptwirkung zukommt, während Coffein und Chlorogensäure eine untergeordnete Rolle spielen.

In der neueren Zeit wurde auch die Wirkung von Kaffee auf das **Leber-Galle-System** sowohl am Tier als auch am Menschen näher untersucht, und es soll hier kurz auf die wichtigsten Befunde eingegangen werden. Bei den Untersuchungen am Menschen sollen hierbei nur die Befunde erwähnt werden, die bei gesunden Versuchspersonen erhalten wurden.

Wir untersuchten die Wirkung von Kaffee, und zwar von coffeinhaltigem und coffeinfreiem Kaffee, von Coffein, von Chlorogensäure und von Trigonellin bei Gallenfistelratten. Da die Ratte bekanntlich keine Gallenblase besitzt, wird durch solche Untersuchungen nur die choleretische, nicht aber die cholagoge Wirkung der zu prüfenden Substanzen erfasst. Im einzelnen wurden bei diesen Untersuchungen die folgenden Befunde erhoben : Coffeinhaltiger Kaffee bewirkte eine deutliche Anregung der Gallensekretion. Nach coffeinfreiem Kaffee war dieser Effekt etwas schwächer und nach Coffein, in einer dem coffeinhaltigen Kaffee entsprechenden Dosierung, nur sehr schwach ausgeprägt. Nach diesen Befunden wird die durch Kaffee ausgelöste Anregung der Gallensekretion offenbar zum grössten Teil durch die Röststoffe und nur zu einem kleinen Teil durch Coffein bewirkt.

Nach Gabe von Chlorogensäure und Trigonellin wurden erst dann Effekte auf die Gallensekretion festgestellt, wenn unverhältnismässig hohe Mengen zugeführt wurden. Chlorogensäure bewirkte dann eine Zunahme und Trigonellin eine Abnahme der Galleausscheidung.

Es sei hier auch erwähnt, dass das in den Artischocken enthaltene Cynarin, das chemisch als 1,5-Dicaffeylchinasäure zu bezeichnen ist und somit der Chlorogensäure nahesteht, ebenfalls eine choleretische Wirksamkeit besitzt. Über entsprechende Beobachtungen haben PREZIOSI und LASCALZO, PANNIZZI und SCARPATI sowie MANCINI, ORIENTE und ANDREA berichtet. Die zuletzt genannten Autoren sahen ausserdem nach Gabe von Cynarin ein Absinken des Cholesterinspiegels im Blut.

Unsere Feststellung, wonach das Coffein nur einen verhältnismässig geringen Einfluss auf die Gallesekretion ausübt, konnte in neuester Zeit auch von VAILLE, DEBRAY, DE LA TOUR, ROSÉ und SOUCHARD bestätigt werden. Diese Autoren fanden ausserdem, dass Coffein die Sekretion des Pancreas von Ratten ganz erheblich zu steigern vermag. Beim Menschen konnte dagegen MÜLLER-WIELAND keinen Einfluss von Kaffee auf die Pancreassekretion nachweisen. Ausserdem wird nach diesem Autor die Magensekretion durch coffeinhaltigen und coffeinfreien Kaffee in gleicher Weise angeregt.

Nach MÜLLER-WIELAND sind Beschwerden, die gelegentlich nach Kaffeegenuss im Bereich des Magens und des Lebergallesystems auftreten, wohl auf Störungen in

der Motorik von Magen und Duodenum zurückzuführen. Die Sekretionsverhältnisse in Magen und Duodenum dürften dabei von untergeordneter Bedeutung sein.

Den Einfluss von Kaffee auf die Kontraktion der Gallenblase, d. h. also seine cholagoge Wirkung, hat in neuester Zeit STIEVE an gesunden Versuchspersonen eingehend geprüft. Hierbei zeigte sich, dass durch Kaffee allein, gleichgültig ob coffeinhaltig oder coffeinfrei, keine Kontraktion der Gallenblase ausgelöst werden konnte. Wurde dagegen der Kaffee zusammen mit einer Reizlösung, beispielsweise mit Eigelb gegeben, so ergab sich ein unterschiedliches Verhalten zwischen coffeinhaltigem Kaffee einerseits und coffeinfreiem Kaffee andererseits. Nach Gabe von coffeinhaltigem Kaffee und Eigelb war die Gallenblasenkontraktion ebenso stark wie nach alleiniger Verabreichung von Eigelb. Nach coffeinfreiem Kaffee und Eigelb ergab sich aber ein beträchtlich stärkerer Kontraktionseffekt im Vergleich zur alleinigen Eigelbgabe. Nach diesen Befunden sind in einem coffeinfreiem Kaffee offenbar Substanzen enthalten, die allein zwar cholecystokinetisch unwirksam sind, im Zusammenwirken mit einer andern cholecystokinetisch wirkenden Substanz wie z. B. Eigelb aber eine verstärkte Gallenblasenkontraktion hervorrufen. STIEVE neigt zu der Ansicht, dass es sich bei den fraglichen, im coffeinfreien Kaffee enthaltenen gallewirksamen Substanzen um bestimmte Röststoffe handelt, deren Bildung an die vorausgegangene Entcoffeinierung des Kaffees gebunden ist.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung, dass bestimmte Kaffee-Inhaltsstoffe erst dann Wirkungen entfalten, wenn sie zusammen mit anderen Nahrungsmitteln verabreicht werden. STIEVE weist nämlich noch darauf hin, dass bestimmte Nahrungsmittel im Bereich des Leber-Gallesystems Wirkungen auslösen können, die häufig zu Unrecht dem gleichzeitig zugeführten Kaffeegetränk angelastet werden. Hierzu gehören z. B. Zucker, Sahne und Kuchen. Die Richtigkeit dieser Auffassung wird auch durch die Aussagen galleempfindlicher Personen gestützt, dass Kaffee ohne Zucker und Milchzusatz und ohne den gleichzeitigen Verzehr von Kuchen oder Torte im allgemeinen gut vertragen wird. Der Zuckerzusatz zum Kaffee kann aber auch noch andere Wirkungen hervorrufen. So wird beispielsweise der durch Kaffee oder Coffein ausgelöste Anstieg der freien Fettsäuren im Blut durch eine gleichzeitige Zuckergabe unterdrückt.

Nicht unwichtig ist auch die Wirkung des Kaffees auf die **Niere,** und zwar kommt es hier zu einer Anregung der Diurese. Für diesen Effekt ist in erster Linie das Coffein verantwortlich. Es verstärkt die Nierendurchblutung, verringert die Wasserrückresorption in den Nierentubuli und setzt das Wasserbindungsvermögen im Blut und im Gewebe herab. Die diuretische Wirkung von Kaffee und Coffein ist allerdings nur gering, so dass ihre Verwendung als Diuretica heute von stärker wirkenden Substanzen abgelöst ist. Es handelt sich hierbei meist um Xanthinkörper, die sich vom Coffein nur dadurch unterscheiden, dass die 7-Methylgruppe durch einen anderen Substituenten ersetzt ist.

Zum Schluss sei noch auf zwei Anschuldigungen eingegangen, die in der letzten Zeit gegen den Kaffee erhoben wurden.

Sie lauten : « Der Kaffee enthält **cancerogene Substanzen,** die den Menschen gefährden könnten » und « der Kaffee bezw. das darin enthaltene Coffein könnten beim Menschen eine **Erhöhung der Mutationsrate** bewirken. »

Die Untersuchungen über das Vorkommen von cancerogenen Substanzen im Kaffee gehen auf ROFFO zurück. ROFFO hatte 1938 und 1939 aus Kaffees, die unter extremen Bedingungen geröstet waren, teerige Produkte erhalten, die sich im Pinselungsversuch am Kaninchenohr als carcinogen erwiesen. EICHLER und VOLLMER konnten allerdings später (1948) die von ROFFO erhobenen Befunde nicht bestätigen, obwohl die Versuche zum Teil noch unter schärferen Bedingungen (Erhöhung der Rösttemperatur bis auf 500° C) durchgeführt worden waren. Die Pinselung der dabei erhaltenen Destillate an 60 Kaninchen und 300 Mäusen ergab in keinem einzigen Falle ein cancerogene Wirkung. Dieser Befund wird auch durch neuere chemische Untersuchungen von KURATSUNE und HUEPER gestützt. Diese Autoren konnten nämlich im Kaffeeruss nur extrem geringe Mengen an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen nachweisen und vertreten daher die Ansicht, dass ein Zusammenhang zw. Krebserkrankung und Kaffeegenuss nicht besteht. Die in der Kaffeebohne gegebenfalls vorhandenen polycyclischen Kohlenwasserstoffe gehen ausserdem nur zu einem geringen Anteil in das Kaffeegetränk über, so dass eine mögliche Gefährdung des Menschen noch weiter verringert wird.

Von Interesse mag in diesem Zusammenhang der Hinweis sein, dass die Menge an polycyclischen Aromaten im Malzkaffeegetränk wenigstens ebenso gross oder sogar grösser ist, als in einem Bohnenkaffeegetränk (FRITZ).

Dass Kaffee bezw. Coffein beim Menschen möglicherweise eine Erhöhung der Mutationsrate bewirken, wurde neuerdings in der Öffentlichkeit verschiedentlich behauptet. Ausgangspunkt für diese Diskussion waren mutagene Effekte, die verschiedene Autoren nach Applikation von Coffein bei Pflanzen, Mikroorganismen und isolierten Zellkulturen erhalten hatten.

Experimente am Säugetier, die allein in dieser wichtigen Frage beweisend sein können, ergaben dagegen keine sicheren Anhaltspunkte für die mutagene Wirksamkeit des Coffeins.

So verabreichte CATTANACH männlichen Mäusen im Trinkwasser für die Dauer von 3 Monaten eine 0.3 % Coffeinlösung und erzielte dabei nur eine Fertilitätssenkung, die aber nicht auf genetischen Faktoren beruhen muss. LYON und Mitarb. erhielten mit einer 0.1 % Coffeinlösung und ähnlicher Applikationsweise völlig negative Resultate. Ein negatives Ergebnis hatte ebenfalls eine

grosse, von VOGEL durchgeführte Erhebung, bei der geprüft wurde, ob der Kaffeegenuss der Eltern einen Einfluss auf das Geschlechtsverhältnis ihrer Nachkommen hat.

Nach diesen Befunden können wir also sagen, dass nach dem derzeitigen Stand unseres Wissens keine sicheren Befunde vorliegen, die eine mutagene Wirkung von Kaffee oder Coffein beim Menschen ernstlich befürchten liessen.

Der bekannte deutsche Pharmakologue STRAUB hat einmal gesagt, dass der Kaffee unter den Genussgiften den Gipfel der Harmlosigkeit darstellt. Ich möchte glauben, dass dieser Satz auch heute noch seine Gültigkeit hat, obwohl inzwischen viele neue Erkenntnisse über die Wirkung des Kaffees und seiner Inhaltsstoffe bekannt geworden sind. Diese Feststellung dürfte aber von besonderer Wichtigkeit sein, nachdem der Kaffee heute für viele nicht nur ein Genussmittel, sondern in gewissem Sinne ein Bestandteil der normalen Ernährung geworden ist. Und gerade weil heute bei vielen Menschen die geistige und nervliche Belastung weit mehr ins Gewicht fällt als die körperliche, möchte ich es mit dem arabischen Dichter ABD AL QADIR halten, der schon vor 400 Jahren sagte :

« O Kaffee, Du löschest alle Sorgen ;
Dich begehren die, welche studieren.
Trinke ihn mit Vertrauen und schenke kein Gehör den Toren,
Die ihn ohne Grund verdammen. »

LITERATUR

BEHRENS, B. u. G. MALORNY : *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, **194**, 369 (1940).

CZOK, G. : *Z. Ernährungswiss.* Suppl. 5 (1966).

CZOK, G., B. SCHMIDT u. K. LANG : *Klin. Wschr.* (im Druck).

CATTANACH, B. M. : *Z. Vererbungsl.*, **93**, 215 (1962).

EICHLER, O. u. H. VOLLMER : *Klin. Wschr.*, **26**, 634 (1948).

FRITZ, W. : *Naturwiss.*, **53**, 132 (1966).

HEYL, H. : Vergleich der motorischen Wirkungskomponente zentralerregender Stoffe. Inaug. Diss. (Hamburg, 1963).

KARGOSCHA, R. : Spontane itätsverhalten von Mäusen nach verschiedenen Pharmaka. Inaug. Diss. (Hamburg, 1967).

KURATSUNE, M. u. W. C. HUEPER : *J. nat. Cancer Inst.*, **20**, 37 (1958).

LYON, M. F., J. S. R. PHILLIPS u. A. S. SEARLE : *Z. Vererbungsl.*, **93**, 7 (1962).

MÜLLER-WIELAND, K. : Symposium « Alkohol-Coffein » (Berlin, 1967).

MANCINI, M., P. ORIENTE u. L. D. ANDREA : *Minerva Med.*, **51**, 2460 (1960).

PANIZZI, L. u. M. L. SCARPATI : *Nature*, **174**, 1062 (1954).

PREZIOSI, P. u. B. LOSCALZO : *zit. Chem. Zbl.*, 14744 (1961).

ROFFO, A. H. : *Cancer*, **15**, 741 (1938).

STIEVE, F. E. : *Heilkunst*, **78**, 55 (1965).

STRAUB, W. : *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, **190**, 118 (1938).

VAILLE, Ch., Ch. DEBRAY, J. de la TOUR, Cl. ROZÉ et M. SOUCHARD : *Annal. pharmaceut. franç.*, **24**, 515 (1966).

VOGEL, F. : Symposium « Alkohol-Coffein » (Berlin, 1967).

CZOK (G.). — **Le café et ses actions physiologiques.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 269-276, réf.

De nombreuses études ont récemment établi que des constituants du café autres que la caféine, tels que les produits de torréfaction, l'acide chlorogénique, la trigonelline et l'huile de café, présentaient également des actions biologiques déterminées. Ainsi s'est trouvé posé le problème d'une participation possible de ces substances aux actions physiologiques de la boisson de café. Il est exposé de quelle façon il est possible de répondre à cette ques-

CZOK (G.). — **Coffee and its physiological effects.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 269-276, réf.

Numerous studies have recently established the fact that substances contained in coffee other than caffeine, such as the products formed during the roasting process, chlorogenic acid, trigonellin and the essential oil of coffee, also produced clearly determined biological effects. For this reason the problem arises as to the possible participation of these substances in the physiological effects of the coffee beverage. An explanation is given as to how this

CZOK (G.). — **Der Kaffee und seine physiologischen Wirkungen.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 269-276, réf.

In der neueren Zeit wurde durch zahlreiche Untersuchungen festgestellt, dass neben dem Coffein auch noch andere Kaffee-Inhaltstoffe wie z. B. die Röststoffe, die Chlorogensäure, das Trigonellin und das Kaffee-Öl bestimmte biologische Wirkungen entfalten. Damit stellte sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung dieser Substanzen an den physiologischen Wirkungen des Kaffeegetränks. Wie diese Frage nach dem derzeitigen

tion dans l'état actuel de nos connaissances.

Les effets principaux de la boisson de café portent sur le système nerveux central, le système cardiovasculaire, le canal estomac-intestin et le système foie-bile.

Le café provoque sur le système nerveux central une excitation générale de certaines fonctions intellectuelles et psychiques et une disparition de la sensation de fatigue. La popularité universelle du café est d'ailleurs due à ces actions. Selon les résultats de recherches les plus récents, ces effets sont dus principalement à la caféine. Les produits de torréfaction et l'acide chlorogénique doivent également y prendre part.

Le café agit également de façon déterminée sur le système cardiovasculaire. On constate d'ordinaire une dilatation des vaisseaux rénaux, musculaires et dermiques et des contractions plus rapides et plus puissantes du muscle cardiaque. Ces effets sont essentiellement attribués à la caféine, les autres constituants du café (produits de torréfaction, acide chlorogénique) n'ayant pas montré d'action certaine sur le système cardiovasculaire.

L'action du café sur le canal estomac-intestin et sur le système foie-bile induit une augmentation des sécrétions gastrique et biliaire ainsi qu'une excitation du péristaltisme intestinal. Ces effets ne sont dus que pour une faible part à la caféine ; ils sont surtout provoqués par d'autres constituants du café, tels que les produits de torréfaction et peut-être l'acide chlorogénique.

question can be answered in the light of our present knowledge.

Coffee drinking mainly affects the central nervous system, the cardio-vascular system, the gastro-intestinal tract and the liver-gall bladder system.

Coffee induces in the central nervous system a general excitation of certain intellectual and psychical functions and relief from the sensation of fatigue. In fact, the universal popularity of coffee is due to these effects. According to the results of recent research, these effects are due mainly to the caffeine in coffee. The products formed during the roasting process and the chlorogenic acid also play a part.

Coffee also acts in a well-defined manner on the cardio-vascular system. One notes in most cases a dilatation of the muscular and dermic vessels and of the vessels of the kidneys, and more rapid and stronger contractions of the heart muscle. These effects are essentially attributed to caffeine, the other constituents of coffee (products of roasting, chlorogenic acid) not having had any definite effect on the cardio-vascular system.

The action of coffee on the gastro-intestinal tract and on the liver-gall bladder system induces an increase of the gastric and biliary secretions as well as an excitation of the intestinal peristalsis. Caffeine is only responsible to a very small degree for these effects : they are mainly caused by other constituents of coffee, such as the products formed during the roasting process and perhaps also by chlorogenic acid.

Stand unseres Wissens zu beantworten ist, soll im folgenden dargelegt werden.

Die Hauptwirkungen des Kaffeegetränks erstrecken sich auf das Zentralnervensystem, auf Herz und Kreislauf, auf den Magendarmkanal und das Leber-Galle-System.

Die Wirkungen des Kaffees auf das Zentralnervensystem äussern sich in einer allgemeinen Anregung gewisser geistiger und auch psychischer Funktionen und einer Verscheuchung des Ermüdungsgefühls, das sind also die Wirkungen, denen der Kaffee seine allgemeine Beliebtheit verdankt. Nach den neueren Untersuchungsergebnissen sind diese Wirkungen zum grossen Teil durch Coffein hervorgerufen. Zu einem gewissen Teil dürften auch noch Röststoffe und Chlorogensäure daran beteiligt sein.

An Herz und Kreislauf entfaltet der Kaffee ebenfalls bestimmte Wirkungen. Man findet meist eine Erweiterung der Nieren-, Muskel- und Hautgefässe und einen schnelleren und kräftigeren Ablauf der Herzmuskelkontraktionen. Diese Wirkungen sind wohl im wesentlichen dem Coffein zuzuschreiben, nachdem bei anderen Kaffee-Inhaltstoffen (Röststoffe, Chlorogensäure) eine sichere Herz- und Kreislaufwirksamkeit vermisst wurde.

Die Wirkungen des Kaffees auf den Magendarmkanal und das Leber-Gallesystem äussern sich in einer gewissen Zunahme der Magen- und Gallesaftsekretion und einer Anregung der Darmperistaltik. Diese Wirkungen sind nur zu einem geringen Teil durch Coffein, zum grössten Teil aber durch andere Kaffee-Inhaltstoffe, hauptsächlich Röststoffe und vielleicht auch Chlorogensäure, ausgelöst.

DISCUSSION

M. SMITH : I have two short questions to ask :

— what are the effects of stale coffee on the stomach ?

— and have you examined the effects of different degrees of roasting on physiological action ?

M. CZOK : In stale coffee different oxidation products can be formed from coffee oil and those products may be harmful for the stomach.

On the other hand, experiments with coffees roasted at different degrees were not undertaken so no answer can be given to that second question.

M. PRCHAL : Führen Sie die besonderen physiologischen Wirkungen der Röststoffe auf die hochmolekularen oder mehr auf die niedermolekularen Röststoffe zurück ?

M. CZOK : Von den Röststoffen hat offenbar nur die Gruppe der niedermolekularen Substanzen eine starke biologische Wirkung. Die hochmolekularen Substanzen waren nach orientierenden Versuchen nur wenig oder überhaupt nicht wirksam.

M. WURZIGER : Ich möchte fragen über die verwendeten Aufgüsse. Es fehlen nämlich Angaben über die Zusammensetzung.

M. CZOK : Die Herstellung der Kaffee-Infuse erfolgte immer unter Standard-Bedingungen, sodass Vergleichsuntersuchungen mit Kaffee-Infusen gerechtfertigt sind.



ÜBER NACHWEISMÖGLICHKEITEN ZENTRALER WIRKUNGEN DES COFFEIN IN TIERVERSUCHEN

O. NIESCHULZ

Pharmakologische Abteilung der Chemischen Fabrik Promonta GmbH., Hamburg

Alkohol und Coffein sind die beiden ältesten Psychopharmaka, die zugleich in ihrer Auswirkung am Menschen am besten bekannt sind. Bei der Entwicklung neuer tierexperimenteller Untersuchungsmethoden für psychoaktive Substanzen habe ich diese beiden Genussmittel weitgehend als Standardsubstanz benutzt, um ein Bild von dem Aussagewert einzelner Methoden und der Übertragbarkeit ihrer Ergebnisse auf den Menschen zu erhalten. Die Auswirkung beider Substanzen auf das Verhalten von Laboratoriumstieren ist bisher systematisch nur wenig untersucht worden. Nur BOISSIER u. SIMON (1965) haben in den letzten Jahren den Einfluss von Coffein auf die spontane Motilität von Mäusen eingehender untersucht.

BEEINFLUSSUNG DER AKTIVITÄT VON MÄUSEN

Spontane Aktivität

Zu den ältesten psychopharmakologischen Methoden gehören Verfahren zur Untersuchung der Beeinflussung von Aktivitätszuständen durch Pharmaka. Diese Untersuchungen beschränkten sich fast ausschliesslich auf eine Form der Aktivität, auf die Motilität, die besonders bei Mäusen leicht zu bestimmen ist. Seitdem SZYMANSKI (1914) seinen Zitterkäfig beschrieben hat, sind zahlreiche abgewandelte Messmöglichkeiten angegeben worden.

Wenn wir normale Mäuse in einen leeren Laufkäfig bringen, so entfalten sie zunächst eine erhebliche Motilität, die nach einiger Zeit abnimmt, um auf einem niedrigen Niveau konstant zu bleiben. Die hier entfaltete Aktivität wird von dem natürlichen Trieb der Tiere verursacht, den neuen Raum und seine Begrenzung kennen zu lernen. Dieser Trieb zur Erkundung, zur Exploration seines Revieres ist für jedes Tier im Freien von entscheidender Bedeutung für die Kenntnis seines Lebensraumes. In den allgemein benutzten Aktivitätsversuchen wird allerdings der Explorationstrieb nicht gemessen, sondern fast ausschliesslich seine Folgeerscheinung, die Motilität. Da anzunehmen war, dass Explorationstrieb und Motilität unterschiedlich durch verschiedene Pharmaka beeinflusst werden können, haben wir versucht, beide Aktivitätsäusserungen in einer Versuchsanordnung zu erfassen (NIESCHULZ 1965).

Zur Messung der Motilität benutzten wir in unseren Laufkäfigen Lichtschranken (DEWS 1953). Zur Erfassung des Explorationstriebes nutzten wir die gezielten Suchbewegungen der Mäuse an den Wänden ihres Käfigs aus. An einer der Längsseiten brachten wir 3 Löcher von 12 mm Durchmesser an und vor ihnen dünne Plexiglasstreifen mit etwas kleineren Öffnungen, die elektrische Kontakte auslösten, wenn die Mäuse beim Absuchen der Käfigwand ihre Nase hindurchsteckten. Die Streuungen der Einzelwerte können erheblich sein, aber genügend grosse Tierzahlen geben befriedigende Ergebnisse.

Von grundsätzlicher Bedeutung war zunächst der Nachweis, dass bei normalen Mäusen ein festes, naturgegebenes Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Intensität des Explorationstriebes und der Motilität besteht, d. h. unter natürlichen Verhältnissen bestimmt der Explorationstrieb das Ausmass der Motilität.

An der Anzahl elektrischer Kontakte während einer Versuchsdauer von 30 min gemessen lagen die vierteljährlichen Durchschnittswerte eines Jahres für den Explorationstrieb zwischen 65 ± 4 und 92 ± 5, für die Motilität zwischen 140 ± 4 und 155 ± 5.

Coffein verstärkt nach den Angaben der meisten Untersucher bei höheren Dosen die Motilität. Diese Erfahrung wurde in Versuchen, in denen orale Gaben von 0,1 — 80 mg/kg verwendet wurden, bestätigt. Eine etwa normale Aktivität war nur bis zu 1 mg/kg vorhanden. Danach wird die Motilität laufend erhöht und erreicht bei 25 mg/kg mit einem Anstieg von etwa 100 % das Maximum. Bei weiter ansteigenden Dosen nimmt die Motilität zunächst etwas und dann erheblich ab, um nach 80 mg/kg wieder etwa normale Werte zu erreichen. Einen ähnlichen Anstieg mit anschliessender Rückkehr zur Norm haben auch BOISSIER u. SIMON (1965) beobachtet.

Die Intensität des Explorationstriebes blieb bis etwa 25 mg/kg per os mit geringen Schwankungen nach oben und unten im Rahmen der Norm. Erst bei 50 mg/kg war eine deutliche Abnahme festzustellen. Beim Coffein sehen wir also eine erhebliche Erhöhung der Motilität, zunächst bei gleichbleibender Intensität des Explorationstriebes. Bei recht hohen Dosen erlahmt dann das Interesse an der Umwelt und die Beziehungen zu ihr werden gestört. Das zur Erhaltung der Motilität benötigte zentrale Aktivitätsniveau wird jetzt pharmakodynamisch aufrecht erhalten.

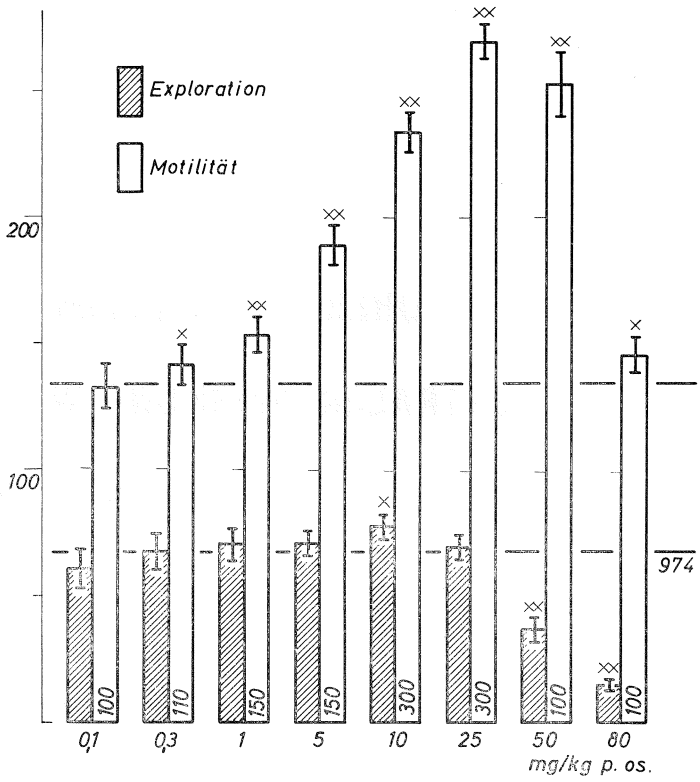


Abb. 1. — *Beeinflussung von Explorationstrieb und Motilität von Mäusen durch Coffein*

*Messwerte für Explorationstrieb : elektrische Kontakte bei der Exploration von Löchern in der Käfigwand ; für die Motilität : Unterbrechung von Lichtschranken. Zahlen in den Säulen : Anzahl Versuchstiere. Horizontale Linien : Durchschnittswerte für Exploration und Motilität aller Kontrolltiere derselben Versuchsreihen Unterschiede significant gegenüber Kontrolltieren desselben Tages : *) $p < 0{,}05$ **) $p < 0{,}01$. Versuchsbeginn 1 h nach der Behandlung, Versuchsdauer 30 min.*

Veranlasste Aktivität

Der spontanen Aktivität (spontaneous activity) lässt sich die durch äussere Umstände, in Versuchen durch Zwangsmassnahmen veranlasste Aktivität (induced activity) gegenüberstellen. Sie würde bei Tieren im Freien über Erfolg und Misserfolg bei der Nahrungssuche oder bei der Begegnung mit der Gefahr entscheiden. Reaktionsfähigkeit und Merkvermögen sind die Messwerte für diese Form der Aktivität.

Für Fragen des Lernens und Behaltens sind zahlreiche Methoden im Laufe der Jahre von der experimentellen Psychologie entwickelt worden. Für pharmakologische Zwecke müssen Serienversuche mit grösseren Tierzahlen bei erträglichem Aufwand durchführbar sein. Die Methoden müssen daher einfach und überschaubar sein und die Versuche sollten, wenn möglich, in einer Sitzung beendet werden können, um den Einfluss auf Lernen und Behalten auch getrennt festzustellen. In unserem Fall waren ausserdem Mäuse als Versuchstiere erwünscht, um die Wirkung der Arzneimittel auf beide Formen der Aktivität miteinander vergleichen zu können. Diesen verschiedenen Anforderungen entsprach eine unserer eigenen Versuchsanordnungen (NIESCHULZ 1965 a).

An beiden Enden einer erhöhten, schmalen Plattform war je ein Kästchen drehbar angebracht, das durch Zug abwechselnd angehoben und wieder aufgesetzt werden konnte. Jedes Kästchen besass an der Innenseite ein Schlupfloch mit Klapptür. Neue Mäuse, die noch für keinen Versuch gebraucht worden waren, wurden auf die Plattform gesetzt, auf die eines der Kästchen herabgelassen war. Während der Exploration der Plattform kroch ein Teil der Mäuse schon in die Kästchen, die anderen wurden nach 10 min. mit pressluftstössen hineingetrieben. Nach 1 min. wurde das Kästchen abgehoben, und die Mäuse sahen das andere Kästchen vor sich, das inzwischen niedergelassen war. Die Tiere hatten jetzt 20 sec. Zeit, um in das Kästchen zu schlüpfen, danach wurden sie wieder mit Pressluftstössen, die von einem Flackerlicht angekündigt wurden, hineingetrieben. Die Versuche wurden so lange fortgesetzt, bis die Tiere 5mal nacheinander rechtzeitig ohne Anmahnung reagierten. Die Versuche waren weitgehend automatisiert, nur die Pressluftstösse mussten mit der Hand ausgelöst werden.

Die Aufgabe war für die Mäuse nicht schwer, da sie ihren normalen Lebensgewohnheiten entsprach. Ausserdem wurden die Tiere durch Pressluftstösse nicht verängstigt, die nur unangenehm aber nicht schmerzhaft sind wie die in ähnlichen Versuchen als Zwangsmassnahme normal benutzten elektrischen Reize. Die Tiere wurden auch sonst nicht überfordert. Sie hatten in den einzelnen Versuchsphasen genügend Zeit, sich zwischen dem natürlichen Spiel-und Explorationstrieb und den drohenden Pressluftstössen zu entscheiden. Unter diesen günstigen Versuchsbedingungen wurden für das Erlernen der Aufgabe nur durchschnittlich 5-6 Einübungen benötigt, und es wurde zugleich ein lang dauernder Behaltenserfolg erzielt.

Das Ausmass des Behaltens war an der Einsparung an Einübungszeit bei Wiederholung der Versuche zu messen. Diese Einsparung betrug 24 Std. nach den Lernversuchen 92 % in einer grösseren Anzahl Kontrollversuche über mehrere Jahre. Erst nach 12 Tagen traten Unregelmässigkeiten auf und bis zu 30 Tagen fielen die Werte nicht unter 80 %.

Eine genauere Analyse unseres Versuchsmaterials zeigte weiter, dass Mäuse, die schnell lernen, auch ein besseres Merkvermögen besitzen.

Die Versuchsergebnisse sind durch äussere Umstände verhältnismässig leicht beeinflussbar. Wie wir schon früher beschrieben haben, wird durch die Handhabung der Tiere vor dem Versuch die Lernleistung verbessert. Das einschneidende Erlebnis einer ersten oralen Injektion erhöht die Aufmerksamkeitsbereitschaft, vielleicht auch ein Schutzbedürfnis. Da die zum Eintrainieren der Mäuse benötigten Pressluftstösse mit der Hand ausgelöst werden mussten, gelangte auch ein persönliches Element in den Versuchsablauf. Die Geschicklichkeit und die Geduld der einzelnen Mitarbeiterinnen war verschieden und sie wirkten sich auch auf die Leistung der Mäuse aus, wie wir an den Versuchsergebnissen von zwei unserer Mitarbeiterinnen feststellen konnten (NIESCHULZ 1965 a).

Mit zunehmenden Erfahrungen wurden die individuellen Unterschiede zunächst ausgeglichen. Eine fortlaufende Kontrolle zeigte aber, dass die Unterschiede wieder erkennbar wurden, nachdem die Versuche zu einer Routine geworden waren. Die Mäuse der einen Mitarbeiterin brauchten im Durchschnitt über 2 Jahre 4,7 ± 0,1, die der anderen 5,7 ± 0,1 Einübungen (n = 841 und 1 073). Der Unterschied von etwa 20 % war bei der grossen Anzahl Versuche auch statistisch significant. Ähnliche Unterschiede waren bei der Merkleistung festzustellen. Dieselben Kontrolltiere benötigten in Wiederholungsversuchen 0,36 ± 0,04 bzw. 0,44 ± 0,03 Nachübungen. Die Leistungen von Mäusen werden also eindeutig von der Befähigung ihrer « Lehrerinnen » beeinflusst. Diese Einzelheiten zeigen, wie empfindlich auch Mäuse reagieren können. Den Tieren muss allerdings trotz der zwangsläufig durch Raum und Zeit eingeengten Versuchsbedingungen die Möglichkeit individueller Reaktionen gelassen werden. Um statistisch gesicherte Ergebnisse zu erhalten, ist ausserdem die genügend grosse Zahl nicht zu entbehren.

Die Empfindlichkeit einer Methode ist allein nicht ausreichend für ihre Brauchbarkeit, entscheidend ist wieder die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen. Wir erwarten vom Coffein in normaler Dosierung eine günstige anregende Wirkung, die zu einer erhöhten Leistungsbereitschaft führt und bei starker Erhöhung der Dosis Unruheerscheinungen mit einem Leistungsabfall. Diese Erwartungen wurden in unseren Versuchen beinahe wie in einem Musterbeispiel erfüllt.

Für die Versuche wurde wieder der weite Dosenbereich zwischen 0,1 und 80 mg/kg per os gewählt. Eine einwandfreie Verbesserung der Leistung, gemessen

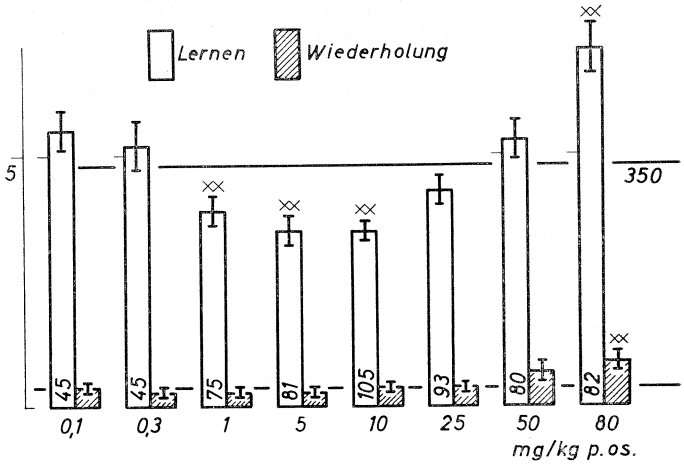


Abb. 2. — *Einfluss von Coffein auf die Lern- und Merkleistung von Mäusen*

Weitere Erklärungen s. Abb. 1.

an der Abnahme der Anzahl Einübungen bis zum geforderten Ziel, finden wir nach 1-10 mg/kg. Die Leistungszunahme gegenüber Kontrollversuchen derselben Tage war 26-31 % (n = 264). Sie wurde wahrscheinlich von einer gesteigerten Lebhaftigkeit und Aufmerksamkeit veranlasst. Bei Gaben unter 1 mg/kg wird auch die Wirkung abgeschwächt und nach 0,1 mg/kg war sie nicht mehr nachweisbar. Bei Erhöhung der Dosen wurden bei 50 mg/kg wieder etwa normale Werte erreicht, während nach 80 mg/kg eine deutliche Leistungsminderung erkennbar wurde.

Die Merkfähigkeit wird bis zu Gaben von 25 mg/kg wenig beeinflusst. Sie war durchschnittlich um 9 % verbessert, aber diese Unterschiede waren nicht gesichert. Ungünstig wirken sich auf die Merkfähigkeit auf jeden Fall Dosen von 50 und 80 mg/kg aus. Unruheerscheinungen beeinträchtigten die Konsolidierung der Erlebniseindrücke.

VERGLEICH DER BEEINFLUSSUNG DER VERSCHIEDENEN AKTIVITÄTSFORMEN

Aus Beeinflussungen der verschiedenen Aktivitätsformen — Exploration und Motilität, Lernen und Behalten — lassen sich für Coffein typische Wirkungsprofile aufzeichnen. Dosen von 1-10 (25) mg/kg fördern die Lernleistung, ohne das Merkvermögen zu benachteiligen. Dieselben Dosen erhöhen die Motilität teilweise erheblich, ohne die Intensität des Explorationstriebes zu vermindern. Die günstige Auswirkung eines verhältnismässig breiten Dosenbereiches auf die wichtigsten Komponenten des Verhaltens wird durch die erhöhte Motilität nicht beeinträchtigt.

Amphetamin besitzt wie Coffein eine stimulierende Wirkung, aber es sind deutliche Unterschiede vorhanden. Der Explorationstrieb wird weit früher gehemmt als beim Coffein und damit die Beziehung zur Umwelt früher abgeschaltet. Auch ist die Beeinträchtigung der Merkfähigkeit weit stärker ausgeprägt. Der Dosenbereich günstiger Wirkungen ist beim Amphetamin schmal, viel kleiner als die breite Zone beim Coffein.

Cocain verstärkt bei hohen parenteral applizierten Dosen die Motilität, während der Explorationstrieb leicht gehemmt wird. Das Lernvermögen wird über einen weiten Dosenbereich leicht begünstigt, aber schon kleine Dosen vermindern das Merkvermögen wesentlich. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Beeinträchtigung des realen Wahrnehmungsvermögens.

Auch die Einflüsse sedativ wirkender Substanzen lassen sich mit dieser Methode gut erfassen (NIESCHULZ 1965 b). Beim Chlorpromazin und Perazin als Vertreter der Phenothiazinderivate werden Exploration und Motilität mit steigenden Dosen zunehmend abgeschwächt. Niedrige Dosen können die Leistung in Lernversuchen verbessern, wahrscheinlich dadurch, dass Angst- und Furchtzustände, die in einer neuen Situation das Verhalten von Tieren hemmend beeinflussen, abgeschwächt werden. Bei höheren Dosen führt zunehmende Antriebsschwäche zu einer Aktivitätsabnahme und schliesslich zu völligem Versagen. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Erfahrungen beim Menschen überein.

Selbst für die in ihrer Verhaltensbeeinflussung indifferent erscheinenden Antidepressiva, wie Imipramin, ist mit diesen Methoden noch ein typisches Wirkungsbild zu erhalten, eine mit dem Ansteigen der Dosis sich stärker ausprägende Hemmung der spontanen Aktivität bei einer leichten Verbesserung der gerichteten Aktivität.

Wir haben also die Möglichkeit, wie die hier aufgeführten Beispiele zeigen, aus der Beeinflussung der verschiedenen Formen der Aktivität bei Mäusen Wirkungsprofile aufzuzeichnen, die mit den klinischen Wirkungen psychoaktiver Substanzen recht gut in Übereinstimmung zu bringen sind.

Diese Wirkungsprofile erlauben ausserdem, den praktisch wichtigen Dosenbereich festzulegen, der nicht nur für die psychischen, sondern auch für physiologische Wirkungen von Bedeutung ist. In der experimentellen Pharmakologie besteht leicht die Neigung, Dosen auch unrealistisch zu erhöhen, um Wirkungen zu erhalten. Für Coffein ist in Versuchen mit Mäusen der wirklich interessante Dosenbereich 1-10, höchstens 25 mg/kg. Nach höheren Gaben treten psychische Störungen auf, die auf den Menschen übertragen, die allgemeine Verkehrssicherheit beeinträchtigen könnten. Diese Dosis beträgt weniger als 1/10 der DL_{50}. Pharmakologische Befunde, denen eine praktische Bedeutung zukommen soll, müssen daher unterhalb dieser Grenzwerte erhoben werden.

ANTAGONISTISCHE WIRKUNGEN DES COFFEIN

Die zentralerregenden Wirkungen des Coffein lassen sich auch an der Aufhebung sedierender Effekte anderer Substanzen nachweisen. Von den zahlreichen Möglichkeiten sollen hier zwei als Beispiel angeführt werden.

Phenothiazinderivate können, wie wir gesehen haben, eine Antriebsarmut verursachen, die so ausgeprägt sein kann, dass die Tiere eine geforderte leichte Aufgabe nicht mehr aus eigener Initiative durchführen. Nach oralen Gaben von 10 mg/kg Chlorpromazin waren in unseren Lernversuchen 56 % der Mäuse Versager, d. h. auch mit 50 Anmahnungen durch Pressluftstösse wurde das geforderte Ziel nicht erreicht. Bei gleichzeitiger Injektion von 0,1 und 0,3 mg/kg Coffein zusammen mit Chlorpromazin versagte kein Tier, während nach 1 und 3 mg/kg 2 bzw. 15 % versagten (n = je 45-48). Eine ähnliche Verschiebung der Ergebnisse bei Erhöhung der Dosen haben wir auch mit anderen stimulierenden Substanzen wie Cocain erhalten.

Eine andere stark sedierend wirkende Substanz ist Reserpin. Ein Mass für die Intensität der Sedation ist bei mit Reserpin vorbehandelten Mäusen die Dauer der Seitenlage nach Hexobarbital-Injektion. Diese Dauer wurde durch 0,3 bzw. 1 und 3 mg/kg sc. um 9 bzw. 41 und 53 % verkürzt (n = je 15), durch 10 und 25 mg/kg um 74 und 76 % (n = je 5). Eine ähnliche, ebenfalls dosisabhängige Wirkung wurde in dieser Versuchsanordnung auch mit Cocain erhalten.

Auf einen Antagonismus gegenüber Alkohol werden wir noch zu sprechen kommen.

VERSUCHE MIT UNVORBEREITETEN RATTEN

Leicht hungrige, unvorbereitete Ratten erhielten die Möglichkeit, sich beim Umherstreifen in ihren Käfigen durch zufällige Betätigung einer Taste Futtertabletten zu verschaffen (NIESCHULZ u. SCHNEIDER 1964).

In einer Reihe gleichartiger Käfige wurde flach über dem Boden eine auffällig gefärbte breite Taste angebracht. Beim zufälligen Betreten dieser Taste wurde eine Futtertablette ausgeliefert. Die Versuche wurden an 5 Tagen wiederholt. Sie dauerten nur 10 min., um eine Gewöhnung der Tiere zu vermeiden. Die Ergebnisse des 1. Tages und aller 5 Tage zusammenstimmten prinzipiell mit einander überein.

Coffein 5 mg/kg per os hatte 30 min. nach der Behandlung keinen Einfluss, während sich die Tiere nach 10 mg/kg doppelt so viel Futtertabletten verschafften wie gleichzeitige Kontrollen, 48,7 ± 6,0 gegenüber 24,4 ± 4,7. Von diesen Tabletten wurden 97 bzw. 94 % auch verzehrt (n = 27 und 24). Nach Methylamphetamin 5 und 10 mg/kg war die Anzahl erhaltener Tabletten 48 bzw. 70 % geringer als bei den Kontrollen und von ihnen wurden nur 21 bzw. 3 % verzehrt (n = je 8). Der günstige Effekt einer Anregung des Wachseins war überschritten.

VERHALTENSVERSUCHE MIT EINGEÜBTEN RATTEN

Ratten lernen verhältnismässig leicht, eine Taste auch bewusst zu betätigen. Auf dieser Befähigung beruht ein grosser Teil der Verhaltensversuche mit diesen Tieren. In einem unserer Versuche mussten Ratten eine Taste bedienen, um Futter zu erhalten, und eine andere, um durch einen Warnton angekündigte schmerzhafte Reize zu vermeiden. Die pharmakologische Beeinflussung von zwei wichtigen Komponenten des Verhaltens, für Futter sorgen und gleichzeitig auf eine Gefahr zu achten, wurde dadurch der Beobachtung zugänglich (NIESCHULZ 1963).

In einem verhältnismässig langen Versuchskasten waren an den beiden gegenüberliegenden Schmalseiten zwei Tasten angebracht. Nach 10maliger Betätigung der einen Taste wurde jeweils eine Futtertablette aus einem Magazin ausgeliefert. Um die 2 1/2 min. kam über einen Kleinlautsprecher ein langsam anschwellender Warnton, der einen elektrischen Schlag über den Gitterboden des Käfigs ankündigte. Die Ratten konnten diesen schmerzhaften Reiz vermeiden und zugleich den Warnton abstellen, wenn sie innerhalb 45 sec. die zweite Taste niederdrückten. Nach einer ausreichenden Einübungszeit zeigen die Tiere ein gleichmässiges, voraussehbares Verhalten. Sie entwickeln ein gutes Zeitgefühl und lassen sich durch den ankommenden Warnton nicht gleich bei ihrer Tätigkeit an der Futtertaste stören.

Die Beachtung des Warnsignals wurde durch Coffein 25 und 50 mg/kg *per os* nicht behindert, aber die Wartezeit bis zum Abschalten significant verkürzt. Das durch Erfahrung erworbene Zeitgefühl war gestört. Die Tiere blieben nicht wie sonst ruhig an der Futtertaste sitzen sondern liefen wiederholt zwischen beiden Tasten hin- und her. Die Futteraufnahme wurde aber nicht beeinträchtigt, sie wurde durch 25 mg/kg sogar um 20 % erhöht *(Tab. 1)*.

Mit dieser Methode lassen sich auch antagonistische Wirkungen des Coffein gut zum Ausdruck bringen. Schwere Ausfallserscheinungen sind durch höhere Gaben von Alkohol zu erreichen. Nach 7,5 ml/kg erweckt die Mehrzahl der Tiere den Eindruck, recht betrunken zu sein. In 28 % der Versuche wurden die Warnsignale nicht rechtzeitig beachtet und nur wenige Futtertabletten aufgenommen. Durch gleichzeitige Gaben von Coffein wurde ab 10 mg/kg die Beachtung des Warnsignals erheblich verbessert, teilweise normalisiert. Die durch Alkoholgaben verminderte Betätigung der Futtertaste wurde wenig beeinflusst (Tab. 1). Der Lauf der Tiere von Taste zu Taste blieb taumelnd. Nur die grobe Motorik war wieder hergestellt, das Verhalten selbst nicht normalisiert. Versuche mit verschiedenen anderen Substanzen haben gezeigt, dass die Beachtung des Warnsignals in dieser Versuchsanordnung sehr arzneimittelresistent ist. Hierdurch lässt sich die bevorzugte Wiederherstellung dieser Reaktionen erklären.

Dass Coffein in Tierversuchen alkoholbedingte Verhaltensänderungen nicht aufzuheben vermag, zeigte auch der folgende Versuch. Mäuse wurden in einen für sie neuen Käfig gesetzt, in dem sich eine kleine Leiter befand. Wie KNEIP zuerst beschrieben hat, klettern alle Tiere zur Befriedigung ihrer Neugier diese Leiter bald hinauf. Mit Alkohol kann bei Mäusen ein schlafähnlicher Zustand erzeugt werden, der durch Vorbehandlung mit geeigneten Dosen Coffein aufzuheben ist. Die Tiere laufen unruhig umher, aber wir konnten keine Coffeindosis finden, die den normalen Klettertrieb wieder herstellt.

Wir lernten weiter Ratten an, auf einem Steg durch verschiedene Türen zu laufen, um Futtertabletten zu erhalten (NIESCHULZ 1965).

Auf einem erhöht aufgestellten hölzernen Steg wurden einer alten Anregung von BROWN u. GHISELLI (1934) folgend drei Paar verschieden gekennzeichnete Klapptüren angebracht, die auswechselbar waren und von denen jeweils nur eine mit einer bestimmten Markierung zu öffnen war. Da Ratten nur ungern über ungeschützte Flächen laufen, war die Einübungszeit bis zum Erreichen eines stabilen Leistungsstandes verhältnismässig lang. Für jede Versuchsreihe mussten die Tiere 5mal hin- und herlaufen und hatten sich dabei 30mal für eine der Türen zu entscheiden. Am Behandlungstag wurden erst zwei Kontrollversuche gemacht und dann je eine Reihe von 10 Läufen 30, 60 und 90 min. sowie 3 und 5 h nach der Behandlung.

TABELLE 1

Versuche mit Ratten, die für Futtertabletten arbeiten und auf ein Warnsignal zu achten hatten. Futtertabletten : Differenz gegenüber Kontrollversuchen am Vortage.

	Futtertabletten	Warnsignal nicht beachtet	n
Coffein			
25 mg/kg	+ 20 %	3 %	10
50 mg/kg	— 6 %	0 %	10
Alkohol			
7,5 ml/kg	— 72 %	28 %	35
Alkohol			
7,5 ml/kg			
+ Coffein			
5 mg/kg	— 63 %	18 %	10
10 mg/kg	— 42 %	3 %	10
25 mg/kg	— 63 %	8 %	10
50 mg/kg	— 68 %	5 %	10

Nach Vorbehandlung mit Coffein waren die Ratten lebhafter und schneller in ihren Bewegungen, wirkten aber unkonzentriert und liessen sich durch normale Geräusche leicht ablenken. Sie machten Fehler bei der Wahl der Türen, aber korrigierten sich meist schnell selbst wieder. Coffein 5 mg/kg hatte noch keinen Einfluss auf Laufzeiten und Fehlerzahl. Ab 10 mg/kg machte sich die Wirkung des Coffeins bemerkbar, und war nach 25 und 50 mg/kg an der Verlängerung der Laufzeiten und der Zunahme der Fehlerzahl sehr deutlich erkennbar (Tab. 2).

Die typischen Nebenwirkungen des Coffein, wie Unruhe, Unsicherheit in Entscheidungen und Konzentrationsmangel sind mit dieser Versuchsanordnung gut zu erfassen, ebenso wie der Dosenbereich, in dem sie aufzutreten beginnen. Der Versuch ist aber nicht automatisierbar und erfordert während des Einübens der Tiere und des eigentlichen Versuchsablaufes ständige Überwachung. Er ist dadurch sehr aufwendig, und wir haben daher versucht, auf andere Weise Unruheerscheinungen nach Coffein zu messen.

TABELLE 2

Versuche mit Ratten auf einem erhöhten Laufsteg mit verschieden gekennzeichneten Türen. Laufzeiten und Fehlerzahl als Durchschnittswerte für 2 Vorversuche und 5 Versuche 1/2-5 h nach der Behandlung mit Coffein.

	Laufzeiten sec.		Fehler		
Coffein	Vorwert	1/2-3 h	Vorwert	1/2-3 h	n
5 mg/kg	2,4	2,4	2,6	2,2	8
10 mg/kg	2,8	3,0	2,1	2,6	10
25 mg/kg	2,5	3,4	0,8	2,7	6
50 mg/kg	2,6	4,0	1,0	3,6	4

Wir benutzten hierfür Versuchskäfige mit 2 Tasten, die nebeneinander angebracht waren. Über jeder Taste befand sich eine Scheibe, die beleuchtet werden konnte. Durch automatische Programmierung wechselten zwei Versuchsphasen miteinander ab. Die erste Phase dauerte 15 Sek. und eine der Tasten wurde beleuchtet. Durch Niederdrücken dieser Taste erhielt die Ratte etwas Milch ausgeliefert. Die Tiere konnten sich dabei mehrere Belohnungen nacheinander verschaffen. Welche der beiden Tasten beleuchtet wurde, entschied ein Zufallswähler. In der zweiten Phase von 30 Sek. wurden die Tasten nicht beleuchtet, und es waren auch keine Belohnungen zu erhalten.

Die Tiere lernen leicht, sich durch Tastenbetätigung Milch zu besorgen. Die Bedeutung der Lichtsignale zu begreifen, war für sie schwieriger. Wir versuchten, den Tieren das Lernen dadurch zu erleichtern, dass ein falscher oder unnötiger Tastendruck einen Warnton verursachte. Das Erfassen der Lichtsignale erfolgte nicht allmählich sondern ruckweise mit Verminderungen der Fehlerzahlen, manchmal um über 50 % von einem Tag auf den anderen. Durch Zähldruckgeräte wurden jeweils die erhaltenen Belohnungen, die ungenutzten Chancen und die unnötigen oder falschen Tastenbetätigungen registriert. Verglichen wurden die Ergebnisse von 2 aufeinander folgenden Tagen ohne Behandlung und an 2 Tagen 1 Std. nach der Behandlung bei einer Beobachtungszeit von 1/2 Std. Der technische Aufwand für die automatische Programmierung derartiger Versuchsabläufe und für die Registrierung der Ergebnisse ist erheblich.

Bei gut eingeübten Tieren mit einem ziemlich stabilen Leistungsstand war der Einfluss von Coffein auf alle Phasen des erlernten Verhaltens erheblich. Nach 10 und 25 mg/kg *per os* nahm die Anzahl erhaltener Belohnungen zu, aber ebenso die Zahl der verpassten Chancen und besonders stark die falschen und unnötigen Tastenbetätigungen. Die Wirkung war dosisabhängig und jeweils statistisch gesichert. Die durch Coffein bedingte Unruhe beeinträchtigte den bisherigen Leistungsstand (Tab. 3). Die Ratten können nicht abwarten, bis die Wartezeit abgelaufen ist, und dadurch entstehen unnötige Tastenbetätigungen. Sie laufen im Käfig herum und verpassen angebotene Chancen. In der Angebotszeit machen sie mehr falsche Tastenbetätigungen — die Zunahme beträgt 25 bzw. 46 % — aber durch ihre Ungeduld auch mehr richtige. Da sie die erhaltene Milch nicht wie sonst üblich erst voll austranken, sondern schon vorher eine der Tasten betätigten, nahm die Gesamtzahl der erhaltenen Belohnungen zu. Eine ähnliche Zunahme bei gleichzeitiger Beeinträchtigung des Zeitgefühls haben wir schon in einer der anderen Versuchsanordnungen gesehen. Diese Zunahme ist nicht als ein erwünschter Erfolg zu betrachten. Die günstigen Auswirkungen des Coffein dürften daher bei Ratten mit 10 mg/kg schon überschritten sein.

In derselben Versuchsanordnung nahm nach Alkohol und Perazin mit steigenden Dosen die Anzahl erhaltener Belohnungen ab und die der ungenutzten Chancen zu, aber die Anzahl Fehler hatte auch eine abfallende Tendenz, d. h. ihre Zahl bleibt der Aktivität proportional (Tab. 3). Sedierende Eigenschaften lassen sich also ebenfalls mit der Methode feststellen, ihr besonderer Wert dürfte aber im Nachweis unerwünschter erregender Eigenschaften und in der Bestimmung der Grenzdosis ihres Auftretens liegen.

TABELLE 3

Beeinflussung eines angelernten Verhaltens von Ratten. Durchschnittswerte für die erhaltenen Belohnungen, verpasste Chancen und fehlerhafte Tastenbetätigungen an zwei aufeinanderfolgenden Behandlungstagen und prozentuale Unterschiede gegenüber zwei Vorwerten.

	Belohnungen	Verpasste Chancen	Fehler	n
Coffein				
10 mg/kg	78 ± 3 + **15** %**	8 ± 1 — **28** %**	48 ± 3 + **34** %**	28
25 mg/kg	76 ± 3 + **13** %*	6 ± 1 — **48** %**	64 ± 6 + **65** %**	10
Alkohol 25 %				
1 ml/kg	60 ± 3 — 10 %	15 ± 1 + 29 %	34 ± 2 — 16 %	19
2,5 ml/kg	56 ± 3 — 4 %	18 ± 2 + 12 %	25 ± 3 — 10 %	15
5 ml/kg	57 ± 3 — 12 %	17 ± 1 + 17 %	29 ± 3 — 1 %	15
10 ml/kg	47 ± 3 — **28** %**	20 ± 1 + **31** %**	25 ± 2 — **19** %*	20
Perazin				
1 mg/kg	59 ± 4 — 4 %	16 ± 1 + 2 %	30 ± 5 — 2 %	15
5 mg/kg	53 ± 3 — 10 %	19 ± 1 + 19 %	29 ± 2 — 19 %	20
20 mg/kg	50 ± 3 — **19** %*	18 ± 1 + **26** %**	28 ± 2 — **9** %	20

LITERATUR

1. BOISSIER, J. R. et SIMON, P. — *Arch. int. Pharmacodyn.*, **158,** 212 (1965).
2. BROWN, C. W. a. GHISELLI, E. E. — *J. comp. Psychol.*, **18,** 451 (1934).
3. DEWS, P. B. — *J. Pharmacol.*, **113,** 393 (1955).
4. KNEIP, P. — *Arch. int. Pharmacodyn.*, **126,** 238 (1960)
5. NIESCHULZ, O. — *Med. Mschr.*, **17,** 566 (1963).
6. NIESCHULZ, O. — *Farmacia* (Bukarest), **12,** 141 (1964).
7. NIESCHULZ, O. — *Arzneim. forschg.*, **15,** 271 (1965).
8. NIESCHULZ, O. — *Med. Pharmacol. exp.*, **13,** 294 (1965 a).
9. NIESCHULZ, O. — *Activ. nervosa sup.* (Prag), **7,** 224 (1965 b).
10. NIESCHULZ, O. u. SCHNEIDER, G. — *Arzneim. forschg.*, **14,** 104 (1964).
11. SZYMANSKI, J. S. — *Arch. ges. Physiol.*, **158,** 343 (1914).

NIESCHULZ (O.). — **Possibilités de mise en évidence des actions centrales de la caféine par des essais sur animaux.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 277-285, fig., tabl., réf.

Les différents exemples exposés montrent que l'on dispose d'une gamme de méthodes permettant de mettre en évidence les actions centrales de la caféine et ainsi d'obtenir des résultats rapportables aux être humains. L'aperçu le plus clair du champ d'action de la caféine a été obtenu par l'étude de l'influence exercée quant à l'activité spontanée et dirigée de souris. Les doses favorables sont faciles à délimiter. Elles varient entre 1 et 10 (25) mg/kg *per os* pour les souris et sont inférieures à 10 mg/kg pour les rats. Des doses supérieures induisent, en réaction annexe importante, des symptômes d'agitation qui nuisent au processus d'exploration, amoindrissent les facultés d'apprentissage et de mémoire et perturbent la stabilité d'un comportement appris.

Les essais ont été réalisés, dans le cadre des travaux de l'auteur, avec de la caféine pure et non avec des boissons de café. Ces méthodes devraient également convenir à la compréhension objective des effets supplémentaires d'autres constituants du grain de café et des actions de procédés de fabrication particuliers ; elles devraient aussi faciliter un travail statistique.

NIESCHULZ (O.). — **Possibilities to explain the effects of caffeine on the central nervous system by experiments on animals.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 277-285, fig., tabl., réf.

The various examples put forward show that a whole series of methods exist which make it possible to shed light on the effects of caffeine on the central nervous system and thereby obtain results applicable to human beings. The clearest insight into the field of action of caffeine was obtained by studying the effect on the volontary and induced activities of mice. The most suitable doses are easy to determine. They vary between 1 and 10 (25) mg/kg taken by mouth in the case of mice and are less than 10 mg/kg for rats. Larger doses cause, as a marked side-effect, symptoms of nervousness which affect adversily the process of exploration, diminish the faculties of learning and retention and disturb the stability of an acquired behaviour.

The experiments were carried out, within the scope of the writer's work, with pure caffeine and not with coffee beverages. These methods should facilitate equally well an objective understanding of the additional effect of other constituants of the coffee bean and of effects due to any particular method of manufacture ; they should also facilitate statistical work.

NIESCHULZ (O.). — **Über Nachweismöglichkeiten zentraler Wirkungen des Coffein in Tierversuchen.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris) 1968, p. 277-285, fig., tabl., réf.

Uns stehen, wie die verschiedenen hier vorgetragenen Beispiele zeigen, eine ganze Reihe von methodischen Möglichkeiten zur Verfügung, um in Tierversuchen zentral erregende Wirkungen des Coffeins nachzuweisen und dabei Ergebnisse zu erhalten, die auch auf den Menschen übertragbar sind. Die deutlichste Übersicht über die ganze Breite der Wirkungsspektra des Coffeins wurden in Versuchen über die Beeinflussung der spontanen und der gerichteten Aktivität von Mäusen erhalten. Der Dosisbereich günstiger Wirkungen liess sich gut abgrenzen. Er lag für Mäuse zwischen 1 und 10 (25) mg/kg *per os*, bei Ratten noch unter 10 mg/kg. Darüber hinaus treten Unruheerscheinungen als ungünstige Nebenwirkungen auf, die den Explorationstrieb beeinträchtigen, Lern- und Merkfähigkeit vermindern und die Stabilität eines erlernten Verhaltens stören.

Die Versuche wurden meiner Aufgabenstellung entsprechend mit reinem Coffein gemacht, nicht mit Kaffeegetränken. Diese Methoden werden aber ebenfalls geeignet sein, die zusätzlichen Effekte der weiteren Inhaltsstoffe der Kaffeebohne und die Auswirkungen einzelner Herstellungsprozesse des Kaffeegetränkes objektiv zu erfassen und einer statistischen Bearbeitung zugänglich zu machen.

DISCUSSION

M. ADRIAN : Je voudrais connaître la composition exacte du régime de base des animaux et celle des tablettes ou « bonbons » donnés aux animaux au cours des essais.

M. NIESCHULZ : Unsere Mäuse und Ratten erhalten normal Wasser und ein vorgefertigtes, bei uns allgemein gebräuchliches Futter (Altromin). Während der Versuche erhielten die Tiere aber ein besonders hergestelltes Futtert Kein Tier tut etwas ohne besondere Veranlassung. Diese Veranlassung kann die Angst vor elektrischen Reizen sein oder Durst oder Hungergefühle. Bei normalem Futter müssen die Tiere für die Versuche hungrig oder durstig gemacht werden. Ein angelerntes Diskriminationsvermögen könnte beeinträchtigt werden, wenn zu hungrige Tiere unbeding. Futter erlangen wollen. Bei Flüssigkeitsbelohnungen haben wir den Tieren Zuckerwasser oder Milch gegeben oder Futtertabletten mit besonderen Zusätzen (u. a. Lebertran) und einem Zuckerüberzug (Dragees). Es waren für die Tiere eine Art Bonbon, die sie auch gerne ohne grossen Hunger frassen. Um günstige Versuchsverhältnisse zu schaffen, wurde also von den normalen Ernährungsbedingungen abgewichen.

M. KENSLER : I think that your experiments showing an antagonism between caffeine and alcohol were interesting, as everybody knows it when it applies to man.

In our laboratories we have been doing some experiments with monkeys. We have an experiment going right now, studying caffeine and alcohol in the rations, but we have not completed it. We have studied caffeine and nicotine : in the situations where caffeine improves performance, nicotine does also, but has a much shorter duration range. When we give the nicotine and the caffeine together, we observe marked potentiation. In the lower doses of either one, when in combination, they will produce a greater effect than one can get with either one alone. I wonder, have you by any chance done any combination studies with nicotine and caffeine ?

M. NIESCHULZ : No, I didn't.

M. FISCHBACH : Ich bitte um die Erklärung eines Versuchsergebnisses. In einer Tabelle war gestanden dass 18 % der Ratten, die eine geringe Dosis Coffein erhalten hatten 5 mg/kg, nicht auf das Warnsignal reagiert haben. Dagegen die Ratten die kein Coffein bekommen haben, bei den hatten 3 % nicht reagiert. Es waren ja die Versuche mit der elektrischen Platte und das kann ich mich nicht erklären.

M. NIESCHULZ : In der Versuchsanordnung mit zwei Tasten bleiben immer einige gefrässige Tiere bis zum letzten Augenblick an der Futtertaste. Sie kommen gelegentlich zu spät zur Abschalttaste und machen dann die 3 % der Tiere aus, die elektrische Reize erhalten. Die schlecht reagierenden Tiere hatten ausser 5 mg/kg Coffein auch Alkohol erhalten. Es war die kleinste Dosis, die schon leichte Verbesserung der Alkoholwirkung hervorrief, aber sie noch nicht aufhob.

M. MALORNY : Ich möchte noch mal ganz kurz darauf hinweisen, dass die Konzentrationsbereiche, die Herr Nieschulz als besonders effektiv gefunden hat, zwischen 1 und 10 mg/kg gelegen sind und es ist ja nicht ohne weiteres möglich von einer kleinen weissen Maus rückschliesslich zu ziehen, gleichwohl wären das dann doch aber Dosen so ungefähr von 70 mg bis allerdings 700, was natürlich dann für den Menschen eine sehr hohe Dosis wäre. Und es ist doch dabei ganz interessant herausgekommen wie unkoordinierten Bewegungen erst bei recht hohen Dosen deutlich geworden sind.

M. NIESCHULZ : Selbstverständlich gelten die Dosen nur für die Maus, sie sind schon bei der Ratte anders. Sie sind aber wertvoll um den Dosenbereich festzulegen für andere pharmakologische Versuche, die mit den Tieren durchgeführt werden. Das Dosenbereich 1 bis 10 mg ist für die Ratte oder die Maus günstig. Wenn Untersuchungen über physiologische Einflüsse oder andere pharmakologische Einflüsse gemacht werden, sollte man sich darüber klar sein dass alles was über 10 und 25 mg gemacht wird, in einem Bereich liegt, der für die Menschen nicht mehr ganz interessant ist.

STOFFWECHSEL VON ^{14}C-COFFEIN BEI DER RATTE
(unter Berücksichtigung des Kaffeegetränks)

B. SCHMIDT,
Institut für physiologische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Von den Untersuchungen, die Herr CZOK und ich gemacht haben, möchte ich hier drei Punkte vortragen.

A. Verteilung der ^{14}C-Aktivität, wenn man der nüchternen Ratte markiertes Coffein allein, zusammen mit Chlorogensäure oder als Bestandteil eines Kaffee-Infuses *per os* anbietet.

In diesem Zusammenhang haben wir ausserdem die Beeinflussung durch das Körpergewicht berücksichtigt.

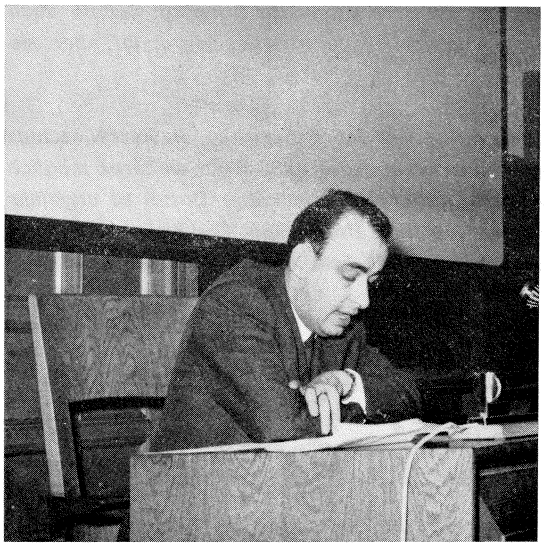
B. Verteilung der ^{14}C-Aktivität, wenn die oben genannten Lösungen nicht nüchtern, sondern im Anschluss an Modellmahlzeiten (Fett, Eiweiss und Kohlenhydrat) angeboten werden.

C. Einfluss einer Gewöhnung auf die Verteilung im Organismus.

Sämtliche Versuche wurden mit männlichen Ratten gemacht. Es waren Albinoratten (Sprague Dawley), meist mit einem Körpergewicht von etwa 200 g, in Ausnahmefällen bis zu einem Körpergewicht von 500 g.

Den Tieren wurde 16-20 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter (Altromin) entzogen ; Wasser erhielten sie *ad libitum*.

VERTEILUNG DER ^{14}C-AKTIVITÄT IM ORGANISMUS DER NÜCHTERNEN RATTE



Man untersuchte die Verteilung der ^{14}C-Aktivität im Organismus der nüchternen Ratte, wenn wässrige Lösungen von ^{14}C-Coffein *per os* angeboten werden.

Folgende Versuchslösungen wurden mit der Schlundsonde verabreicht :

1. Coffein, in wässriger Lösung, 15 mg Coffein/kg Körpergewicht ;
2. Coffein und Chlorogensäure, in wässriger Lösung, 15 mg Coffein/kg Körpergewicht und 30 mg Chlorogensäure/kg Körpergewicht ;
3. Kaffee-Infus, 15 mg Coffein/kg Körpergewicht.

Resorption

Zur Beurteilung der Resorption von ^{14}C-Coffein untersuchten wir Menge und Geschwindigkeit der aus dem Darm aufgenommenen sowie die im Serum des Blutes gefundene ^{14}C-Aktivität. Dabei stellten wir fest, dass die

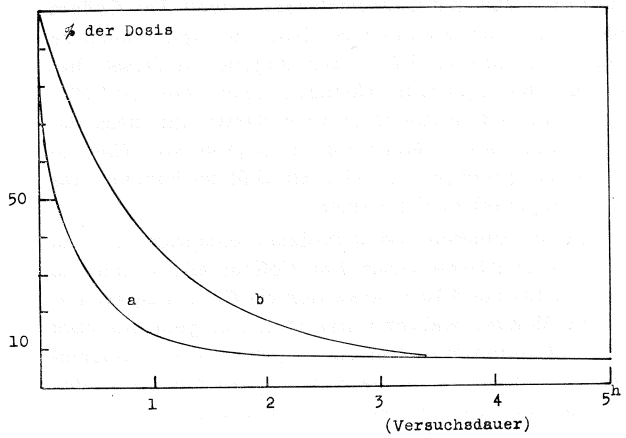


Abb. 1. — *^{14}C-Aktivität im Darmkanal der Ratte bei Verabreichung von markiertem Coffein (a = nüchtern) und im Anschluss an eine « Eiweissmahlzeit » (b)*

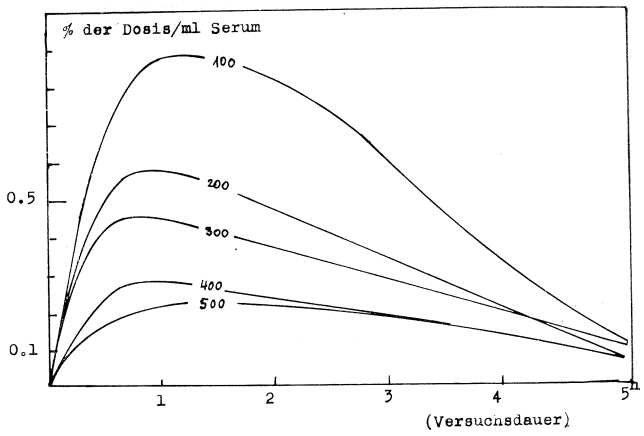


Abb. 2. — *^{14}C-Aktivität, in % der Dosis im ml Serum, bei verschiedenem Körpergewicht*

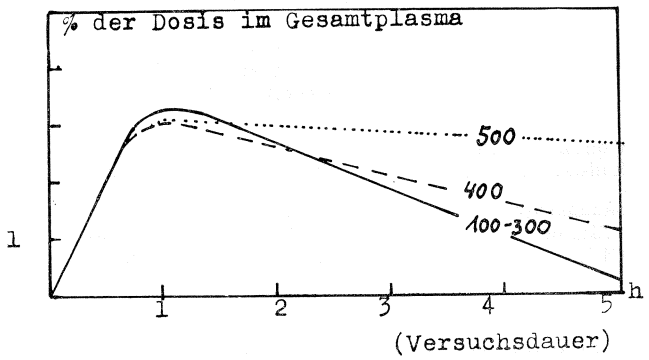


Abb. 3. — *^{14}C-Aktivität im Serum bei verschiedenem Körpergewicht*

Verlaufskurve der noch im Verdauungskanal angetroffenen ^{14}C-Aktivität bei einer Serie von Einzeltieren leicht zu reproduzieren war, dass aber das Körpergewicht einen entscheidenden Einfluss auf die im Serum gefundene ^{14}C-Aktivität ausübt. Abb. 1, Kurve a zeigt in Abhängigkeit von der Versuchsdauer den Abfall der im Darmtrakt verbliebenen ^{14}C-Aktivität. Daraufhin verwendeten wir in verschiedenen Versuchsserien jeweils gewichtsgleiche Tiere, beginnend mit einem Körpergewicht von 100 g ansteigend bis zu einem Körpergewicht von 500 g.

Aus Abb. 2 ergeben sich folgende Schlüsse : Trägt man die ^{14}C-Aktivität in % der gegebenen Dosis/ml Serum gegen die Versuchsdauer in Stunden auf, so ergibt sich folgendes Bild. Unabhängig von den Begleitstoffen des Coffeins, wird ein Maximum durchlaufen, welches zwischen einer 1/2 und 1 Stunde liegt. Mit fortschreitender Versuchsdauer fällt die Konzentration ab. Die Höhe des Konzentrationsmaximums sinkt mit steigendem Körpergewicht. Finden wir im Serum von 100 g schweren Ratten 0;9 % der gegebenen ^{14}C-Dosis im ml Serum, so finden wir bei 500 g schweren Tieren nur noch einen Wert von 0,2 % der Dosis/ml Serum.

Zunächst lag der Gedanke nahe, dass dieser Effekt einfach mit der bei steigendem Körpergewicht auch zunehmenden Körperflüssigkeit zu erklären sei. Mit zunehmendem Verteilungsraum steht der Substanz auch grössere Verdünnung zu.

Rechnet man aber die im ml Serum gefundene Werte für die ^{14}C-Aktivität auf das Gesamtserum um (Abb. 3), so stellt man fest, dass die im Blut angetroffene Gesamtaktivität zu Versuchsbeginn bei allen Tieren ungefähr gleich ist, dass aber mit fortschreitender Versuchsdauer die Ausscheidung bei den leichteren, jüngeren Tieren wesentlich schneller als bei den älteren schwereren Tieren vonstatten geht.

Nachdem wir bei einer Reihe von Tieren das extrahierbare Gesamtlipid des Körpers bestimmt hatten (Abb. 4), sind wir der Überzeugung, dass dem lipophilen Coffein mit zunehmendem Depotfett ein spezifischer Verteilungsraum zur Verfügung steht, der die erhöhte Retention erklären könnte.

Bei unseren weiteren Untersuchungen haben wir, um den Einfluss des Körpergewichtes auszuschalten, gewichtsgleiche Tiere mit einem Körpergewicht von 200-220 g gewählt.

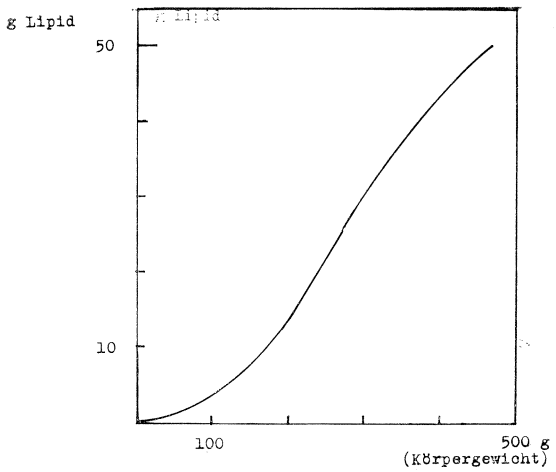


Abb. 4. — *Körperfett der Ratte in Abhängigkeit vom Körpergewicht*

TABELLE I

Resorption von ^{14}C-Coffein

	^{14}C, in % der Dosis (im Darmkanal) (30 min.)	$T_{1/2}$ (min.)
Coffein (+ Chl.)..	10-12	3-4
Kaffee.....	13-15	6-8
Saccharose	50-55	25-30
Albumin	60-70	35-40
Öl.....	55-70	40

Tabelle I : Bei der Verabreichung von Coffein allein oder zusammen mit Chlorogensäure beträgt die $T_{1/2}$ für die Resorption 3-4 Minuten, nach 30 Minuten sind noch 10-12 % der applizierten Dosis im Magen-Darm-Kanal zu finden.

Als Bestandteil eines Kaffee-Infuses ergibt sich für die als Coffein zugeführte ^{14}C-Aktivität eine $T_{1/2}$ für die Resorption von 6-8 Minuten und nach 30 Minuten sind noch 13-15 % der Dosis im Verdauungskanal.

Bietet man Coffein mit äquimolaren Mengen an Chlorogensäure an, so liegen die Verhältnisse in der ersten 1/2 Stunde gleich wie bei Coffein allein. Nach einer Stunde sind bei Coffein allein noch 6-9 % der Dosis anzutreffen, sind bei Coffein + Chlorogensäure noch 5 % der Dosis im Darmkanal ; bei Kaffee sind es noch 8-10 %.

Nach 5 Stunden Versuchsdauer finden sich im Darm folgende Aktivitätsmengen : bei Coffein allein und als Kaffee-Infus 5-8 % der gegebenen Dosis, während man im Gemisch Coffein/Chlorogensäure nur noch 1-2 % der Dosis im Darm wiederfindet. Dieser Befund ist umso bemerkenswerter, wenn man damit Werte vergleicht, die Herr CZOK mit Gallefisteltieren erhielt. Bei Coffein allein und als Kaffee-Infus liegt die gallepflichtige Ausscheidung bei 5-7 % der gegebenen Dosis, bei Coffein/Chlorogensäure-Gemisch aber bei 10-12 %. Dieser Befund deutet wohl auch darauf hin, dass die Resorption des Coffeins durch Zugabe von Chlorogensäure gesteigert ist, hier speziell im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes.

Nach 5 Stunden Versuchsdauer entspricht die im Darm verbliebene Dosis bei Coffein allein und als Kaffee-Infus mit 5-10 % etwa der via Galle ausgeschiedenen Menge, während bei gleichzeitigem Angebot von Chlorogensäure bei einer gesteigerten Ausscheidung durch die Leber nach 5 Stunden nur 1-2 % der applizierten Dosis im Darm gefunden werden.

Aber nicht nur diese Befunde beweisen die durch Chlorogensäure gesteigerte Resorption von Coffein bzw. die Rückresorption seiner Metaboliten aus dem Darm, sondern auch die im Serum gefundenen Werte (Abb. 5).

Der Anstieg im Serum ist steiler, wenn man Coffein im Gemisch mit Chlorogensäure anbietet. Die Zeit bis das halbe Maximum im Blut erreicht ist beträgt 7-8 Minuten, während 15 Minuten verstreichen, wenn Coffein allein angeboten wird.

Coffein als Bestandteil eines Kaffee-Infuses liefert im Serum etwa das gleiche Maximum, wie man es bei Gabe von Coffein allein findet, jedoch verzögert : $T_{1/2}$ (max) beträgt hier 20-25 Minuten.

Die im Blut gefundene ^{14}C-Aktivität wird am schnellsten eliminiert, wenn Coffein allein in den Organismus gelangt. Coffein als Bestandteil eines Röstkaffees angeboten zeigt einen Blutwert (nach 5 Stunden), der höher liegt als bei Coffein allein. Zusammen mit Chlorogensäure angebotenes Coffein liefert an ^{14}C-Aktivität einen konstant höher liegendem Spiegel im Blut. Zusammenfassend lässt sich also sagen : Chlorogensäure beschleunigt und erhöht die Resorption des Coffeins, während das Coffein eines Kaffee-Infuses verzögert in den Organismus der Ratte aufgenommen wird, wenn keine Gewöhnung an diesen Stoff vorliegt.

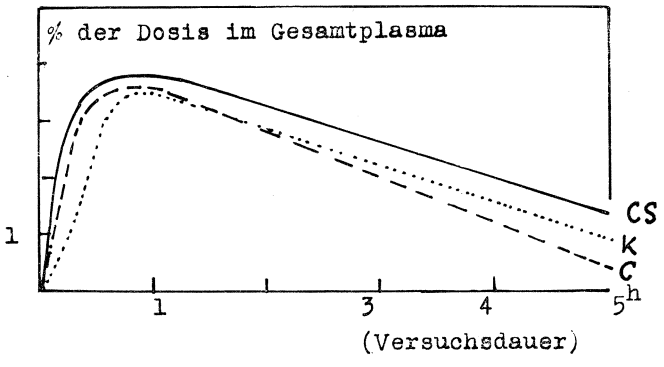


Abb. 5. — *^{14}C-Aktivität im Plasma bei Gabe von Coffein, Coffein + Chlorogensäure und Kaffee*

Retention

Bestimmt man die im Körper der Ratte zurückbleibende ^{14}C-Aktivität, so ergeben sich — wenn man die Befunde gegen die Versuchsdauer aufträgt — Kurvenbilder, die denen im Serum ähneln. Noch vor Ablauf der 1. Stunde wird ein Maximum durchlaufen. Dann fällt der ^{14}C-Gehalt des Körpers geradlinig ab. (Abb. 6).

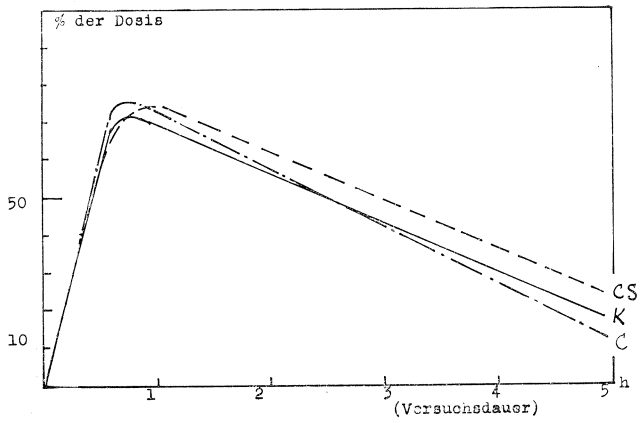


Abb. 6. — *Retention der ^{14}C-Aktivität im Körper der Ratte*

Bei Verabreichung von **Coffein allein** liegt das Maximum an Retention bei rd. 75 % der applizierten Dosis. Nach 5 Stunden sind es noch 10-12 %. $T_{1/2}$ für die Eliminierung aus dem Organismus beträgt 190-200 Minuten. Bei einem äquimolaren Zusatz von **Chlorogensäure** wird ebenfalls maximal 3/4 der Aktivität im Carcass retiniert, aber die Eliminierungsrate ist kleiner. Nach 5 Stunden sind noch 23 % der anfänglich gegebenen Dosis im Carcass. $T_{1/2}$ beträgt 230-240 Minuten.

Das Coffein im **Röstkaffee** wird nur maximal mit 72 % der Dosis im Körper der Ratte retiniert. Nach 5 Stunden liegen die Werte mit 14-16 % etwas höher als bei Coffein allein. $T_{1/2}$ beträgt 200-210 Minuten.

Das Körpergewicht der Versuchstiere erhöht Retention und Verweildauer der als Coffein angebotenen ^{14}C-Aktivität im Organismus.

Körpergewicht (g)	% der Dosis, nach 5 Stunden im Körper retiniert
100-300	10-12
400	38-42
500	50-65

Ausscheidung (Abb. 7)

Die Ausscheidung der als Coffein angebotenen ^{14}C-Aktivität erfolgt im wesentlichen via Niere. Im Harn liegen nur wenige % noch als Coffein vor, ein bekannter Befund, der auch von uns gefunden wurde.

Eine geringere Menge wird gallepfichtig ausgeschieden — wie CZOK mit Gallefisteltieren feststellte — und umso mehr je weniger über die Niere eliminiert wird.

Bei den Tieren bis zu einem Körpergewicht von 250 g nimmt die Ausscheidung im Harn in Abhängigkeit von der Versuchsdauer linear zu bis auf Werte von 75-80 % (nach 5 Stunden), wenn man ***Coffein*** allein zuführt. Wird Coffein in Form eines unbehandelten **Röstkaffees** angeboten, so liegen die Werte mit 65-72 % etwas niedriger infolge einer verzögerten Eliminierung. Bei schwereren Tieren sinken die Werte für die Ausscheidungsgeschwindigkeit ab : bei 500 g schweren Ratten finden sich nach 5 Stunden erst 25-35 % der angebotenen Dosis im Harn vor.

Bei Verabreichung von **Coffein + Chlorogensäure** im äquimolaren Verhältnis steigt zwar die im Harn ausgeschiedene Menge an Aktivität ebenfalls an, erreicht aber nur Werte von 62-68 % der applizierten Dosis. Erhöhte Resorption und Rückresorption führen zu einer verlängerten Retentionsdauer.

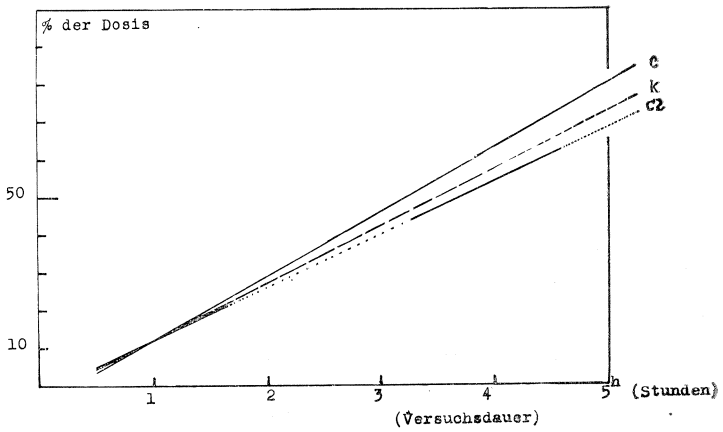


Abb. 7. — *Ausscheidung der ^{14}C-Aktivität im Harn, in % der Dosis, in Abhängigkeit von der Versuchsdauer*

^{14}C-COFFEIN IN VERSCHIEDENER FORM IM ANSCHLUSS AN MODELLMAHLZEITEN

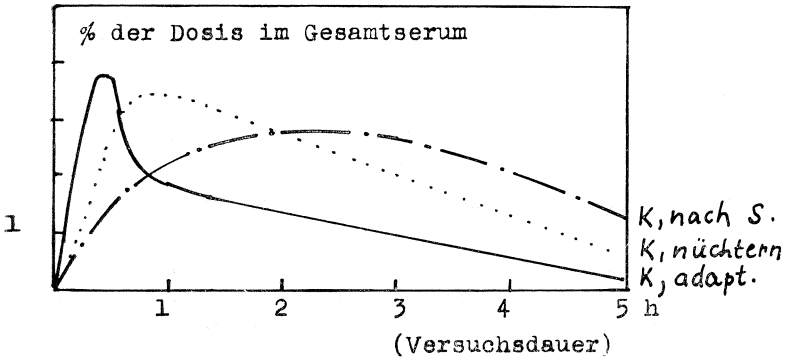


Abb. 8. — *^{14}C-Aktivität im Blutplasma nach Gabe von Kaffee nüchtern, nach Gabe einer Rohrzuckerlösung und nach Gewöhnung*

Um festzustellen, inwieweit sich die Resorption des zugeführten Coffeins verändert in Abhängigkeit verschiedener vorher genossener Kost, wurde die Aktivität im Anschluss an eine Gabe von Kohlenhydrat, Eiweiss und Fett appliziert.

Der zunächst nüchternen Ratte (200 g) wurde gegeben :

1) 5 g Saccharose/kg Körpergewicht, 1/4 Stunde später Coffein ;

2) 8 g Serumalbumin/kg Körpergewicht, 1/2 Stunde später Coffein ;

3) 3 ml Erdnussöl/kg Körpergewicht, 2 Stunden später Coffein ;

Resorption

Die veränderten Verhältnisse bei der Resorption werden deutlich in Abb. 1, Kurve b. Bei der unter diesen Bedingungen nicht mehr nüchternen Ratte ist die Resorption verringert und die $T_{1/2}$ für die Resorption verlängert (Abb. 5).

Gleichgültig in welcher Kombination das Coffein angeboten wird (auch im Kaffee-Infus), liegt die $T_{1/2}$ bei Saccharosevorgabe bei 25-30 Minuten, bei Albuminvorgabe bei 35-40 Minuten und bei Ölvorgabe ebenfalls bei 40 Minuten.

Der Anstieg der ^{14}C-Aktivität im Serum erfolgt ebenfalls langsamer (Abb. 8).

Retention und Ausscheidung

Bei Vorgabe von **Saccharose** werden im Körper der Ratte durch die verzögerte Resorption maximal nur 60-65 % gespeichert. Nach 5 Stunden sind es noch 15-20 % der Dosis. Da die Harnbereitung der Coffein-Metabolite erst später einsetzt, sind nach 5 Stunden von der applizierten Dosis erst 60-65 % ausgeschieden. Bei einer Vorgabe von **Albumin** oder **Öl** liegt das Maximum an retinierter Aktivität im Körper bei 50-55 %. Nach 5 Stunden ist dieser Wert auf 25-30 % abgefallen und via Niere sind in dem gleichen Zeitraum 55-60 % ausgeschieden worden.

COFFEIN UND KAFFEE NACH EINER GEWÖHNUNG

Nach einem Test von einer Woche, in dem die Ratten 1 mal täglich 15 mg Coffein/kg Körpergewicht erhielten, ergaben sich bei der Untersuchung des Serums gegenüber der Kontrolle niedrigere Werte. Den gleichen Versuch mit Kaffee ausgeführt ergab noch keine nennenswerten Unterschiede.

In einer neuen Serie erhielten 14 Tage lang 200 g schwere Ratten täglich 3 Kaffeemahlzeiten (jeweils 15 mg/kg Körpergewicht). Nach dieser Vorperiode wurde ^{14}C-Coffein in Form eines Kaffee-Infuses verabreicht (Abb. 8).

Im Serum schnellt der Aktivitätsgehalt nach 20-30 Minuten auf einen Wert, der höher als der sonst nach 40-60 Minuten erreichte Wert liegt.

Durch die Gewöhnung an das Coffein tritt eine vermehrte Ausscheidung via Niere ein. Die Ausscheidung im Harn steigt steil an : Nach 1 Stunde sind 50 % der Dosis schon wieder ausgeschieden. Im Blut liegt zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration vor wie sie bei nicht adaptierten Tieren sonst erst nach mehr als 3 Stunden Versuchsdauer erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt ist die im Organismus der Ratte retinierte Aktivität schon auf 35 % abgefallen. Nach 5 Stunden Versuchsdauer liegen bei adaptierten Tieren wie bei Kontrolltieren identische Verhältnisse vor.

TABELLE II

Verteilung der ^{14}C-Aktivität nach 1^{h}
(in % der Dosis)

	Resorption	Retention	Blut	Harn
Coffein	6-9	75	3	
Coffein + Chlorogensäure	5	75	3	5-10
Kaffee	8-10	72	3	5-10
Vorher: Saccharose	25-35	40-60	3	
Albumin	30-45	40-50	3	0-5
Erdnuss-Öl	35-45	40-50	3	
Kaffee, adaptiert	5-6	35	2-3	50

TABELLE III

Verteilung der ^{14}C-Aktivität nach 5^{h}
(in % der Dosis)

	Retention	Blut	Harn
Coffein	10	0-0.5	76-81
Coffein + Chlorogensäure	20	1-1.5	62-68
Kaffee	12-15	0.5-1	65-70
Saccharose	15-20	1-2	60-65
Albumin/Öl	25-30	1-2	55-60
Kaffee, adaptiert	5-10	0	80-85

SCHMIDT (B.). — **Métabolisme de la caféine marquée au carbone 14 chez les rats (en prenant en considération la boisson de café).** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 286-291, fig., tabl.

On peut dire que la caféine marquée au carbone 14 est rapidement absorbée et que ses métabolites sont vite éliminés. L'addition d'acide chlorogénique augmente l'absorption, allonge la durée de séjour dans l'organisme et retarde l'élimination par les reins.

La caféine sous forme d'infusion de café est un peu plus lentement absorbée et éliminée que sous forme pure. Cependant, le retard d'élimination est loin d'être aussi marqué que celui provoqué par l'addition d'acide chlorogénique.

L'absorption et par suite l'élimination sont retardées après administration d'un repas-type (saccharose, sérum-albumine ou huile d'arachide).

L'accoutumance à la caféine du café provoque une augmentation de l'absorption et de l'élimination par les reins, une baisse de la rétention dans l'organisme et une diminution de la durée de séjour dans ce dernier.

SCHMIDT (B.). — **The metabolism of ^{14}C-labeled caffeine in rats (with reference to coffee beverage).** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 286-291, fig., tabl.

It is possible to affirm that ^{14}C-labeled caffeine is rapidly absorbed and that its metabolites are quickly eliminated. The addition of chlorogenic acid increases the absorption, prolongs the period during which it remains in the organism and slows down elimination by the kidneys.

Caffeine, as found in an infusion of coffee beans, is absorbed and eliminated a little more slowly than in its pure state. However, the inhibition of the elimination is far from being as marked as that caused when chlorogenic acid is added.

The absorption and in consequence the elimination, are slowed down after the administration of a standard meal (sucrose, serum albumin or peanut oil).

An adaptation to the caffeine of coffee causes an increase in its absorption and in its elimination by the kidneys and a decrease in retention in the organism and in the time of retention.

SCHMIDT (B.). — **Stoffwechsel von ^{14}C-Coffein bei der Ratte (unter Berücksichtigung des Kaffeegetränks).** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 286-291, fig., tabl.

Es kann also gesagt werden, dass ^{14}C-Coffein rasch resorbiert wird und dass seine Metaboliten ebenso schnell wieder ausgeschieden werden. Durch einem Zusatz an Chlorogensäure ist die Resorption erhöht, die Verweildauer im Organismus länger und die Ausscheidung via Niere ist verzögert.

Coffein in Form eines Kaffee-Infuses wird etwas langsamer resorbiert und wieder ausgeschieden als bei einer Gabe von Coffein allein. Jedoch ist die Ausscheidungshemmung längst nicht so ausgeprägt wie sie durch einem Zusatz von Chlorogensäure hervorgerufen wird.

Nach Vorgabe einer Modellmahlzeit (Saccharose, Serumalbumin oder Erdnussöl) ist die Resorption verzögert und im Gefolge davon die Ausscheidung ebenfalls.

Im Anschluss an eine Gewöhnung an das Coffein des Kaffees sind Resorption und Ausscheidung via Niere erhöht, im Organismus Retention niedriger und die Verweildauer verkürzt.

UNTERSCHIEDE IN RESORPTION UND STOFFWECHSEL VON ^{14}C-COFFEIN BEI RATTEN NACH ORALER GABE VON KAFFEE UND TEE

G. CZOK,
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Mainz

Kaffee und Tee enthalten als wesentliche Wirksubstanz das Coffein, und man kann sagen, dass mit einem in üblicher Weise hergestellten Kaffee- oder Tee-Infus in etwa die gleichen Coffeinmengen aufgenommen werden. Überraschenderweise ergeben sich aber deutliche Unterschiede, wenn die physiologischen Wirkungen eines Kaffee- und Teegetränkes miteinander verglichen werden. Im allgemeinen werden dabei folgende Aussagen gemacht: Die Wirkung des Kaffees sei stärker, halte aber nicht so lange an, während nach Tee eine im ganzen schwächere, dafür aber viel länger andauernde Wirkung zu beobachten sei.

Da nach diesen Beobachtungen zu vermuten war, dass nach Verabreichung von Kaffee und Tee möglicherweise die Resorption und der Stoffwechsel von Coffein sich unterschiedlich verhalten, wurden Versuche mit ^{14}C-Coffein durchgeführt, über deren Ergebnisse hier berichtet werden soll. In ergänzenden Versuchen wurde auch die Spontanmotilität von Mäusen nach Verabreichung von Coffein, Kaffee und Tee geprüft, um festzustellen, ob neben dem Coffein noch andere Inhaltsstoffe des Kaffees oder Tees zentrale Wirkungen entfalten.

Die Versuche mit ^{14}C-Coffein wurden an 200-250 g schweren Ratten durchgeführt, die Altromin als Standard-Kost und Wasser *ad libitum* erhalten hatten. Die Tiere blieben 14-16 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern und erhielten dann mittels Schlundsonde Kaffee-und Tee-Infuse, denen ^{14}C-Coffein zugesetzt worden war. Die Kaffee- und Tee-Infuse wurden aus gefriergetrockneten Aufgüssen hergestellt und so dosiert, dass jeweils 15 mg Coffein pro kg Ratte appliziert wurden. Nach der Kaffee- und Teegabe wurden jeweils 3-5 Tiere in Intervallen von 1/2, 1, 3 und 5 Stunden getötet. Es wurde dann die ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal, im Blutserum, im Carcass und im ausgeschiedenen Harn ermittelt und in Prozent der verabreichten ^{14}C-Aktivität ausgedrückt. Im Serum wurde neben der ^{14}C-Aktivität auch der Coffeingehalt nach der Methode von AXELROD und REICHENTHAL bestimmt.

Abbildung 1 zeigt das Verhalten der ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal, Carcass und Harn von Ratten, die Kaffee erhalten hatten. Hierbei ist folgendes festzustellen: Im Magendarmkanal fällt die ^{14}C-Aktivität in der 1. Stunde steil ab, dann ist der Abfall nur noch verhältnismässig gering, und etwa von der 3. Stunde ab wird ein konstanter Wert für die ^{14}C-Aktivität erreicht. Nach diesen Befunden wird das mit dem Kaffeegetränk zugeführte Coffein im Verlauf von einer Stunde zum grössten Teil resorbiert. Der fehlende Abfall der ^{14}C-Aktivität im späteren Verlauf des Versuches beruht darauf, dass

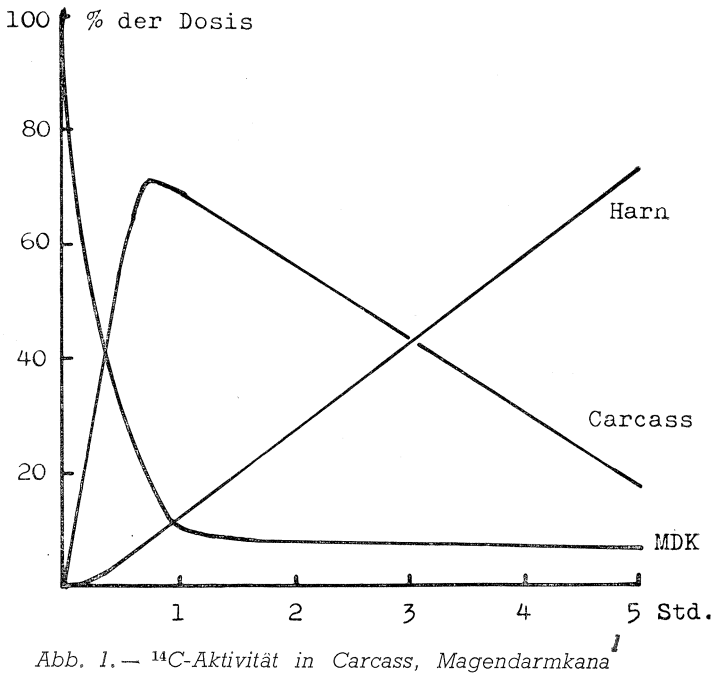


Abb. 1. — ^{14}C-Aktivität in Carcass, Magendarmkana und Harn von Ratten narch Gabe von Kaffee

nach der Resorption von ^{14}C-Coffein ^{14}C-haltiges Material auch über die Galle ausgeschieden wird. Bei der Ausscheidung über die Galle, die an Gallefistelratten nachgewiesen werden konnte, handelt es sich hauptsächlich um Coffeinmetaboliten, in einem gewissen Umfang auch um unverändertes Coffein. Die über die Galle ausgeschiedene ^{14}C-Aktivität war nach Gabe von Kaffee und von Coffein etwa gleich, nach gleichzeitiger Verabreichung von Coffein und Chlorogensäure in einem Mengenverhältnis von 1 : 2 dagegen deutlich erhöht.

Entsprechend der raschen Coffeinresorption steigt die ^{14}C-Aktivität im Carcass nach Kaffeegabe steil an, sie erreicht etwa nach 50 min. ihr Maximum und fällt dann verhältnismässig schnell ab. Die in den Harn ausgeschiedene ^{14}C-Aktivität zeigt unter diesen Versuchsbedingungen einen linear verlaufenden steilen Anstieg, und es ist festzustellen, dass nach Ablauf von 5 Stunden etwa 3/4 der ^{14}C-Aktivität über die Niere ausgeschieden sind.

Ein völlig anderes Bild in der Verteilung der ^{14}C-Aktivität ist aber dann festzustellen, wenn die Ratten Tee unter Zusatz von ^{14}C-Coffein erhielten. Abbildung 2 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse.

Auch hier zeigt die ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal zunächst einen steilen Abfall, sodass innerhalb der 1. Stunde das im Tee zugeführte Coffein zum grössten Teil resorbiert sein dürfte. Im ganzen gesehen verläuft die Kurve allerdings etwas flacher als nach Kaffee, sodass die Coffeinresorption nach Tee wohl etwas langsamer erfolgen dürfte. Die ^{14}C-Aktivitätswerte im Carcass steigen nach Verabreichung von Tee zunächst steil an, fallend anschliessend aber nur sehr langsam ab. So ist beispielsweise nach 5 Stunden noch nahezu die Hälfte der verabreichten ^{14}C-Aktivität im Carcass enthalten. Entsprechend der erhöhten ^{14}C-Retention im Carcass sind die im Harn ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivitätswerte erwartungsgemäss sehr niedrig. Die Ausscheidungskurve zeigt daher nur einen sehr geringen Anstieg mit fortschreitender Versuchsdauer, und nach Ablauf von 5 Stunden sind erst 1/3 der verabreichten ^{14}C-Aktivität durch die Niere eliminiert.

Abbildung 3 zeigt das Verhalten der ^{14}C-Aktivität im Serum nach Verabreichung von Kaffee und Tee. Die ^{14}C-Aktivität wurde hierbei in Prozent der verabreichten Dosis errechnet und auf die Gesamtserummenge (= 3 ml/100 g Ratte) bezogen. Aus dem Bild ist zu entnehmen, dass nach Verabreichung von Tee die ^{14}C-Aktivitätswerte im Serum erheblich höher ansteigen als nach Kaffeegabe. Der erreichte Maximalwert der ^{14}C-Aktivität liegt nach Tee mehr als doppelt so hoch gegenüber der Kaffeegabe. Ausserdem ist nach Verabreichung von Tee der Abfall der ^{14}C-Aktivitätswerte im Serum sehr stark verzögert. So sind 5 Stunden nach Verabreichung von Tee noch über 4 % der verabreichten ^{14}C-Aktivität im Gesamtserum enthalten, während nach Kaffeegabe der entsprechende Wert auf nahezu 0 % abgesunken ist.

Ausser den ^{14}C-Aktivitätskurven sollen auch die Coffeinkurven im Serum nach Verabreichung von Kaffee und Tee gezeigt werden, da durch den Vergleich dieser

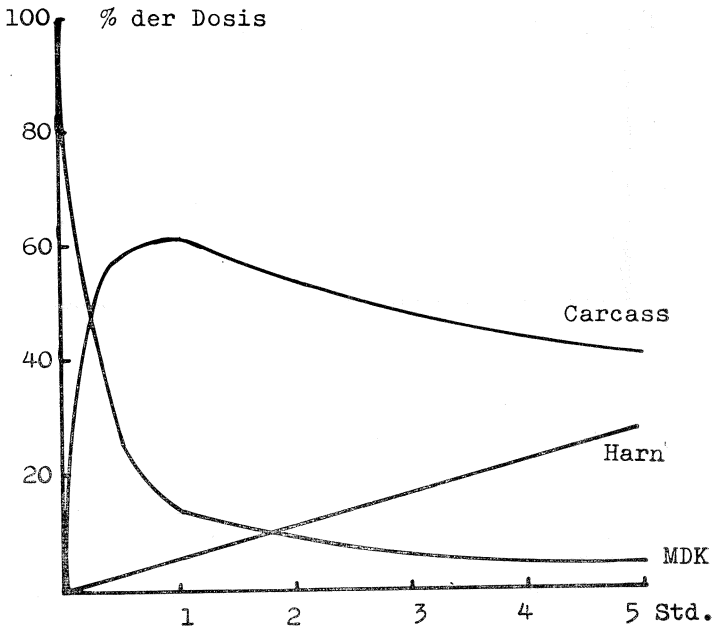


Abb. 2. — ^{14}C-Aktivität in Carcass, Magendarmkanal und Harn von Ratten nach Gabe von Tee

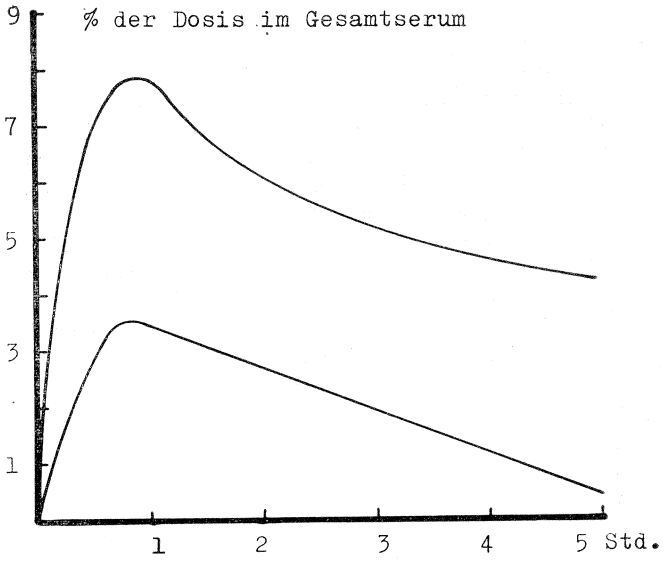


Abb. 3. — ^{14}C-Aktivität im Serum von Ratten nach oraler Gabe von Kaffee (untere Kurve) und von Tee (obere Kurve)

Kurven die im Serum enthaltenen Mengen an Coffeinmetaboliten abschätzbar sind. Auf Abbildung 4 sind die Coffeinserumkurven von Ratten, die Kaffee oder Tee erhielten, gegenübergestellt. Es kann dabei folgendes festgestellt werden : Nach Verabreichung von Tee

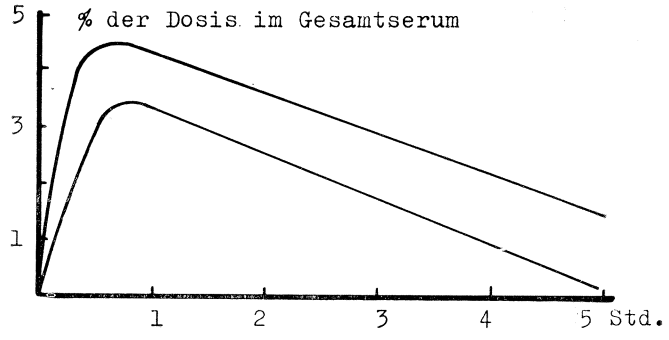


Abb. 4. — Coffeingehalt im Serum von Ratten nach oraler Gabe von Kaffee (untere Kurve) und von Tee (obere Kurve)

steigen die Coffeinwerte im Serum steiler und höher an und fallen anschliessend langsamer ab als nach Kaffeegabe.

Um den Gehalt des Serums an Coffein und Coffeinmetaboliten unmittelbar vergleichen zu können, sind im folgenden die Kurven der ^{14}C-Aktivität und des Coffeingehalts gegenübergestellt. Abbildung 5 zeigt diese Verhältnisse nach Verabreichung von Kaffee. Wie man sieht, verlaufen die Kurven der ^{14}C-Aktivität und des Coffeingehalts im Serum bis etwa eine Stunde nach der Kaffeegabe identisch, anschliessend ist die Kurve der ^{14}C-Aktivität etwas über der Coffeinkurve gelegen. Auf Grund dieser Befunde lassen sich folgende Aussagen machen : Etwa bis zu 1 Stunde nach Verabreichung von ^{14}C-coffeinhaltigem Kaffee liegt die im Serum nachweisbare ^{14}C-Aktivität als Coffein vor. Anschliessend treten im Serum auch Coffeinmetaboliten auf, deren Menge mit fortschreitender Versuchsdauer ein wenig zunimmt. Nach Verabreichung von Kaffee werden also nur verhältnismässig geringe Mengen an Coffeinmetaboliten im Serum gefunden. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die entstehenden Coffeinmetaboliten sehr schnell über die Niere ausgeschieden werden.

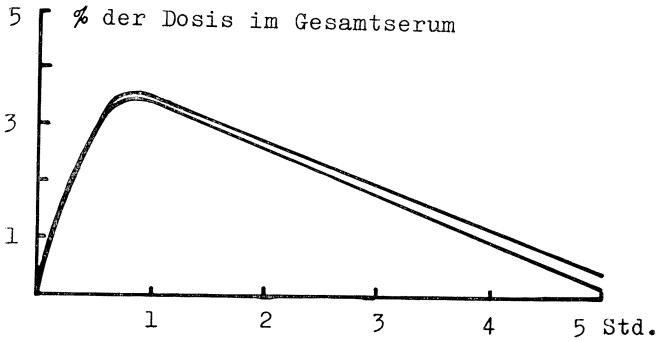


Abb. 5. — ^{14}C-Aktivität und Coffeingehalt im Serum von Ratten nach oraler Gabe von Kaffee
^{14}C-Aktivität : obere Kurve
Coffeingehalt : untere Kurve

Ein wesentlich anderes Bild ergibt sich aber nach Verabreichung von Tee. Abbildung 6 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse. Die ^{14}C-Aktivitätswerte steigen hierbei etwa doppelt so hoch an wie die Coffeinserumwerte und liegen auch während des anschliessenden Abfalls ganz erheblich über den Coffeinserumspiegelwerten. Nach diesen Befunden werden also nach Verabreichung von Tee sehr grosse Mengen an Coffeinmetaboliten im Serum gefunden. Die Coffeinmetaboliten sind dabei dem Coffein gegenüber etwa in gleich grossen oder sogar noch grösseren Mengen vorhanden.

Die Anhäufung von Coffeinmetaboliten im Serum, die nach Verabreichung von Tee zu beobachten ist, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass ihre Ausscheidung durch die Niere nur sehr langsam erfolgt. Die verringerte Ausscheidung der Coffeinmetaboliten durch die Niere könnte auf einer festeren Bindung dieser Substanzen an bestimmte Serumbestandteile beruhen. In diesem Sinne könnte vielleicht auch der Befund gedeutet werden, dass die ^{14}C-Aktivitätswerte im Serum zumindest in den ersten Versuchsstunden deutlich über denen des Carcass gelegen sind.

Die vorgewiesenen Untersuchungsbefunde sollen noch durch einige zahlenmässige Angaben über die Verteilung der ^{14}C-Aktivität ergänzt und vervollständigt werden. Hierbei wurde auch die Verteilung der ^{14}C-Aktivität nach Verabreichung von Coffein berücksichtigt, sodass auch ein Vergleich in der Verteilung nach Coffein einerseits und Kaffee und Tee andrerseits möglich war.

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der ^{14}C-Aktivität 1 Stunde nach Verabreichung von Coffein, Kaffee und Tee.

TABELLE 1

Verteilung der ^{14}C-Aktivität nach 1 Stunde
(in Prozent der Dosis)

	MDK	Carcass	Blut	Harn
Coffein	6-9	75	3	5-10
Kaffee	8-10	72	3	5-10
Tee	13-16	61	8	4-5

Nach den vorstehenden Messwerten sind nach Verabreichung von Coffein und Kaffee keine grösseren Unterschiede in der Verteilung der ^{14}C-Aktivität festzustellen. Im Harn und Blut sind die ^{14}C-Aktivitätswerte identisch. Nach Gabe von Kaffee ist die ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal etwas höher und die im Carcass etwas niedriger als nach Coffeingabe. Hieraus dürfte abzuleiten sein, dass das mit dem Kaffeegetränk zugeführte Coffein etwas langsamer resorbiert wird als wenn Coffein in wässriger Lösung angeboten wird.

Noch stärker verzögert ist offenbar die Coffeinresorption nach Verabreichung von Tee. Eine Stunde nach der Teefuhr werden dann nämlich noch 13-16 % der zugeführten ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal wiederge-

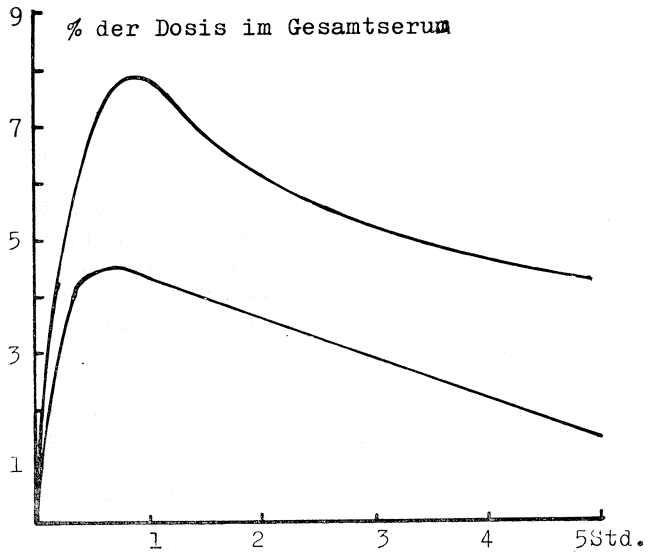


Abb. 6. — ^{14}C-Aktivität und Coffeingehalt im Serum von Ratten nach oraler Gabe von Tee
^{14}C-Aktivität : obere Kurve
Coffeingehalt : untere Kurve

funden. Wegen der langsameren Coffeinresorption sind nach Tee auch die ^{14}C-Aktivitätswerte im Carcass niedriger als nach Kaffee oder Coffein. Bemerkenswert ist ferner, dass nach Verabreichung von Tee im Blut sehr hohe, im Harn dagegen sehr niedrige ^{14}C-Aktivitätswerte gefunden werden.

Tabelle 2 zeigt die Verteilung der ^{14}C-Aktivität 5 Stunden nach Verabreichung von Coffein, Kaffee und Tee.

TABELLE 2

Verteilung der ^{14}C-Aktivität nach 5 Stunden
(in Prozent der Dosis)

	MDK	Carcass	Blut	Harn
Coffein	5-6	10	0 -0.5	76-81
Kaffee.....	5-6	12-15	0.5-1	65-70
Tee	5-6	41-44	4 -5	28-38

Nach den vorstehenden Befunden ist folgendes festzustellen : Die ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal ergibt nach Verabreichung von Coffein, Kaffee und Tee gleiche Werte, wobei noch 5-6 % der zugeführten ^{14}C-Aktivität wiedergefunden werden. Wie bereits in anderem Zusammenhang erwähnt wurde, handelt es sich hierbei um ^{14}C-haltiges Material, das nach Ausscheidung durch die Galle in den Darm gelangt ist. Die im Darm wiedergefundene ^{14}C-Aktivität ist dabei abhängig von den durch die Galle ausgeschiedenen und von den im Darm reabsorbierten Mengen der ^{14}C-Aktivität. Für die Coffeinmetaboliten besteht danach offenbar ein enterohepatischer Kreislauf, und es ist zu vermuten, dass diesem auch im Zusammenhang mit der « Coffeinwirkung » eine Bedeutung zukommt.

Die Verteilung der ^{14}C-Aktivität in Carcass, Blut und Harn zeigt sehr unterschiedliche Werte je nachdem, ob Coffein, Kaffee oder Tee verabreicht wurden. So ist nach Coffein die Retention der ^{14}C-Aktivität im Carcass und im Blut am geringsten, nach Kaffee etwas höher und nach Tee am höchsten. Umgekehrt ist das Verhalten der ^{14}C-Aktivität im Harn. Hier ist nach Coffein die ^{14}C-Aktivität am höchsten, nach Kaffee deutlich geringer und nach Tee am geringsten. Nach diesen Befunden bestehen also bestimmte Unterschiede in der Resorption und im Stoffwechsel von ^{14}C-Coffein je nachdem ob Coffein in wässriger Lösung, als Kaffee- oder Tee-Getränk zugeführt wird.

Eine weitere Frage, die in diesem Zusammenhang von besonderen Interesse schien, war die, ob und gegebenenfalls in welcher Weise sich die Wirkungen einer Coffeinlösung, eines Kaffee-Infuses und eines Tee-Infuses unterscheiden. Um dies zu klären, wurde bei Mäusen die Spontanmotilität mit der von SCHULER angegebenen Apparatur gemessen. Diese Untersuchungen wurden an 4 Tiergruppen von je 40-80 Mäusen durchgeführt. Tiergruppe 1 diente als Kontrolle und erhielt Wasser mittels Schlundsonde, Tiergruppe 2 erhielt eine Coffeinlösung, Tiergruppe 3 einen Kaffee-Infus und Tiergruppe 4 einen Tee-Infus. Bei den Tiergruppen 2, 3 und 4 war die Coffeinzufuhr gleich und betrug 20 mg/kg K.-Gew.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind auf der Abbildung 7 dargestellt. Sie erlauben folgende Aussagen zu machen : Nach Verabreichung von Coffein steigen die Aktivitätswerte gegenüber den Kontrollen in der 1. Stunde deutlich an. Anschliessend fallen die Aktivitätswerte in zunehmendem Umfang ab und zeigen in der 4.

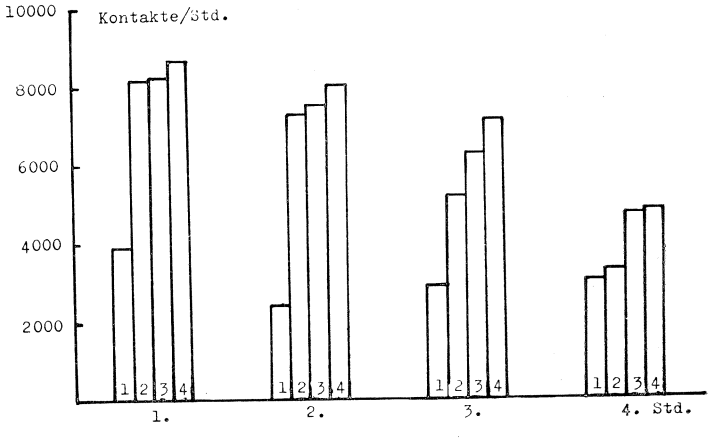


Abb. 7. — Spontanaktivität von Mäusen nach oraler Gabe von Wasser (1. Kontrolle) Coffein (2), Kaffee (3) und Tee (4)

Stunde keinen Unterschied mehr gegenüber den Kontrollen. Ein anderes Verhalten in der Spontanmotilität zeigen dagegen die Tiergruppen, die Kaffee oder Tee erhalten hatten. In der 1. und 2. Stunde entsprechen dabei die Aktivitätswerte zunächst denen, die nach Coffeingabe erhalten wurden ; in der 3. und 4. Stunde fallen die Aktivitätswerte nach Kaffee und Tee nur verhältnismässig wenig ab, sodass der Coffeingruppe gegenüber noch deutlich erhöhte Messwerte gefunden werden. Die festgestellten Unterschiede erwiesen sich beim Mittelwertsvergleich nach dem t-Test mit einem $p < 0.01$ als signifikant.

Nach diesen Befunden wirken also Kaffee und Tee offenbar stärker zentral stimulierend als eine Coffeinlösung mit entsprechendem Coffeingehalt. Zwischen den Wirkungen von Kaffee einerseits und Tee andrerseits war dagegen kein sicherer Unterschied nachzuweisen.

In diesem Zusammenhang scheint es nützlich, noch einmal auf die in den Rattenversuchen erhaltenen Coffeinserumkurven zurückzukommen, da sie uns wichtige Hinweise geben können, wie die stärkere zentrale Wirksamkeit von Kaffee und Tee zu erklären ist.

Vergleicht man die zentralen Wirkungen und die Coffeinserumkurven nach Gabe von Kaffee und Tee mit denen, die nach alleiniger Coffeingabe erhalten wurden, so ist folgendes festzustellen : Nach Verabreichung von Kaffee ist die zentrale Erregbarkeit im Vergleich zur alleinigen Coffeingabe erhöht, während der Coffeinserumspiegel keine Beeinflussung erkennen lässt. Nach Verabreichung von Tee ist sowohl die zentrale Erregbarkeit als auch der Coffeinserumspiegel im Vergleich zur alleinigen Coffeingabe erhöht.

Da hiernach die gesteigerte zentrale Erregbarkeit nach Kaffeegabe im Vergleich zur alleinigen Coffeingabe ohne nachweisbare Änderung des Coffeinserumspiegels und daher wohl auch ohne Änderung des Coffeinspiegels im Gehirn einhergeht, ist zu schliessen, dass der Kaffee neben dem Coffein noch andere zentralerregende Substanzen enthält. Unter diesen Substanzen dürften die Röststoffe und die Chlorogensäure eine Rolle spielen, deren zentrale Wirksamkeit in der neueren Zeit von verschiedenen Autoren (CZOK, HEYL, KARGOSCHA) nachgewiesen werden konnte.

Anders liegen die Verhältnisse nach Verabreichung von Tee. Hier geht die erhöhte zentrale Erregbarkeit im Vergleich zur alleinigen Coffeinwirkung auch mit einer Erhöhung des Coffeinserumspiegels einher. Es ist daher zu vermuten, dass unter diesen Bedingungen auch erhöhte Coffeinkonzentrationen im Gehirn vorliegen, welche die gesteigerte Erregbarkeit hervorrufen. Darüber hinaus könnten auch andere Tee-Inhaltsstoffe wie z. B. das Theophyllin an diesem Effekt beteiligt sein.

Zusammenfassend ist also folgendes festzustellen : Nach den hier vorgelegten Untersuchungsbefunden sind Resorption und Stoffwechselverhalten von Coffein unterschiedlich, wenn Coffein in Form eines Kaffee- oder Tee-Infuses an Ratten verabreicht wird.

Nach Kaffee, der mit ^{14}C-Coffein versetzt war, war das darin enthaltene Coffein bereits nach 1 Stunde zu etwa 90 % resorbiert. Anschliessend kam es zu einem raschen Abfall der ^{14}C-Aktivität und des Coffeinspiegels im Blut und im Körpergewebe und nach 5 Stunden waren etwa 3/4 der als ^{14}C-Coffein verabreichten Aktivität durch den Harn ausgeschieden. Nach Verabreichung von Tee erfolgte die Coffeinresorption mit einer gewissen Verzögerung. Die ^{14}C-Aktivitätswerte und die Coffeinspiegel im Serum stiegen gleichzeitig erheblich höher an als nach Kaffeegabe und zeigten anschliessend einen stark verzögerten Abfall. Die ^{14}C-Aktivität wurde durch den Harn nur sehr langsam ausgeschieden und war nach 5 Stunden erst zu 30 % durch die Niere eliminiert.

In Untersuchungen an Mäusen bewirkten Kaffee und Tee eine deutliche Steigerung der zentralen Erregbarkeit, welche stärker ausgeprägt war als nach alleiniger Coffeingabe.

Dieser Befund wird in folgender Weise gedeutet : Beim Kaffee kommt die erhöhte zentrale Wirkung dadurch zustande, dass ausser dem Coffein auch andere Inhaltsstoffe (Röststoffe, Chlorogensäure) zentrale Wirkungen entfalten. Beim Tee finden sich bedeutend erhöhte Coffeinserumspiegelwerte ; es können daher auch erhöhte Coffeinkonzentrationen im Gehirn erwartet werden, welche zu einer gesteigerten zentralen Wirkung Anlass geben. Darüber hinaus könnten auch noch andere Inhaltsstoffe des Tees wie z. B. Theophyllin bei dem nachgewiesenen Effekt bedeutungsvoll sein.

LITERATUR

AXELROD, J. und REICHENTHAL, J. — *J. Pharmacol. Ther.*, **107**, 519 (1953).

CZOK, G. — *Z. Ernährungswiss.*, Suppl. 5 (1966).

HEYL, H. — Vergleich der motorischen Wirkungskomponente zentralerregender Stoffe. Inaug. Diss. (Hamburg 1963).

KARGOSCHA, R. — Spontaneitätsverhalten von Mäusen nach verschiedenen Pharmaka. Inaug. Diss. (Hamburg 1967).

SCHULER, E. — *Arzneimittelforschg.*, **10**, 959 (1960).

Czok (G.). — **Différences dans la résorption et l'échange de caféine marquée au carbone 14, chez les rats, après administration orale de café et de thé.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 292-298, fig., tabl., réf.

Le café et le thé présentent des effets physiologiques nettement différents, même si les quantités de caféine ingérées sont identiques. Ceci permet de supposer que résorption et échange de la caféine se produisent différemment et fait apparaître la nécessité de poursuivre les études à l'aide de caféine marquée au carbone 14, de façon à éclairer le problème.

Dans ce but on a administré à des rats du café et du thé contenant de la caféine marquée ; la résorption de l'activité du carbone 14, sa rétention dans l'organisme et son élimination par les reins ont été déterminées.

La résorption de la caféine du thé est la plus lente. Une heure après administration de café et après administration de thé, 8 à 10 % et 13 à 16 % respectivement de l'activité introduite sont retrouvés dans le canal estomac-intestin. Simultanément l'activité du carbone 14 dans la « carcasse » (ensemble du corps, moins l'intestin, le foie et l'estomac) et dans l'urine était plus faible, alors qu'elle était plus élevée dans le plasma sanguin après ingestion de thé.

Cinq heures après administration de café et de thé, les activités du carbone 14 sont identiques dans le canal estomac-intestin. Il existe cependant des différences plus marquées dans la rétention du carbone 14 par l'organisme et dans son élimination par les reins. Après ingestion de thé, la « carcasse » contenait encore 41 à 44 % de l'activité introduite et le plasma sanguin 4 à 5 %, alors qu'après ingestion de café, « carcasse » et plasma sanguin n'en contenaient plus respectivement que 12 à 15 % et 0,5 à 1 %. Cinq heures après administration de thé 28 à 38 % de l'activité du carbone 14 étaient éliminés par l'urine et cinq heures après celle de café, 65 à 70 %.

Czok (G.). — **Differences in the resorption and exchange of ^{14}C-labelled caffeine in the case of rats after oral administration of coffee and tea.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 292-298, fig., tabl., réf.

Coffee and tea have entirely different physiological effects, even if the amounts of caffeine absorbed are the same. From this, it can be presumed that the resorption and exchange of the caffeine take place differently and leads to the necessity of carrying out the research with the help of ^{14}C-labelled caffeine in order to elucidate the problem.

With this in view, coffee and tea containing labelled caffeine were administered to rats ; the resorption of the activity of the carbon 14, its retention in the system and its elimination by the kidneys, were determined.

The resorption of the caffeine in tea is the slower. One hour after the administration of the coffee and of the tea, 8 to 10 % and 13 to 16 % respectively of the activity of the carbon 14 are found in the gastro-intestinal tract. At the same time the activity of the carbon 14 in the « carcass » (*) and in the urine was less, whilst being greater in the blood plasma after absorption of tea.

Five hours after the administration of coffee and tea, the respective activities of the carbon 14 are indentical in the gastro-intestinal tract. There exists, however more marked differences in the retention of the carbon 14 in the system and in its elimination by the kidneys. After absorption of tea, the « carcass » still contained 41 to 44 % of the activity introduced and the blood plasma only contained a residual 12 to 15 % and 0.5 to 1 % respectively. Five hours after the administration of tea 28 to 38 % of the carbon 14 activity had been eliminated by the urine and five hours after that of coffee, 65 to 70 % had been eliminated.

(*) The entire body with intestines, liver and stomach remaved.

Czok (G.). — **Unterschiede in Resorption und Stoffwechsel von ^{14}C-Coffein bei Ratten nach oraler Gabe von Kaffee und Tee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 292-298, fig., tabl., réf.

Kaffee und Tee zeigen auch dann, wenn die mit ihnen aufgenommenen Coffeinmengen identisch sind, deutliche Unterschiede in ihren physiologischen Wirkungen. Dies legte die Vermutung nahe, dass dabei Resorption und Stoffwechsel von Coffein sich unterschiedlich verhalten, und liess es angezeigt erscheinen, zur weiteren Klärung Untersuchungen mit ^{14}C-Coffein durchzuführen.

Zu diesem Zweck wurde ^{14}C-coffeinhaltiger Kaffee und Tee an Ratten verabreicht und die Resorption der ^{14}C-Aktivität, ihre Retention im Organismus und ihre Ausscheidung durch die Niere ermittelt.

Die Coffeinresorption erfolgte nach Tee etwas langsamer als nach Kaffee. So wurden 1 Stunde nach Kaffeegabe 8-10 %, 1 Stunde nach Teegabe aber 13-16 % der zugeführten Aktivität im Magendarmkanal wiedergefunden. Gleichzeitig war nach Tee die ^{14}C-Aktivität im Carcass und Harn niedriger, im Blutplasma dagegen höher als nach Kaffee.

5 Stunden nach Verabreichung von Kaffee und Tee zeigte die ^{14}C-Aktivität im Magendarmkanal identische Werte. Es ergaben sich dann aber noch stärker ausgeprägte Unterschiede für die ^{14}C-Retention im Organismus und die ^{14}C-Ausscheidung durch die Niere. Nach Tee wurden im Carcass noch 41-44 % und im Blutplasma noch 4-5 % der zugeführten ^{14}C-Aktivität gefunden, während nach Kaffee der Carcass nur 12-15 % und das Blutplasma nur 0,5-1 % der verabreichten ^{14}C-Aktivität enthielt. 5 Stunden nach Gabe von Tee waren 28-38 % der ^{14}C-Aktivität durch den Harn ausgeschieden, nach Kaffee dagegen 65-70 %.

DISCUSSION

relative aux exposés de M. Schmidt et de M. Czok

M. KENSLER : Before opening the discussion, I would like to know if one of you can say if what has metabolized in rats is the same as in man or not. Have you chromatographs showing radioactivity and enabling you to tell how many metabolites are there and to identify any of them.

M. SCHMIDT : Wir haben lediglich die Gesamtaktivität bestimmt, und Herr Czok hat bei seinen Untersuchungen darüber hinaus noch spezifisch auch Coffeinuntersuchungen angestellt. Ueber die Verteilung und die Metaboliten können wir jetzt nichts sagen.

Es besteht dazu zunächst auch die technische Schwierigkeit noch die Metaboliten zunächst so anzureichern dass man sie überhaupt bestimmen kann. Aus einigen Kurven die Herr Czok gezeigt hat geht hervor, dass manchmal die Metaboliten nur 5 bis 10 % von der Gesamtaktivität ausmachen, im Blutserum beispielsweise.

M. NAVELLIER : Quelles sont les méthodes d'analyse qui ont été utilisées pour doser la caféine ?

M. CZOK : Die Coffeinbestimmungen wurden nach der Methode von Axelrod und Reichenthal durchgeführt.

M. KENSLER : Have you measured the ability of liver to metabolize caffeine in your clinic animals ?

M. SCHMIDT : Unsere Untersuchungen sind am ganz Tier ausgeführt worden in vivo und nicht in einzeln Organ Untersuchungen.

ÜBER GENUSSWERT UND BEKÖMMLICHKEIT VON RÖSTKAFFEE

J. WURZIGER

Chemische und Lebensmitteluntersuchungsanstalt im Hygienischen Institut der Freien und Hansestadt, Hamburg

Bekanntlich verdankt Röstkaffee seine grosse Verbreitung und Wertschätzung der belebenden Wirkung des Koffeins und den charakteristischen Geruchs- und Geschmacksstoffen, die insgesamt den Genusswert der Kaffeezubereitungen ausmachen. In den letzten Jahren wird in verschiedenen Verbreitungsgebieten immer häufiger auf die Bekömmlichkeit des Röstkaffees hingewiesen. Da Genusswert und Bekömmlickheit sehr oft sogar gleichzeitig angewandt werden, entsteht der Eindruck, dass es sich hier um Eigenschaften handelt, die miteinander keine Berührungspunkte haben. Im folgenden soll auf einige Faktoren eingegangen werden, die sich insbesondere auf die Bekömmlichkeit auswirken könnten und denen daher etwas mehr Beachtung geschenkt werden sollte.

Für den Verbraucher sind bekanntlich nur die Kaffeesubstanzen interessant, die mit heissem Wasser unter üblichen Bedingungen das Getränk bilden. Hieraus folgt zwangsläufig, dass Genusswert und Bekömmlichkeit sich allein an Kaffeegetränken bzw. in Verbindung mit solchen betrachten und beurteilen lassen. Hierbei ist es sogar von untergeordneter Bedeutung, ob es sich dabei um Getränke aus Röstkaffees oder um solche aus Kaffee-Extraktpulver handelt. Auf die Trocken-Extrakte soll jedoch in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden.

Die im Haushalt und Gewerbe üblichen Kaffeezubereitungsverfahren lassen sich zu 3 grossen Gruppen zusammenfassen.

1. Zubereitung ohne Filtration. Hierher gehören die Aufbrüh- und Auslaugeverfahren. Bei diesen Arbeitsweisen gelangen jedoch oftmals mehr als 25 % der wasserlöslichen Extraktstoffe nicht in den Aufguss.

2. Kaffee-Zubereitung mit Filtration. Bei diesen Zubereitungsverfahren bleibt das Aufgusswasser nur eine bestimmte Zeit mit dem Kaffeemehl in Berührung, also nur solange bis die Filtration beendet ist.

3. Kaffee-Zubereitung mit Druckfiltration. Bei diesen Verfahren wird die Filtration durch Druck beschleunigt. Dabei wird der Druck fast immer durch das Wasser selbst erzeugt, indem dieses in einem dicht verchlossenen Gefaäs über seine Siedetemperatur hinaus erhitzt wird.

Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich nicht nur in den geruchlichen und geschmacklichen Eigenschaften der Aufgüsse, die damit herzustellen sind, sondern insbesondere auch in der Ausnützung des Röstkaffees. Unter vergleichbaren Aufgussbedingungen wirkt sich bei gleichem Verfahren selbstverständlich auch die eingesetzte Röstkaffeemenge auf die Ausbeute und die Zusammensetzung der extrahierten Kaffeesubstanzen merkbar aus.

In Tabelle 1 sind Beispiele zusammengestellt, aus denen der Einfluss verschiedener Aufgussverfahren auf die Menge und Zusammensetzung der gelösten Kaffeesubstanzen zu ersehen ist. Für diese Untersuchungen wurden fein gemahlene bis grob zerkleinerte Röstkaffees etwa gleichen Röstgrades genommen.

Die Zubereitungsweisen wurden so ausgewählt, dass jede Gruppe vertreten war. In diesem Zusammenhang soll jedoch nicht auf alle Einflüsse eingegangen werden, die sich auf Art und Zusammensetzung der Extrakte auszuwirken vermögen. Es unterliegt jedoch keinem Zweifel, dass über die Zubereitungsweisen auch Genusswert und Bekömmlichkeit der Getränke Beeinträchtigungen erfahren. Die angeführten Beispiele vermitteln einen Einblick in die Unterschiede zwischen Gesamtextrakt, Asche im Extrakt und den unter bestimmten Bedingungen mit Alkohol abscheidbaren Kaffeesubstanzen für nach verschiedenen Verfahren aus grob, mittelfein und fein gemahlenen Röstkaffees gewonnenen Zubereitungen.

Unter den gewählten Bedingungen wurden aus grob gemahlenen Röstkaffees zwischen 11,5 und 14,9% Gesamtextrakt gewonnen. Die Mineralbestandteile betrugen — als Asche bei 600° C ausgedrückt — 17,5 bis 19,6 %. Wenn 4 % Gesamtasche im Röstkaffee angenommen werden, dann wurden davon nur 2,25 bis 2,92 % gelöst. Der Anteil an alkoholunlöslichen Stoffen war mit 0,5 bis 1,4 % gering.

Aus mittelfein gemahlene Röstkaffees wurden zwischen 18,4 und 24,1 % Gesamtextrakt erhalten. Die Mineral-

TABELLE 1

Extrakte aus Röstkaffee in Abhängigkeit von Mahlungsgrad und Zubereitungsweise

Bezeichnung des Röstkaffees und Zubereitungsweise	Extrakt %	Asche % im Extrakt	Verhältnis aus : Extr. zu Asche	Asche bezogen auf 4 %	Alkoholunlösliches bezogen auf	
					Extrakt	Röstkaffee
Röstkaffee, grob gemahlen						
Brühverfahren, 4 g/100 ml.....	14,9	19,6	5,1 : 1	2,92	4,0	0,6
Filtrationsverfahren 4 g/100 ml....	11,5	19,6	5,1 : 1	2,25	4,3	0,5
Druckfiltration 4 g/100 ml....	14,5	17,5	5,7 : 1	2,54	9,6	1,4
Röstkaffee, mittelfein gemahlen						
Brühverfahren, 4 g/100 ml....	19,6	15,8	6,3 : 1	3,10	8,2	1,6
Filtrationsverfahren 4 g/100 ml....	18,4	15,9	6,3 : 1	2,93	7,7	1,4
Druckfiltration 4 g/100 ml....	24,1	14,4	6,9 : 1	3,47	13,1	3,2
Röstkaffee, Melitta-fein gemahlen						
Brühverfahren, 4 g/100 ml....	22,0	16,6	6,0 : 1	3,65	10,1	2,3
Filtrationsverfahren 4 g/100 ml....	22,7	16,7	6,0 : 1	3,79	9,4	2,1
Druckfiltration 4 g/100 ml....	28,9	14,0	7,7 : 1	4,00	19,9	5,8

bestandteile betrugen darin nur zwischen 14,4 und 15,9 % oder auf Gesamtasche bezogen zwischen 2,93 und 3,47 %. Insgesamt wurde also eine wesentlich günstigere Auslaugung der Röstkaffees erreicht. Gleichzeitig waren auch die alkoholunlöslichen Substanzen auf 1,4 bis 3,22 % gestiegen.

Aus dem Melitta-fein gemahlenem Röstkaffee wurden unter den gleichen Bedingungen 22,0 bis 28,9 % Gesamtextrakt ermittelt. Die Aschegehalte lagen zwischen 14,0 und 16,7 % oder auf Gesamtasche von 4 % bezogen zwischen 3,64 und 4,0 %. Dabei waren die alkoholunlöslichen Substanzen noch weiter angestiegen. Sie bewegten sich zwischen 2,1 und 5,8 %.

Nach diesen Untersuchungsergebnissen kommt es nicht allein auf den Röstkaffee an, also z.B. auf die darin vorliegenden Sorten, den Röstgrad und eventuell die Bearbeitungsart, sondern zumindest im gleichen Masse auf die Art der Getränkebereitung sowie den Mahlungsgrad des Röstkaffees. Ob Röstkaffee günstig oder schlecht ausgenutzt wird, hängt damit allein vom Verbraucher ab. Wenn jedoch die Extraktausbeute sehr unterschiedlich sein kann, wie diese Beispiele zeigen, dann stellt sich die Frage, inwieweit die Zubereitungsweisen den Genusswert und die Bekömmlichkeit eines Kaffees bzw. eines Kaffeegetränkes mitbestimmen.

Die Faktoren, die den Genusswert der Kaffeegetränke ausmachen, lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen :

1. Faktoren, die ausschliesslich vom Kaffeeröster bestimmt werden, wie die Auswahl der Rohkaffees und das Mischungsverhältnis der verschiedenen Sorten, ferner die Bearbeitung der Roh- oder Röstkaffees sowie, Röstart und Röstgrad.

2. Faktoren, die weitgehend bis ausschliesslich vom Verbraucher bestimmt werden. Hierbei handelt es sich insbesondere um solche, die auf das Getränk von Einfluss sind, also Röstkaffeemenge, Vermahlungsgrad, Zubereitungsweise, Wassertemperatur und Ziehzeit.

Die organoleptische Prüfung der Röstkaffees oder anders ausgedrückt die Feststellung des Genusswertes gehört zu den wesentlichen Aufgaben eines Kaffeerösters. Diese Prüfung wird allegemein auch sehr gewissenhaft und gründlich vorgenommen. Diese subjektive Aussage über den Genusswert eines Kaffeegetränkes kann jedoch nur als Ausdruck der zufällig gewählten Prüfungsbedingungen gewertet werden. Eine verbindliche Aussage für den Verbraucher stellt sie nicht dar. Um auch diesem die Möglichkeit zu geben, Aufgüsse mit optimalen Geruchs- und Geschmackseigenschaften bereiten zu können, lässt sich allein durch Verknüpfung der organoleptischen Beurteilung mit analytischen Kennzahlen erreichen. Über diese Verbindung kann eine gewisse Gleichmässigkeit des Röstgrades und besonders der Kaffeegetränke garantiert werden.

Bei normalen handelsüblichen Röstkaffees sind keine Hinweise auf die Bereitung von Kaffeegetränken mit höchstem Genusswert üblich. Derartige Hinweise werden vom Verbraucher auch nicht erwartet. Anders sind jedoch Röstkaffees zu beurteilen, die als besonders bekömmlich angeboten werden. Bei solchen Röstkaffees müsste der Hersteller dafür Sorge tragen, dass der Verbraucher in ausreichender Weise darüber informiert wird, wie die Bereitung eines bekömmlichen Getränkes aus dem Röstkaffee zu erfolgen hat. Diese

Notwendigkeit folgt eindeutig aus den Untersuchungsergebnissen in Tabelle 1.

Die bessere Bekömmlichkeit wird mit ausgewählten Sorten, besonderer Röstführung und Bearbeitung der Kaffees vor bzw. nach dem Rösten begründet. Die handelsüblichen Röstkaffees denen eine bessere Bekömmlichkeit zugeschrieben wird, lassen sich etwa in folgende Gruppen aufgliedern :

1. Röstkaffees aus natürlichen, unbehandelten, normal gerösteten Kaffeebohnen ausgewählter Provenienzen.

2. Röstkaffees aus nach besonderen Verfahren gedämpften Rohkaffees jeder Art und Sorte.

3. Röstkaffees aus aerotherm gerösteten Kaffeebohnen jeder Art und Provenienz.

4. Röstkaffees, die nach « neuartigen » Verfahren gewonnen wurden.

5. Röstkaffees jeder Art und Provenienz, die mit flüssiger Kohlensäure unter bestimmten Bedingungen gewaschen wurden.

Diese Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie zeigt jedoch, dass man sowohl aus unbehandelten und gedämpften Rohkaffees, unabhängig vom Röstverfahren und unabhängig von den Kaffeesorten und Provenienzen als auch durch spezielle Röstverfahren, wiederum unabhängig von den Kaffeesorten und Provenienzen zu bekömmlichen Röstkaffees gelangt. Zu Produkten mit ähnlichen Eigenschaften soll auch bereits das Behandeln von Röstkaffees jeder Art mit flüssiger Kohlensäure führen.

Ob sich die bessere Bekömmlichkeit dieser verschiedenen Röstkaffees in gleicher Weise ausdrückt, ist bisher nicht bekannt. Da in den Anpreisungen in der Regel keine bis höchstens unbedeutende Unterschiede gemacht werden, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest keine wesentlichen Unterschiede bestehen dürften. Danach würden Genusswert und Bekömmlichkeit weitgehend von denselben Faktoren beeinflusst bzw. bestimmt. Somit müsste ein Röstkaffee von hohem Genusswert gleichzeitig sehr bekömmlich sein. Die Aufzählung veranschaulicht ausserdem, dass der Verbraucher völlig auf den Hersteller angewiesen ist ; denn weder auf die Auswahl der Kaffeesorten noch auf die Bearbeitung des Roh-oder Röstkaffees kann er Einfluss nehmen.

Hinweise auf die Bekömmlichkeit setzen voraus, dass diese auf entsprechende Untersuchungsergebnisse gestützt werden. Eine objektive Beurteilung der Bekömmlichkeit von Röstkaffee-Auszügen dürfte überhaupt erst über eingehende medizinische Prüfungen in Verbindung mit chemischen Untersuchungen gelingen. Unabhängig davon, dass es bisher noch gar nicht eindeutig geklärt ist, ob die Bekömmlichkeit überhaupt in jedem Fall durch derartige Kaffeebehandlungen verbessert werden kann, bleibt zu prüfen, ob diese unabhängig oder doch weitgehend unabhängig von der Aufgussbereitung ist, oder ob sie im wesentlichen von den Faktoren abhängt, die allein der Verbraucher im Zusammenhang mit der Aufgussbereitung bestimmt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Kaffee-Bekömmlichkeit durchgeführt wurden. Eindeutig sind die Ergebnisse leider insbesondere deswegen nicht, weil die Zusammensetzung der Aufgüsse zu wenig Beachtung gefunden hat.

Genusswert und Bekömmlichkeit sind von der Art und Zusammensetzung der Kaffeesubstanzen im Getränk nicht zu trennen. Eine Anleitung zur Aufgussbereitung durch den Röster würde zwar noch keine Gewähr dafür bieten, dass der Verbraucher solche Anleitung auch befolgt, sie würde ihn aber zumindest aufklären und ihm erläutern, in welcher Weise — aufgrund der medizinischen Prüfungen — mit grösster Wahrscheinlichkeit auch von ihm ein Getränk mit der besonderen Bekömmlichkeit erreicht werden kann.

Mit den Beispielen in Tabelle 1 wurde bereits die Abhängigkeit der Aufgusstärke von der Zubereitungsweise angesprochen. Der Gesamtextrakt in Kaffeeaufgüssen wird von verschiedenen, unter den Aufgussbedingungen mehr oder minder vollständig herausgelösten Kaffeesubstanzen bestimmt. Mit diesen Substanzen oder besser Substanzgruppen, wie z.B. Mineralbestandteilen, Koffein, Chlorogensäuren, erfährt die Gesamtmenge und das Verhältnis aus Gesamtextrakt und wertgebenden Stoffen mehr oder minder deutliche Verschiebungen. Dies trifft z.B. auch für die sauren Bestandteile zu, die mit dem Aufgusswasser herausgelöst werden. Ein Einblick in die sauren Kaffeesubstanzen lässt sich dadurch gewinnen, dass Kaffeeaufgüsse unter vergleichbaren Bedingungen mit Alkali neutralisiert bzw. auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt werden. Bewährt hat sich bei uns, die Kaffee-Zubereitungen auf den pH-Wert 7 zu titrieren.

In Tabelle 2 werden Untersuchungsergebnisse wiedergegeben, die an Extrakten aus verschiedenen Röstkaffees gewonnen wurden. In den Kaffee-Zubereitungen, sowie den nach dem Eindampfen mit Wasser wieder gelösten Rückständen wurden die pH-Werte und die mit n/100 Natronlauge titrierbaren sauren Substanzen ermittelt.

Die Aufgüsse wurden nach dem Filtrationsverfahren aus verschiedenen Mengen der gemahlenen Röstkaffees hergestellt. Obgleich die Aufgüsse unter gleichen Bedingungen bereitet wurden, ergaben sich bei den Extrakten recht bemerkenswerte Unterschiede. Hierin zeigt sich nicht nur, dass die mit dem Aufgusswasser herausgelösten Substanzen vom Verhältnis aus Röstkaffee und Wasser abhängen und mit steigender Röstkaffeemenge sogar deutlich abnehmen, sondern dass bereits unbeabsichtigte geringe Änderungen in den Aufgussbedingungen auf den Extraktgehalt von Einfluss sein können. In den Aufgüssen aus den sogen. « säurearmen » Röstkaffees bewegten sich die Extrakte in

gleicher Höhe wie in den Auszügen aus normale Röstkaffees. Auf die pH-Werte der Aufgüsse wirkten sich die geringen Unterschiede allerdings praktisch nicht aus. Die Aufgüsse wurden mit n/100 Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Die hierfür benötigte Lauge nahm allgemein mit den Kaffeemengen ab, die ausgelaugt wurden. Zur Einstellung der Aufgüsse aus Röstkaffee und Wasser wie 1 : 50 auf pH 7 wurde — auf jeweils 1 g Extrakt bezogen — mehr Natronlauge benötigt als für die Aufgüsse aus Röstkaffee und Wasser wie 1 : 10. Die extraktärmeren Zubereitungen wiesen also meist mehr saure Bestandteile auf als die extraktreicheren. Die Röstkaffeezubereitungen werden danach mit steigender Röstkaffeemenge immer milder. Interessant ist dabei jedoch, dass dies nicht für alle Röstkaffees zutrifft. Nach den Beispielen in Tabelle 2 werden auch Röstkaffees angetroffen, bei denen die freien titrierbaren sauren Kaffeebestandteile vom Röstkaffee-Wasser-Ver-

TABELLE 2

pH-Werte und titrierbare saure Bestandteile — als Essigsäure berechnet — in Auszügen aus handelsüblichen Röstkaffees vor und nach dem Eindampfen

Bezeichnung u. Zubereitung	Extrakt %	Zubereitungen					
		vor Eindampfen			nach Eindampfen		
		pH-Wert	ml n/100 NaOH/g Extrakt	mg Essigsäure/g Extrakt	pH-Wert	ml n/100 NaOH/g Extrakt	mg Essigsäure/g Extrakt
1. Röstkaffee-Mischung							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	26,70	4,91	71,9	43,1	6,30	17,6	10,6
4 g/100 ml..	25,60	4,95	61,5	36,9	5,80	23,1	13,9
6 g/100 ml..	24,80	4,95	60,9	36,5	5,74	22,6	13,5
8 g/100 ml..	26,15	4,96	56,4	33,8	5,61	24,0	14,4
10 g/100 ml..	23,15	4,96	58,3	35,0	5,27	36,3	21,8
2. Röstkaffee-Mischung							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	22,9	5,17	61,7	37,0	6,42	9,2	5,5
4 g/100 ml..	23,55	5,19	53,8	32,9	6,40	9,6	5,7
6 g/100 ml..	22,30	5,18	51,3	30,8	5,95	18,7	11,2
8 g/100 ml..	21,5	5,16	50,2	30,1	5,61	26,5	15,9
10 g/100 ml..	19,0	5,15	51,1	30,6	5,61	26,0	15,6
3. Röstkaffee-Mischung							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	23,3	5,22	49,8	29,9	6,45	9,4	5,6
4 g/100 ml..	22,5	5,12	50,7	30,4	6,21	12,9	7,7
6 g/100 ml..	23,95	5,15	48,2	28,9	5,77	20,0	12,0
8 g/100 ml..	20,9	5,13	50,3	30,2	5,67	22,7	13,6
10 g/100 ml..	22,0	5,13	48,1	28,9	5,53	26,5	15,9
4. Röstkaffee « säurearm »							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	24,28	4,99	65,7	39,4	6,50	11,0	6,6
4 g/100 ml..	23,88	5,01	56,7	34,0	6,02	18,1	10,9
6 g/100 ml..	22,66	5,04	56,3	33,8	5,67	24,0	14,4
8 g/100 ml..	20,56	5,03	56,1	33,7	5,48	29,1	17,5
10 g/100 ml..	17,72	5,03	55,6	33,4	5,48	28,9	17,3
5. Röstkaffee « säurearm »							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	25,26	4,98	57,6	34,6	6,66	7,5	4,5
4 g/100 ml..	24,05	5,00	53,0	31,8	6,15	12,5	7,5
6 g/100 ml..	24,19	5,02	50,9	30,5	5,68	19,9	12,0
8 g/100 ml..	22,73	5,01	52,2	31,3	5,53	23,2	13,9
10 g/100 ml..	19,31	5,02	50,8	30,5	5,42	25,9	15,5
6. Röstkaffee « säurearm »							
Zubereitung aus 2 g/100 ml..	21,86	5,11	50,0	30,0	6,95	5,0	3,0
4 g/100 ml..	21,39	5,06	57,6	34,6	6,50	9,0	5,4
6 g/100 ml..	21,20	5,06	55,7	33,4	5,86	29,9	17,9
8 g/100 ml..	21,43	5,05	54,4	32,6	5,65	25,0	15,0
10 g/100 ml..	20,45	5,05	55,6	33,4	5,53	29,9	17,9

hältnis praktisch unabhängig sind. Für die extraktärmeren Aufgüsse wurde — auf jeweils 1 g Extrakt bezogen — nicht mehr Natronlauge zur Einstellung auf pH 7 benötigt als für die extraktreicheren Auszüge. Zwischen « normalem » und sogen. « säurearmem » Röstkaffee bestanden in dieser Beziehung keine deutlichen Unterschiede.

Wenn die titrierbaren sauren Bestandteile — auf jeweils 1 g Extrakt bezogen — zugrunde gelegt werden, dann können aus jedem normal gerösteten Kaffee geschmacklich milde Zubereitungen hergestellt werden. Hierbei gilt als Voraussetzung, dass das Röstkaffee-Wasser-Verhältnis etwa 1 : 10 gewählt wird. Unabhängig davon, ob diese Unterschiede im Gehalt an sauren Bestandteilen mit der Kaffeesorte oder deren Herkunft im Zusammenhang stehen oder ob sich hier allein Röstführung und Röstgrad auswirken, lassen sich andererseits sicher Röstkaffees herstellen, deren wasserlösliche Extraktstoffe — zumindest bei den hier geprüften Konzentrationen — sich im Gehalt an sauren Bestandteilen nicht bzw. nur geringfügig unterscheiden. Sofern die sauren Kaffeebestandteile eine Beziehung zur Bekömmlichkeit haben, müsste Röstkaffees mit den wenigsten sauren Bestandteilen und den geringsten Schwankungen bei verschiedenen Kaffee-Konzentrationen der Vorzug gegeben werden. Bei solchen Röstkaffees könnte dann sogar auf Angaben über die Zubereitung bekömmlicher Aufgüsse verzichtet werden.

In Tabelle 3 sind Röstkaffees zusammengestellt, die eine Bearbeitung erfahren hatten. Die Untersuchungen erstreckten sich ebenfalls auf die sauren Bestandteile.

Die Zusammenstellung zeigt, dass zwischen handelsüblichen Röstkaffees aus unter verschiedenen Bedingungen bearbeiteten Rohkaffees und solchen aus unbearbeiteten, wie sie in Tabelle 2 aufgeführt wurden, in der Regel keine sehr wesentlichen Unterschiede bestehen. Interessant ist auch an diesen Beispielen, dass für jeweils 1 g Extrakt, unabhängig von der eingesetzten Röstkaffeemenge nur wenig unterschiedliche Mengen an ml n/100 Natronlauge zur Einstellung auf pH 7 benötigt wurden. Dies gilt sowohl für Röstkaffees aus gedämpften als auch fur solche aus koffeinfreien Rohkaffees.

Hiernach kann sich z.B. die Rohkaffeebearbeitung mit Wasserdampf — unabhängig von der Kaffeesorte und deren Herkunft — u.a. darin ausdrücken, dass aus Röstkaffee und Wasser wie 1 : 50 bis 10 Zubereitungen erhalten werden, fur deren Einstellung auf pH 7 ähnliche Mengen an n/100 Natronlauge — bezogen auf 1 g Extrakt — benötigt werden. Vielleicht wirkt sich die Rohkaffeedämpfung in dieser Richtung günstig aus. Untersuchungen darüber, ob eine Dämpfung auch bei solchen Kaffees eine Wirkung zeigt, die bereits nach normalem Rösten, unabhängig von der eingesetzten Röstkaffeekonzentration, milde Getränke ergeben, sind noch nicht abgeschlossen.

Bei der Getränkebereitung bleiben mindestens 70 %, oftmals sogar 80 % und mehr als Kaffeesatz zurück, wenn die im Röstkaffee vorliegenden wasserlöslichen Kaffeesubstanzen nicht vollständig ausgenutzt werden. Mit einer ungünstigen Ausnutzung ändert sich jedoch nicht allein der prozentuale Anteil an wasserlöslichen Stoffen und damit das Verhältnis aus Gesamtextrakt zu wertgebenden Substanzen, wie Mineralbestandteile und Koffein, sondern auffallenderweise kann bei verschiedenen Zubereitungsweisen sowohl die Reaktion des Getränks als auch der Anteil an ml n/100 Natronlauge

TABELLE 3

pH-Werte und titrierbare saure Bestandteile — als Essigsäure berechnet — in Auszügen aus bearbeiteten Röstkaffees vor und nach dem Eindampfen

Bezeichnung u. Zubereitung	Extrakt %	Zubereitungen					
		vor Eindampfen			nach Eindampfen		
		pH-Wert	ml n/100 NaOH/g Extrakt	mg Essigsäure/g Extrakt	pH-Wert	ml n/100 NaOH/g Extrakt	mg Essigsäure/g Extrakt
1. **Röstkaffee, koffeinfrei**							
Zubereitung aus 2 g/100 ml.	22,5	4,88	64,0	38,4	6,25	20,5	12,3
10 g/100 ml.	20,6	4,88	64,2	38,5	5,16	45,0	27,0
2. **Röstkaffee, « veredelt »**							
Zubereitung aus 2 g/100 ml.	22,3	5,03	55,1	33,1	6,79	6,2	3,7
10 g/100 ml.	21,9	5,04	54,0	32,4	5,38	34,4	20,6
3. **Röstkaffee, « sâurefrei »**							
Zubereitung aus 2 g/100 ml.	20,9	5,06	66,7	40,0	6,40	13,3	8,0
10 g/100 ml.	14,0	5,06	62,6	37,6	5,40	31,7	19,0

TABELLE 4

pH-Werte und titrierbare saure Bestandteile in nach verschiedenen Verfahren hergestellten Zubereitungen

Aufgussbereitung aus 8 g/150 ml	Extrakt %	Asche im Extrakt %	Verhältnis aus: Extr. : Asche	pH-Wert	ml n/100 Natronlauge bis pH 7 bezogen auf :	
					100 ml	g Extrakt
1. **Röstkaffee, fein gemahlen**						
Brühverfahren	21,0	16,8	6,0 : 1	5,05	77,2	68,0
Filtrationsverfahren	26,5	14,1	7,1 : 1	4,95	78,1	55,4
Druckfiltration	28,9	12,7	7,9 : 1	4,98	79,8	50,2
2. **Röstkaffee, mittelfein gemahlen**						
Brühverfahren	19,7	15,7	6,4 : 1	5,10	71,8	68,4
Filtrationsverfahren	23,3	13,7	7,3 : 1	5,10	75,6	60,0
Druckfiltration	26,1	13,7	7,3 : 1	5,10	74,2	53,4

zur Einstellung des pH 7 Beeinträchtigungen erfahren. In Tabelle 4 sind dafür einige Beispiele zusammengefasst.

Unter den gewählten Bedingungen stiegen die Extraktausbeuten unabhängig vom Mahlungsgrad des Röstkaffees an. Dabei wiesen die nach dem Brühverfahren hergestellten Auszüge die geringsten und die nach dem Druckverfahren gewonnenen die höchsten Extraktmengen auf. Die bei der Druckfiltration günstigere Ausnutzung des Röstkaffees zeigt sich sowohl in den Aschewerten als im Verhältnis aus Gesamtextrakt und Asche. Die verschiedenen Aufgussverfahren können sich auf die pH-Werte auswirken. Sie können allerdings auch ohne Einfluss bleiben. An den sauren Bestandteilen drücken sich die verschiedenen Verfahren in der Regel nur geringfügig aus, wenn die Natronlaugemenge als Beurteilungsmasstab gewählt wird, die zur Einstellung der Auszüge auf pH 7 erforderlich ist. Wird jedoch auf 1 g Extrakt umgerechnet, dann ergibt sich ein völlig verändertes Bild. Um pH 7 zu erreichen, musste für 1 g Extrakt aus dem nach dem Brühverfahren zubereiteten Getränk, unabhängig von Mahlungsgrad und der Röstkaffeesorte, die meiste Natronlauge aufgewendet werden. Die kleinste Menge war für die Extrakte aus den druckfiltrierten Aufgüssen erforderlich. Hieraus könnte der Eindruck entstehen, dass die Druckfiltration geschmacklich mildere Zubereitungen liefert als das Filtrations- oder das Brühverfahren.

Unabhängig davon, ob die sauren Substanzen in Kaffeeaufgüssen in einer Beziehung zur Bekömmlichkeit stehen, veranschaulichen diese Beispiele, dass es nicht allein auf das Röstkaffee-Wasser-Verhältnis ankommt, sondern dass auch das Zubereitungsverfahren Beachtung finden muss.

Selbstverständlich ermöglichen weder die pH-Werte noch die titrierbaren sauren Bestandteile allein eine ausreichende Beurteilung von Kaffeegetränken.

Recht umfassende Untersuchungen an Kaffee-Aufgüssen aus normalen und bearbeiteten Röstkaffees wurden von F. ALBANESE (1) durchgeführt. Die Aufgüsse wurden aus Röstkaffee und Wasser wie 1 : 20 nach dem Brühverfahren bei 10 Minuten Ziehzeit hergestellt. Mit Tabelle 5 wird zu den von F. ALBANESE (1) mitgeteilten Untersuchungsergebnissen eine kurze Erläuterung gegeben.

TABELLE 5

Untersuchungen an Aufgüssen aus Röstkaffees verschiedener Bearbeitung

Bezeichnung	Normaler koffeinhaltiger Columbia-Kaffee	Gedämpfter koffeinhaltiger Columbia-Kaffee	Koffeinfreier Columbia-Kaffee	Kohlensäure behandelter koffeinhaltiger Columbia-Kaffee
Extrakt : Asche	8,4 : 1	8,1 : 1	7,6 : 1	8,8 : 1
ml n/100 NaOH/g Extrakt bis pH 6,7.	46,4	46,0	49,5	46,6
pH-Wert	5,95	5,85	5,78	6,01
Ätherlösliche Substanz in % bezogen auf Extrakt	5,0	4,5	3,4	5,1

Diese kurze Zusammenstellung zeigt, wie schwierig aus Röstkaffees etwa gleichen Röstgrades Aufgüsse gleichen Extraktgehaltes zu gewinnen sind. Die Aufgüsse wurden bis pH 6,7 mit Natronlauge titriert. Die Extrakte aus normalen, gedämpften und mit Kohlensäure behandelten Röstkaffees verhielten sich hierbei etwa gleich. Für den Extrakt aus dem koffeinfreien Röstkaffee ergaben sich jedoch mehr saure Stoffe. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass, bedingt durch die entzogenen Stoffe, der Extrakt aus koffeinfreiem Kaffee sich zwangsläufig anders verhalten muss. Nach F. ALBANESE (1) sind für die Unterscheidung zwischen gedämpften koffeinhaltigen und unbehandelten Röstkaffees die ätherlöslichen Substanzen besonders wichtig. Aus Aufgüssen gedämpfter Röstkaffees wurde weniger ätherlösliche Substanz erhalten als aus solchen normaler Röstkaffees. Am geringsten waren die abgeschiedenen Substanzmengen für Aufgüsse aus koffeinfreien Kaffees. Dies ist wiederum verständlich, wenn die Bearbeitung bedacht wird. Es müssten sich also deutliche Unterschiede in den Substanzmengen ergeben, wenn davon ausgegangen wird, dass solche Substanzen beim Dämpfen bzw. Entkoffeinieren entfernt bzw. verändert werden und dadurch nicht mehr in den Aufguss gelangen können. Nach K. MÜLHENS und L. RIECKMANN (2) üben bearbeitete Röstkaffees eine wesentlich geringere Reizwirkung auf die Magenschleimhaut aus.

Nach den analytischen Feststellungen sollen durch die Bearbeitung gewisse beschwerdeerregende, schwer verträgliche Begleitstoffe entfernt bzw. abgebaut und ausserdem der Gehalt an Chlorogensäure vermindert werden, so dass die bearbeiteten Kaffees für viele Kaffee-Empfindliche als gut verträglich, besser bekömmlich und reizarm bezeichnet und empfohlen werden können.

Für die Bearbeitung sind nach diesen Äusserungen alle Rohkaffees gut geeignet. Eine Einschränkung besteht nur darin, dass man zweckmässigerweise von Natur aus milde Sorten bevorzugen sollte.

Nach den mitgeteilten Untersuchungsergebnissen von K. MÜLHENS und L. RIECKMANN (2) sind die Unterschiede zwischen bearbeiteten und unbearbeiteten Rohkaffees so gross, dass hieraus auf eine merkbare Beeinflussung einer Substanzgruppe in den Rohkaffees unter den Bearbeitungsbedingungen geschlossen werden muss. Sofern die von F. ALBANESE (1) mitgeteilten Untersuchungsergebnisse zugrunde gelegt werden, sind die Unterschiede für solche Kaffees beinahe unbedeutend. Hierbei bleibt jedoch zu beachten, dass die Arbeitsweisen verschieden waren und sicher auch andere Kaffees vorgelegen haben.

Diese wenigen Beispiele lassen erkennen, dass die ätherlöslichen Substanzen nicht ohne erhebliche Einschränkungen als Beurteilungsmerkmal für die Bekömmlichkeit eines Kaffees gelten können. Hier -für dürften nicht nur Bearbeitungsweise und -bedingungen eine wichtige Rolle spielen, sondern auch wieder die Getränke selbst, die aus solchen Röstkaffees bereitet werden. Auf diese muss es sogar in besonderem Masse ankommen, wenn die Feststellungen von G. CZOK und K.LANG (3) allgemein zutreffen. In Versuchen an einer grösseren Zahl von Ratten wurde von diesen beobachtet, dass sich ungefilterte Kaffeegetränke von gefilterten deutlich unterschieden. Die Ergebnisse waren reproduzierbar und konnten statistisch einwandfrei gesichert werden. Danach soll gefilterter Kaffee das Zentralnervensystem wesentlich mehr schonen als ungefilterter. Durch das Filtern werden hiernach dem Kaffeegetränk Substanzen entzogen, die für die genannten Wirkungen verantwortlich sind. Da diese beim Filtern des Kaffees im Kaffeerückstand verbleibenden Substanzen mit Fettlösungsmitteln leicht herausgelöst werden konnten, entstand der Verdacht, dass die beobachteten Wirkungen von beim Röstprosess oxydiertem Kaffeeöl ausgehen könnten.

Bei pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen drücken sich oxydative Veränderungen u.a. in einer mehr oder minder deutlichen Braunfärbung aus, wenn die Fette mit alkoholischer Kalilauge erhitzt werden. Über diese einfache auf bestimmte Carbonylverbindungen ansprechende Reaktion lassen sich oxydative Veränderungen, insbesondere an erhitzten Fetten, verhältnismässig schnell und sicher erkennen. Beim Kaffeeöl liegen die Verhältnisse nicht so einfach, wenn von Röstkaffeeöl ausgegangen wird. Die starke Eigenfärbung des Röstkaffeeöls beruht nämlich nicht auf oxydativen Fettveränderungen, wie manchmal fälschlich angenommen wird, sondern auf während des Röstprozesses entstandenen mehr oder minder flüchtigen Aromastoffen, die mit dem Kaffeeöl gemeinsam abgeschieden werden.

Die beim Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge auftretende Braunfärbung zeigt damit beim Kaffeeöl auch keine oxydativen Fettveränderungen an. Die Extinktion fur die Alkalifärbung kann jedoch als Mass angesehen werden für z.B. die Carbonylverbindungen, die durch den Röstprozess in einem Kaffee entstehen und unter den gewählten Bedingungen mit Alkali reagieren. Da sich aber diese Substanzen mit Wasser zumindest teilweise aus dem Röstkaffee herauslösen lassen, ist es über die Alkali-Reaktion möglich abzuschätzen, wie sich die in Aufgüssen vorliegenden petroläther- bzw. ätherlöslichen Substanzen verhalten. In Tabelle 6 sind Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die an einer Kaffeemischung aus Columbia-, Salvador-, Mexico- und Costarica-Kaffee gewonnen wurden. Die Kaffeemischung wurde normal, kern- und aerotherm geröstet. Bei allen Röstverfahren wurde versucht, auf den gleichen Röstgrad einzustellen.

Nach diesen Untersuchungen waren in dem aerotherm-gerösteten Kaffee weniger lösliche saure Stoffe als in dem normal- und kerngerösteten. Am günstigsten erwies sich der normal geröstete Kaffee. Die Extinktionen für die Braunfärbung der PAe-Extrakte lagen

TABELLE 6

Untersuchungen an einer Kaffeemischung auf saure Bestandteile und das Verhalten des extrahierten Kaffeeöls gegen alkoholische Kalilauge

Bezeichnung	Kaffeemischung		
	Normalröstung	Kernröstung	Aerothermröstung
pH-Wert			
Zubereitung 4 g/100 ml	5,04	5,15	5,10
10 g/100 ml	5,05	5,15	5,10
Extraktmenge			
Zubereitung 4 g/100 ml	20,8	23,6	25,9
10 g/100 ml	21,8	22,6	24,3
ml n/100 Natronlauge bis pH 7			
Zubereitung 4 g/100 ml	46,6	48,0	48,6
10 g/100 ml	121,4	116,8	116,0
ml n/100 NaOH für 1 g Extrakt bis pH 7			
Zubereitung 4 g/100 ml	56,1	50,9	47,2
10 g/100 ml	55,2	51,6	47,7
Petroläther-Extrakt			
$E^{100\ \%}$ 1 cm, S 47 E	13,65	15,45	15,75
$E^{100\ \%}$ 1 cm, S 47 E nach Filtration über Kieselgel	0,75	0,85	0,65

TABELLE 7

Untersuchungen an gedämpftem Kaffee auf saure Bestandteile und das Verhalten des extrahierten Kaffeeöles gegen alkoholische Kalilauge

Bezeichnung	Behandelte Kaffeemischung		
	Normalröstung	Kernröstung	Aerothermröstung
pH-Wert			
Zubereitung 4 g/100 ml	5,20	5,32	5,16
10 g/100 ml	5,20	5,32	5,19
Extraktmenge			
Zubereitung 4 g/100 ml	21,4	21,7	22,2
10 g/100 ml	19,1	21,2	18,9
ml n/100 Natronlauge bis pH 7			
Zubereitung 4 g/100 ml	43,2	41,0	44,4
10 g/100 ml	99,8	100,4	98,0
ml n/100 Natronlauge für 1 g Extrakt bis pH 7			
Zubereitung 4 g/100 ml	50,2	47,1	50,1
10 g/100 ml	52,2	47,4	51,8
Petroläther-Extrakt			
$E^{100\ \%}$ 1 cm, S 47 E	20,3	17,75	19,25
$E^{100\ \%}$ 1 cm, S 47 E nach Filtration über Kieselgel	n. b.	1,70	1,65

zwischen 13,65 bis 15,75. Sie unterschieden sich damit voneinander nicht wesentlich und sie bewegten sich ausserdem in der Grössenordnung, die für Kaffeeöle sehr häufig angetroffen wird. Die niedrigste Extinktion wurde allerdings für das Kaffeeöl aus dem normal gerösteten Kaffee erhalten, die höchste für das Öl aus dem aerotherm-gerösteten.

Sobald Röstkaffee-Öl über Kieselgel filtriert wird, zeigt sich, dass die hohe Extinktion auf im Öl gelöste Substanzen zurückzuführen ist und nicht auf oxydativen Veränderungen beruht. Die filtrierten Kaffee-Öle wiesen kaum noch Unterschiede im Verhalten gegen alkoholische Kalilauge auf.

Die Rohkaffee-Mischung wurde unter Bedingungen, wie sie beim Lendrichverfahren üblich sind, gedämpft. In Tabelle 7 sind Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die an Röstkaffees aus diesem behandelten Rohkaffee gewonnen wurden.

Bereits die pH-Werte zeigen den Einfluss der Röstung. Sie waren höher und ausserdem waren zur Einstellung der Aufgüsse auf pH 7 etwas geringere Natronlaugemengen erforderlich. Allgemein erschienen die Aufgüsse aus den bearbeiteten Röstkaffees etwas milder.

In den Extinktionen für die Alkalifärbung der PAe-Extrakte unterschieden sich die behandelten Röstkaffees nur wenig. Deutlich war der Unterschied dagegen zu den Extinktionen für die PAe-Extrakte aus den unbehandelten Röstkaffees. Unerwartet war, dass sämtliche Extinktionen für die PAe-Extrakte aus den behandelten Röstkaffees bedeutend höher lagen als die Extinktionen für die Braunfärbung der Öle aus den unbehandelten Röstkaffees. Nach dem Filtrieren der Kaffeeöle über Kieselgel bestanden zwischen den Ölen aus dem unbehandelten und dem behandelten Kaffee nur noch unwesentliche Unterschiede.

Insgesamt muss jedoch aus diesen Untersuchungen gefolgert werden, dass sich die Röstbedingungen auf behandelte Rohkaffees anders auswirken als aus unbehandelte. Die Abnahme der sauren Substanzen und die Zunahme der mit alkoholischer Kalilauge reagierenden im Kaffeeöl gelösten Bestandteile muss im vorliegenden Falle als eine Folge der Rohkaffeebehandlung angesehen werden.

Nach K. MÜLHENS und L. RIECKMANN (2) hängt — wie bereits erwähnt wurde — die Bekömmlichkeit von Röstkaffeeauszügen — zumindest teilweise — von den

ätherlöslichen Substanzen ab. Daraus könnte auch abgeleitet werden, dass für die Bekömmlichkeit und vielleicht auch für den Genusswert der Kaffee-Aufgüsse in den Kaffeeölen gelöste Substanzen bedeutsam sind, die beim Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge sich braun färben und deren Menge durch Messung der Extinktion für diese Braunfärbung ungefähr ausgedrückt werden kann. Diesen Substanzen kann andererseits jedoch wiederum nur insoweit Bedeutung zukommen als sie bei der Aufgussbereitung mit dem Aufgusswasser herausgelöst werden. Um einen Einblick in die Löslichkeit dieser Substanzen zu bekommen, wurde zunächst vom PAe-Extrakt aus den Röstkaffees die Alkalifärbung gemessen. Danach wurde gemahlener Röstkaffee nach dem Filtrationsverfahren ausgezogen und der ausgelaugte Rückstand nach dem Verreiben mit wasserfreiem Natriumsulfat ebenfalls mit PAe extrahiert. Von diesem extrahierten Kaffeeöl wurde wiederum die Extinktion für die Alkalifärbung ermittelt. In Tabelle 8 sind Versuchsergebnisse zusammengestellt. Es wurden Röstkaffees verschiedener Provenienzen ausgewählt, die Kaffees waren ausserdem nach verschiedenen Verfahren geröstet und wiesen etwa den gleichen Röstgrad auf. Das Röstkaffee-Wasser-Verhältnis betrug 1 : 25. Es entsprach damit etwa dem Verhältnis, das bei haushaltsüblichen Kaffeezubereitungen häufig zugrunde gelegt wird.

Die ausgewählten Röstkaffees unterschieden sich im Gehalt an sauren Bestandteilen ganz eindeutig. Unterschiede bestanden ebenfalls in den Extinktionen für die Alkalifärbungen der PAe-Extrakte. Dabei wirkte sich das Röstverfahren nur wenig aus und ausserdem fanden sich keine Beziehungen zwischen sauren Kaffeebestandteilen und den Substanzen, die mit alkoholischer Kalilauge die Braunfärbung ergaben. Unter den gewählten Aufgussbedingungen wurden, wenn nur die Extinktionen betrachtet werden, sehr ähnliche Substanzanteile aus den Kaffeeölen mit dem Aufgusswasser ausgewaschen.

In Tabelle 9 sind Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die an Röstkaffees aus bearbeitetem Costarica-Rohkaffee gewonnen wurden. Der Rohkaffee wurde unter verschiedenen Bedingungen mit Wasserdampf behandelt bzw. einer Bearbeitung unterzogen, die hier « Spezialbehandlung » genannt werden soll. Darüber hinaus wurden in einzelnen Fällen beide Bearbeitungsweisen hintereinander angewandt. Die Rohkaffees wurden diesen Bearbeitungen unterzogen, um den Einfluss der Röstbedingungen auf die sauren Bestandteile sowie das Verhalten der Kaffee-Öle gegen alkoholische Kalilauge bei diesen bearbeiteten Röstkaffees beurteilen zu können. Jede der in Tabelle 9 genannte Bearbeitung hatte zu Röstkaffee geführt, aus dem geschmacklich mildere Getränke erhalten wurden als aus dem Röstkaffee des unbehandelten Rohkaffees.

Wenn Röstführung und Röstzeit, auf die in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden soll, berücksichtigt werden, dann besteht nach diesen

TABELLE 8

Saure Bestandteile in Kaffeezubereitungen und Extinktionen für die Alkalifärbung der Kaffeeöle

Bezeichnung	Ex rakt %	ml n/100 Natronlauge bis pH 7 bezogen auf		$E^{100\ \%}_{1cm,\ S\ 47\ E}$ im PAe-Extrakt aus	
		1 g Kaffee	1 g Extrakt	Röstkaffee	ausgelaugtem Kaffee
Salvador-Kaffee					
Normalröstung	24,25	10,9	45,0	13,94	8,55
Kernröstung	24,0	10,8	45,0	13,76	6,19
Aerothermröstung	24,05	11,8	49,1	14,55	5,81
Costarica-Kaffee					
Normalröstung	22,4	14,9	67,0	12,55	7,85
Kernröstung	21,8	14,3	65,6	13,60	7,17
Aerothermröstung	21,0	14,7	70,0	14,80	7,19
Tanganjika-Kaffee					
Normalröstung	23,9	12,7	53,1	14,11	6,50
Kernröstung	24,2	11,4	47,3	14,81	7,23
Columbia-Kaffee					
Normalröstung	20,35	13,45	66,1	9,15	8,31
Kernröstung	22,1	12,7	57,5	9,85	8,90
Aerothermröstung	21,4	13,7	63,9	11,36	8,50

TABELLE 9

Einfluss der Röstbedingungen auf behandelte Rohkaffees

Bezeichnung	Einbrand %	Extrakt %	pH-Wert	ml n/100 NaOH/g Extrakt	Farbtiefe $E^{100\ \%}_{1\ cm}$ 0,8 g Kaffee S 47 E (100 ml)	$E^{100\ \%}_{1\ cm}$ S 47 E bezogen auf Röstkaffee	$E^{100\ \%}_{1\ cm}$ S 47 E bezogen auf Kaffeesatz 10 g/100 ml
Costarica-Kaffee							
unbehandelt	13	26,7	5,0	53,9	0,710	14,8	10,0
1 Std. Dampfdruck 120° C	10	21,75	5,15	49,0	0,610	9,8	9,7
1 Std. Dampfdruck 140° C	10	25,4	5,2	45,0	0,818	10,8	12,7
1 Std. Dampfdruck 140° C	13	25,2	5,15	47,7	0,760	13,0	10,6
1 Std. Dampfdruck 150° C	n. b.	25,0	5,25	38,4	0,820	10,9	11,4
1 Std. Dampfdruck 150° C	11	23,4	5,1	49,8	0,661	9,3	9,7
Spezialbehandlung	15	27,4	5,3	40,9	0,837	11,75	7,5
1 Std. Dampfdruck 120° C, anschl. Spezialbehandlung	n. b.	24,6	5,3	37,8	0,790	9,9	8,75
— —	13	22,5	5,25	44,5	0,700	11,7	12,5
1 Std. Dampfdruck 150° C, anschl. Spezialbehandlung	13	22,5	5,3	42,0	0,718	10,8	11,4
1 Std. Dampfdruck 160° C, anschl. Spezialbehandlung	10	21,2	5,3	39,3	0,696	9,8	8,5

TABELLE 10

Alkalifärbungen der Petrolätherextrakte aus Kaffee-Aufgüssen

Bezeichnung	Kaffee-Mischung					
	Unbehandelt			Behandelt		
	Normal	Kern	Aerotherm-Röstung	Normal	Kern	Aerotherm-Röstung
Aufguss aus 10 g Röstkaffee u. 100 ml Wasser mit PAe extrahiert						
PAe-Extrakt bezogen auf Röstkaffee in %	0,060	0,033	0,056	0,076	0,106	0,045
PAe-Extrakt bezogen auf wasserlösliche Extrakte %	0,30	0,16	0,28	0,38	0,50	0,23
Alkalifärbung des Extraktes $E^{100\ \%}_{1\ cm}$ S 47 E	942	1.373	1.124	730	498	1.333
Chlorogensäure in %	3,6	3,4	3,3	3,3	3,3	3,1

Untersuchungsergebnissen kein grundsätzlicher Unterschied in der Wirkung der Behandlung auf die Kaffeebohnen. Die Beispiele zeigen aber andererseits, dass noch recht umfassende Untersuchungen erforderlich sind, um gesicherte Aussagen über die Bekömmlichkeit von Zubereitungen aus bearbeiteten Röstkaffees machen zu können. Auch diesen Extinktionen für die Braunfärbung der PAe-Extrakte kann entnommen werden, dass bei der Aufgussbereitung meist Substanzen aus dem Kaffeeöl herausgelöst werden, die die Reaktion mit Alkali geben.

Über die Substanzmengen, die beim Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge eine Umfärbung geben können, unterrichten die Beispiele in Tabelle 10. Eine Rohkaffeemischung wurde vor und nach der Wasserdampfbehandlung normal-, kern- und aerotherm-geröstet. Aus Röstkaffee und Wasser im Verhältnis 1 : 10 wurden Filtrationsaufgüsse hergestellt. Die Auszüge wurden anschliessend mit PAe ausgeschüttelt und in den Rückständen die Extinktionen für die mit alkoholischer Kalilauge entstandenen Braunfärbungen ermittelt.

Die Kaffee-Aufgüsse und damit auch die Röstkaffees waren im Chlorogensäuregehalt sehr ähnlich. Da bei der Aufgussbereitung etwa gleiche Mengen an Extraktstoffen herausgelöst wurden, können sich die untersuchten Kaffees im Röstgrad nur unwesentlich unterschieden haben. Unter den gewählten Bedingungen wurden aus den Aufgüssen — auf Röstkaffee bezogen — 0,033 % bis 0,106 % petrolätherlösliche Stoffe isoliert. Dcbei kam die geringste und die höchste Menge auf

den kerngerösteten Kaffee. Für diese PAe-Extrakte wurden Extinktionen für die Braunfärbungen zwischen 498 und 1373 errechnet. Leider sind die errechneten Extinktionen schlecht vergleichbar, weil die Extraktmengen und die Art der darin vorliegenden Substanzen hierbei eine bedeutsame Rolle spielen. Über die Art der Substanzen ist bisher noch nichts bekannt. Nach diesen bisherigen Untersuchungen scheint es jedoch so zu sein, dass in Kaffeeauszügen aus bearbeiteten Kaffees weniger Substanzen enthalten sind, die sich mit alkoholischer Kalilauge braun färben. Ob jedoch diese Substanzen überhaupt etwas mit der Bekömmlichkeit zu tun haben, müsste zunächst noch an weiteren Kaffeeaufgüssen und insbesondere an daraus isolierten Substanzen überprüft werden. Eine grosse Schwierigkeit liegt sicher darin, dass diese Substanzen in Kaffeeaufgüssen stets nur in sehr kleinen Mengen vorkommen.

Auch bei Aufgusszubereitungen nach dem Filtrationsverfahren werden mit PAe unterschiedliche Substanzmengen herausgelöst. Es ist verständlich, dass der petrolätherlösliche Anteil weitgehend vom Aufgussverfahren abhängt. Aus Röstkaffees verschiedener Art und Bearbeitung wurden zunächst die Kaffeeöle extrahiert und das Verhalten gegen alkoholische Kalilauge geprüft. Ausserdem wurden Aufgüsse nach dem Filtrations- und Brühverfahren bereitet, diese mit PAe extrahiert und die PAe-Extrakte in gleicher Weise untersucht. In Tabelle 11 sind Beispiele zusammengestellt.

Unter den gewählten Bedingungen wurden für die PAe-Extrakte aus den Röstkaffees Extinktionen für die beim Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge auftretende Braunfärbung zwischen 9,8 und 17,3 errechnet. In bearbeiteten Kaffees muss die Extinktion für die Alkalifärbung also durchaus nicht kleiner sein als in unbehandelten Röstkaffees.

Aus den nach dem Filtrationsverfahren gewonnenen Auszügen wurden mit PAe zwischen 0,043 % und 0,059 % Substanzen extrahiert. Für diese wurden Extinktionen zwischen 657 und 1256 errechnet. Aus diesen Extinktionen kann jedoch auch nur wenig abgeleitet werden, weil sie u.a. auch von den herausgelösten Mengen abhängen. Diese Substanzen werden z.B. durch Papierfilter bei den haushaltsüblichen Getränkezubereitungen nicht oder doch höchstens in ganz geringer Menge zurückgehalten, so dass sie durchaus die Bekömmlichkeit beeinträchtigen könnten.

Unter den gleichen Extraktionsbedingungen wurden aus den nach dem Brühverfahren bereiteten Getränken zwischen 0,52 % und 2,32 % petrolätherlösliche Substanzen gewonnen. Sie lagen also wesentlich höher als bei den filtrierten Auszügen. Die Extinktionen für die Alkalifärbung betrugen jedoch nur 49 bis 145. Hier zeigt sich, dass die Extinktionen ganz wesentlich von der extrahierten Menge abhängen. Ausserdem geht daraus noch hervor, dass diese Veränderungen nicht auf dem Fettanteil beruhen, der mit in die Aufgüsse geht, sondern allein von den Substanzen bestimmt wird, die mit Wasser aus dem Röstkaffee herausgewaschen werden. Röstkaffeeöl, das nach G. CZOK (4) ungünstige Wirkungen ausüben soll, kann in Brühaufgüssen nach diesen Untersuchungen doch in recht beachtlicher Menge vorkommen. Zu bemerken bleibt noch, dass das Brühverfahren recht häufig angewendet wird.

Soweit Aussagen über die Bekömmlichkeit von Röstkaffees auf Extrakte aus Auszügen gestützt werden, kommt es nicht auf die petrolätherlöslichen sondern auf die ätherlöslichen Stoffe an. In Tabelle 12 sind

TABELLE 11

Untersuchungen an PAe-Extrakten aus Röstkaffees und Kaffee-Auszügen

Bezeichnung	Röstkaffee			
	bearbeitet	bearbeitet	« säurearm »	normal
PAe-Extrakt aus Röstkaffee $E^{100\ \%}_{1\ cm,\ S\ 47\ E}$ ..	11,05	14,0	9,80	17,3
Kaffee-Zubereitung aus 10 g mit 100 ml nach Filtrationsverfahren				
PAe-Extrakt in %	0,048	0,059	0,055	0,043
$E^{100\ \%}_{1\ cm,\ S\ 47\ E}$	1.057	657	1.086	1.256
Kaffee-Zubereitung aus 10 g mit 100 ml nach Brühverfahren				
PAe-Extrakt in %	2,32	0,63	0,52	2,0
$E^{100\ \%}_{1\ cm,\ S\ 47\ E}$	49	98	145	69
Chlorogensäure	2,5	3,8	2,3	2,8

Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die an unbehandelten und behandelten Röstkaffees gewonnen wurden. In den Aufgüssen wurden sowohl die petroläther- als auch die ätherlöslichen Substanzmengen ermittelt.

TABELLE 12

Petroläther- und Ätherlösliches aus Getränken unbehandelter und behandelter Röstkaffees

Bezeichnung	Röstkaffee	
	unbehandelt	behandelt
PAe-Extrakt : $E^{100\ \%}_{1\ cm,\ S\ 47\ E.}$	9,75	8,50
Zubereitung aus 10 g/100 ml : Chlorogensäuren bezogen auf Röstkaffee	2,50	2,80
PAe-Extrakt		
bezogen auf Extrakt	0,34 %	0,16 %
bezogen auf Röstkaffee	0,072 %	0,36 %
Ae-Extrakt		
bezogen auf Extrakt	1,73	1,47
bezogen auf Röstkaffee	0,38	0,32

Nach dem Gehalt an Chlorogensäuren bestanden im Röstgrad keine wesentlichen Unterschiede. Die PAe-Extrakte aus den Röstkaffees verhielten sich auch gegen alkoholische Kalilauge sehr ähnlich. Die Getränke wurden unter gleichen Bedingungen aus jeweils 10 g Röstkaffee und 100 ml Wasser bereitet. Im Gehalt an petrolätherlöslichen Substanzen bestand jedoch ein deutlicher Unterschied. Danach sind durch die Bearbeitung durchaus Einwirkungen möglich, die sich auf die Menge der petrolätherlöslichen Substanzen auswirken. Mit Äther wurden aus den Aufgüssen höhere Extraktmengen erhalten. Zu beachten bleibt hier jedoch, dass die Unterschiede zwischen den Kaffees nur gering waren. Hiernach muss der ätherlösliche Substanzanteil in Getränken aus bearbeiteten Röstkaffees nicht unbedingt kleiner sein als der Anteil aus Getränken normaler Röstkaffees. Vor allem darf der Einfluss der Röstbedingungen und vielleicht auch der Einfluss der Kaffeesorten nicht unbeachtet bleiben. Hierüber liegen aber bis jetzt leider noch keine sehr umfassenden Untersuchungen vor. Darüber hinaus kommt es nicht nur auf die Mengen an, die mit den erwähnten Lösungsmitteln isoliert werden können, sondern es kommt auch auf die Zusammensetzung und das chemische Verhalten der extrahierbaren Stoffen an. In Tabelle 13 sind nochmals Untersuchungsergebnisse zusammengestellt, die an PAe- und Ae-Extrakten aus nach dem Filtrations- und dem Brühverfahren hergestellten Aufgüssen gewonnen wurden. Bei dem Röstkaffee handelte es sich um ein als « Diätkaffee » angebotenes Produkt.

TABELLE 13

Untersuchungen an PAe- und Ae-Extrakten aus Röstkaffee-Aufgüssen

Untersuchungen an einem sog. « Diätkaffee »	Untersuchungsergebnisse
Aufguss aus 10 g Kaffee mit 100 ml Wasser	
ml n/100 Natronlauge bis pH-7 für 100 ml...	98,0
ml n/100 Natronlauge bis pH-7 für 1 g Extrakt	42,0
Extraktgehalt in %	23,35
A. **PAe-Extrakt aus Aufguss 10 g/100 ml**	
nach dem Filtrationsverfahren in %.....	0,096
nach dem Brühverfahren in %.....	0,96
Farbreaktionen der PAe-Extrakte aus	
Filtrationsverfahren	keine
Brühverfahren	keine
B. **Ae-Extrakt aus Aufguss 10 g/100 ml**	
nach dem Filtrationsverfahren in %.....	0,37
nach dem Brühverfahren in %	1,33
Farbreaktionen der Ae-Extrakte aus	
Filtrationsverfahren	keine
Brühverfahren	keine
Fettsäuren in Extrakten	
A. PAe-Extrakt : aus Filtrationsaufguss	23 %
PAe-Extrakt : aus Brühaufguss	71,1 %
B. Ae-Extrakt : aus Filtrationsaufguss	8,6 %
Ae-Extrakt : aus Brühaufguss	63,6 %
Farbreaktion der Fettsäuren aus	
PAe-Anteil	keine
Farbreaktionen der Fettsäuren aus Ae-Anteil	keine

Nach den sauren Bestandteilen in dem Aufguss aus Röstkaffee und Wasser wie 1 : 10 konnte der Röstkaffee als geschmacklich mild bezeichnet werden. Unter den gewählten Bedingungen waren nur 42 ml n/100 Natronlauge zur Einstellung von 1 g Extraktstoffen in diesen Aufgüssen auf pH 7 erforderlich. Aufgüsse dieser Konzentration wurden mit PAe und Ae extrahiert. Aus den verschiedenen Aufgüssen wurden mit Ae die höchsten Extrakte erhalten. Aus sämtlichen Extrakten wurden in bekannter Weise die Fettsäuren isoliert. Daraus errechneten sich für die PAe- und Ae-Extrakte aus den Filtrationsaufgüssen sehr ähnliche Mengen. Die Extraktstoffe aus den Brühaufgüssen bestanden zu 2/3 bis 3/4 aus Fettsäuren. Hieraus folgt, dass es sich bei den höheren Extraktmengen im wesentlichen um Kaffeeöle handelt. Kaffeeöle aus Roh- und Röstkaffee zeigen bestimmte Reaktionen, die den Nachweis kleinster Kaffeeölmengen ermöglichen. Auf die Farbreaktionen soll in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden. Die Extrakte aus den Aufgüssen ergaben diese Farbreaktionen allerdings nicht. Damit können die Auszüge auch nicht mit Kaffeeöl gleich gesetzt werden. Die Fettsäuren wurden nach dem Abscheiden des Unverseifbaren mit PAe extrahiert. In den sauren

Lösungen schieden sich dabei grünlich-braune bis schwarz-braune feste Substanzen ab. Diese Substanzen werden in allen Röstkaffeeaufgüssen angetroffen, unabhängig davon, ob es Aufgüsse aus normalen oder bearbeiteten Kaffees und unabhängig davon, ob die Aufgüsse mit PAe oder mit Ae ausgezogen werden. Unterschiede bestehen nur in den Mengen und dem Aussehen der Substanzen. Auf Einzelheiten kann in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden. Sofern jedoch zwischen den mit PAe oder Ae aus Röktaffeeaufgüssen extrahierbaren Substanzen und der Bekömmlichkeit des Röstkaffees eine Verbindung angenommen werden muss, dann ist es auch nach den bisherigen Untersuchungen an diesen Substanzen erforderlich, dem Verbraucher genaue Angaben über die Zubereitung eines bekömmlichen Getränkes aus einem bestimmten Röstkaffee zu machen.

Dem Verbraucher kommt es weniger aus den Röstkaffee an als auf die Getränke, die sich unter üblichen Bedingungen daraus herstellen lassen. Damit können Genusswert und Bekömmlichkeit auch immer nur auf die Kaffeegetränke bezogen werden. An verschiedensten Beispielen wurde der Einfluss der Zubereitungsverfahren und das Röstkaffee-Wasser-Verhältnis auf das Verhalten der Kaffeegetränke bzw. auf die Zusammensetzung der aus normalen und bearbeiteten Röstkaffees extrahierten Kaffeesubstanzen aufzuzeigen versucht. Es ist nicht auszuschliessen, dass bestimmte Bearbeitungsverfahren sich günstig auf gewisse Kaffee-Eigenschaften auswirken. Entscheidend sind aber auch bei solchen Röstkaffees die Kaffeegetränke und damit die Zubereitungsweisen, die vom Verbraucher zur Getränkebereitung angewandt werden. Daher ist eine Anleitung zur Bereitung eines Getränkes mit dem herausgestellten Genusswert bzw. der besonderen Bekömmlichkeit durch den Röster bei Röstkaffees, denen herausragenden Eigenschaften zugeschrieben werden, zur ehrlichen Unterrichtung der Verbraucher und zur Vermeidung von Beanstandungen nicht nur erwünscht sondern sogar unbedingt notwendig.

LITERATURVERZEICHNIS

1. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 60, 38 (1964).
2. Gutachtliche Äusserung.
3. *Dtsch. Med. Zschr.*, 80, 1641 (1955).
4. G. CZOK, Untersuchungen über die Wirkung von Kaffee. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1966, S. 64.

WURZIGER (J.). — **Qualité et digestibilité du café torréfié.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I C. (Paris), 1968, p. 299-312, fig., tabl., réf.

En relation avec le café torréfié on emploie généralement les notions de qualité et de digestibilité. Comme le café n'atteint le consommateur que par l'intermédiaire de sa fraction soluble dans l'eau, on ne peut considérer et estimer sa qualité et sa digestibilité qu'en fonction des boissons de café. On indique les facteurs influençant la qualité et la digestibilité et on tente de montrer, par des exemples, de quelle façon peuvent agir différents facteurs tels que la préparation des cafés verts ou torréfiés, le mode de torréfaction, son degré, de même que des variantes dans les conditions de préparation des boissons sur la composition de la fraction soluble dans l'eau.

WURZIGER (J.). — **The quality and digestibility of roasted coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torrifiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 299-312, fig., tabl. réf.

In regard to roasted coffee the question of quality and digestibility is generally under consideration. Since coffee only reaches the consumer by means of its water-soluble ingredients, it is not possible to study and judge its quality and its digestibility except in terms of the coffee beverage. The factors which affect its quality and its digestibility are set forth and an attempt is made to show, by means of examples, how such factors as the following can affect the brew : the different methods used in the preparation of the raw or roasted coffees, the degree of roast as well as the various methods used in making the brew.

WURZIGER (J.). — **Über Genusswert und Bekömmlichkeit von Röstkaffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 299-312, fig., tabl., réf.

In Verbindung mit Röstkaffee werden häufig die Begriffe Genusswert und Bekömmlichkeit verwendet. Da es dem Verbraucher allein auf den wasser löslichen Röstkaffeeanteil ankommt, dürften Genusswert und Bekömmlichkeit nur in Verbindung mit Kaffeegetränken betrachttet und beurteilt werden. Es wird auf Faktoren hingewiesen, durch die Genusswert und Bekömmlichkeit zu beeinflussen sind und es wird an Beispielen aufzuzeigen versucht in welcher Weise verschiedenste Faktoren wie z.B. die Bearbeitung des Roh- oder Röstkaffees, die Röstart und Röstgrad sowie der Änderungen in den Zubereitungsbedingungen der Getränke sich auf die Zusammensetzung der wasserlöslichen Kaffeesubstanzen und damit auf das Verhältnis zwischen Genusswert und Bekömmlichkeit auszuwirken vermögen.

DISCUSSION

M. LOCKHART : I should like to ask Dr Wurziger how he measures the different degrees of digestibility associated with the data present in his paper ?

M. WURZIGER : Es ist sehr schwierig etwas darüber auszusagen. Deswegen muss ich mich auf das stützen, was zunächst einmal die Industrie schreibt und ich habe versucht mir einen Ueberblick zu verschaffen, wie die Produkte aussehen, die mit Bekömmlichkeitshinweisen im Handel sind. Also eine Bewertung kann ich heute noch nicht abgeben. Ich möchte es nur so sehen, dass Kaffees, die als bekömmlich angeboten werden, und dazu gehören vielleicht in wesentlichen solche die eine Bearbeitung erfahren haben, vielfach weniger petrolätherlösliche Stoffe in Aufgüssen enthalten als Aufgüsse aus normale Kaffees. Aber es muss nicht unbedingt so sein, das ist die Schwierigkeit. Ich möchte meinen der Hersteller sollte, genau testen, wie die Aufgüsse aus bestimmten Kaffees beschaffen sind, und sollte dann zumindest Angaben über die Art der Herstellung von bekömmlichen Kaffeezubereitungen auch aut den Packungen anbringen damit der Verbraucher ein Anhaltspunkt hat. Das wäre schon sehr viel wenn wir so etwas erreichen könnten.

THE EFFECT OF METHYLXANTHINES ON LIPID MOBILIZATION AND TRANSPORT*

M. M. USARDI, C. SIRTORI
Institute of Pharmacology, University of Milan

MODE OF ACTION OF METHYLXANTHINES

Methylxanthines are purine derivatives closely related to the xanthine bodies found in the urine and animal tissues. Xanthine is the 2 : 6 dioxipurine, caffeine (from the seeds of *Coffea arabica*) the 1 : 3 : 7 trimethylxanthine, theobromine (from the seeds of *Theobroma cacao*) the 3 : 7 dimethylxanthine, theophylline (from the leaves of *Thea synensis*) the 1 : 3 dimethylxanthine (fig. 1).

The three methylxanthines resemble each other in most points of their pharmacological actions, but they differ markedly in the relative intensity of their effects on various functions.

Caffeine is the most potent stimulant on central nervous system of the group, theobromine exerts its action mainly on the muscles, theophylline is the most effective diuretic and coronary dilatating agent.

Their most important pharmacological actions are on the central nervous system (CNS), the cardiovascular system and the kidneys.

Caffeine stimulates the CNS, especially in respect to the psychic functions. After moderate doses (up to 0.3 g in man) the reaction speed is increased, fatigue disappears, thoughts are clearer, while very large doses may produce even delirium and convulsions of the strychnine type. Electroencephalographic patterns under caffeine show rapid potential variations similar to those induced by cocaine and strychnine. The medullary centers are moderately stimulated. There is little or no subsequent depression, even with toxic doses. The most conspicuous effect is on the respiratory centers (1).

The predominant action on the cardiovascular system consists in vasodilatation combined with direct cardiac stimulation sufficient to maintain the blood pressure (2).

Methylxanthines also act as diuretics, though they are scarcely used in therapy (3). They act mainly by three mechanisms :

1) peripheral mobilization of salts and water,

2) changes in circulatory dynamics which improve the renal circulation (4),

3) diminished reabsorption of water and Na^+ in the proximal segment of the tubule (5).

The mechanism of many of the pharmacological activities of methylxanthines has been only recently clarified at enzymatic level, which is located at the cyclic 3′5′ adenosine monophosphate (3′5′ AMP) system.

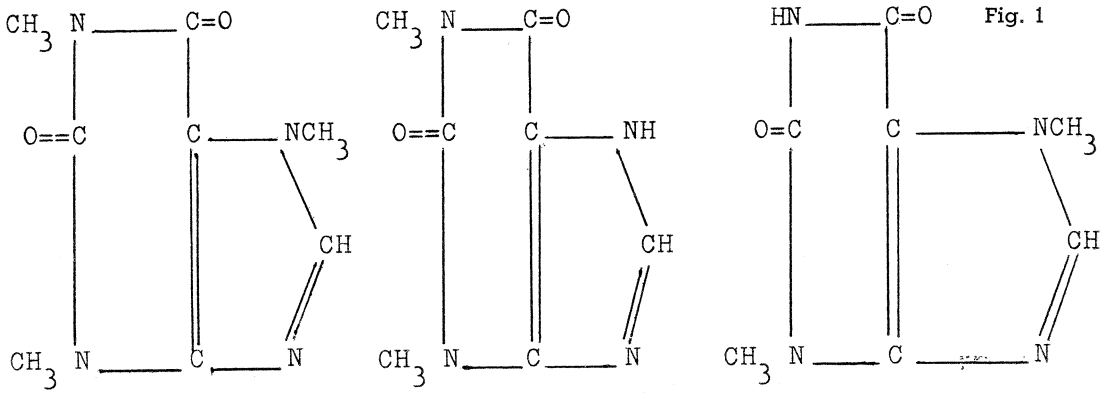


Fig. 1

* Communication présentée par le Professeur Paoletti.

BILOGICAL ROLE OF CYCLIC 3′5′ AMP

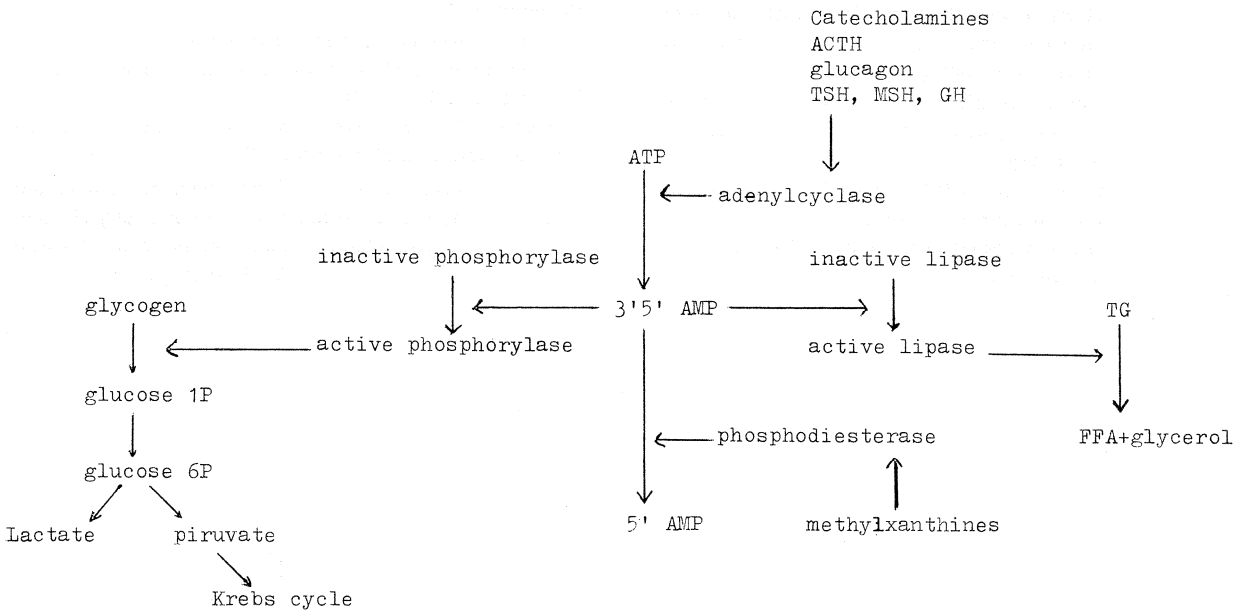
Cyclic 3′5′ adenosine monophosphate (3′5′ AMP) is a nucleotide which is formed in the cell from adenosine triphosphate (ATP) by the action of a cyclizing enzyme, adenylcyclase. This enzyme seems to be present in every animal tissue. In fact, 3′5′ AMP formation has been demonstrated with preparations from various tissues of various animal species, even from the flat worm, *Fasciola epatica* (7). It seems to be localized in the cells very closely to the membrane (8).

Cyclic 3′5′ AMP formation is stimulated by several hormones : catecholamines, ACTH, glucagon, etc., but it has been shown that adenylcyclase is a strictly specific enzyme, which responds to a specific hormone in every different tissue. In fact, it has been shown that glucagon stimulates the accumulation of cyclic 3′5′ AMP in liver, but not in skeletal muscle preparations (8), ACTH but not epinephrine or glucagon cause an increase of 3′5′ AMP in slices of adrenal cortex (10) ; LH only is active on bovine ovary slices (11), and norepinephrine on isolated toad bladder (12). However, in adipose tissue of many species, several peptide hormones and catecholamines activate the adenylcyclase. Cyclic 3′5′ AMP inactivation is due to an enzyme, called phosphodiesterase, which transforms it into 5′ AMP, biologically inactive (13) (fig. 2).

Phosphodiesterase is also widely distributed in animal tissues, it was found in all the tissues that form 3′5′ AMP, but in contrast with adenylcyclase it seems not to have a tissue specificity. It may be assumed that cyclic 3′5′ AMP represents the mediator of hormonal action on various organs or tissues.

Methylxanthines are powerful inhibitors of phosphodiesterase (theophylline being more active than caffeine as an inhibitor), (13-14), thus raising the cellular content of 3′5′ AMP, even if the rate of synthesis is not increased.

Fig. 2. -



EFFECT OF METHYLXANTHINES ON LIPID METABOLISM

Non structural lipids stored as triglycerides (TG) in adipose tissue cells are hydrolyzed to glycerol and free fatty acids (FFA) by a specific enzyme called hormone-sensitive-lipase. The FFA are bound to the blood albumin and quickly transferred and oxidized in the various peripheral organs, thus representing a major source of

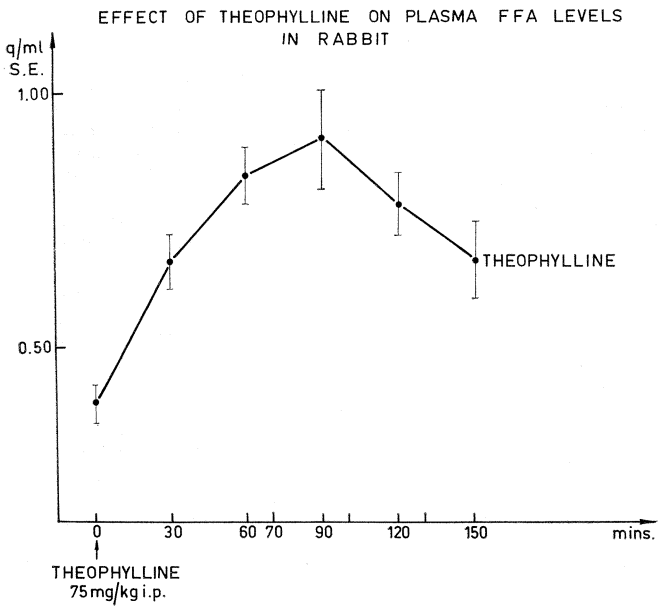
energy for the organism. The fraction of FFA which is not used, is taken up by the liver, reesterified with the cellular glycerol and stored again as TG. Adipose tissue, in contrast to the liver, requires alpha-glycerophosphate for the resynthesis of TG, which therefore is severely limited when glycogen is depleted in the tissue.

The hormone-sensitive-lipase is activated by a series of peptide hormones and by catecholamines which activate the adenylcyclase, it is in fact directly dependent on cellular 3′5′ AMP levels ; 3′5′ AMP transforms this lipase from the inactive into the active form, which in turn is able to hydrolyze TG. In the same way (transforming from the inactive into the active form) 3′5′ AMP acts also on phosphorylase, the enzyme which transforms glycogen into alpha-glycerophosphate, which is essential for the resynthesis of TG. Methylxanthines, which raise the level of 3′5′ AMP in adipose cells, show a definite lipolytic effect, even if the mechanism by which they reach it is completely different from that of catecholamines (15).

The intravenous administration of theophylline (36 mg/kg) in rats produces a prolonged elevation of the plasma FFA levels (15). The level rises slowly, about 45 min being required to reach a plateau, which is maintained for more than 90 min. The lipolytic response to theophylline is dose-dependent.

In rabbits the effect seems to be the same, though the time required for the FFA elevation is slightly more prolonged (16) (fig. 3). In adipose tissue or isolated adipose cells incubated « in vitro » the lipolytic response is dependent on the theophylline concentration and it is maximal at 5.10^{-3}M (17). This response is greater than the optimum response given by norepinephrine (NE).

Fig. 3



MAICKEL et al. (18) and WEISS et al. (19) have shown that the incubation of cyclic 3′5′ AMP with fat cells elecits a negligible lipolysis ; however, maximal lipolytic activity is produced when added with theophylline in an amount that exerts only a slight activity by itself. Apparently the inhibitor acts by protecting the cyclic 3′5′ AMP that enters the cells from being inactivated by the phosphodiesterase.

These results indicate a rate-limiting step in lipolysis at the cyclic 3′5′ AMP concentration level, and not at the level of adenyl-cyclase. It may therefore be deduced that theophylline, by blocking phosphodiesterase, causes cyclic 3′5′ AMP to accumulate to a concentration that completely activates lipase (15). BUTCHER and SUTHERLAND (20) have measured directly the amount of cyclic 3′5′ AMP accumulated by incubating adipose tissue with caffeine « in vitro ». Caffeine (1 mM) did not significantly increase cyclic 3′5′ AMP levels when added alone to the incubation medium, but in combination with a dose of epinephrine, which by itself was only mildly stimulatory, produced striking increases in intracellular cyclic 3′5′ AMP, therefore enhancing lipolysis. On the other hand, a further evidence that the action of theophylline is directly on phosphodiesterase was given by HYNIE et al. (16), who demonstrated that the inhibition of adipose tissue phosphodiesterase depends on theophylline concentration.

Recent data (21) have shown that theophylline increases the output of insulin. This increase is far greater than that evoked by α-glucose alone. It may be explained as a compensatory mechanism to the liberation of glucose and FFA, evoked by theophylline through the accumulation of cyclic 3′5′ AMP.

In addition theophylline has been found to be antagonized by prostaglandins. Prostaglandins (PGs) are a series of natural substances which were isolated from various mammalian tissues, and whose chemical structure is related to that of a C_{20} fatty acid.

In rats, for instance, prostaglandin E_1(PGE_1) antagonizes the hyperlipemia following the administration of lipomobilizing hormones or theophylline, even at doses which are well in the physiological range. The point of action of PGs on the 3′5′ AMP cycle is not completely established, some authors suggesting it could be at phosphodiesterase level (17), that is against the block of 3′5′ AMP breakdown due to theophylline, other authors at the adenylcyclase level (22).

BERGSTRÖM (23) and VAN DORP (24) have shown that the precursors of PGs are some highly unsaturated fatty acids, which are not synthetized in the organism, and therefore are known as essential fatty acids (EFA). Animals made deficient in EFA with a fat free diet should be therefore deficient in PGs, that is in anti-lipolytic substances, and should have an enhanced lipolysis. In agreement with this hypothesis, using preparation of adipose cells isolated « in vitro » according to RODBELL

(25) obtained from EFA deficient rats (table 1) a lypolytic response to theophylline much higher than normal controls has been demonstrated (26).

These investigations on the rôle of methylxanthines on lipid transport in normal and pathological conditions, represent an important experimental model to clarify the mode of action of these fundamental components of coffee and tea. The presence of 3′5′ AMP, adenylcyclase and phosphodiesterase in most mammalian tissues explains the different pharmacological effects of these drugs which interfere with this key enzyme system at central and peripheral level.

TABLE I

Theophylline-induced FFA release from isolated fat cells

Concentration of theophylline (M)	μeq/mM TG/h (± S. E.)	
	Controls	EFA-deficient
1×10^{-4}	0.87 ± 0.14	12.9 ± 0.57
3.16×10^{-4}	4.63 ± 0.24	40.2 ± 1.5
5×10^{-4}	25.5 ± 0.07	79.5 ± 1.0
1×10^{-3}	44·1 ± 0.6	86.6 ± 1.5

REFERENCES

1. RICHMOND G. H. — *J. Appl. Physiol.*, **2**, 16, 1949.
2. FOWELL D. M., WINSLOW J. A., SYDENSTRICKER U. P. and WHEELER N. C. — *Arch. Int. Med.*, **83**, 150, 1949.
3. ROTH F. E., WINBURY M. M. and GOVIER W. M. — *J. Pharm. Exptl. Ther.*, **121**, 487, 1957.
4. DE CORRAL J. M. — *Actualité Pharm.*, **5**, 77, 1953.
5. KUPFER S., THOMPSON D. D., PITTS R. F. — *Am. J. Physiol.*, **167**, 703, 1951.
6. SUTHERLAND E. W., RALL T. W., MENON T. — *J. Biol. Chem.*, **237**, 1220, 1962.
7. MANSOUR T. E., SUTHERLAND E. W., RALL T. W. and BUEDING E. — *J. Biol. Chem.*, **235**, 466, 1960.
8. RAJAM P. C. and JACKSON A. — *Nature*, **181**, 1670, 1958.
9. RALL T. W., SUTHERLAND E. W. — *J. Biol. Chem.*, **232**, 1065, 1958.
10. HAYNES R. C. Jr. — *J. Biol. Chem.*, **233**, 1220, 1958.
11. MARSH J. M. and SAVARD K. — *J. Biol. Chem.*, **239**, 1, 1964.
12. ORLOFF J. and HANDLER J. S. — *J. Clin. Invest.*, **41**, 702, 1962.
13. SUTHERLAND E. W. and RALL T. W. — *J. Biol. Chem.*, **232**, 1077, 1958.
14. BUTCHER R. W. and SUTHERLAND E. W. — *The Pharmacologist*, **63**, 1, 1959.
15. HYNIE S., KRISHNA G. and BRODIE B. B. — *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **153**, 90, 1966.
16. LENTATI R., KOROLKIEWICZ Z. and PAOLETTI R. — Proc. of the Second Nobel Symp. on Prostaglandins. S. Bergström and B. Samuelsson Eds, Interscience Publ., New York, p. 147, 1967.
17. MÜHLBACHOVA E., SOLYOM A. and PUGLISI L. — *Europ. J. Pharmac.*, **1**, 321, 1967.
18. MAICKEL R. P., DAVIES J. I. and WEISS B. — *Fed. Proc.*, **24**, 299, 1965.
19. WEISS B., DAVIES J. I. and BRODIE B. B. — *Biochem. Pharmac.*, **15**, 1553, 1966.
20. BUTCHER R. W., and SUTHERLAND E. W. — *J. Biol. Chem.*, **240**, 4515, 1965.
21. TURTLE J. R., LITTLESON J. K. and KIPNIS D. M. — *Nature*, **213**, 727, 1967.
22. BUTCHER B. W., PIKE J. E., and SUTHERLAND E. W. — Second Nobel Symp. on Prostaglandins. S. Bergström and B. Samuelsson Eds, Interscience Publ., New-York, p. 133, 1967.
23. BERGSTRÖM S., DANIELSSON H. and SAMUELSSON B. — *Biochem. Biophys. Acta*, **90**, 207, 1964.
24. V. DORP D. A., BEERTHUIS R. K., NUGTEREN D. H., VONKELMAN H. — *Biochem. Biophys. Acta*, **90**, 204, 1964.
25. RODBELL M. — *J. Biol. Chem.*, **4**, 410, 1964.
26. BIZZI A., VENERONI E., GARATTINI S., PUGLISI L., PAOLETTI R. — *Europ. J. Pharmacol.*, **2**, 48, 1967.

USARDI (M. M.), SIRTORI (C.). — **L'effet des méthylxanthines sur la mobilisation et le transport des lipides.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 313-316, fig., tabl., réf.

L'effet des méthylxanthines sur la mobilisation des lipides « in vitro » et « in vivo » est discuté et les résultats obtenus sont en corrélation avec l'effet de ces produits sur l'enzyme phospho-diesterase.

L'antagonisme entre les prostaglandines et les méthylxanthines est démontré et son mécanisme discuté.

La valeur de ces résultats en tant qu'explication des effets physiologiques des aliments contenant des méthylxanthines est également discutée.

USARDI (M. M.) SIRTORI (C.). — **The effect of methylxanthines on lipid mobilization and transport.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 313-316, fig., tabl., réf.

The effect of methylxanthines on lipid mobilization « in vitro » and « in vivo » is discussed and the results are correlated with the effect of these drugs on the enzyme phospho-diesterase.

The antagonism between prostaglandins and methylxanthines is demonstrated and the mechanism discussed. The significance of these results in explaining the physiological effects of foods containing methylxanthines is also discussed.

USARDI (M. M.), SIRTORI (C.). — **Wirkung der Methylxanthine auf die Mobilisierung und den Transport der Fette.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 313-316, fig., tabl., réf.

Es wird die Wirkung der Methylxanthine auf die Mobilisierung der Fette *in vitro* und *in vivo* erörtert. Die erzielten Ergebnisse stehen in Wechselbeziehung zur Wirkung dieser Produkte auf das Enzym Phospho-Diesterase.

Der Antagonismus zwischen den Prostaglandinen und den Methylxanthinen wird dargelegt und sein Mechanismus erörtert.

Der Wert dieser Resultate als Erklärung der physiologischen Wirkung der Methylxanthine enthaltenden Nahrungsmittel wird ebenfalls erörtert.

DER EINFLUSS VON COFFEIN UND KAFFEE AUF DEN GEHALT DES SERUMS AN FREIEN FETTSÄUREN BEIM GESUNDEN UND LEBERKRANKEN



H. P. T. AMMON

H. P. T. AMMON, W. ZELLER, C.-J. ESTLER

Pharmakologisches Institut und Medizinische Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg

Xanthinderivate wie Coffein und Theophyllin gehören zu den Stoffen, die direkt und vermutlich auch indirekt in das lipolytische System des Fettgewebes eingreifen. Das lipolytische System des Fettgewebes hat die Aufgabe, durch laufende Spaltung von Triglyceriden Freie Fettsäuren (FFS) an das Blut abzugeben und einen bestimmten Blutspiegel an FFS aufrecht zu erhalten, der dazu dient, verschiedenen Organen, darunter auch der Muskulatur und der Leber, oxydierbares Substrat zur Gewinnung chemischer Energie zur Verfügung zu stellen.

Die Abb. 1 zeigt die wichtigsten Schritte der Lipolyse in Anlehnung an ein Schema von WESTERMANN (1). Eine Adenylcyclase, die durch die Überträgerstoffe des sympathischen Nervensystems — vorwiegend Noradrenalin — aktiviert wird, bildet aus ATP cyclisches 3,5 AMP. Dieses aktiviert sehr wahrscheinlich eine Kinase, die die im Fettgewebe vorliegende inaktive Lipase in die aktive Form überführt (hormonsensitive Fettgewebslipase). In aktiver Form spaltet diese aus den Triglyceriden den ersten Fettsäurerest ab. Auch andere körpereigene Hormone wie ACTH, STH, TH, Lipotropin und Glucagon führen zur Aktivierung der hormonsensitiven Fettgewebslipase. Die Abspaltung des 2. und 3. Fettsäurerestes erfolgt anschliessend durch nicht hormonsensitive Lipasen. Cyclisches 3,5 AMP unterliegt einer andauernden Inaktivierung durch das Enzym Phosphodiesterase, das es in 5 AMP überführt. Damit wird verhindert, dass sich cyclisches 3,5 AMP anreichert und zu einer übermässigen Lipolyse führt.

Da Xanthinderivate einerseits diese Phophodiesterase *in vitro* hemmen (BUTCHER u. SUTHERLAND (2) ; RIZACK (3)) und andererseits auch eine vermehrte Freisetzung von Katecholaminen *in vivo* verursachen (METZ (4) ; KIEFER (5)) lag es nahe, *in vivo* den Einfluss von Coffein auf die Lipolyse zu untersuchen. Wir bestimmten zu diesem Zweck den Fettgehalt des epididymalen Fettgewebes und den Gehalt des Serums an FFS nach Verabreichung von Coffein, da sich eine Aktivierung des lipolytischen Systems in einer Abnahme des Fettgehaltes des epididymalen Fettgewebes und in einer Zunahme der FFS im Serum äussern müsste. Ausserdem bestimmten wir den Fettgehalt der Leber, da dieser in engem Zusammenhang mit der Höhe der der Leber angebotenen FFS steht (NESTEL u. STEINBERG (6) ; FEIGELSON u. Mitarb. (7) ; GIDEZ u. Mitarb. (8)).

Die Ergebnisse dieser Versuche, die wir bereits an anderer Stelle mitgeteilt haben (ESTLER u. AMMON (9)), sind in Abb. 2 dargestellt.

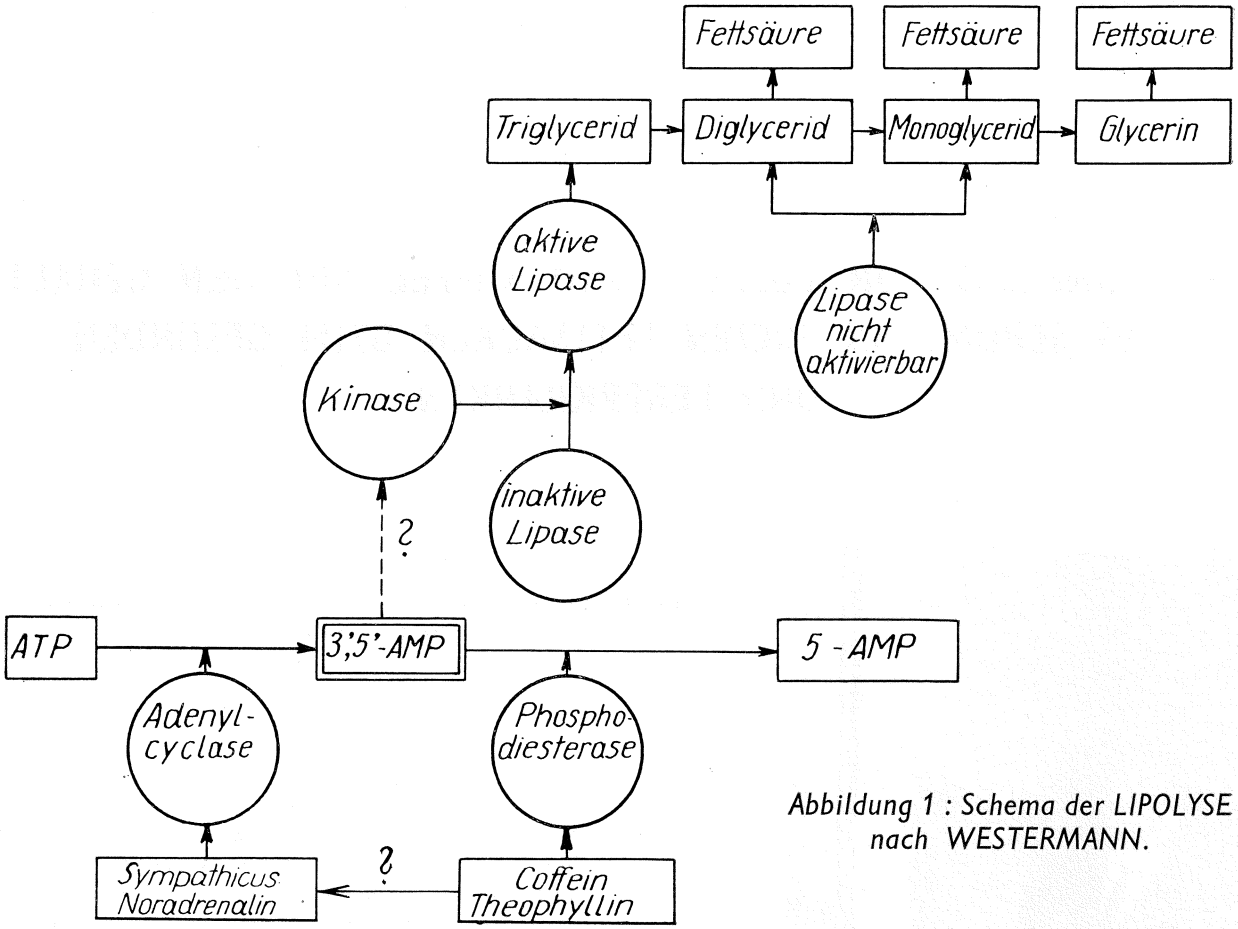


Abbildung 1 : Schema der LIPOLYSE nach WESTERMANN.

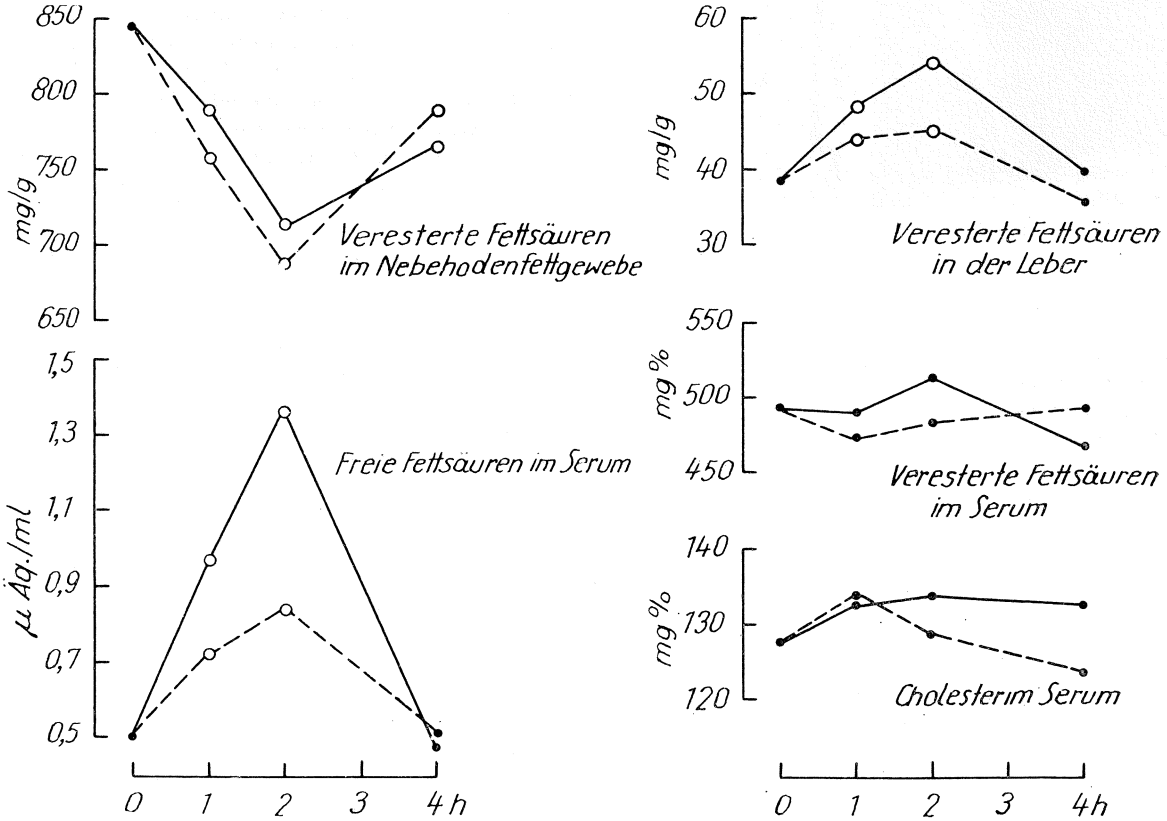


Abb. 2. — *Fettgehalt des Nebenhodenfettgewebes und der Leber sowie Gehalt des Serums an freien und veresterten Fettsäuren und Cholesterin bei weissen Mäusen nach s. c. Injektion von* — — — 25 *mg/kg,* ——— 50 *mg/kg Coffein.* 0 : $P \leqslant 0{,}05$.

TIERVERSUCHE

Sowohl nach 50 mg/kg als auch nach 25 mg/kg Coffein s. c. kommt es bei weissen Mäusen dosisabhängig zu einer Abnahme des Fettgehaltes im Nebenhodenfettgewebe und zur Zunahme der FFS im Serum als Ausdruck einer gesteigerten Mobilisierung von Depotfett. Gleichzeitig findet sich eine Zunahme des Leberfettgehaltes, die auch von STIEVE (10) sowie von HINDEMITH (11) beobachtet wurde. Der Gehalt des Serums an veresterten Fettsäuren (EFS) und Cholesterin ist nicht verändert.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir den Einfluss chronischer Coffeinzufuhr auf den Fettgehalt der Leber sowie den Gehalt des Serums an EFS und FFS. Zu diesem Zwecke ersetzten wir bei weissen Mäusen das Trinkwasser durch eine Coffeinlösung über 6 Wochen, die so eingestellt war, dass die Versuchstiere pro Tag 150 mg/kg Coffein peroral aufnahmen. Bei dieser Behandlung ergaben sich, wie aus der Tabelle I hervorgeht, keine signifikanten Änderungen im Gehalt des Serums an EFS und FFS. Der Fettgehalt der Leber nahm zwar signifikant aber nur ganz unwesentlich zu. Ähnliche Beobachtungen konnten wir auch mit einer Coffeinzufuhr von 75 mg/kg/Tag machen.

TABELLE I

Fettgehalt der Leber sowie Freie Fettsäuren und Veresterte Fettsäuren im Serum von weissen Mäusen 6 Wochen nach Ersatz des Trinkwassers durch eine Coffeinlösung (täglich aufgenommene Coffeinmenge 150 mg/kg)

	Kontrollen	Coffein
Fettgehalt der Leber	32 ± 1 mg/g (n = 33)	37 ± 1,2 mg/g (n = 33)
Freie Fettsäuren im Serum....	0,448 ± 0,024 µÄq/ml (n = 15)	0,430 ± 0,026 µÄq/ml (n = 15)
Veresterte Fettsäuren im Serum	430 ± 19 mg % (n = 15)	369 ± 18 mg % (n = 15)

UNTERSUCHUNGEN AN GESUNDEN STUDENTEN

Ausgehend von den Befunden nach einmaliger Verabreichung von Coffein interessierte uns besonders, ob die im Tierversuch beobachteten Änderungen im Fettstoffwechsel auch beim Menschen nach gebräuchlichen Coffeindosen nachweisbar sind. Da Fett- u. Lebergewebe diesen Untersuchungen verständlicherweise nicht ohne weiteres zugänglich sind, mussten wir uns darauf beschränken, den Einfluss des Coffeins auf den Gehalt des Serums an FFS zu untersuchen.

Wir verabreichten daher einer Gruppe von 10 Studenten 250 mg Coffein i. v. bzw. einer zweiten Gruppe ein der Coffeinlösung entsprechendes Volumen 0,9 % NaCl-Lösung.

Bei den mit Coffein behandelten Versuchspersonen (Abb. 3) kommt es zu einem Anstieg der FFS im Serum, der noch 3 Stunden nach der Injektion nachweisbar ist, während bei den mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelten Versuchspersonen keine signifikanten Änderungen auftreten (ZELLER u. AMMON (12)).

Auch nach Verabreichung von Kaffee (entsprechend 225 mg Coffein) kommt es, wie die Abb. 4 zeigt, bei gesunden Versuchspersonen ebenfalls zu einem Anstieg

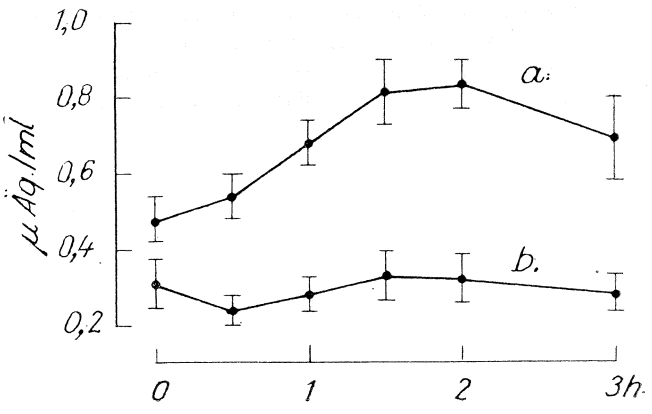


Abb. 3. — *Freie Fettsäuren im Serum gesunder Versuchspersonen*

a) *nach i. v. Verabreichung von 250 mg Coffein* (*n* = 10)

b) *nach i. v. Verabreichung von 5 ml 0,9 % NaCl* (*n* = 10)

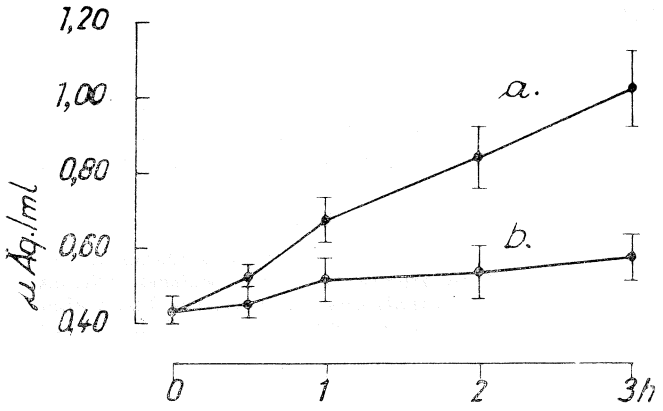


Abb. 4. — *Freie Fettsäuren im Serum gesunder Versuchspersonen*
a) *nach peroraler Verabreichung von Kaffee, entspr. 225 mg Coffein* (n = 10)
b) *nach peroraler Verabreichung von entcoffeiniertem Kaffee, entspr. 9 mg Coffein* (n = 10)

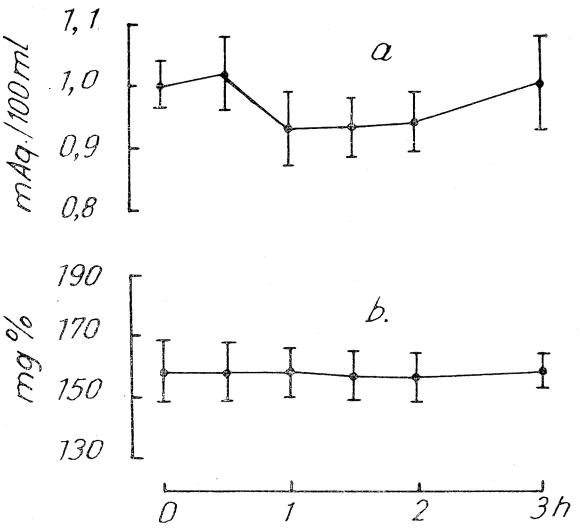


Abb. 5. — *Serumkonzentration an*
a) *Veresterten Fettsäuren*
b) *Gesamtcholesterin bei gesunden Versuchspersonen nach i. v. Verabreichung von 250 mg Coffein* (n = 20)

der FFS im Serum. Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen von BELLET u. Mitarb. (13). Der gegenüber den mit einer Coffeininjektion behandelten Versuchspersonen verzögerte Anstieg der FFS im Serum erklärt sich aus der langsameren Resorption des Coffeins aus dem Magen-Darm-Trakt. Die Verabreichung von entcoffeiniertem Kaffee (entsprechend 9 mg Coffein) führt zu keinem signifikanten Anstieg der FFS im Serum. Der Anstieg der FFS nach Coffein und Kaffee dürfte ebenso wie im Tierversuch auf eine gesteigerte Mobilisierung von Depotfett als Folge der Aktivierung der Lipolyse zurückzuführen sein.

Da bei Mäusen nach chronischer Verabreichung von Coffein keine Zunahme der FFS im Serum nachzuweisen war und daher die Frage auftauchte, ob auch beim gewöhnten Kaffeetrinker Coffein bzw. Kaffee zum Anstieg der FFS im Serum führt, befragten wir unsere Versuchspersonen (Studenten) nach der von ihnen täglich eingenommenen Kaffeemenge. Nach ihren Angaben tranken sie während der letzten 2 Jahre täglich im Durchschnitt 3-5 Tassen Kaffee. Trotzdem führte die von uns durchgeführte Verabreichung von Coffein bzw. Kaffee zu einem Anstieg der FFS im Serum. Man muss also annehmen, dass auch nach mehrjährigem täglichem Konsum von Kaffee nach jeder Kaffeezufuhr erneut FFS mobilisiert und in das Blut ausgeschwemmt werden.

Abb. 5 Analog zu unseren Tierversuchen finden sich nach einmaliger i.v. Injektion von 250 mg Coffein bei unseren Versuchspersonen keine Änderungen im Gehalt des Serums an EFS und Cholesterin.

UNTERSUCHUNGEN AN LEBERKRANKEN PATIENTEN

Die Leber entnimmt dem Pfortaderblut ca. 30-50 % der angebotenen FFS (SPITZER u. Mitarb. (14) ; ROBINSON (15)), von denen sie 3/4 vorwiegend zu Triglyceriden reverestert und ca. 1/4 bis zu CO_2 abbaut (SPITZER u. Mitarb. (14)). Die Triglyceride gibt sie nach Bindung an eine Eiweisskomponente in Form der β-Lipoproteide wieder an das Blut ab, aus dem sie erneut in das Fettgewebe aufgenommen und dort gespeichert werden. Die biologische Halbwertszeit der FFS im Blut beträgt ca. 2 Minuten (DOLE u. RIZACK (16)). Diese Zahlen zeigen, dass die intakte Leber ganz erhebliche Mengen an FFS umsetzt.

Da die Leber einerseits grossen Anteil am Umsatz der FFS und auch der Nahrungstriglyceride (CAHILL (17)) hat, andererseits bei Störungen der Leberfunktion auch Störungen im Fettstoffwechsel vorliegen können (ZELLER (18)), interessierte uns der Einfluss des Coffeins auf den Gehalt des Serums an FFS bei leberkranken Patienten. Wir wählten zu diesem Zwecke ein Kollektiv von Patienten mit akuter Hepatitis, Zustand nach Hepatitis, chronischer Hepatitis, Fettleber und Lebercirrhose, die eine deutlich eingeschränkte Leberfunktion aufwiesen aus und bestimmten 1-10 Studen nach der i.v. Verabreichung von 250 mg Coffein den Gehalt des

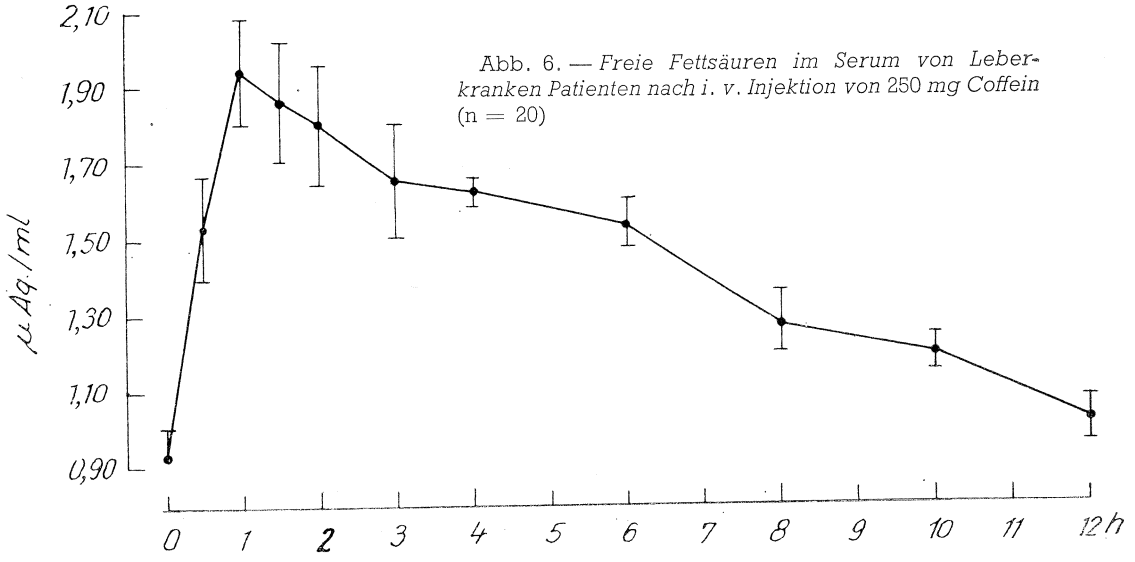
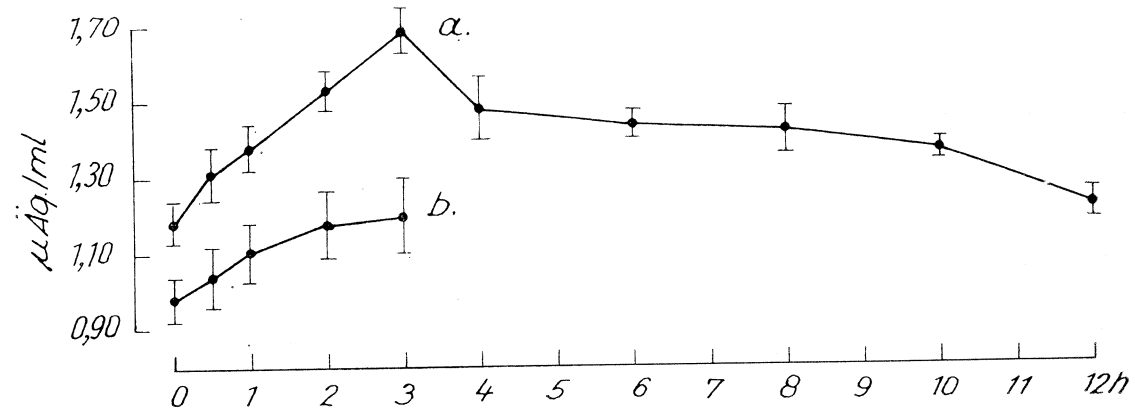


Abb. 6. — *Freie Fettsäuren im Serum von Leberkranken Patienten nach i. v. Injektion von 250 mg Coffein* (n = 20)

Abb. 7. — *Freie Fettsäuren im Serum von leberkranken Patienten* : a) *nach peroraler Verabreichung von Kaffee, entspr. 225 mg Coffein* (*n* = 16) : b) *nach peroraler Verabreichung von entcoffeiniertem Kaffee, entspr. 9 mg Coffein* (*n* = 16)



Serums an FFS. Die Ergebnisse dieser Versuche an 20 Patienten (ZELLER u. AMMON (12)) sind in Abb. 6 dargestellt.

Überraschenderweise liegt der Ausgangswert der FFS bei diesem Patientenkreis mit 0,92 uÄq/ml bereits um 100 % über der Norm. Die Injektion von 250 mg Coffein führt zu einem weiteren starken Anstieg der FFS auf 1,94 uÄq/ml nach 1 Stunde. Noch 10 Stunden nach der Applikation von Coffein liegen die FFS signifikant über dem Ausgangswert.

Nach Verabreichung von Kaffee (entsprechend 225 mg Coffein) kommt es wie die Abb. 7 zeigt, ebenfalls zu einem weiteren Anstieg der bereits erhöhten FFS. Sie liegen noch 10 Stunden nach der Kaffeezufuhr signifikant über dem Ausgangswert. Die Verabreichung von entcoffeiniertem Kaffee (entsprechend 9 mg Coffein) führt zu einem nicht signifikanten Anstieg der FFS.

Der bereits ohne Coffeinzufuhr erhöhte Gehalt an FFS im Serum von leberkranken Patienten dürfte seine Ursache — bedenkt man die erhebliche Beteiligung der Leber am Umsatz der FFS — in einer Störung der Aufnahme bzw. der Utilisation der FFS durch die in ihrer Funktion eingeschränkten Leber haben. Dass die Leber offenbar auch die durch Coffein bzw. Kaffee zusätzlich mobilisierten FFS nicht zu utilisieren vermag zeigt der besonders nach intravenöser Zufuhr von

Coffein weitere und langanhaltende Anstieg der FFS im Serum.

Für unsere Annahme, dass bei eingeschränkter Leberfunktion die Aufnahme bzw. Utilisation der FFS herabgesetzt ist, sprechen auch Befunde von ZELLER (19), die zeigen, dass bei leberkranken Patienten auch die Aufnahme von infundierten, J^{131} -markierten Triglyceriden durch die Leber eingeschränkt ist.

Das nach Coffein erhöhte Angebot an FFS an die Leber dürfte bei den leberkranken Patienten, bei denen häufig bereits eine fettige Infiltration der Leber vorliegt zu einer weiteren Zunahme des Leberfettgehaltes führen sowie eine zusätzliche Belastung für den Stoffwechsel der in ihrer Funktion geminderten Leber bedeuten.

LITERATUR

1. E. WESTERMANN.— *Fette in der Medizin*, **7**, 8, 1966.
2. R. W. BUTCHER and E. W. SUTHERLAND. — *J. Biol. Chem.*, **237**, 1244, 1962.
3. M. A. RIZACK. — *J. Biol. Chem.*, **239**, 392, 1964.
4. B. METZ. — 1er colloque international sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 20-22 mai 1963. *Café Cacao Thé*, Paris vol. VII, nº 4, oct.-déc., p. 347-348.
5. G. KIEFER. — Dissertat. Univ. Mainz, BRD, 1964.
6. P. J. NESTEL and D. STEINBERG. — *J. Lipid Res.*, **4**, 461, 1963.
7. E. B. FEIGELSON, W. W. PFAFF, A. KARMEN and D. STEINBERG. — *J. Clin. Invest.*, **40**, 2171, 1961.
8. L. I. GIDEZ, S. ROHEIM and H. A. EDER. — *Fed. Proc.*, **21**, 289, 1962.
9. C.-J. ESTLER and H. P. T. AMMON. — *Experientia*, **22**, 589, 1966.
10. H. STIEVE. — *Z. f. Mikroskop. Anatom. Forschg.*, **41**, 88, 1937.
11. H. HINDEMITH. — *Arch. exp. Path. Pharmak.*, **199**, 167, 1942.
12. W. ZELLER und H. P. T. AMMON. — *Z. f. Gastroenterologie*, **5**, 84, 1967.
13. S. BELLET, A. KERSHBAUM and J. ASPE. — *Arch. Int. Med.*, **116**, 750, 1965.
14. J. SPITZER, M. GOLD and B. J. BRANSON. — *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, **118**, 149, 1965.
15. D. S. ROBINSON. — Proc. Int. Symp. on Lipid Transport, Tennessee, 1963, Charles C. Thomas Publisher, Springfield-Illinois
16. V. P. DOLE and M. A. RIZACK. — *J. Lipid Res.*, **2**, 90, 1961.
17. G. F. CAHILL. — Proc. Int. Symp. on Lipid Transport, Tennessee, 1963, Charles C. Thomas Publisher, Springfield-Illinois.
18. W. ZELLER. — Vortrag 16. Therapiekongress, Karlsruhe, 1965.
19. W. ZELLER, H. SCHÖN und F. WOLF. — *Melsunger Med. Wiss. Mitteilungen*, **103**, 32, 1965.

AMMON (H. P. T.), ZELLER (W.), ESTLER (C. J.). — **Influence de la caféine et du café sur la teneur en acides gras libres du sérum d'êtres sains et de malades du foie.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 317-324, fig., réf.

L'administration de caféine à des animaux entraîne une diminution de la teneur en matières grasses du tissu adipeux de l'épididyme, une augmentation des acides gras libres dans le sérum et de la teneur en matières grasses du foie. Ces variations sont considérées comme l'expression d'une mobilisation amplifiée des matières grasses de réserve.

Chez les étudiants sains, 250 mg de caféine i. v. entraînent une augmentation de la teneur en acides gras libres du sérum. Il en est de même avec le café (225 mg de caféine). Par contre, on n'observe pas cette augmentation avec le café décaféiné.

AMMON (H. P. T.), ZELLER (W.), ESTLER (C. J.). — **The effect of caffeine and coffee on the free fatty acid content of serums taken from healthy subjects and from those suffering from diseases of the liver.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 317-324, fig., réf.

The administration of caffeine to animals leads to a decrease in the fatty matter content of the epididymal adipose tissue, an increase of the free fatty acids in the serum and of the fatty matter content of the liver. These changes are considered as being the effect of an increased mobilization of the reserves of fatty matter.

In the case of healthy students, 250 mg of caffeine i. v. causes an increase in the free fatty acid content of the serum. The same thing happens with coffee (225 mg of caffeine). On the other hand, this increase does not occur using decaffeinated coffee.

AMMON (H. P. T.), ZELLER (W.), ESTLER (C. J.). — **Der Einfluss von Coffein und Kaffee auf den Gehalt des Serums an Freien Fettsäuren beim Gesunden und Leberkranken.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 317-324, fig., réf.

Im Tierversuch kommt es nach Verabreichung von Coffein zur Abnahme des Fettgehaltes im Nebenhodenfettgewebe, zur Zunahme der Freien Fettsäuren (FFS) im Serum und zur Zunahme des Leberfettgehaltes. Diese Änderungen werden als Ausdruck einer gesteigerten Mobilisierung von Depotfett angesehen.

Bei gesunden Studenten führen 250 mg Coffein i. v. zum Anstieg der FFS im Serum. Kaffee (225 mg Coffein) führt ebenfalls zum Anstieg der FFS. Dagegen wird bei entcoffeiniertem Kaffee keine sign. Erhöhung der FFS beobachtet.

Chez les malades du foie (hépatite aiguë, état après hépatite, hépatite chronique, foie trop gras, cirrhose) les fonctions de ce dernier sont nettement réduites ; l'administration de caféine entraîne une forte augmentation de la teneur en acides gras libres du sérum qui se prolonge pendant 10 heures. On a constaté le même phénomène après ingestion de café (225 mg de caféine). Le café décaféiné ne provoque pas d'augmentation significative.

Les causes et la signification de l'augmentation des acides gras libres après administration de caféine à des êtres sains et à des hépatiques sont discutées.

In the case of persons suffering from liver disease (acute hepatitis, post hepatitis condition, chronic hepatitis, fatty liver, cirrhosis) the functioning of the liver is distinctly diminished ; the administration of caffeine leads to an increase in the free fatty acid content of the serum which lasts for 10 hours. The same phenomena was noticed after drinking coffee (225 mg of caffeine). Decaffeinated coffee does not produce any significant increase.

The causes and the signification of the increase of free fatty acids after the administration of caffeine by healthy subjects and those suffering from liver complaints, are discussed.

Bei leberkranken Patienten (akute Hepatitis, Zustand nach Hepatitis, chronische Hepatitis, Fettleber, Lebercirrhose) mit deutlich eingeschränkter Leberfunktion führt die i. v. Verabreichung von Coffein zu einem starken, über 10 Stunden anhaltenden Anstieg der FFS im Serum. Ein ebenfalls über 10 Stunden anhaltender Anstieg der FFS im Serum wird nach Kaffee (225 mg Coffein) beobachtet. Bei entcoffeiniertem Kaffee kommt es zu einem nicht sign. Anstieg der FFS.

Die Ursache und Bedeutung erhöhter FFS nach Coffein beim Gesunden und Leberkranken werden diskutiert.

DISCUSSION

Relative aux exposés de M. Usardi et de M. Ammon

M. LEE : Your charts specified theophylline. Did you observe any difference between the action of caffeine and theophylline ?

M. PAOLETTI : No, in fact the main difference is probably the length of action ; it is a little bit longer in our experiments for theophylline.

M. CZOK : Dr Bellet hat in Untersuchungen am Menschen und am Tier festgestellt dass der Anstieg der freien Fettsäuren nach Gabe von Coffein und Kaffee nicht auftritt oder erheblich abgeschwächt ist, wenn zusammen mit Coffein oder Kaffee Zucker verabreicht wurde. Haben Sie auch diesen Effekt beobachdet ?

M. AMMON : Wir haben darüber selbst keine Untersuchungen angestellt. Est ist aber durchaus denkbar, dass die gleichzeitige Verabreichung von Zucker den Anstieg der freien Fettsäuren nach Coffein hemmt. Mir ist aus der Arbeit von Bellet bekannt, dass der Anstieg der FFS zwar noch vorhanden ist, aber nicht mehr in diesem Ausmass. Die Aufnahme von Zucker führt zu einer gegenregulatorischen Ausschüttung von Insulin. Insulin selbst vermindert das für die Mobilisierung der FFS wichtige cycl. 3,5 AMP.

M. KENSLER : I wonder whether either of you has determined if the metabolites of caffeine would produce one of these effects ?

I also wonder if any sex difference has been noticed ? In man and woman, there is a marked difference in coronary area disease.

M. PAOLETTI : I'll answer your first question and leave Dr Ammon answer your second question.

Caffeine metabolites have not been tested, but they should be.

M. AMMON : Zur Frage ob geschlechtsabhängige Unterschiede bei der Erhöhung der freien Fettsäuren auftreten möchte ich sagen, wir haben die Tierversuche nur an mannlichen Tieren durchgeführt. Unsere Untersuchungen bei Menschen erstreckten sich jedoch auf Studenten und Studentinnen und wir sahen in beiden Fällen einen Anstieg der freien Fettsäuren. Ich möchte aber damit nicht gesagt haben, dass nicht quantitative Unterschiede bestehen können, qualitativ jedenfalls kommt es sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Versuchspersonen zu einem Anstieg der Fettsäuren nach Coffein.

M. PAOLETTI : May I comment on this very important point which has been raised. There is a difference between the rate of heart disease in men and women. This difference may be related to the difference in the mobilization of free fatty acids. I am not sure that this is the case, because in some species, female mobilize more fats, and there is not necessarily a connection between the two facts. What is probably more important is the mobilization of cholesterol and the production of cholesterol esters. In the long run, high level of free fatty acids may be important because it induces a secondary increase of liver secretion of cholesterol and biosynthesis of cholesterol.

M. KENSLER : There is a number of papers, specially by Russian researchers, on the administration of caffeine and cholesterol to animals. Have you any experience on the resolution and accumulation of these ?

M. PAOLETTI: I have no experience, but I suspect that the mechanism may be through the stimulation of the sympathetic system first and later through the stimulation of the thyroid if this is prolonged for a long time.

M. KENSLER : Have you any information whether caffeine will favorise an increase of free fatty acids in animals ?

M. PAOLETTI : I have data with theophylline which is able to increase free fatty acid release from adipose tissues.

M. CZOK : Little hat festgestellt, dass Patienten mit Zustand nach Herzinfarkt nach chronischem Kaffeegenuss einen Anstieg der Gesamtfettsäuren im Blut zeigten. Nach chronischem Teegenuss trat dieser Effekt aber nicht auf. Haben Sie eine Erklärung dafür ?

M. AMMON : Ich möchte sagen, das ist eine Frage der Dosierung. Mit dem Kaffee nimmt man natürlich mehr Coffein zu sich und Sie sahen aus der zweite Abbildung dass die Mobilisierung von Fettsäuren ja nun Dosis abhängig ist. Inwieweit bei chronischer Zufuhr von Kaffee die andauernde Mobilisierung von freien Fettsäuren auch nach Coffein zu einer Hyperlipidämie führt, weisst man noch nicht. Man weiss aber dass dauernde Übermobilisierung die verestern Fettsäuren im Serum erhöht, ganz einfach weil der Fetttransport beschleunigt wird, aber man hat das direkt für das Coffein, soweit mir bekannt ist, nicht nachgewiesen.

M. LANG : 1. Mit Kaffee und Tee wird praktisch die gleiche Coffeinmenge aufgenommen.

2. Wenn ein Antagonismus bei der Kaffeewirkung hinsichtlich Wirkung auf Adrenalin und Insulin besteht, so kann dieser Antagonismus nicht direkter Art sein. Es ist noch nie gelungen nachzuweisen, dass Coffein die Ausscheidung von Catecholaminen vergrössert. Einem Antagonismus muss daher ein komplizierter Mechanismus zu Grunde liegen.

3. Wie Prof. Paoletti gezeigt hat, ist es die physiologische Aufgabe einer Erhöhung der freien Fettsäuren in Plasma, den Menschen resistent gegen Stress-Situationen zu machen. Daher ist es denkbar, dass Versuche an bettlägerigen Patienten, z. B. Leberkranke, nicht vergleichbar sind mit denen an nicht bettlägerigen Personen. Es wäre daher zu empfehlem, wenn in die Versuchsreihen von AMMON noch eine Kontrolle mit gesunden, aber liegenden Personen, eingebaut würde.

M. AMMON : Das ist nicht geschehen, aber das ist sicher eine interessante Frage, die zu prüfen wäre.



Le Professeur PAOLETTI au cours de la présentation de l'exposé de MM. USARDI et SIRTORI.

DIE KAFFEEVERTRÄGLICHKEIT DES PSYCHOLABILEN PATIENTEN



Dr. R. ULRICH
Bremen

In den meisten Kliniken der Bundesrepublik Deutschland werden die aufgenommenen Patienten bei Aufnahme der Anamnese nach ihren Alkoholgewohnheiten befragt bzw. ob und in welchem Umfang sie rauchen. Aber nur selten findet man, dass die Assistenzärzte nach dem Kaffeegenuss zu fragen pflegen. Ich habe daher seit meiner Teilnahme an dem Kongress unserer Gesellschaft in Paris bei der Aufnahme bewusst immer wieder die Patienten nach ihren Kaffeegewohnheiten befragt. Bevor ich auf die Ergebnisse dieser Befragung eingehe, möchte ich darauf hinweisen, dass die Psychiatrie von der Kaffeeforschung bisher etwas stiefmütterlich behandelt worden ist. Gerade unsere sogenannten psychiatrischen Patienten sind nämlich zum Teil exzessive Kaffeetrinker. Der Schizophrene und auch der Defektschizophrene bevorzugt Kaffee, allerdings auch Alkohol, und der in seiner Persönlichkeit veränderte und versandete typisch klebende Epileptiker kennt die euphorisierende Wirkung des Bohnenkaffees sehr genau und benutzt ihn, um seine typischen Verstimmungsphasen zu beeinflussen. Gerade dieser sollte allerdings wegen der möglichen Anfallsprovokation auf den Genuss von stimulierenden Substanzen verzichten. Der Maniker greift oft unbeherrscht zum Kaffee, allerdings auch zum Alkohol, und in gleicher Weise auch zur Zigarette. Wie und in welcher Form der Kaffee auf die krankhaft veränderte Psyche dieser Menschen wirkt, ist weitgehend unbekannt und wurde auch bisher noch nicht untersucht. Wir wissen zum Beispiel nicht, warum gerade in bestimmten Phasen ihres Krankheitsgeschehens von unseren Patienten der Bohnenkaffeegenuss verstärkt wird. Es wird so oft über die Weckwirkung des Kaffees, über die Schlafstörung nach Kaffee, über die Zunahme des psychomotorischen Leistungsvermögens gesprochen. Sowie aber die Kaffeewirkung auf die verschiedenen Schichten der Persönlichkeitsstruktur des Menschen angesprochen wird, lassen uns die wissenschaftlichen Erkenntnisse weitgehend im Stich. Wenn zum Beispiel in der Literatur behauptet wird, dass bei älteren Frauen der Genuss von Bohnenkaffee zu einer negativen und abwertenden Beurteilung bestimmter Probleme führt, so ist das sicher eine geistvolle Feststellung, die aber wissenschaftlich kaum zu realisieren ist, es sei denn man würde sich der Mühe unterziehen, diese Frauen zu analysieren. Und auch dabei würde man zu einem Fehlschluss kommen, da bei einer Einzelanalyse das Gemeinschaftsgefühl einer Gruppe von Frauen nicht Berücksichtigung finden kann. Es fehlen zum Beispiel Untersuchungen, die sich, wie Bleuler bereits schon sagte, mit der Bewusstheit des Menschen befassen. Der Einfluss des Kaffees auf das Unbewusste ist im übrigen auch nicht bekannt. Dagegen gibt es eine Reihe von Arbeiten, die sehr deutlich zum Ausdruck bringen, dass alle Wahrnehmungsempfindungen des Menschen unter der Bohnenkaffeewirkung verstärkt werden. Auch das Handlungs- und Vorstellungsvermögen scheint unter der Einwirkung von Kaffee ausgeprägter zu werden. Die Gedächtnisfunktionen nehmen ohne Zweifel unter der Kaffeewirkung zu, während die Affektivität gesteigert wird, ein durchaus nicht immer erwünschter Effekt. Phantasie und Assoziationsvermögen werden unter der Kaffeewirkung verstärkt, während von

anderer Seite behauptet wird, dass darunter die Assoziationsqualität leide. Fest steht jedenfalls, dass augenscheinlich der Intelligente anders auf Kaffee reagiert als zum Beispiel der Debile. Er wird unter der Kaffeewirkung angeregter und etwas distanzloser und euphorisch, während sich beim Intellektuellen die Zahl der möglichen Gedankenassoziationen steigert. Ob dabei immer die richtige Auswahl des assoziierenden Materials erfolgt, wurde augenscheinlich noch nicht untersucht. Es bestehen auch keine Klarheiten darüber, inwieweit das Orientierungsvermögen und auch die Situationseinordnung nach Kaffeegenuss verbessert wird. Die Aufmerksamkeitsleistung, also die Tenazität und Vigilität, werden bei den meisten Menschen durch Bohnenkaffeegenuss verbessert. Es scheint hier allerdings auch antagonistische Reaktionen zu geben, die augenscheinlich von der Dosierung bzw. Überdosierung abhängig sind. Auch über die Einwirkung des Kaffeegenusses auf das autistische Denken liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Bei der Durchsicht der pharmakopsychologischen Literatur des Bohnenkaffees ergibt sich, dass BALZAC dem Kaffee die Wirkung zuschreibt, dass er die « espritsmoteurs » hüpfen und sprudeln lasse, und augenscheinlich war auch schon damals die « Somnolence » nach Bohnenkaffee, die wir auch heute noch gelegentlich beobachten können, bekannt. KRAEPELIN fand, dass die Patienten nach dem Genuss von Kaffee angeregter und besser arbeiten können. Allers stellt fest, dass nach Kaffeegenuss der Reichtum an bildhaften Vorstellungen gesteigert wird. Er findet ausserdem, dass die Geruchs- und Gehörsvorstellungen deutlicher werden. Interessant ist eine weitere Untersuchung, in der vor vielen Jahrzehnten die Feststellung getroffen wurde, dass Patienten nach dem Genuss von Kaffee über eine « innere Ataxie » berichten. Die Erklärung dieses sehr unklaren Begriffes wird nur undeutlich abgegeben. Es handele sich dabei um etwas, was mit dem Tremor verglichen werden könne.

Rauschartige Zustände nach Kaffeegenuss werden in der Literatur des öfteren beschrieben. Ausserdem wird berichtet, dass die Bohnenkaffee-Euphorie gelegentlich auch in eine Dysphorie, also in Unlustgefühle übergehen könne, wenn die Kaffeedosis erheblich gesteigert würde. Neben diesen Missgefühlen käme es dann auch zu Angstzuständen, die allerdings seltener beobachtet werden könnten. Andeutungsweise findet man auch Beschreibungen einer Kaffee-spezifischen Hast- und Rastlosigkeit. Dass bei der Kaffeewirkung im übrigen suggestive und auch autosuggestive Faktoren, die experimentell nicht fassbar sind, berücksichtigt werden müssen, wurde von mir bereits schon 1953 beschrieben. Aus einer italienischen Arbeit, veröffentlicht 1923, geht hervor, dass der Kaffee eine messbare Wirkung auf die Sexualsphäre des Menschen ausüben könne. Auch die Kaffeewirkung, in Verbindung mit Medikamenten, ist nur lückenhaft bekannt. Dass es infolge der schlafstörenden Wirkung von Bohnenkaffee mehrfach zum Phanodormmissbrauch kam, konnte an mehreren Fällen beobachtet werden. Nach MÜLLER sind auch rauschartig euphorische Zustände nach Überdosierung von Colabrause beschrieben worden.

Wenn auch die echten Psychosen zahlenmässig eine verhältnismässig geringe Rolle spielen und wenn man diese aus der Betrachtung des Problems ausnimmt und auch die echten Kern-Neurosen bei der Beurteilung der Kaffeefrage unberücksichtigt lässt, dann bleibt die grosse Gruppe der Patienten mit wesentlichen sogenannten psycholabilen Beschwerden übrig. Ich bin mir im übrigen völlig darüber im Klaren, dass es sich bei diesem Patientenkreis nicht um ein homogenes Krankheitsgeschehen handelt, ferner dass auch die Diagnose einer Psycholabilität keinen exakten Begriff darstellt. Er kann im übrigen verglichen werden mit der Diagnose der vegetativen Dystonie in der inneren Medizin. Im übrigen darf ich ergänzen, dass sich in der letzten Zeit Stimmen mehren, die in der inneren Medizin vor der Pauschaldiagnose einer vegetativen Dystonie warnen, ohne dass vorher alle diagnostischen Möglichkeiten ausgeschöpft worden sind.

In dieser grossen Gruppe der Psycholabilen finden wir den Psychastheniker, den Übersensiblen, den Menschen mit Einordnungsschwierigkeiten, den Lebensfremden und vor allem aber auch die affektgestörten Menschen, bei denen gelegentlich eine depressive Stimmungsfärbung eine grosse Rolle spielt. Dieser Patientenkreis, oft von hoher Intelligenz, beobachtet sich selbst ausserordentlich sorgfältig und fügt sich den Anordnungen des Arztes meistens widerspruchslos, er bevorzugt oft eine gesundheitsbewusste Lebensweise. Im übrigen bestehen bei diesen Patienten im psychosomatischen Sinne oft vegetative Organbeschwerden, die im Sinne einer vegetativen Fehlregulation, besonders bezogen auf das Kreislaufgeschehen, berücksichtigt werden müssen. Dieser Patientenkreis ist in der Frage der Kaffeeverträglichkeit völlig uneinheitlich. Es gibt unter ihnen eine ganze Reihe von Menschen, die Kaffee auch in hoher Dosierung gut vertragen können. Es ist fur sie, besonders wenn sie beruflich stark belastet werden, geradezu zu einem Lebenselexier geworden. Aber eine andere Gruppe unserer Patienten kann den Bohnenkaffee schlecht vertragen und reagiert im psychischen als auch im organischen Sinne auf den Kaffeegenuss überwertig. Diese Patienten klagen über eine innere Gespanntheit, Unruhe, Konzentrations- und Merkschwäche, sie sind leicht gereizt, neigen zu Fabulationen und haben unter dem Eindruck dieser Symptomatologie schon seit langerem auf den Kaffeegenuss verzichtet. Eingehende Untersuchungen auf diesem Gebiet, zumal wie ich oben erwähnte, die Diagnose nicht einheitlich ist, liegen augenscheinlich nicht vor, und es dürfte ausserdem schwierig sein, bei diesen Patienten gut exakte Untersuchungen durchzuführen, da gerade diese Menschen auf das psychogene Moment ausserordentlich stark reagieren.

Im übrigen sieht es im Augenblick so aus, als ob ein grosser Teil dieser von mir erwähnten Patienten die abgeschwächte Stimulationswirkung des gedämpften bzw. des gedampften coffeinfreien Kaffees besser vertragen, weil er augenscheinlich ihre psychische Reizschwelle nicht erreicht. Durch diesen Rat konnte auch dieser Patientenkreis dem Kaffeegenuss zugeführt werden.

ULRICH (R.). — **Les malades instables psychologiquement supportent-ils le café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 325-327.

Au cours de plusieurs années, l'auteur a interrogé des patients relevant de la psychiatrie quant à leurs habitudes de consommation du café. Dans plusieurs cas pathologiques, tels schizophrénie, épilepsie et certaines phases maniaques, on a pu constater une consommation excessive de café. La littérature concernant l'action du café sur le psychisme est discutée en détail. Au premier plan des constatations on remarque que le groupe très hétérogène des patients dits psycholabiles semble mieux supporter le café étuvé et le café étuvé décaféiné que le café de consommation normal, vraisemblablement parce que ces préparations n'atteignent pas leur seuil d'excitation psychique.

ULRICH (R.). — **Do psychologically unstable patients tolerate coffee ?** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 325-327.

During several years, the writer has questioned patients, having psychiatric backgrounds, about their coffee drinking habits. In several pathological cases such as schizophrenia, epilepsy and certain maniacal conditions, it has been possible to find evidence of excessive coffee drinking. Literature dealing with the effect of coffee on the psychism is discussed in detail. At the head of the list of statements one notices that the very heterogenous group of patients known as « psycholabiles » (ie. liable to psychosis) seem to tolerate better « steamed » coffee and steamed decaffeinated coffee to ordinary coffee, probably because these preparations do not reach their psychical excitation level

ULRICH (R.). — **Die Kaffeeverträglichkeit des psycholabilen Patienten.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 325-327.

Der Autor hat im Laufe mehrerer Jahre psychiatrische Patienten nach den Gewohnheiten ihres Kaffeegenusses befragt. Bei mehreren Krankheitsbildern, zum Beispiel bei der Schizophrenie, beim Epileptiker sowie in bestimmten manischen Phasen konnte ein exzessiver Kaffeegenuss festgestellt werden. Die vorhandene Literatur über die Wirkung des Bohnenkaffees auf die Psyche wird ausführlich diskutiert. Im Vordergrund der Betrachtung steht die Kaffeeverträglichkeit der völlig inhomogenen Gruppe, der sogenannten psycholabilen Patienten, die augenscheinlich zu einem grossen Teil den gedämpften bzw. den gedämpften koffeinfreien Kaffee besser vertragen, als den normalen Konsumkaffee, da er augenscheinlich ihre psychische Reizschwelle nicht erreicht.

KAFFEE UND SPORT

Dr E. FISCHBACH
München

Es ist meine Aufgabe, das coffeinhaltige Kaffeegetränk vom Blickpunkt des Sportlers aus zu erörtern.

Hierbei ist es natürlich erforderlich, dass man nicht nur allein das Coffein der Kaffeebohne, sondern auch die übrigen Inhaltsstoffe und ebenso die Röstprodukte berücksichtigt, die alle mehr oder weniger physiologische und pharmakologische Wirkungen entfalten.

Betrachten wir zunächst die **Röstprodukte**, d.h. die eigentlichen Aromastoffe des gerösteten Kaffees. Sie können wirkungsmässig mit anderen Röst- und Backprodukten, schliesslich auch mit Extraktivstoffen und mit Riech- und Schmeckstoffen der Früchte und Gemüse verglichen werden. Es ist schon lange bekannt, dass die Röstprodukte des Kaffeegetränkes gewisse anregende Wirkungen im Organismus entfalten. Im Vordergrund steht vorallem die Wirkung auf den Magen. Hier liegen eingehende Untersuchungen von BEHRENS und MALORNY vor, die ergeben haben, dass ein coffeinhaltiger und coffeinfreier Kaffee bezüglich der Reizwirkung auf den Magen sich in ihrer Wirksamkeit nicht unterscheiden. Dies ist ein Beweis dafür, dass die Röstprodukte selbst eine physiologische Wirkung ausüben. Wenn allerdings die Kaffeebohne vor der Röstung mit gespanntem Wasserdampf (Verfahren nach LENDRICH) behandelt wird, dann findet man eine deutlich herabgesetzte oder überhaupt keine Reizwirksamkeit bzw. Brechwirksamkeit mehr. Nach Untersuchungen von KRÖPLIEN treten als Folge dieser Vorbehandlung bedeutsame Umbau- und Abbauprozesse an der Chlorogensäure und ihren Verwandten auf, sodass der Verlauf der Röstung ein anderer ist.

Neben der Reizwirkung auf die Verdauungsorgane rufen die flüchtigen Aromastoffe bzw. Röstprodukte des Kaffees bestimmte Qualitäten von Geruchsempfindungen hervor, die aber im einzelnen nicht genügend differenziert sind, wie ja ohnehin das Riechen und Schmecken ein höchst komplizierter Vorgang ist, der an eine Vielheit von Receptoren gebunden ist.

Wenn auch die zentral-nervösen Wirkungen der flüchtigen Aromastoffe im einzelnen nicht genügend geklärt sind, so besteht der Ausspruch « vom anregenden Duft » des Kaffees zu recht. Sicher spielen bei der Wirkung der Aromastoffe des Kaffees auch psychische Einflüsse mit, die wahrscheinlich mit der Erwartung der Coffeinwirkung zusammenhängen. Die physiologisch wirksamen Aromastoffe sind natürlich auch für den Sportler von Bedeutung, denn zu den trockenen Kalorien gehört unbedingt ein guter Geschmack und auch ein angenehmer Geruch. Wir wissen, dass eine einförmige, geschmacklose Kost bald Widerwillen erregt, ja sogar Ekelgefühle hervorruft. Der Zusammenhang zwischen Ernährung und Leistung ist gerade beim Wettkampfsportler ein sehr enger und oft müssen schon kleine Ernährungsfehler mit grossen Leistungsminderungen bezahlt werden. Es ist auch daran zu denken, dass der Wettkämpfer häufig Trainingslager zu besuchen hat, wo er von einer nicht individuell eingestellten Gemeinschaftsverpflegung abhängig ist. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, wenn der Sportler zur abwechslungsreicheren Gestaltung seines physiologischen Bedürfnisses nach Aroma- und Würzstoffen, neben anderem sich auch nach den Aromastoffen des Kaffeegetränkes sehnt. Und in normalen Grenzen gehalten haben sie keine nachteilige Wirkung, so dass von physiologischer Seite aus keine Bedenken bestehen. Mit diesen Hinweisen habe ich die eine Seite des Kaffees — die Bedeutung der Aromastoffe für den Sportler — erörtert. Im folgenden möchte ich mich der anderen Seite des Kaffeegetränkes, der zentral-anregenden Wirkung widmen.

Im Rahmen dieses Referates betrachte ich es nicht als meine Aufgabe, über die differenzierten zentralen Wirkungen des Kaffees und seiner Inhaltsstoffe zu sprechen. Dieses Thema befindet sich auch noch im Fluss, ich darf auf die entsprechenden Vorträge hinweisen, in denen dieses Thema bereits behandelt worden ist oder noch wird. Daher erlauben Sie mir

summarisch von der « zentral-anregenden Wirkung » des Kaffeegetränkes zu sprechen — also von der Wirkung des Coffeins und der übrigen Inhaltsstoffe zusammengenommen — ohne die genauen Angriffspunkte dieser Stoffe benennen zu müssen (*Formatio reticularis*, Schlaf-Wachzentrum u.a.).

Aus dem grossen Fragenkomplex der Wirkung des Kaffees möchte ich vorallem die Frage herausgreifen, ob der Gebrauch von coffeinhaltigem Kaffee als unerlaubtes **Doping** beim Wettkampspfort anzusehen ist. Diese Frage hängt mit dem Problem der künstlichen Leistungssteigerung im Sport durch Pharmaka zusammen. Da der Weg zur sportlichen Höchstleistung ein sehr dornenvoller ist und es beim internationalen Wettkampf nicht mehr allein um die Erringung eines Siegerkranzes, eines Bechers oder einer Medaille geht, sondern Ehrgeiz und Jagd nach Höchstleistungen vorliegen, ist es verständlich, wenn manche Sportler versuchen, durch Einnahme bestimmter Pharmaka künstlich eine Leistungssteigerung zu erreichen.

Alle Sportmediziner sind sich darüber einig, dass echtes Doping verboten sein muss, aber die Ansichten über die Definition des Dopings sind nicht einheitlich. Nach einer ganz strengen Definition von Doping ist jede Zufuhr von Stoffen, gleichgültig welcher Art, in der Absicht der künstlichen Leistungssteigerung kurz vor oder während des Wettkampfes als **Doping** zu betrachten und streng zu verbieten. Demnach wäre auch die Einnahme eines coffeinhaltigen Kaffeegetränkes verboten. Diese strenge Definition über Doping ist aber nicht ohne Widerspruch geblieben. Sie entspricht einer alten Betrachtungsweise über Doping, die mit der modernen Pharmakologie nicht mehr begründet werden kann, weil heute der Wirkungsmechanismus zahlreicher Pharmaka auch der des Coffeins und der anderen Inhaltsstoffe der Kaffeebohne, differenzierter aufgeklärt werden konnte. Auf Grund dieser neuen pharmakologischen Erkenntnisse konnte man ganz neue Gruppierungen von Pharmaka vornehmen.

Ursprünglich hat man nur bestimmte Reizmittel und Rauschgifte zu den Dopingmitteln gerechnet, die heute nach der neuen pharmakologischen Klassifizierung den Psychopharmaka zugerechnet werden. Diese Stoffe, die über eine Bekämpfung des natürlichen Ermüdungsgefühls — man spricht von einer zentralen Enthemmung vegetativer Schutzmechanismen — eine künstliche Leistungssteigerung erzwingen, wirken schädigend auf den Organismus und sind als echte Dopinggifte streng zu verbieten. Zu ihnen gehören z.B. Euphorica und Weckamine wie Pervitin, Benzedrin u.a. Diese Pharmaka habe ich zu einer ersten Gruppe von Dopinggiften zusammengefasst. Von diesen Pharmaka muss man aber jene Stoffe abtrennen, die noch pharmakodynamische Eigenschaften besitzen, aber in normaler Dosis nicht toxisch bzw. schädigend wirken. Zu diesen Stoffen gehört aus der Gruppe der Psychoanaleptica das im Kaffee enthaltene Coffein.

Für das Auftreten des stimulierenden Coffeineffektes spielt allgemein die **Ausgangslage** eine entscheidende Rolle. Hierfür einige einfache Beispiele : Wenn man sozusagen « hellwach » ist, dann lässt sich der anregende Coffeineffekt kaum nachweisen. Andererseits gibt es Menschen, es handelt sich um vegetativ Labile und um solche, bei denen eine Schilddrüsenüberfunktion vorhanden ist, die auf Coffein anders reagieren. Bei ihnen können Herzbeschwerden, Kopfschmerzen oder andere Sensationen auftreten. Manche Menschen zeigen einen « negativen » Coffeineffekt, indem sie nach Kaffeegenuss mit einer Ermüdung oder Schläfrigkeit antworten.

Die sportärztliche Praxis spricht dafür, dass das coffeinhaltige Kaffeegetränk in normaler Dosis beim Gelegenheitssportler und beim trainierten Wettkämpfer nicht nur nicht schädigend wirkt, sondern auch keine sportliche bzw. muskuläre Leistungssteigerung hervorruft. Bei der Betrachtung der Beziehungen zwischen Kaffee und Sport darf nicht ausser acht gelassen werden, dass der Sportler etwas benötigt um plötzlich auftretende leistungsmindernde Einflüsse zu unterdrücken oder diese schon vorbeugend zu verhindern. Als leistungsmindernde Faktoren kommen u.a. klimatische Verhältnisse und seelische Stimmungsschwankungen in Frage. Hier kommt dem coffeinhaltigen Kaffeegetränk, natürlich neben anderen Mitteln eine hervorragende Rolle zu. Der **nervöse** Sportler wird nicht zum Kaffee greifen, weil er weiss, dass der Kaffee ihn noch unruhiger macht. Beim **ermüdeten** Sportler wird die Müdigkeit unterdrückt, ohne dass eine echte Leistungssteigerung zustande kommt ; im günstigsten Fall wird eine bessere Koordination der Bewegungen erreicht.

Bei dem an Coffein ungewöhnten Sportler und bei übermässig grossen Dosen ist der Gebrauch von coffeinhaltigem Kaffee mit Risiken verbunden, denn es kann leicht eine überschiessend stimulierende Wirkung mit Gegenregulationen und mit einer Leistungsminderung auftreten. Die praktische Erfahrung spricht dafür, dass diese auf einer **Übererregung** und **nicht** auf einer **Erschöpfung** beruht. Im Gegensatz hierzu stehen die vorher erwähnten Dopinggifte, die deshalb so gefährlich sind, weil sie zu einer Ausschöpfung der Leistungsreserven führen, so dass der Sportler in eine Risikozone gelangt, die der tödlichen Zone vorgelagert ist. Zum Schluss noch ein anderes Argument : Am häufigsten nimmt der erfahrene Sportler den Kaffee erst **nach** dem Wettkampf ein, weil ein kaltes Getränk unzweckmässig ist, dagegen ein **warmer Kaffee** mit einem guten Aroma ihn wieder erfrischt. Wenn ich nun zusammenfasse, dass der coffeinhaltige Kaffee für den Sportler in üblichen Dosen nicht schädlich ist und in hohen Dosen keine Erschöpfungsreaktionen hervorruft, sondern höchstens Übererregungsreaktionen mit Fehlleistungen verursacht, dann besteht kein Anlass den Gebrauch von Kaffee beim Sportler als Doping zu betrachten. Damit dürfte der Kaffee auch vom Blickpunkt des Sportlers aus eigentlich keine Feinde haben.

FISCHBACH (E.). — **Café et sport.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 328-331.

Les sportifs de compétition soucieux de leur forme sont toujours à la recherche de moyens leur permettant de maintenir leur condition, d'accroître leur résistance et d'une façon générale, d'éviter toute influence susceptible d'abaisser leur rendement. Dans ce but l'emploi de caféine et de café est très important. La réglementation interdit l'emploi de substances qui provoquent une augmentation artificielle des capacités sportives et qui constituent un doping. La définition actuelle du doping est très controversée. Il convient de séparer nettement les excitants très actifs et les stupéfiants — néfastes parcequ'ils mettent en œuvre les dernières matières de réserve de l'organisme, après suppression de la sensation de fatigue — des analeptiques tels que la caféine, utilisée à dose physiologique et non préjudiciable. La caféine ne saurait être considérée comme un dopant du point de vue pharmacologique. Des expériences ont montré que la caféine et les boissons en contenant ne provoquaient pas d'augmentation véritable du rendement sportif. Il faut, de plus, remarquer qu'un être soumis à un entraînement intensif ne se trouve pas dans le même état physiologique que la moyenne et qu'il réagira donc différemment à la caféine. On sait ainsi que chez un être « bien éveillé » l'action corticale usuelle de la caféine est à peine décelable. Il faut considérer d'autre part qu'en plus de la caféine, le café torréfié contient des substances volatiles et de l'acide chlorogénique qui interviennent dans l'activité totale de la boisson. La caféine pourrait jouer un rôle dans la mise en solution des principes actifs formés au cours de la torréfaction. Il faudrait étudier également l'accoutumance au café. En fait, les problèmes complexes de l'action propre de la caféine et des effets de la caféine du café ne sont pas encore résolus pour le sportif de compétition.

FISCHBACH (E.). — **Coffee and sport.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 328-331.

Athletes engaged in competitive sports and concerned about their form, are always on the lookout for ways and means of maintaining their condition, of increasing their stamina and, generally, of avoiding anything that might diminish their performance. In this respect, the use of coffee is very important. The regulations forbid the use of substances which produce an artificial increase in the athlete's performance and which would constitute doping. The actual definition of doping is very controversal. A definite line must be drawn between highly stimulating substances and narcotics (the latter are dangerous because they mobilize the last reserves of the system, after suppressing the feeling of tiredness) from stimulants such as coffee used in physiological and innocuous doses. Caffeine cannot be considered as a dope in the pharmaceutical sense. Experiments have shown that caffeine and beverages containing it, did not induce a real increase in athletic performance. It must also be noted that a human being undergoing intense training is not in the same physiological condition as the average person and therefore reacts to caffeine in a different manner. It is also well known that with a person « fully awake » the usual cortical action of the caffeine is hardly noticeable. In addition, it must be borne in mind that, apart from caffeine, roasted coffee contains volatile substances and chlorogenic acid, which play a part in the total activity of the beverage. Caffeine could also influence the solubilisation of the active elements formed during the roasting process. Addiction to coffee must also be studied. Actually, the complex problem of the action of caffeine by itself and the effects of the caffeine in coffee, are still not solved as far as those engaged in competitive sport are concerned.

FISCHBACH (E.). — **Kaffee und Sport.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 328-331.

Zur Wahrung ihrer Form sind Leistungssportler stets darauf bedacht, ihre Kondition zu erhalten, ihre Widerstandskraft zu heben und im allgemeinen allen leistungsmindernden Einflüssen vorzubeugen. Hierbei spielt die Verwendung von Coffein und Kaffee eine bedeutende Rolle. Offizielle Bestimmungen verbieten den Gebrauch von Substanzen, die eine künstliche Leistungssteigerung bewirken und als Doping zu betrachten sind. Der gegenwärtige Begriff des Dopings ist sehr umstritten. Es muss unterschieden werden zwischen den hochwirksamen Reizmitteln und Rauschgiften-die schädlich sind, da sie die letzten Reserven des Körpers nach Unterdrückung des natürlichen Ermüdigungsgefühls in Anspruch nehmen-und einem Analepticum wie dem Coffein, das in üblichen Dosen nicht schädigend wirkt. Vom pharmakologischen Gesichtspunkt kann das Coffein nicht als Dopingmittel betrachtet werden. An Hand von Experimenten hat es sich gezeigt, dass Coffein und coffeinhaltige Getränke keine wirkliche Leistungssteigerung hervorrufen. Ausserdem ist zu bemerken, dass ein Mensch, der sich einem intensiven Training unterzieht, sich nicht im gleichen physiologischen Zustand befindet wie der Durchschnittsmensch und daher anders auf das Coffein reagiert. So ist z. B. bei einem « hellwachen » Menschen die übliche corticale Wirkung kaum nachzuweisen. Anderseits ist zu berücksichtigen, dass der Röstkaffee ausser dem Coffein noch flüchtige Stoffe und Chlorogensäure enthält, die bei der Gesamtwirkung des Kaffees beteiligt sind. Das Coffein könnte als Lösungsmittel der beim Rösten entstehenden wirksamen Grundstoffe eine Rolle spielen. Auch die Gewöhnung an Kaffee müsste untersucht werden. Tatsächlich sind die komplexen Probleme der individuellen Wirkung des Coffeins und der Coffeineinwirkung von Kaffee für den Leistungssportler noch nicht gelöst.

DISCUSSION

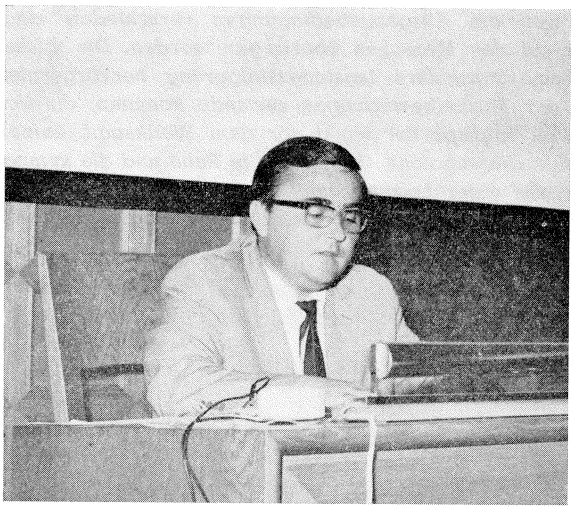
M. KENSLER : I would like to say that with the question of whether or not caffeine can beneficially affect performance, it is extremely difficult to manage objectively, to find adequate studies. I think that one of the reasons for the lack of success is that in a case like this, we are looking for very small differences.

On that subject, we found in the literature a good paper by Pilcher and Smith in which they were able to show a slight effect with amphetamine in physical exercise, not in mental. They have not yet looked at caffeine, but we hope they will.

When you talk about your experiences do you mean observations on individuals, or have you a number of control groups ? Either a possible control analysis ? What kind of diet these experiments are based on ?

M. FISCHBACH : Derartige Untersuchungen sind bei Leistungssportlern schwer durchzuführen. Es wurden bisher nur Beobachtungen bei kleineren Gruppen von Sportlern mit entsprechenden Kontrollen angestellt. Die Sportler wurden vor den Wettkämpfen gefragt, ob sie Kaffee eingenommen haben oder nicht. Nachher wurde bestimmt, ob die sportliche Leistung durch Kaffee besser geworden ist. Die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse sind meist nicht miteinander zu vergleichen, weil die Ausgangsbedingungen verschieden sind. Resultate von Tierexperimenten können nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Die bisherigen Beobachtungen sprechen dafür, dass durch Kaffee keine muskuläre Leistungssteigerung hervorgerufen wird ; es kann eine vorübergehende bessere Koordination der Muskelbewegungen zustande kommen, die sich bei manchen Sportarten günstig auswirkt. Der erfahrene Wettkampfsportler trinkt vor dem Wettkampf keinen Kaffee. Die Gefahr ist zu gross, dass beim trainierten Sportler die vagotone Umstellung in Ruhe und die sympathikotone Reaktionslage während der Leistung gestört wird, was einer Leistungsminderung gleichzusetzen wäre. Für die Anregung, in dieser Richtung weitere Untersuchungen anzustellen, danke ich Ihnen vielmals.

ZUM PROBLEM DER MUTAGENEN WIRKUNG VON COFFEIN BEIM MENSCHEN



G. RÖHRBORN
Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität, Heidelberg

Die chemische Mutagenese und zwar insbesondere die Auslösung von Mutationen durch Arznei-, Genussmittel und Nahrungsmittelzusätze ist in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt des humangenetischen Interesses gerückt. Durch zahlreiche Untersuchungen über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und mutagener Wirkung wissen wir heute recht genau, dass bei Vorhandensein bestimmter reaktiver Gruppen eine Verbindung bei allen Testorganismen relativ stark mutagen wirkt (RÖHRBORN 1965a).

Bei derartigen Stoffen, zu denen u.a. die S-Loste, N-Loste-Epoxyde, Äthylenimine und Methylsulfonsäureester gehören, muss man natürlich auch mit einer mutagenen Wirkung beim Menschen rechnen, wenn die wirksamen Dosen in Therapie und Mutagenese vergleichbar sind. Dennoch besteht selbst bei Verbindungen mit einer solchen Gruppierung die Möglichkeit, durch bestimmte Substitutionen die mutagene Wirkung herabzusetzen bzw. sogar auszuschalten (RÖHRBORN 1965b).

Wie steht es nun um die mutagene Wirkung von Coffein und speziell um die genetische Gefährdung des Menschen durch diese Verbindung ?

Coffein, das nicht die reaktiven Gruppierungen der oben erwähnten Stoffe besitzt, ist ein Purinderivat. Dies lässt *a priori* vermuten, dass es als konkurrierendes Analogon der Purinbausteine Adenin bzw. Guanin der Erbsubstanz, der DNS wirken und dadurch Mutationen auslösen könne. Deshalb und wegen des vielfaltigen und weitverbreiteten Konsums dieses Stoffes gehört Coffein heute zu den mutationsgenetisch meistgeprüften chemischen Verbindungen. Die wichtigsten Befunde sind in den folgenden Abschnitten kurz skizziert.

UNTERSUCHUNGEN AN HÖHEREN PFLANZEN

KIHLMAN und LEVAN (1949) prüften verschiedene Konzentrationen von Coffein cytogenetisch an Allium cepa. Sie fanden 1. Noch bei 24 stündiger Behandlung mit einer 0,4 % igen Coffeinlösung eine totale Mitosehemmung. In den Konzentrationsstufen 0,2 %, 0,1 % und 0,04 % wurde die Mitosehemmung immer schwächer, und bei 0,02 % war die Mitoserate wieder normal oder sogar höher als normal. Die mitosefreie Periode betrug bei 0,4 % etwa 12 Stunden. 2. Beobachteten die Autoren ein Ausbleiben der Zellwandbildung bei den Mitosen, wodurch es zur Bildung von zwei- und mehrkernigen Zellen und durch Fusion dieser Kerne zur

Entstehung grosser Chromosomenhaufen kam. Der Schwellenwert für diesen Effekt lag bei einer Konzentration von 0,02 bis 0,04 %. 3. Wiesen KIHLMAN und LEVAN die Induktion physiologischer und struktureller Chromosomenveränderungen im Konzentrationsbereich von 0,02-0,4 % nach. Der Prozentsatz der in Mitose befindlichen Zellen mit physiologischen Chromosomenveränderungen wie Stickiness (Verklebung von Chromosomen) und Pseudochiasmatabildung stieg proportional zur Dosis an. Bei 0,04 % Coffein betrug der Prozentsatz solcher Zellen etwa 5 %, bei 0,2 % etwa 60 % und bei 0,4 % etwa 80 %. Bei den strukturellen Chromosomenveränderungen, den eigentlichen Chromosomenmutationen, wurde eine solche einfache Korrelation nicht beobachtet. Die grösste Häufigkeit (z.T. mehr als 30 % Mitosen mit strukturell aberranten Chromosomen) wurde nach Behandlung mit 0,1 % Coffein gefunden. Bei höheren Dosen (0,2 %, 0,4 %) wurden nur Werte bis zu 20 % Mitosen mit Strukturveränderungen ermittelt. Bei der höchsten Konzentration (0,4 %) schienen die beobachteten Veränderungen allerdings schwerer zu sein als bei den niederen Konzentrationen. Nur in der höchsten Konzentration waren auch Chromosomenerosionen zu sehen. Eine Beziehung zwischen dem Auftreten coffeininduzierter Chromosomenanomalien und dem pH-Wert (Bereich 4,5-9,5) fand sich nicht.

UNTERSUCHUNGEN AN MIKROORGANISMEN

Im Rückmutationstest von Streptomycinabhängigkeit zu Streptomycinunabhängigkeit fanden DEMEREC und Mitarbeiter (1951) bei *E. coli* mit Coffeinkonzentrationen von 0,50 % bis 2,10 % eine schwache mutagene Wirkung dieser Verbindung. Eine Erhöhung phagenresistenter Mutanten nach Coffeinbehandlung beobachteten GEZELIUS und FRIES (1952) am gleichen Objekt. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Arbeit von NOVICK (1956). Auch er fand nach Behandlung von *E. coli* (im Chemostaten) eine deutlich erhöhte Anzahl phagenresistenter Mutanten nach Behandlung mit 150 mg/l Coffein. Darüber hinaus konnte er jedoch zeigen, dass ein Zusatz von 50 mg/l Adenosin die Mutagenität von Coffein, Theophyllin, Theobromin, 8-Methoxycoffein und einigen anderen hier nicht interessierenden Substanzen völlig unterdrückt. Auch einige andere Purinribonukleoside und wesentlich schwächer gleichfalls die Desoxyribonukleoside, Desoxyguanosin und Desoxyadenosin liessen antimutagene Wirkung erkennen.

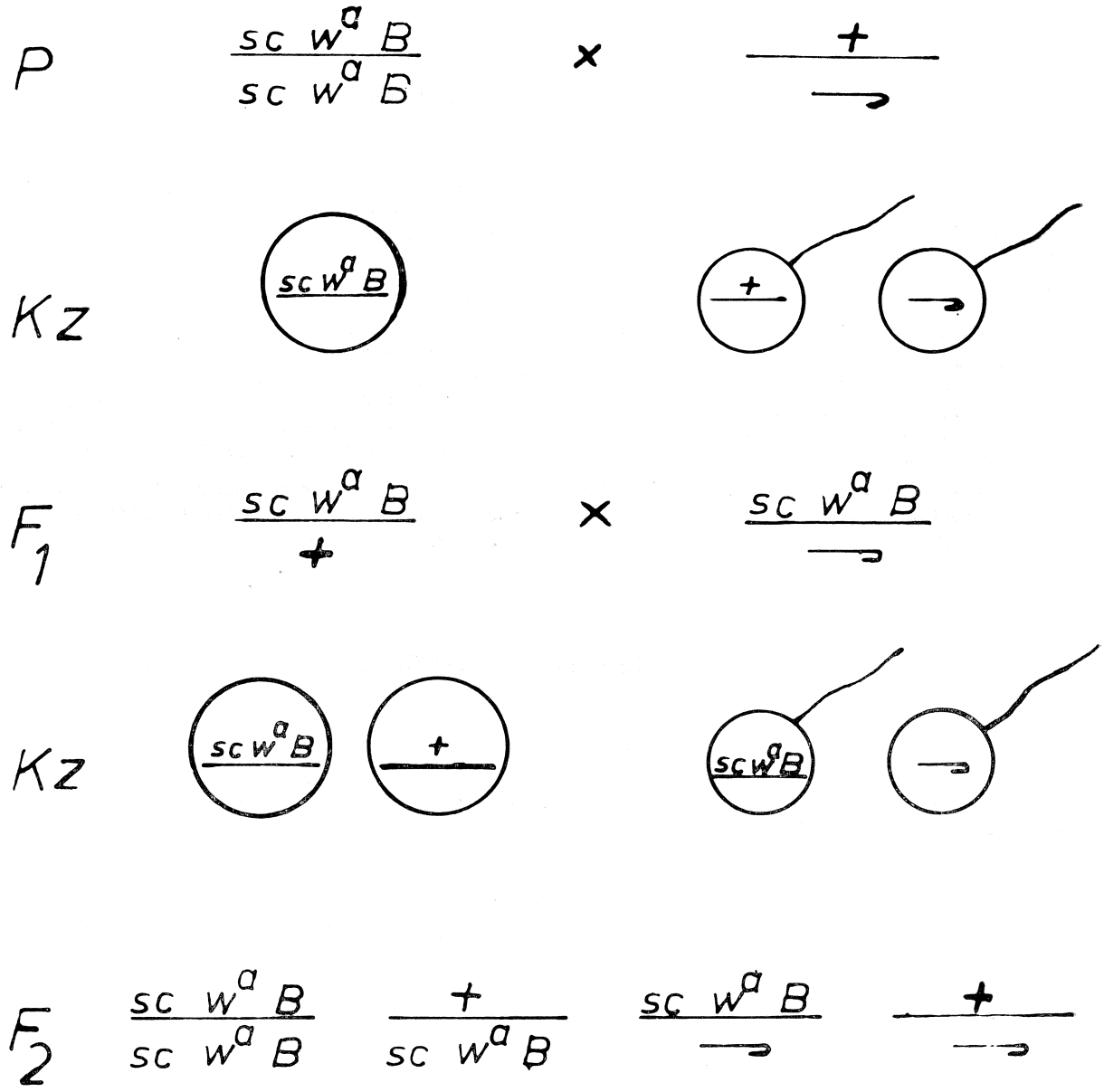
Ebenfalls an *E. coli* fanden KUBITSCHEK und BENDIGKEIT (1964a), dass Coffein offenbar 2 Typen von Mutationen induziert : 1. solche, die unabhängig von der Wachstumsrate der Kultur und damit von der Genreplikation sind, weil sie danach induziert werden, und 2. solche, die während der DNS-Synthese induziert werden und daher mit der Wachstumsrate korreliert sind.

Ferner sei noch erwähnt, dass Coffein den Repairvorgang UV-induzierter Schaden der DNS von *E. coli* hemmt (siehe Harm 1967).

UNTERSUCHUNGEN AN DROSOPHILA

ANDREW (1959) liess Larven des Stammes Canton S von *Drosophila melanogaster* 3-4 Tage auf einem Futter aufwachsen, das 0,25 % Coffein enthielt und verpaarte die geschlüpften männlichen Fliegen im Alter von 0-1 Tagen in 11 aufeinanderfolgenden 1 Tage-Bruten mit je 5 (Brut 1-3) bzw. 3 (Brut 4-11) virginen Muller-5-♀♀. In einer anderen Versuchsreihe injizierte ANDREW adulten Canton S-Männchen, die weniger als 1 Tag alt waren, eine 0,5 % ige Lösung von Coffein in physiologischer Lösung und verpaarte sie etwa 18 Stunden später in der gleichen Weise. Mittels der Muller-5-Methode (= Basc-Methode, siehe Schema 1) prüfte ANDREW dann in der F_2 den Prozentsatz rezessiv geschlechtsgebundener Letalmutationen bezogen auf die Gesamtzahl der aus behandelten X-Spermien der P-♂♂ hervorgegangenen F_2-Kulturen ; er betrug insgesamt im Coffein-Fütterungstest 0,7 %, im Coffein-Injektionstest 0,6 % und in der Kontrolle 0,14 %. Die Mutationsrate in den einzelnen Bruten, verschiedene behandelte Spermatogenesestadien repräsentierend, liess ANDREW darüber hinaus vermuten, dass prämeiotische Stadien der Spermatogenese weniger empfindlich sind als reifere. ANDREW weist in seiner Arbeit im übrigen vergleichend darauf hin, dass eine 1 % ige Mutationsrate in reifen Spermatozoen von Drosophila bereits der Wirkung von 250 r Röntgenstrahlen entspricht. Unter ähnlichen Bedingungen wie ANDREW führten YANDERS und SEATON (1964) Mutationsversuche mit Coffein an Drosophila durch. Im Gegensatz zu ANDREW beschreiben diese beiden Autoren Nichtmutagenität von Coffein bei Drosophila. In ihren Untersuchungen fanden YANDERS und SEATON allerdings u.a. ein

Nest von 13 Mutationen, die sie alle auf ein Mutationsereignis in einer Spermatogonie zurückführten und daher alle 13 Mutationen als 1 Mutation zählten. Sie reduzierten jedoch die Zahl der getesteten X-Chromosomen (F_2-Kulturen), auf die die Mutationsrate bezogen wird, nicht gleichfalls, was eigentlich in einem solchen Fall nötig wäre. Ferner treten grosse Mutationsnester spontan sehr selten auf, wodurch das Mutationsnest in ihrem Versuch als ein Indiz für eine mutagene Wirkung von Coffein angesehen werden könnte. Mutagenität von Coffein beobachteten auch OSTERTAG und HAAKE (1966) an *Drosophila melanogaster*. Sie legten Drosophilalarven beiderlei Geschlechts, die sich im 3. Larvenstadium befanden, 1 Stunde lang in eine Hefezuckerwassersuspension, die 10 mg/ml Coffein enthielt. Danach wurden die Larven wieder auf normales Medium übertragen und zunächst das Geschlechtsverhältnis der geschlüpften Fliegen bestimmt. Danach kreuzten die Autoren die als Larven behandelten adulten virginen Weibchen mit unbehandelten Männchen aus und prüften auf XO-Männchen und XXY-Weibchen infolge von Nondisjunction d.h. einer Fehlverteilung der Geschlechtschromosomen bzw. X-Chromosomenverlust. Gleichzeitig prüften sie durch eine geeignete Kreuzungsan-



Schema 1. — *Basc-Methode. Die in den X-Spermien der P-♂♂ induzierten rezessiven X-chromosomalen Letalmutationen werden am Fehlen der* F_2 — + —♂♂ *erkannt. Kz = Keimzellen.*

ordnung das Auftreten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalfaktoren. Sie fanden, dass männliche Larven durch die 1 % ige Coffeinlösung in stärkerem Masse abgetötet werden als weibliche (somatische Wirkung). Ferner beobachteten sie in der Nachkommenschaft der als Larven mit Coffein behandelten Weibchen eine Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses zuungunsten der Männchen und eine signifikante Erhöhung der Raten rezessiv-geschlechtsgebundener Letalmutationen im Kreuzungstest, die bereits durch die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses in der Nachkommenschaft der behandelten Weibchen angedeutet war. Darüber hinaus erhielten sie auch Anhaltspunkte für X-Chromosomenverlust, fanden aber merkwürdigerweise keine Erhöhung der Nondisjunction-Rate, sondern schlossen aus ihren Befunden vielmehr, dass Coffein die Nondisjunction-Häufigkeit reduziert.

Während OSTERTAG und HAAKE keine Erhöhung der Anzahl an XXY-Weibchen (als Kriterium für Nondisjunction) sondern eher Anzeichen für eine Reduzierung fanden, beobachteten MITTLER und Mitarbeiter (1967) einen deutlichen Anstieg unter allerdings veränderten Versuchsbedingungen (0,1225 % Coffein im Futter von Eiablage bis zum Schlüpfen der Imagines, sowie andere Teststämme). Möglicherweise gibt es für die Nondisjunction spezifische sensible Phasen der larvalen Keimzellbildung, die nicht in OSTERTAG Testbereich lagen.

UNTERSUCHUNGEN AN MENSCHLICHEN ZELLKULTUREN

OSTERTAG und Mitarbeiter (1965, 1966, 1967) führten *in vitro* Mutagenitätsuntersuchungen an HeLa-Zellen und Leukozytenkulturen durch.

Die HeLa-Zellen wurden in ihren Versuchen 1 Stunde mit Konzentrationen von 500 µg/ml bis 10.000 µg/ml Coffein in Eagles Medium behandelt und danach in coffeinfreies Medium überführt. 24 Stunden später wurden die Kulturen abgebrochen und eine Chromosomenanalyse durchgeführt.

Gefunden wurden — besonders bei den höheren Dosen — zahlreiche Chromatiden- und wenig Chromosomen- (Isolocus) brüche, bei höheren Dosen häufig Deletionen (wobei die Unterscheidung zwischen Bruch und Deletion oft schwer sein dürfte) und nur ganz vereinzelt komplizierte Chromosomenaberrationen. Zwischen der Coffeindosis und der Zahl der Chromatiden- und Isolocusbrüche wurde eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung gefunden.

TABELLE 1

Coffeininduzierte Brüche vei HeLa-Zellen (24 Stunden nach 1-stündiger Behandlung Zellen fixiert)

(aus OSTERTAG 1966)

Coffein µg/ml	Zahl der Chromosomen	Chromatiden + Isolocusbrüche		Translokationen
		Zahl	pro Chromosom	
0	4.187	4	0,0009	
500	2.754	18	0,0065	
1.000	3.693	47	0,0128	10*
2.000	4.361	111	0,0250	1
3.000	2.663	106	0,0398	1
5.000	5.666	401	0,0708	5
10.000	3.456	763	0,221	11

* 2 Zellen mit 10 Translokationen.

Die Zahl der gefundenen Chromatidenbrüche war abhängig von der Zeit zwischen Behandlung und Analyse. Die ersten induzierten Brüche liessen sich nach 5 Stunden feststellen; ihre Zahl stieg dann mit zunehmendem zeitlichem Abstand an, um bei 18-28 Stunden ihr Maximum zu erreichen und danach wieder abzusinken. Nach 45 Stunden (2 Zellteilungen) fanden sich fast keine Chromatidenbrüche mehr sondern nur noch Chromosomenbrüche. Die coffeininduzierten Deletionen zeigten ein ähnliches Abhängigkeitsverhältnis vom Zeitpunkt der Behandlung wie die Chromatidenbrüche. Da nach LAITHA und Mitarbeiter (1955, zitiert nach OSTERTAG 1966) bei HeLa-Zellen die G_1-(Präsynthese)-Phase 8-9 Stunden, die (DNS)-Synthese-Phase etwa 6 Stunden, die G_2-(Postsynthese)-Phase etwa 4-5 Studen und die Mitose selbst etwa 1 Stunde dauern, schliesst OSTERTAG aus der Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zwischen Behandlung und Analyse darauf, dass ähnlich wie in Leukozytenkulturen die in HeLa-Zellen durch Coffein induzierten Brüche von der DNS-Replikation abhängig sind.

Die Leukozytenkulturen wurden 2 Stunden bei 37° C mit 1 % Coffein behandelt. Danach wurden die Coffeinlösungen entfernt, die Zellen in der üblichen Weise weitergezüchtet und in bestimmten Zeitabständen nach der Behandlung aufgearbeitet. Sie fanden, dass Coffein in den diploiden Zellen der Leukozytenkultur Chromatidbrüche auslöst. Auf Grund der Befunde in den zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung abgebrochenen Kulturen folgern sie, dass die Zahl der coffeininduzierten Chromatidbrüche in der mittleren bis späten G_1-Phase höher ist als in den ersten 2 Stunden der G_1-Phase und in den letzten beiden Stunden der S-Phase. Bei Behandlung in der G_2-Phase beschreiben sie nur « eine leichte signifikante Erhöhung der Bruchzahlen in der darauffolgenden Mitose ». Verf. ziehen daraus den Schluss, dass coffeininduzierte Brüche von der DNS-Synthese abhängig sind. Neben einer grundsätz-

lichen Bevorzugung der Telomerregion fanden die Autoren eine phasenabhängige Spezifität der Bruchverteilung unter den Chromosomen. So ist die Bruchhäufigkeit bei Behandlung in der späten S-Phase für die Gruppe der B-Chromosomen deutlich grösser als bei Behandlung in der G_1-Phase.

UNTERSUCHUNGEN AM SÄUGETIER *IN VIVO*

CATTANACH (1962) verabreichte Mäuseböcken des JU-Inzuchtstammes 3 Monate lang eine 0,3 % ige wässrige Coffeinlösung als Trinkwasser. Danach wurde jedes ♂ mit je 3 virginen ♀♀ 6 Wochen lang verpaart. Die befruchteten ♀♀ wurden isoliert, die Wurfgrösse protokolliert und die Jungen (F_1) in Alter von 3 Wochen auf morphologische Anomalien inspiziert. Danach wurden die F_1-Weibchen verworfen. Die F_1-♂♂ wurden frühestens im Alter von 6 Wochen mit je 2 ♀♀ des Q-Stammes verpaart. Von denjenigen ♂♂, die kleinere Würfe als 8 Junge pro Wurf hatten und daher als translokationsverdächtig angesehen wurden, untersuchte CATTANACH die Testes cytologisch. Als Indiz für eine Translokation galt das Auftreten von mindestens 8 Metaphaseplatten der ersten meiotischen Teilung mit 19 statt 20 Bivalenten. CATTANACH erhielt folgende Befunde :

1. Die durchschnittliche Wurfgrösse der behandelten Serien war insgesamt kleiner als die der Kontrolle.

2. Die Wurfgrösse zeigte die Tendenz, mit dem grösser werdenden Abstand zwischen Behandlung und Verpaarung zuzunehmen.

3. Besonders in den ersten 3 Wochen nach der Behandlung war die Zahl der sterilen Paarungen verhältnismässig gross.

4. Von den geprüften 201 F_1-♂♂ hatten nur 13 Tiere Würfe, die im Durchschnitt kleiner als 8 waren. Die cytologische Analyse ergab bei 11 Tieren ein völlig normales Bild und bei 2 Tieren « cytologically abnormal pictures », jedoch nicht 19 statt 20 Bivalente (s.o.).

5. Morphologisch feststellbare Anomalien wurden weder in der F_1 noch in der F_2 beobachtet.

Die unter 1. beschriebene Verringerung der durchschnittlichen Wurfgrösse verliert, wie CATTANACH selbst schreibt, dadurch an Gewicht, dass in der Kontrolle die Q-♀♀ mit anderen ♂♂ (Q-♂♂) verpaart wurden als im Versuch (JU-♂♂). Die mit dem Abstand zur Behandlung zunehmende Wurfgrösse dürfte allerdings nicht durch das wachsende Alter der Mäuseböcke sondern nach CATTANACH eher durch Oligospermie oder das Auftreten dominanter Letalmutationen zu erklären sein. Sichere Anhaltspunkte für beide Effekte sind den Befunden jedoch nicht zu entnehmen.

LYON und Mitarbeiter (1962) paarten jeweils 2 C3H/HeH-♀♀ mit einem 101/H-♂ und gaben ihnen eine 0,1 %-ige Coffeinlösung als Trinkwasser. Den Nachkommen wurde bis zum Alter von 10 Wochen die gleiche Coffeinlösung verabfolgt ; die geschätzte Coffeinaufnahme vom Absetzen bis zum Alter von 10 Wochen betrug etwa 0,3 g pro Tier. Die F_1-♀♀ wurden danach mit unbehandelten PCT-♂♂ verpaart, die homozygot für die 7 rezessiven Gene a, b, c^{ch}, d, p, s und se waren. Reziprok hierzu wurden die F_1-♂♂ mit PCT-♀♀ des gleichen Typs verpaart. In dieser Zeit erhielten die Tiere gewöhnliches Leitungswasser zum Trinken. Die Nachkommen beider Paarungen wurden im Absetzalter auf Mutationen an einem der 7 spezifischen rezessiven Loci und auf dominante phänotypisch erkennbare Mutationen geprüft. Es fanden sich in beiden Versuchsreihen weder sichere Anhaltspunkte für coffeininduzierte rezessive noch für dominant sichtbare Mutationen. LYON und Mitarbeiter prüften ferner ♂♂, die 36 Tage lang 0,05, 0,1 und 0,2 %-ige Coffeinlösung als Trinkwasser erhalten hatten ohne Erfolg auf coffeininduzierte dominante Letalmutationen (vgl. Tab. 2 und 3).

KUHLMANN, der mir freundlicherweise Zwischenergebnisse seiner noch nicht abgeschlossenen Arbeit mit Coffein überliess, verabreichte Mäuseböcken des Stammes C57BL/6 im Alter von etwa 2 Monaten mehrere Monate lang Trinkwasser mit Coffeinkonzentrationen von 0,025-, 0,05-, 0,1-, 0,2-, 0,3, 0,5 % und weiteren Mäuseböcken des gleichen Stammes 8 Tage lang eine 0,85 %ige Coffeinlösung und kreuzte sie entweder unmittelbar nach der Coffeinbehandlung oder nach einer zwischenzeitlichen Verabreichung (1-3 Wochen) von normalem Leitungswasser mit 10-18 Wochen alten C3H-♀♀. Nach der dominanten Letalmutationsmethode wurden wie üblich am 15. Tag post conceptionem die ♀♀ seziert, die *Corpora lutea graviditatis* gezählt und die Raten toter Implantate im Uterus (vgl. Abb. 1) bestimmt. Er beschreibt, dass Coffein insgesamt bei langdauernder Behandlung dominante Letalmutationen zu induzieren vermag. Anhaltspunkte für eine eventuelle Stadienspezifität der mutagenen Wirkung lassen sich aus methodischen Gründen aus der Untersuchung nicht ableiten.

Die Frage, ob eine Stadienspezifität der mutagenen Wirkung von Coffein bezüglich der Induktion von dominanten Letalmutationen vorliegt, wird z. Zt. in unserem Labor von Frl. I.-D. ADLER geprüft. Hierzu injizierte sie 10 Wochen alten C3H-♂♂ (einmalig) 0,25 g Coffein pro kg Körpergewicht intraperitoneal und verpaarte sie beginnend mit dem Tag nach der Injektion in 8 aufeinanderfolgenden Wochen mit je 3 C3H-♀♀ pro Woche.

TABELLE 2

Häufigkeit embryonaler Verluste nach Auskreuzung coffeinbehandelter ♂♂

(nach LYON u. Mitarbeiter 1962)

Coffein-konzentration %	n ♂♂	*Corpora lutea*	Anzahl der Implantate	Lebende Implantate	Präimplantativer Eiverlust	Tote Implantate
0.05	2	264	200	187	24,2 ± 2,6	6,5 ± 1,7
0.1	6	743	577	522	22,3 ± 1,5	9,5 ± 1,2
0.2	7	682	522	468	23,5 ± 1,6	10,3 ± 1,3
Kontrolle	8	2.619	2.037	1.836	22,2 ± 0,8	9,9 ± 0,7

TABELLE 3

Dominant-sichtbare und rezessive specific locus Mutanten nach Coffeinbehandlung

(nach LYON u. Mitarbeiter 1962)

Nachkommen von	Anzahl d. untersuchten Nachkommen	Specific locus Mutanten	Mutationsrate/ Locus/Gamete × 10^5	95 % Vertrauengrenze × 10^5	Dominant Sichtbare Mutationen
behand. ♂♂	32.463	1	0,44	0,01-2,45	1
behand. ♀♀	31.686	0	0	0,00-1,66	1

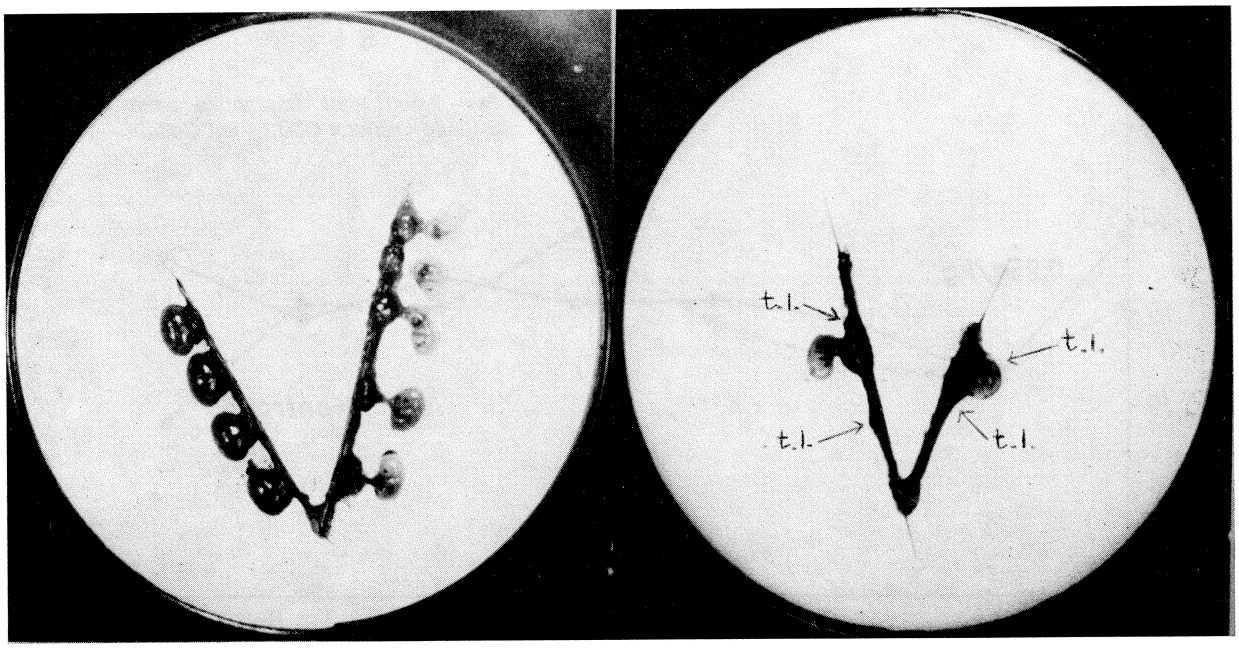


Abb. 1. — *Tote Implantate als Kriterium dominanter Letalmutationen. Uterus eines ♀ nach Trenimonbehandlung (0,125 mg/kg) des männlichen Partners, 14,5 Tage p. c. (rechts), und Uterus eines Kontroll-♀ (links). t. I. = tote Implantate.*

Durch diese Paarungsanordnung können die einzelnen Stadien der Spermatogenese fraktioniert getestet werden. Ihre bisherigen Befunde geben keinen sicheren Hinweis für eine Erhöhung der Raten toter Implantate nach dieser Coffeinbehandlung (Abb. 2). Auch die Raten präimplantativer Eiverluste waren nach dieser Behandlung nicht erhöht (Abb. 3). ADLER (1966) prüfte ferner nach der Methode von Evans et al. (1964, Modifikation nach SCHLEIERMACHER 1966) cytogenetisch das Auftreten von Chromosomenanomalien in der Spermatogenese der C3H-Maus nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 0,20 g/kg Coffein und 21-maliger Injektion von 0,25 g/kg Coffein. Ihre Versuchsanordnungen waren so gewählt, dass sie in geringerem Umfang (je 800 Bivalente) behandelte Diplotän- und Zygotän- Chromosomen und in grösserem Umfang (je 6.000 Bivalente in Versuch und Kontrolle) behandelte prämeiotische Chromosomen, wo noch DNS-Synthesen ablaufen, erfasste (Tab. 4 u. 5). Sie fand in keinem Fall eine signifikante Erhöhung an Chromosomenaberrationen und Univalenten gegenüber der Kontrolle. Darüber hinaus injizierte sie (persönliche Mitteilung) weissen, mit dem S_2-Sarkom der Maus infizierten Mäusen intraperitoneal Coffein (0,25 g/kg). 48 Stunden nach der Behandlung wurden der Tumor abgesaugt, fixiert und gefärbt und die Mitosechromosomen analysiert. Wieder ergab sich kein deutlicher Unterschied zur Kontrolle.

TABELLE 4

Univalente Chromosomenpaare in der ersten meiotischen Teilung der Spermatogenese der männlichen Maus nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 0,20 g/kg Coffein
(nach ADLER 1966)

Behandeltes Stadium	Anzahl d. Bivalente		Anz. d. Univalente		% Univalente	
	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
Diplotän	800	800	5	4	0,625	0,500
Zygotän	800	800	5	5	0,625	0,625

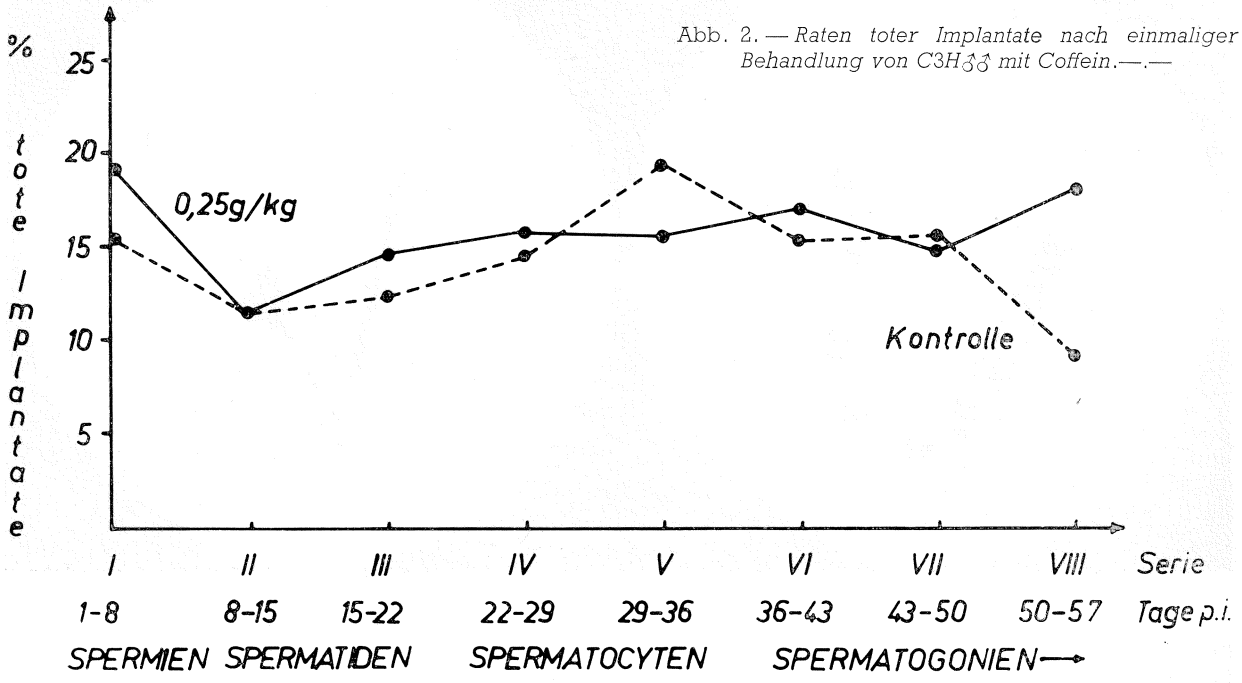


Abb. 2. — *Raten toter Implantate nach einmaliger Behandlung von C3H♀♂ mit Coffein.—.—*

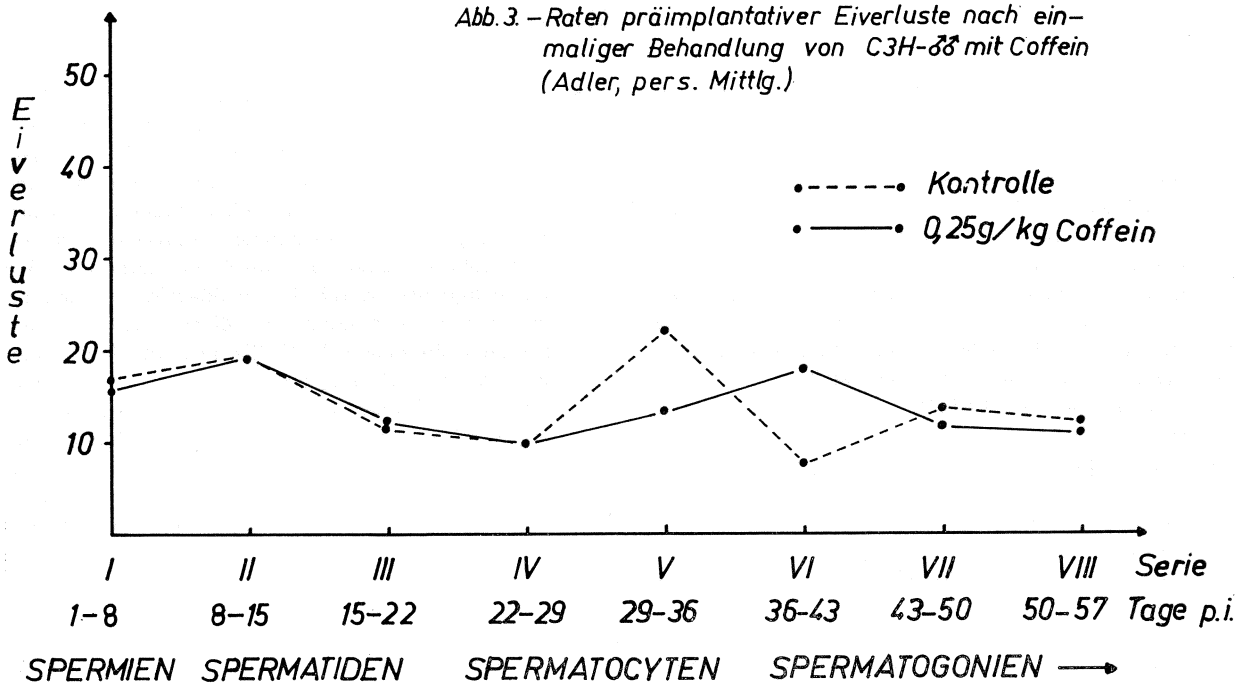


TABELLE 5

Univalente Chromosomenpaare in der ersten meiotischen Teilung der Maus nach 21-maliger intraperitonealer Injektion von 0,25 g/kg Coffein
(nach ADLER 1966)

Behandlung	Zahl der untersuchten Bivalente	Univalente		Zahl der untersuchten Zellen	% der Zellen mit Univalenten
		n	%		
Coffein	6.000	28	0,46	300	9,3
Kontrolle	6.000	26	0,43	300	8,6

UNTERSUCHUNGEN AM MENSCHEN

Auf Grund des XX-XY-Typs der Geschlechtsbestimmung beim Menschen ist bei Behandlung der Mutter durch X-chromosomal-rezessive Letalfaktoren eine Reduzierung der Knabengeburten und bei Behandlung der Vater durch X-chromosomal-dominante Letalfaktoren eine Verminderung der Mädchengeburten zu erwarten.

In einer Erhebung fragten daher VOGEL und Mitarbeiter (1966) Studenten von drei Hochschulen und Schüler nach den Kaffeetrinkgewohnheiten ihrer Väter und Mütter sowie nach Geburtsjahr und Geschlecht der Probanden und ihrer Geschwister. Es ergab sich in keinem Fall eine signifikante Verschiebung des Geschlechtsverhlätnisses in der erwarteten Richtung.

DISKUSSION

Mutationen sind unzweifelhaft das Ausgangsmaterial der Evolution. Ohne sie hätte kaum eine Entwicklung zum Menschen stattgefunden. Dennoch haben bei einem so hochdifferenzierten Organismus wie dem des Menschen Mutationen zweifellos im allgemeinen nachteilige Folgen für den, der diese Mutationen in der wirksamen Dosis erhält. Es ist also unsere Pflicht, die mögliche mutagene Wirkung einer Substanz beim Menschen besonders dann sorgsam abzuwägen, wenn diese Verbindung von vielen Menschen aufgenommen wird, und Coffein gehört fraglos zu diesen Stoffen.

Da Coffein nach GOLDSTEIN und Mitarbeitern (siehe GOLDSTEIN 1962, GOLDSTEIN und Mitarbeiter 1962) die Ovarien und Testes erreicht und die Gonaden bei mehrmaligem täglichen Kaffeegenuss einen annähernd konstanten Spiegel von 1 µg Coffein pro ml Körperflüssigkeit aufweisen sollen, wird die Frage der mutagenen Wirkung von Coffein noch bedeutsamer. (Der Nachweis erfolgte aber lediglich nach i.m. bzw. i.v. Injektion von Coffeinnatriumbenzoat, alles andere ist spekulativ.)

Die einzige Erhebung am Menschen selbst verlief negativ (VOGEL und Mitarbeiter 1966). Diese Erhebung erfasste aber nur ein geringes Spektrum der möglichen Mutationstypen. Ferner lässt sich ein gewisser Unzuverlässigkeitsgrad der in den Fragebogen gemachten Angaben nicht ausschliessen. Darüber hinaus liesse sich die fehlende Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei den Kindern kaffeetrinkender Mutter dadurch erklären, dass in der Keimzellentwicklung der Frau nach der Geburt praktisch keine DNS-Replikation mehr stattfindet und nach OSTERTAG und GREIF (1967) rezessiv-letale Mutationen nur dann zu erwarten sind, « wenn nach der Coffeinbehandlung DNS-Replikationen stattfinden ».

Auch die negativen Befunde von ADLER, LYON u. Mit. u. CATTANACH an der Maus schliessen eine unentdeckte schwäche mutagene Wirkung von Coffein nicht aus.

Wie sieht es nun mit den eingangs zitierten Mutagenitätsbefunden an den verschiedenen Organismengruppen aus ? Die Befunde an Mikroorganismen und höheren Pflanzen lassen aus verschiedenen Gründen (vgl. RÖHRBORN 1965a) keine eindeutigen Schlüsse auf den Menschen zu. Aus den Drosophilauntersuchungen derartige Schlüsse abzuleiten ist schon aus Gründen des Dosisvergleichs kaum möglich. Hier sind exakte Bestimmungen der aufgenommenen Gonadendosis unerlässlich. Bei Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen *in vitro* ist zu bedenken, dass die *in vitro*-Verhältnisse nur unter Vorbehalten den *in vivo*-Bedingungen gleichzusetzen sind. So könnten beispielsweise gestörte Kulturbedingungen bei der Induktion von Chromosomenaberrationen durchaus eine Rolle spielen. Selbst wenn man dies vernachlässigt, ist zu bedenken, dass die niedrigste Dosis, in der in den oben erwähnten Untersuchungen eine mutagene Wirkung von Coffein nachgewiesen wurde, 500 µg/ml war und der Gonadenspiegel nur 1 µg/ml betragen soll. Das Vorliegen einer linearen Dosis-Effekt-Beziehung über 500 µg/ml beweist noch nicht, dass diese Beziehung auch in kleinerem Dosisbereichen gelten muss. Es könnte durchaus ein Schwellenwerteffekt vorliegen, der durch die Aufhebung der Coffeinmutagenität durch Purinnukleoside in den im Abschnitt Untersuchungen an Mikroorganismen beschriebenen Versuchen NOVICKs noch an Wahrscheinlichkeit gewinnt. Dies bedeutet aber auch, dass man sich bei *in vivo*-Untersuchungen in einem Dosisbereich bewegen sollte, der dem menschlichen Coffeinkonsum wenigstens in etwa entspricht. Legt man die Kalkulation von GOLDSTEIN zugrunde, so nimmt ein Erwachsener durchschnittlich 300 mg Coffein täglich auf. Bei Annahme eines durchschnittlichen Körpergewichts von 60 kg bzw. 70 kg entspräche dies etwa 5,0 mg bzw. 4,3 mg pro kg Körpergewicht. Nach LYON und Mitarbeiter (1962) beträgt die tägliche Coffeinaufnahme der Maus etwa 1 mg Coffein pro 4 g Körpergewicht, d.h. 250 mg/kg bei Verabreichung einer 0,1 % igen Coffeinlösung als Trinkwasser. Die Befunde von KUHLMANN (vgl. Abschnitt Untersuchung am Säugetier *in vivo*) sprechen insgesamt für eine mutagene Wirkung von Coffein beim Säuger. Bis heute liegt jedoch noch kein eindeutiger Hinweis gesichert gegenüber einer genügend grossen Kontrolle vor, der besagt, dass so geringe Coffein-Konzentrationen wie wir sie beim Trinken von Kaffee aufnehmen, bei Mäusen *in vivo* mutagen wirken. Umfangreiche Erhebungen sind insbesondere im niederen Dosisbereich dringend erforderlich, so zeitraubend und aufwendig sie auch sein mögen (Röhrborn in Vorbereitung).

Nach den bereits zitierten Arbeiten von OSTERTAG und Mitarbeitern bedarf die Coffeinmutagenese der DNS-Synthese. Die Untersuchungen von KUBITSCHEK und BENDIGKEIT (1964a und b) lassen aber vermuten, dass es zwei Typen von Coffeinmutationen gibt, nämlich DNS-syntheseabhängige und -unabhängige.

Man sollte sich meines Erachtens hüten, bezüglich Keimzellmutationen die postnatale Oogenese der Frau deshalb *a priori* auszuklammern, weil keine DNS-Replikationen mehr stattfinden. Zur Illustration seien eigene Erfahrungen mit einem anderen Mutagen herangezogen (RÖHRBORN 1965c, 1966, 1967). Trenimon gehört zu den mutagenen « alkylierenden » Agenzien. Untersuchungen an höheren Pflanzen (vgl. RIEGER und MICHAELIS 1962) und Mikroorganismen (z.B. SZYBALSKI 1960, KIMBALL 1965) weisen daraufhin, dass solche Stoffe in ihrer mutagenen Wirkung gleichfalls von der DNS-Synthese (-Replikation) abhängig sind. Bei einer eingehenden Prüfung von Trenimon am Säuger auf die Induktion dominanter Letalmutationen (vgl. Abb. 1) wurde zunächst die Spermatogenese geprüft. Hierbei zeigte sich, dass die induzierten dominanten Letalmutationen

praktisch nur in den Keimzellstadien (Spermatiden und Spermatozoen) auftraten, in denen keine DNS-Synthese mehr abläuft. Auch in der postnatalen Oogenese, in der ebenfalls keine DNS-Replikation mehr stattfinden soll, fand sich bei jungen ♀♀ eine Phase, in der die Raten toter Implantate signifikant über den Kontrollwerten lagen.

Dies zeigt, dass auch eine Prüfung der mutagenen Wirkung von Coffein nicht nur auf die pränatalen Oogenesestadien, in denen DNS-Synthesen ablaufen, beschränkt werden sollte, sondern auch auf die postnatale Oogenese ausgedehnt werden und letztere Prüfung mgölichst verschiedene Altersstufen umfassen sollte. Weiterhin sollten genetische Untersuchungen auch in stärkerem Masse synergistische Wirkungen (z.B. Coffein und Röntgenstrahlen) einschliessen.

So zahlreich die Befunde an den verschiedenen Testorganismen bisher auch sind, die Frage einer mutagenen Wirkung von Coffein beim Menschen muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unbeantwortet bleiben. Die Mutagenitätsuntersuchungen mit Coffein sind geradezu ein Modellbeispiel für die Schwierigkeiten an Experimentalobjekten mit relativ schwachen Mutagenen stichhaltige Aussagen für den Menschen zu gewinnen.

LITERATUR

ADLER, I.-D. — Cytogenetic investigations of mutagenetic action of caffeine in premeiotic spermiogenesis in mice. *Humangenetik*, **3,** 82-83 (1966).

— Persönliche Mitteilung.

ANDREW, L. E. — The mutagenic activity of caffeine in Drosophila. *Amer. Nat.*, **93,** 135-138 (1959).

CATTANACH, B. M. — Genetical effects of caffeine in mice. *Z. Vererbungsl.*, **93,** 215-219 (1962).

DEMEREC, M., BERTANI, G. and FLINT, J. — A survey of chemicals for mutagenic action on E. coli. *Amer. Nat.*, **85,** 119-136 (1951).

EVANS, E. P., BRECKON, G. and FORD., C. E. — An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics*, **3,** 289-294 (1964).

GEZELIUS, K., and FRIES, N. — Phage resistent mutants induced in E. coli by caffeine. *Hereditas*, **38,** 112-114 (1952).

GOLDSTEIN, A. — Mutagens currently of potential significance to man and other species. In : SCHULL, W. J., Mutations. The University of Michigan Press, Ann Arbor (1962).

GOLDSTEIN, A. and WARREN, R. — Passage of caffeine into human gonadal and fetal tissue. *Biochem. Pharmacol.*, **11,** 166-168 (1962).

HARM, W. — Differential effects of acriflavine and caffeine on various ultraviolet-irradiated Escherichia coli strains and T_1 phage. *Mutat. Res.*, **4,** 93-110, (1967).

KIHLMAN, B. and LEVAN, A. — The cytological effect of caffeine. *Hereditas*, **35,** 109-111 (1949).

KIMBALL, R. F., Repair and differential sensitivity to mutation induction. Summary and synthesis. In : SOBELS, F. H., Repair from genetic radiation, Pergamon Press, London (1963).

KUBITSCHEK, H. E. and BENDIGKEIT H. E. — Mutation in continuous cultures. I. Dependence of mutational response upon growth-limiting factors. *Mutat. Res.*, **1,** 113-120 (1964a).

— Mutation in continuous cultures. II. Mutations induced with ultraviolet light and 2-aminopurine. *Mutat. Res.*, **1,** 209-218 (1964b).

KUHLMANN, W. — Persönliche Mitteilung.

LYON, M. F., PHILLIPS, J. S. R. and SEARLE, A. G. — A test for mutagenicity of caffeine in mice. *Z. Vererbungsl.*, **93,** 7-13 (1962).

MITTLER, S., MITTLER, J. and OWENS, S. L. — Loss of chromosomes and nondisjunction induced by caffeine in Drosophila. *Nature*, **214,** 424 (1967).

NOVICK, A. — Mutagens and antimutagens. Brookhaven Symp. Biol., **8,** 201-215 (1956).

OSTERTAG, W. — Chemische Mutagenese an menschlichen Zellen in Kultur. Akad, Wiss., Abh. d. Math.-Nat. Klasse Nr. 1, (1966).

— und GREIF, B. J. — Die Erzeugung von Chromatidenbrüchen durch Coffein in Leukocytenkulturen des Menschen. *Humangenetik*, **3,** 282-294 (1967).

— and HAAKE J. — The mutagenicity in Drosophila melanogaster of caffeine and of other compounds which produce chromosome breakage in human cells in culture. *Z. Vererbungsl.*, **98,** 299-308 (1966).

— DUISBERG, E. and STÜRMANN, M. — The mutagenic activity of caffeine in man. *Mutat. Res.*, **2,** 293-296 (1965).

RIEGER, R. und MICHAELIS, A. — Die Auslösung von Chromosomenaberrationen bei Vicia faba durch chemische Agenzien — Eine Ubersicht. *Die Kulturpflanze*, **10,** 212-292 (1962).

RÖHRBORN, G. — Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. *Humangenetik*, **1,** 205-231 (1965a).

— Über die mutagene Wirksamkeit von Pharmaka unter besonderer Berücksichtigung von Chloräthylaminderivaten. Habilitationsschrift Med. Fak, Universität Heidelberg (1965b).

— Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus. *Humangenetik*, **1,** 576-578 (1965c).

RÖHRBORN, G. — Über einen Geschlechtsunterschied in der mutagenen Wirkung von Trenimon bei der Maus. *Humangenetik*, **2,** 81 (1966).

— and BERRANG, H. — Dominant lethals in young female mice. *Mutat. Res.*, **4**, 231-233 (1967).

SCHLEIERMACHER, E. — Über den Einfluss von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. I. Methodik der Präparation und Analyse meiotischer Teilungen. *Humangenetik*, **3**, 127-133 (1966).

SZYBALSKI, W. — The mechanism of chemical mutagenesis with special reference to triethylene melamine action. Developments in Industrial Microbiology Proc. 16 th General Meeting of the Society for Industrial Microbiology State College, August/Sept. 1959, Plenum Press, New York, 231-241 (1960).

VOGEL, F., KRÜGER, J., KURTH, M. und SCHRÖDER, T. M. — Über das Fehlen einer Beziehung zwischen dem Kaffeegenuss der Eltern und dem Geschlechtsverhältnis unter ihren Kindern. *Humangenetik*, **2**, 119-132 (1966).

YANDERS, A. F. and SEATON, R. K. — The lack of mutagenicity of caffeine in Drosophila. *Amer. Nat.*, **46**, 277-280 (1962).

RÖHRBORN (G.). — **Problème de l'action mutagénique de la caféine chez l'homme.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 332-342, fig., tabl., réf.

On a jusqu'alors mis en évidence une action mutagénique de la caféine par des recherches sur des microorganismes, des plantes supérieures, la drosophile et des cultures de cellules humaines. Ces dernières ont plus particulièrement conduit à mettre en garde contre un péril génétique induit par l'absorption de café.

Ces constatations sont en contradiction avec des études sur les souris pour lesquelles on n'a pas observé de mutations provoquées par la caféine. Des résultats négatifs ont été obtenus au cours d'une enquête sur la caféine chez les êtres humains. Ces résultats contradictoires sont confrontés et leur valeur pour les humains est discutée. La poursuite d'expérimentations étendues sur des mammifères *in vivo* est indispensable pour résoudre définitivement le problème de l'activité mutagénique de la caféine chez les êtres humains.

RÖHRBORN (G.). — **The problem of the mutagenic action of caffeine in man.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 332-342, fig., tabl., réf.

So far mutagenic activity of caffeine has been proven in investigations of micro-organisms, higher plants, Drosophila and cultures of human cells. Especially the latter has been the occasion to warn of the genetic dangers originating in coffee consumption. These results are in contradiction to some studies in mice, where no caffeine-induced mutations were observed. A caffeine investigation in man also provided negative results. These contradictory results are dealt with in the paper and the importance for man is discussed. Further far-reaching *in vivo* experiments in mammals will be necessary to give a definite answer to the question of caffeine mutagenesis in man.

RÖHRBORN (G.). — **Zum Problem der mutagenen Wirkung von Coffein beim Menschen.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 332-342, fig., tabl., réf.

Mutagene Wirkungen von Coffein sind bisher in Untersuchungen an Mikroorganismen, höheren Pflanzen, Drosophila und menschlichen Zellkulturen nachgewiesen worden. Insbesondere letztere sind zum Anlass genommen worden, vor einer genetischen Gefährdung des Menschen durch Kaffeegenuss zu warnen. Diesen Befunden stehen Untersuchungen an Mäusen gegenüber, in denen keine coffeininduzierten Mutationen beobachtet wurden. Negative Resultate erbrachte auch eine Coffeinerhebung am Menschen selbst. Diese entgegengesetzten Untersuchungsergebnisse werden im Vortrag gegenübergestellt und ihr Aussagewert für den Menschen erörtert. Weitere grossangelegte Experimente am Säuger *in vivo* sind erforderlich, um die Frage der Coffeinmutagenes beim Menschen endgültig beantworten zu können.

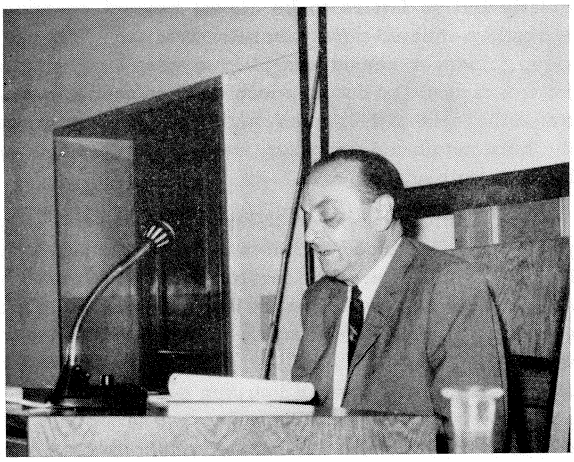
FALLACIES IN CURRENT MEDICAL RESEARCH ON COFFEE

S. LEE
Technical Editor, Tea and Coffee Trade journal, New York

In sickness and in health, medical researcher in widely divergent areas are avidly engaged in serious endeavours to demonstrate that the ingestion of beverage coffee is deleterious to mankind. These divergent areas are both geographical — Chicago, Philadelphia, Boston, Toronto — and physiological — heart failure, circulatory disturbances, diabetes, gastric difficulties and many others. All of these research works are ignoring over three centuries of salubrious usage of this beverage as an item of widespread daily diet by an overwhelming majority of several of our leading nations and are seeking infinitesimal areas where its usage may be contraindicated, or individual allergical conditions which might be unscientifically extrapolated to substantially larger populations. These possibly ultimately could lead to its complete prohibition as has occasionally occurred in the past or at least to labelling identification of : « Caution. May be hazardous to health ». Completely ignored are all the beneficial effects resulting from the extensive international use of the brew.

Medical research today is a strangely bifurcated animal. On the one hand, we have the laboratory sciences — anatomy, histology, physiology, biochemistry, pharmacology, etc. — pure disciplines which have made tremendous strides in the description, identification, alleviation and even cure of many diseases ; and which are largely responsible for the greatest advances in man's health that the world has ever seen. And on the other hand, we have the clinical sciences — gynecology, urology, dermatology, pediatrics, etc. — which comprise in great part of the art of medical healing. Where these clinical scientists recognize a disease for which a specific cure has been developed by the pure sciences such as typhoid, diphtheria, etc., they may be considered to be practicing twentieth century medicine. Where the clinical scientist tries to treat a disease for which the pure scientist has developed no cure — such as cancer, heart failure, etc., — the clinician is not far removed from the mediaeval witch doctor. Most physians recognize the differences between these two areas ; but the public is unable to differentiate, and when informed of any development in the clinical sciences, assume such a development has the validity of an advance in pure science.

A large element of confusion in this area lies in the current processing of **medical literature**. Practically all leading medical journals — the Journal of the American Medical Association, British Medical Journal, Lancet, Klinische Wochenshrift, etc. — publish clinical articles interspersed with pure scientific works — giving each equal prominence. A busy practitioner, reading rapidly, may assume both types of reports have equal scientific standing and may lead to erroneous



conclusions as to progress in a particular field. With the tremendous expansion in medical knowledge this could be even more forcefully true in the case of specialists, where a diabetes expert for instance could easily misinterpret a clinical result in the circulatory field.

A signal advantage of clinical reports in medical literature is the opportunity it affords the author of presenting his personal beliefs and prejudices with an aura of a scientific background. This serves a two-fold purpose : it flatters the ego of the author to be able to present pet theories without necessary substantiation within a framework of authority and at the same time, this reinforces him in his prejudices so that he becomes even more reluctant to question them or admit to the possibility of their being erroneous.

Medical literature is replete with instances of this type. One of the most impartial discussions about coffee was printed in the Journal of the American Medical Association by its president, Dr. I. N. LOVE, in the February 14, 1891 issue on the subject : « Coffee, its Use and Abuse ».

After describing Mocha as the best coffee of commerce and Java next but a blend of equal parts of the two as « most agreable in flavor », he ventures the opinion : « that there is no beverage on earth which, used in moderation, expresses more comfort, contentment and calmness to the cerebral centers than coffee ; but in excess, it is undoubtedly most dangerous ; it disorders digestion, removes the desire for food, creates an indisposition to sleep, excites headache, vertigo, mental confusion and disturbes heart action. »

He then recalls the sad and supposedly typical case of « Mrs. S. » — one of his patients near St. Louis. « A mother of five children all born within eight years and one or more of them sick half the time. Mother, conscientious and ever alert to her duty, suddenly taken down with heart trouble and such nervous symptoms as to imperil life. Upon examination, I discovered an almost bloodless woman with a heart beating irregularly but so fast as to be almost beyond counting. A restless, hunted-down expression of face and physique ; no fever ; an utter inability to sleep ; no appetite for weeks past. The history which I elicited soon demonstrated the fact that the mother, in order to bear up under the burdens placed upon her, had been for six months living upon black coffee.

« The desire for food or ability to digest it had long since gone. The blood had become impoverished from lack of sustenance. Her cerebro-spinal centres, the accelerating nerves of her heart had been whipped almost to the point of exhaustion. Opiates and digitalis, whiskey and predigested milk, good sleep, oats instead of the whip, in the form of nutrition easy to assimilate, gradually brought the patient around to a condition to health. It may not be uninteresting to state that this excellent woman, although a coffee drunkard, was a member of the local Temperance Union. »

Other physicians were nowhere near as impartial towards coffee. Dr. William M. LESZYNSKY, a consulting neurologist to the Manhattan Eye and Ear Hospital and Fellow of the New York Academy of Medicine, in a lecture delivered before the New York County Medical Association, December 17, 1900, discussed the frequent deleterious effects of coffee as a beverage, and acute and chronic coffee poisoning. He had been consulted by victims of the coffee-habit or « chronic coffeeism » among commercial travelers, brokers, merchants, actors, writers and news reporters. In order to produce the desired stimulation, they find it necessary continually to increase the dosage, just like those who have the « alcohol habit » or the « opium habit ». Their general health becomes much impaired and the functional activity of every organ may be affected. They usually complained of symptoms such as general headache and nervousness ; apprehension in regard to some unknown impending trouble ; mental depression and irritability ; insomnia or restless sleep ; bad dreams ; sudden « starting » in sleep and awakening in profuse perspiration ; occasional or frequent dizziness ; general tremulousness and diminished muscular power ; cardiac palpitation, loss of appetite ; frequent eructation of gas, and constipation.

The histories of seventeen patients who had been in the habit of drinking three to seventeen cupfuls of coffee daily were mentioned. The digestive function was first attacked resulting in epigastric pains. The pulse was slow, soft and compressible, neuralgia, vertigo, sexual impotence in the male and profuse leucorrhea in women were listed as prominent symptoms.

Another physician, Dr. MENDEL, called attention to the functional disturbances of the nervous system produced by excessive use of coffee. He graphically describes a class of working women in an industrial district : « At every meal, from early morning until late at night, the working woman drinks her coffee which always stands ready on the stove. The coffee energizes them to work, stills their hunger, cheers them in misfortune ; in short, what the whiskey flask is to the laborer, the coffee pot is to these women. »

What is the modern motivation behind current medical research to demonstrate that beverage coffee is injurious ? Such a beverage has never harmed any of the individuals involved in this work. Why should they spend hundreds of man-hours and thousands of research dollars (that might well be spent in more urgent areas) in trying to prove it harmful ? Such hostility may be divided into two categories :

The first and most conspicuous type — the type prevalent during Victorian days — may be ascribed to the « reformer-missionary spirit » that is present in some dedicated people. These people theorize :

« Man is a sinful animal and is placed on this earth to suffer. Therefore, anything he enjoys or gives him pleasure, is by definition bad for him and should be withheld. » Many lay people ardently believe in this philosophy, and willingly forego pampering themselves in anticipation of a more pleasurable afterlife or in the belief that it builds character.

The second type of motivation is more current. In this category are highly educated individuals seeking personal advancement, glory or gain. The growth of scientific research in the United States has now reached the point where thousands of the most able people are engaged full time in the expansion of human knowledge. The United States government is financing much of this work and every year hundred of such grants are available. Many of these projects are in the obscure areas of atomic energy, electronics, chemistry, biology, etc. Bit by bit, the knowledge gained in these areas are added together to contribute significant advances in all the sciences. Occasionally an individual will conceive a dramatic simple project, which, if successful, would give the researcher instant fame and prestige. Proving coffee is deleterious would qualify as such a project.

During the long history of civilized use of coffee, periodically, vicious enemies have arisen to denounce the safety and benefits derived from the daily consumption of this popular beverage. Originally introduced as a medicinal agent, coffee rapidly made the transition to a food adjunct as the common people discovered the salubrious value of this delightful brew, both with and between meals.

Early in the sixteenth century, coffee was banned in Mecca after several physicians stated that it was injurious and was apt to give rise to actions which were improper for a Mohammedan. Its sale was prohibited and citizens, convicted of having drunk coffee, were led through the town mounted on a donkey. But, like other beverage prohibitions, this law was ineffective and was repealed. In fact, some years later, a Turkish law was passed stating that the refusal of a husband to supply his wife with coffee would be legal ground for divorce.

During Victorian days, many westerners began to agitate against the use of coffee. Without a shred of medical evidence, these reformers proclaimed that beverage coffee caused gastric disorders, headaches, insomnia, restlessness, angina pectoris and other heart diseases, weakness of sight, disturbances of hearing, prostatitis, impotence and sterility. During the first decade of the twentieth century, the use of coffee was criticized in the same terms that LSD is criticized today. In the Greenwich Village of its day, wild coffee orgies were held, and unspeakable crimes were committed by individuals under the influence of too many cups of coffee. Alcohol in wine and whiskey, nicotine in tobacco, and caffeine in coffee were daily pictured in the popular press as three pernicious habit-forming drugs which were leading mankind down the primrose path to perdition and would have to be completely eliminated before people could ever find salvation. It is almost unbelievable that barely sixty years ago, less than a lifetime ago, coffee was described in almost identical terms used today for marijuana, cocaine, heroin and benzedrine. This movement culminated in the marketing and development of decaffeinated coffee and cereal beverages such a Postum during the first decade of the current century.

For half a century, criticism and condemnation of coffee as a beverage disappeared. In some instances, where caffeine was contraindicated, such as ulcers or insomnia, physicians quietly advised their patients to swich to decaffeinated beverages and these latter began to grow in popularity even among people who could tolerate caffeine.

Suddenly, in the sixth decade of the twentieth century, a new group of coffee critics arose. These are the scientific workers trying to establish a name for themselves on the basis of clinical research. These critics are far more subtle and clever than previous objectors to the beverage. They carefully refrain from stating that coffee is harmful. Instead, they propound the theorem of : « We well know that a single cup of coffee is harmless ; however, what is the long term effect of drinking two or three cups a day for ten, twenty or thirty years ? Could there be a cumulative effect leading to degenerative diseases ? » Provocative question like these leading to human clinical research work is responsible for most of the fallacies in current medical research on coffee.

Now let us look at the medical background responsible for the resurgence of this clinical interest in coffee research. This century has seen a revolution in the major causes of human death. All through recorded history, and through the first decades of this century, the primary causes of man's demise have been bacterial diseases, diphtheria, typhoid, plague, tuberculosis, etc. The fantastic discoveries and progress of the pharmaceutical industry have practically eliminated germ diseases as the bane of mankind. Today, the chief causes of human death are the so-called « degenerative » diseases, heart failure, high blood pressure, coronary thrombosis, cerebral strokes, cancer, etc. Major medical research is currently being directed towards alleviating these types of diseases.

Well over fifty percent of the causes of human death today comes under the category of heart failure and circulatory diseases — defects of the circulation of blood which is a major fraction of the medical speciality called « internal diseases ». Human life hangs by the slender thread of a few quarts of vital red fluid which must be continually recirculated. Cessation of this circulation results in instant death.

It is a source of continual frustration to research workers in this area that they are unable to find a single cause for circulation stoppage. In this respect, the microbiological diseases were very neat and pleasing. Once

the causative micro organism was discovered, a single cure could often be found. Circulation, on the other hand, may cease due to a blockage, slippage or breakage at numerous points or due to pump failure at the valves or motive power. It would be highly satisfactory, from the researchers' standpoint, if a single simple cause, such as prolonged and extensive drinking of coffee, could be blamed for the increase in circulatory diseases.

One group of medical research workers tried to do this in 1963. Headed by Dr. Oglesby PAUL, Professor of Internal Medicine at Chicago's Northwestern University Medical School, they published a report in the American Heart Association monthly periodical « Circulation » (1), entitled « A Longitudinal Study of Coronary Heart Disease ». This report covered a five year study of two thousand male employees in a Chicago division of the Western Electric Company. An attempt was made to correlate the percentage of this group developing coronary difficulties with the quantity of coffee they consumed. Statistically, they concluded : « A significant correlation between the use of coffee and later development of coronary disease is seen (P = .025) ».

Although the specific causes of many circulatory diseases are still largely unknown, intensive studies have revealed some very interesting descriptive facts. One large group of these facts have to do with a substance called cholesterol. This compound with the chemical formula $C_{27}H_{45}OH$ is a fat-soluble, complex alcohol that can be isolated as pearly white leaflets or platelike crystals. It is a natural product occurring in all human tissues — an average one hundred fifty pound man having about an ounce of cholesterol in his brain, another ounce in his muscle tissues, about a sixth of an ounce circulating in his blood stream, an equal amount in his liver and an ounce or so stored in his fatty tissue.

In many cases of high blood pressure, it has been observed that the **cholesterol** has been precipitated out of the blood stream and deposited inside the walls of the blood vessels. As the cholesterol deposit builds up, the opening through which the blood passes becomes constricted, and it requires higher pressure to force the blood to continue to circulate. Eventually, a blood vessel can become so clogged with cholesterol that no fluid can go through and death may result.

Low-cholesterol diets have been proposed to prevent or retard this phenomenon, but have been complete failures, for the body can both digest and create cholesterol from whatever food it consumes. Herbivorous animals obtain no cholesterol in their food, and yet their tissues contain essentially the same levels of cholesterol as omnivores or carnivorous animals. Medical science is still not aware of the function of cholesterol in human health — whether it is good or bad for man. All that is known is that, if it is precipitated within the circulation or as gallstones, which are almost one hundred percent cholesterol, it causes trouble ; and under conditions of stress, the percentage of cholesterol in the blood increases. Currently, many medical scientist are seeking the cause or causes for cholesterol deposition. They would love to be able to prove that excessive or long term coffee drinking is responsible.

One other physiological factor is of great significance in the present scientific attacks upon coffee. Under conditions of stress, the concentration of **free fatty acids (FFA) in the blood** stream also increases. A small amount of FFA is always present in blood. In fact, the circulation of the blood is the normal method the human body uses to transport the fat in the food we eat to storage in adipose tissue ; and to call on this reserve fat during periods of excess body requirements for fat. It has been found that the stimulation of a single cup of coffee will cause an increase in the percentage of FFA in the blood stream.

Now, no one knows whether this increase in FFA is harmful or beneficial ; and no one knows whether there is any relationship between FFA and cholesterol concentration. But, on the basis of the increase in FFA content after coffee ingestion, and on the basis of the previous report in circulation suggesting a relationship between coffee and coronary heart disease, Dr. Samuel BELLET, a fifty year old physician affiliated with the Division of Cardiology at the Philadelphia, Pennsylvania, General Hospital, applied for and received a financial grant from the National Institute of Health to study the effect of coffee on FFA. In fact, he received two grants — No. HEO4790 and No. HEO5989, — one to study the effects on dogs and the other to study the effect on humans. The preliminary report on its effect on man was published in Archives of Internal Medicine (2), and a more detailed report was presented at the 115th Annual Convention of the American Medical Association in Chicago, on June 26, 1966 (3).

The authors commence with the statement that « Although some epidemiological evidence suggests that there may be a relationship between coffee and coronary ateriosclerosis, little chemical data support this ». They then set forward their data without stating that it may or may not support this. The report is then summarized as follows : « The effect of caffeine on free fatty acids (FFA) was studied in thirty-nine patients (in the form of caffeine and coffee) and in thirty-three dogs. The subjects were studied in the following ways : the human subjects were given two cups of coffee which contained two hundred fifty miligram of caffeine ; caffeine sodium benzoate (0.5 gm) was given intramuscularly under similar conditions on the next day. Blood was taken before and at thirty minute intervals after administration for three hours. Subjects studied were :

a. twelve normal males (age 18-63),
b. fifteen male patients with coronary artery disease,
c. Twelve diabetic patients.

Additional studies were performed with decaffeinated coffee adminstration. All normal subjects given

caffeine showed a rise in FFA. The mean peak rise was 67 % when compared with the mean FFA response to the control beverage (water-sweetener). Similar results were obtained in patients with coronary artery disease and diabetics. The dogs showed a maximum increase of one hundred to one hundred fifty percent above the control levels. Studies are in progress in animals to determine the effect of chronic caffeine administration. The findings are of interest in view of the suggested relationship of FFA elevation to that of other lipid fractions, notably triglycerides and cholesterol. »

At the present time, no one knows whether an increase in FFA or cholesterol in the circulating blood stream is good or bad. Experts in the field are aware of this situation and will realize that the report is completely inconclusive. But many practising physicians are not up-to-date in their knowledge and will jump to the conclusion that copious coffee is undesirable. Lay coffee lovers, hearing of this work without comprehending its significance, may also be discouraged from their favorite brew.

Dr. BELLET reinforced his position when he officially answered a question in the « Question and Answer page » of the Journal of the American Medical Association (4) :

Q. Do coffee, Sanka, and the cola beverages cause an increase in serum cholesterol ? (MD. Minnesota)

A. From the available data and from recent work published in our laboratory (BELLET, S. ; KERSHBAUM, A. and ASPE, J. : *Arch. Intern. Med.* 116 : 750, 1965), he following summarizes our impressions to date. Relatively little data is available concerning the direct effect of coffee and caffeinated beverages on blood cholesterol. Recent work in our laboratory has shown that coffee or equivalent amounts of caffeine administered intramuscularly produces an increase in free fatty acids (FFA). The increase in FFA produced by caffeine is similar to, but much more prolonged than, that produced by nicotine. These alterations may be a result of a stress effect produced by caffeine. It has been shown by many observers that an increase in FFA predisposes to a rise in lipoprotein lipids, including an increase in blood cholesterol.

A recent epidemiological study has shown a positive relationship between coffee intake and coronary artery disease (PAUL, O. et al : *Circulation*, 28 : 20, 1963).

Recent studies have shown that FFA are related to disturbances in blood clotting mechanism. (Samuel Bellet, M. D., Philadelphia).

This answer is a highly biased implication that caffeine-containing beverages are deleterious to humans, based upon the flimsiest of evidence.

Meanwhile, in Toronto, Dr. J. A. LITTLE, Associate in Medicine at the University of Toronto, Dr. H. M. SHANOFF, Research Associate at the Veterans Hospital, and two technicians, published a study of Coffee and Serum-Lipids in Coronary Heart Disease (5). They compared twenty-five men in each age group from the fourth to the eighth decades who had survived a myocardial infarction with twenty-five healthy men in similar age groups. Total, free and esterified cholesterols were measured as well as phospholipids and lipoproteins. Over eighty degrees of freedom were present in each group sample or three times as many degrees of freedom as individuals. They found that elevated plasma unesterified fatty acids occurred among coffee drinkers ; but « it has yet to be shown that other serum-lipid fractions become elevated with long-term coffee-drinking or that increased ateriosclerosis results ». Later, they report that, « Though PAUL et al (1963) found that Americans who later developed coronary disease, drank more coffee than others, in our retrospective study of Canadians (6), coronary patients and controls drank equal amounts of coffee ». Since tea tended to have negative correlations with serum lipids and lipoproteins, they conclude that caffeine is not the factor at fault.

Working at the Department of Nutrition of Harvard

TABLE I

Coronary results

	Bellet (2)	Bellet (3)	Little (5)
No. of subjects	34 Healthy	13 Healthy 21 Coronary	100 Healthy 100 Coronary
Beverages	Black coffee	Black coffee Coffee and sugar Decaffeinated and sugar	All types of coffee
Control	Hot water and artificial sweetener	Hot water and sugar	Tea
Results	Black coffee increased FFA	Black coffee increased FFA. Coffee and sugar or decaffeinated **did not**	Coffee increased serum lipids in coronary patients but not in healthy. Tea affected neither.

School of Public Health, Boston, and at the Soldiers' Home in Chelsea, Massachusetts, Dr. O. M. JANKELSON and co-workers (7) studied the effect of beverage coffee upon nine mature volunteers suffering from diabetes. Two, double-strength cups of instant coffee made with a measured twelve grams of Maxwell House were imbibed during a period of seven minutes. Twenty minutes after the start of ingestion, fifty percent aqueous glucose was injected and the blood was analysed at ten minute intervals for carbohydrates. A week later, the same amount of hot water was administered and the tests repeated.

Five of the test patients, after drinking the coffee exhibited a ten percent higher blood sugar level than after drinking the water. Three of the patients, after drinking the coffee, exhibited a slightly lower blood sugar level than after the water. These were labelled refractory cases. One patient had approximately the same sugar content after both beverages and was, therefore, labelled : « possibly refractory ». Further tests disclosed there was no obvious correlation between serum-levels of glucose and insulin, with and without coffee.

TABLE II
Diabetic results

	Bellet (3)	Jankelson (7)
No. of subjects .	10	9
Beverage	Black coffee	Black coffee
Control	Hot water	Hot water
Results	Insignificant FFA change	5 increased in blood glucose 4 Refractory

Now, let us explore the fallacies in each of these reports. In the widely-quoted PAUL (1) work involving two thousand cases over a five year period, no account, whatsoever, was taken of the wide variation in the coffee itself. Each individual reported (from memory) the average daily number of cups of coffee consumed, but the physicians took no account of the following variables that were present :

1. volume of cup poured,
2. volume of cup consumed,
3. strength of coffee,
4. types of coffee used,
5. method of preparation,
6. use of sweetner,
7. use of creaming agent,
8. temperature of ingestion,
9. time of ingestion,
10. accompaniment to ingestion.

Their greatest error, however, occurred in the statistical treatment afforded the accumulated data. The fallacies in their handling of these figures are best described by Dr. Stanley S. SCHOR of Temple University, Philadelphia, who recently noted in a brief column on the « Mystic Statistic » in the *JAMA* (8) the following :

« A clinical investigator, seeking the advice of a statistician, may ask him to look over the statistics in his paper meaning : « See, if my chi-squares are computed properly. »

The statistician whose advice is sought explains why the investigator cannot draw the conclusions he wishes regarldess of what the value of chi-square turns out to be because of the manner in which the experiment was designed. The investigator departs in anger because instead of supplying the simple computations requested, the outsider had the gall to comment about what the investigator did in the investigator's own field. The statistician departs in a huff because the investigator with little training in the statistician's field has spent much time and money in an experiment with little likelihood of getting valid results, and instead of looking for advice came seeking a clerk to compute meaningless values for him.

« The statistician ordinarily would not go to a surgeon and ask him to remove his appedix without first getting a medical opinion. Likewise a physician should not go to a statistician and ask him to compute a few chi-squares without getting some opinion on the appropriateness of applying such a technique.

« As long as clinical investigatoıs continue to work on one mountain top and statisticians on another, with few or both groups coming down into the valley to mingle, medical research will not push ahead as fast as it might. It is difficult for a statistician to scale the heights belonging to the medical investigators and just as difficult for the medical investigator to ascend the statistician's hill. There must be a middle ground ; a plain between the two mountains ; a place to which both statisticians and medical investigators can descend so that they may commune on even terms. »

The statistical data obtained by Dr. PAUL et al. were subsequently examined for bias. It was demonstrated (9), that, using the same statistical data, but approaching it from the standpoint of : what are the advantages of coffee drinking ? it could be shown that the beverage was quite beneficial in preventing the development of such heart disturbances. We need not repeat the mathematical treatment here, but needless to say, based upon the data obtained, neither conclusion — that coffee is harmful or beneficial can be validly accepted.

The fallacies in the BELLET, the LITTLE and the JANKELSON reports are equally glaring. In the BELLET and JANKELSON studies, precautions were taken to somewhat standardize the type of coffee consumed — black only in the case of the JANKELSON study ; black,

black with sugar or decaffeinated with sugar in the BELLET work. No such precautions were observed in the LITTLE study, and the hundred cases could have had almost a hundred degrees of beverage variation.

The most serious objection to these studies is the smallness of the population. If we can have a hundred variations in a single beverage such as coffee, we can have a thousand times this number of variations in the people involved. People vary in maturity, in weight, in metabolic rate, in respiration, in digestion, in solid-liquid and gaseous elimination, in emotional states and reactions and in thousands of other properties. The same individuals vary in his biological patterns from day to day, from morning to night, during sleep and awake. Clinical research work on a scant hundred or less individuals is completely meaningless unless the results are overwhelmingly dominant in one direction. Up to a fifty percent variation in many properties can be observed in almost any small random group, even if no external variables are applied. To attach significance to a ten percent variation in a small group of individuals is neither scientifically nor statistically sound. In fact, statistical analysis of such a small group cannot be considered meaningful.

Further evidence of the contradictoriness of these findings are observed when the results are tabulated. BELLET reported that black coffee increased FFA in both healthy and coronary individuals, while black coffee with sugar or decaffeinated coffee did not increase FFA. LITTLE observed, however, that any type of coffee — white, black, sweetened or unsweetened — increased serum lipids in coronary cases, but not in healthy individuals. And he concluded, it could not be the caffeine since tea affected neither. Among diabetics, BELLET reported an insignificant change in FFA following black coffee ; while JANKELSON noted that five patients exhibited an increase in blood glucose and four did not. Emotional factors and others, which can cause even greater discrepancies were completely ignored.

On a clinical research scale of world magnitude, the evidence, that caffeine-containing beverages are not deleterious, may be so obvious that it tends to be completely overlooked. During the past century, in spite of a substantial increase in the consumption of such beverages, the typical human life span has doubled — from an average expectancy of thirty-five years to its present full biblical quota of three score and ten. Even if the consumption of these beverages had exactly paralleled this doubling of the life span, we would hesitate to attribute this to cause and effect. Too many other factors have been a part of this increase in life span : reduction of infectuous diseases, improvements in nutrition, water supply, waste disposal, energy utilization, etc. Conservatively, however, we may conclude these beverages have not been a factor in diminishing longevity expectations.

Nor can we observe any appreciable differences in results from international consumption of coffee and other beverages. The increase in the incidence of coronary occlusions, circulatory disturbances, cerebral mishaps, hypertension, diabetes, etc., has become world wide — in all countries where higher sanitary standards and a rise in the standard of living has reduced contagious diseases, prolonged life and correspondingly increased degenerative diseases. Intensive study of the annual statistical data of these countries has been unable to unearth a significant degree of difference in the occurrence of these degenerative diseases between countries such as England with its high per capita tea inbibition, Scandinavia and the United-States with their high per capita coffee consumption, German with its relatively high cereal beverages or France and Italy with their corresponding equivalent in fermented fruit juices. Conversely, if the world consumption of beverage coffee should suddently cease, it is most unlikely that an appreciable increase in human longevity or decrease in heart failure or other degenerative disease would occur.

BIBLIOGRAPHY

1. PAUL et al. — *Circulation*, XXVII, I, 20-31 (1963).
2. BELLET, S., KERSHBAUM, A. and ASPE, J. — *Arch. Int. Med.*, 116, 750-2 (1965).
3. BELLET, S., KERSHBAUM, A. and FINCH, EM. — *JAMA*, 196, 6, 206 (5/9/66).
4. BELLET, S. — *JAMA*, 196, 6, 229 (5/9/66).
5. LITTLE, J. A., SHANOFF, H. M., CSIMA, A. and YANO, R. — *Lancet*, 1, 732 (5/9/66).
6. LITTLE, J. A., CSIMA, A., REDMOND, S. E. and YANO, R. — *Lancet*, 1, 933 (1965).
7. JANKELSON, O. M., BEASER, S. B., HOWARD, F. M. and MAYER, J. — *Lancet*, 1, 527 (3/11/67).
8. SCHOR, S. S. — *JAMA*, 199, 1, 88 (1/2/67).
9. LEE, S. — *Tea and Coffee Trade J.*, 126, 1, 18 (1964).

LEE (S.). — **Erreurs commises dans la recherche médicale courante sur le café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 343-350, tabl., réf.

Plusieurs rapports dépréciateurs ont été récemment publiés dans la presse médicale, tendant à prouver que la consommation de café pouvait contribuer à une mort prématurée à la suite d'une crise cardiaque, d'hypertension, d'artériosclérose et autres maladies cardio-vasculaires. Tous ces rapports sont basés sur des études statistiques portant sur plusieurs milliers de personnes et sur des périodes de plusieurs années. Mais les principales erreurs commises par les auteurs de ces études résident dans le fait qu'ils n'ont pas tenu compte des grandes différences existant entre les cafés consommés par les différentes personnes, non plus que des habitudes particulières à chaque individu consommant du café. Parmi ces variables qui peuvent modifier de façon significative les effets physiologiques du café, on peut noter : 1) le volume de la tasse versée ; 2) le volume de la tasse ingérée ; 3) la force du café ; 4) les types de café ; 5) la méthode de préparation ; 6) l'emploi d'adoucissants ; 7) l'emploi de produits à base de lait ; 8) la température de la boisson ingérée ; 9) le temps pris pour l'absorption ; 10) les produits consommés en même temps ; 11) les erreurs de calcul statistique.

Si l'on tient compte de toutes ces variables qui n'ont pas été considérées, et d'autres, il est impossible de tirer une conclusion valable des études citées.

LEE (S.). — **Fallacies in current medical research on coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 343-350, tabl., réf.

Several derogatory reports have recently been published in the medical literature, indicating that consumption of coffee may be a factor in premature deaths from heart failure, hypertension, arteriosclerosis, and other cardio-vascular diseases. All have been statistical studies of populations of several thousands over periods of several years.

Chief fallacies in these reports have been the failures of the authors to recognize wide divergencies in the coffee consumed, as well as the habits of the individual ingesting the coffee. Variables that could be responsible for significant deviations in the physiological effect of coffee include : 1) volume of cup poured, 2) volume of cup consumed, 3) strength of coffee, 4) types of coffee, 5) Method of preparation, 6) use of sweetener, 7) use of creaming agent, 8) temperature of ingestion, 9) time for ingestion, 10) accompaniment when ingested, 11) errors in statistical calculations.

In view of these unconsidered variables and others, it is impossible to draw any valid conclusions from the studies described.

LEE (S.). — **Die bei der ärztlichen üblichen Untersuchung über den Kaffee unterlaufenen Fehler.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 343-350, tabl., réf.

Neuerdings wurden in der ärztlichen Fachpresse mehrere absprechende Berichte veröffentlicht, die zu beweisen versuchten, dass der Genuss von Kaffee infolge von Herzkrise, erhöhtem Blutdruck, Arterienverkalkung und anderen Herz- und Gefässkrankheiten einen frühzeitigen Tod herbeiführen konnte. Diese Berichte beruhen alle auf statistische Untersuchungen, die sich auf mehrere tausend Personen und Perioden von mehreren Jahren erstreckten. Die Autoren dieser Untersuchungen begingen jedoch den Hauptfehler, die zwischen den von verschiedenen Personen eingenommenen Kaffees bestehenden grossen Unterschiede ebenso wenig wie die jedem Kaffeeverbraucher eigenen Angewohnheiten berücksichtigt zu haben. Unter den Variabeln welche die physiologische Wirkung des Kaffees auf bedeutsame Weise ändern können seien hier aufgeführt :

1) Die Grösse der ausgeschenkten Tasse Kaffee, 2) die Grösse der eingenommenen Tasse Kaffee, 3) die Stärke des Kaffees, 4) die Art Kaffee, 5) die Zubereitungsweise, 6) der Gebrauch von Abschwächungsmitteln, 7) der Gebrauch von Milcherzeugnissen, 8) die Temperatur des eingenommenen Getränkes, 9) die zur Kaffeeeinnahme verwendete Zeit, 10) die zu gleicher Zeit eingenommenen Produkte, 11) die Fehler der statistischen Rechnung.

Falls man diese Variabeln, die nicht in Betracht gezogen wurden, und andere mehr berücksichtigt, ist es nicht möglich, aus den betreffenden Untersuchungen eine gültige Schlussfolgerung zu ziehen.

DISCUSSION

M. KENSLER : I think that Mr. Lee has really described some of the difficulties in adequately doing medical research. It is often very difficult to get adequate samples, to control all the variables that one would like to control.

I would like to pray the previous speaker, Dr Röhrborn, for his excellent approach to what is or may become a serious problem for the coffee industry, I am talking about the problem of mutagenicity. In the United-States we are very interested in that problem.

I think that the coffee industry should collaborate to more adequate medical research. We need more encouragement and the recognition of the difficulties we meet.

CARDIOVASCULAR ACTIONS OF CAFFEINE AND COFFEE IN ANIMALS AND MAN

W. RIKER

Dept. of Pharmacology,
Woman's Medical College, Philadelphia, Pa.

C. J. KENSLER

Life Sciences Division,
Arthur D. Little, Inc., Cambridge, Mass.

During the past year we have had the opportunity to review the available literature on the biological effects of caffeine and coffee and to assess their relationship to health and disease. This report presents a brief summary of what we found in terms of cardiovascular effects and what we think it means. As is indicated, there are many gaps in our knowledge. The results of this review are reported in two general sections, the first dealing with data obtained in **animal experimentation** and the second with results derived from **observations in man.** The animal studies involving cardiovascular effects deal almost exclusively with caffeine. The data on man include caffeine and coffee and suggest biological activity for some as yet unidentified coffee components.

As a preface to the following sections, it is desirable to give a **brief summary of caffeine's cardiovascular effects,** as presented in a standard American textbook of Pharmacology.

Referring to the xanthine compounds generally, GOODMAN and GILMAN (1) note their ability to cause smooth muscle relaxation, coronary artery dilation and cardiac stimulation, with theophylline more potent than theobromine, and the latter more potent than caffeine. Systemic blood pressure is modified negligibly, or not at all, by the xanthines, because of opposing actions within the cardiovascular system. Thus, dilation of major vessels by xanthines would produce a fall in blood pressure were it not offset by myocardial stimulation. Simultaneous antagonistic effects within the central nervous system may also participate in this equilibrium.

Most major vascular beds are dilated by the xanthines according to GOODMAN and GILMAN (1), with the notable exception that the cerebral vessels of man are constricted. This last effect is believed responsible for reported relief of hypertensive headaches by xanthines.



C. J. KENSLER

Though xanthines can dilate coronary vessels, the demand imposed by concurrent myocardial stimulation may outstrip the increased blood supply. Controversy over the therapeutic value of xanthines in angina continues, but the consensus tends toward interdiction. Finally, and most important, it is established that tolerance, as well as cross-tolerance develops with continued use of the xanthines, particularly to the diuretic and vasodilator actions.

Specific references to caffeine are as follows : caffeine causes direct dilation of coronary, pulmonary, and general systemic vessels, but also stimulates the medullary vasomotor center tending thus to produce vasoconstriction. With therapeutic doses (0.25-0.5 gm) the dilator action predominates, and blood flow is increased because

of the concomitant rise in cardiac output. However, the flow increase is probably too little and too brief « to be of value in the treatment of peripheral vascular disease ». Caffeine toxicity may occur with amounts of 1 gm or more, and in this connection tachycardia and extrasystoles are frequent. Arrhythmias are also occasionally encountered « in persons who use caffeine beverages to excess », though the authors do not specify the meaning of « occasionally » and « excess ».

In subsequent sections only the most important references are cited in the text. However, a more complete reference list is included.

ANIMAL STUDIES

Effects on systemic blood pressure and heart rate in intact animals

SOLLMAN and PILCHER's (21-24) conclusions about the general cardiovascular effects of caffeine, reported in 1912, are essentially valid today. They administered caffeine intravenously (I. V.) (2-800 mg/kg) to anesthetized dogs and cats, and observed : « cardiac stimulation or depression according to the dose and rapidity of injection ; increased heart rate, not due to vagus depression (if the vagus is intact there may be slowing through central stimulation, but with large doses the heart escapes from vagus tone) ; vasodilation, through peripheral depression of the vasoconstrictor mechanism ; central vasoconstrictor stimulation, generally ineffectual ; and cardiac irregularities with large doses ».

Doses of caffeine to 20 mg/kg produced relatively slight cardiovascular effects, principally a lowering of blood pressure. The effects also depended on rate of injection and level of initial blood pressure (the fall being greater the higher the initial pressure). Increased heart rate, when it occurred, usually had a shorter duration than the vasodilator effect.

Separate phases of their intensive study demonstrated that the acute fall in blood pressure after intravenous caffeine was a direct result of peripheral vasodilation. That caffeine is not an inordinately potent vasodilator may be gauged by effects on the animal under intense vasoconstrictor drive. SOLLMAN and PILCHER found that caffeine doses of 75-200 mg/kg, I. V., were required to halve the pressor response to epinephrine or to reduce that due to carotid occlusion.

Subsequent animal studies have confirmed these conclusions. J. D. PILCHER (16) obtained an acute fall of blood pressure in dogs after rapid I. V. injection of caffeine, in doses to 20 mg/kg. After the fall, blood pressure usually increased by a few millimeters of mercury (mm Hg), concurrent with a slight increase in heart rate. At dose levels around 20 mg/kg, the average blood pressure increase was 17 mm Hg, and the average heart rate increase was 30 per minute. Dose dependence of the direction of blood pressure change is also indicated in WALTON and BRODIE's study (32) in anesthetized dogs. Intravenous caffeine citrate, 10 mg/kg, decreased blood pressure by 35 to 60 mm Hg, whereas 20 mg/kg produced an average increase of 6 mm Hg.

The phasic nature of blood pressure responses to intravenous caffeine, i.e., a fall followed by a rise, has also been reported in other studies on anesthetized animals (TSUBOI (29), rabbits, 0.5-5 mg/kg caffeine sodium benzoate ; HAHN (8), cats 3 mg/kg caffeine). In addition, SCHMID, *et al.* (19), have demonstrated this sequence in unanesthetized dogs with caffeine doses of 1-15 mg/kg.

Nevertheless, the secondary pressor response to intravenous caffeine is not always evident or prominent. Essentially pure decrease in systemic pressure occurred after I. V. caffeine in SALANT's study (18) (anesthetized dogs, 15-25 mg/kg) and those of JUNKMANN and STROSS (10-11) (urethanized rabbits, 5-10 mg/kg), TIFFENEAU and BEAUNE (28) (chloralosed dogs, 10-30 mg/kg), MARTINETTI (12-13) (chloralosed dogs, 1-20 mg/kg of caffeine sodium benzoate), and CRAVER, *et al.* (5) (anesthetized dogs, 1-50 mg/kg).

Use of denervation procedures and blocking drugs in these and other studies point unmistakably to a direct peripheral vasodilation by caffeine as the major cause of the blood pressure fall. The secondary blood pressure rise is more complex. The initial blood pressure drop would evoke, via the pressoreceptors, reflex vasoconstriction and cardiac stimulation. No doubt this response contributes to the transience of the initial vasodepression. In addition, direct cardiac effects of caffeine may be involved in the secondary pressor response, though SOLLMAN and PILCHER (21-24) noted that caffeine vasodilation outlasts cardiac stimulation. More likely, the secondary pressor response represents a central effect of caffeine as SOLLMAN and PILCHER (21-24) suspected. Thus, DIKSHIT (6), MARTINETTI (12-13) and HAHN, *et al.* (9) injected caffeine into the cerebral circulation, or intraventricularly, and obtained prominent pressor responses (as well as cardiac arrhythmias ; DIKSHIT) in dogs and cats. Relatively high doses were required (10-12 mg/kg, intraventricularly), which probably accounts for the dose-related appearance of the

pressor response after I. V. caffeine. The high « central » dose of caffeine needed for pressor responses also explains SOLLMAN and PILCHER's conclusion (21-24) that central vasomotor stimulation with I. V. caffeine is generally « ineffectual ». It may also be that the centrally-induced hypertension is only distinct when the pre-existing blood pressure level is low (JUNKMANN and STROSS 10-11).

In summary, the preeminent effect of I. V. caffeine in anesthetized animals is to decrease blood pressure and increase heart rate. Dose and route of administration are of overriding importance in the meaning of this generalization. Doses to 10 mg/kg, I. V., produce a slight to moderate fall in blood pressure, and slight increase in heart rate. But this route of administration presents the peak drug concentration instantaneously to the circulatory system. With slower drug absorption (as after oral administration) it can be predicted that, dose for dose, cardiovascular effects of caffeine would be even less, and that compensatory circulatory reflexes could keep pace, at least partially offsetting the caffeine-induced changes. Finally, it must be remembered here (and in nearly all animal studies) that the experimental population is one with no previous exposure to caffeine, and therefore represents an intolerant population.

Effects on cardiac function and structure

Alterations in cardiac rate and cardiac work (or force of contraction) have been the major focus of these studies. Somewhat less attention has been accorded to caffeine effects on cardiac rhythm.

FUNCTION IN ISOLATED HEARTS

Amphibian hearts have been a popular test object for caffeine studies (see References). But the results obtained have limited applicability to man, from the standpoint of dose. Reviews of caffeine investigations on frog heart (NEUROTH, *et al.* 60 ; LÜLLMAN 56) indicates that concentrations ranging between 1 : 40,000 and 1 : 100 have been used ; i.e., from 0.1 to 50 millimolar (mM) approximately. However, increase in the force of contraction (positive inotropic) and in heart rate (positive chronotropic) are only distinct at caffeine concentrations in the range of 0.5-1 mM. Assuming a distribution of caffeine in body water of man (35 liters), attainment of these concentrations would require a single caffeine dose, rapidly absorbed, of approximately 3.5 to 7 gm.

Similar considerations apply to studies with isolated mammalian hearts or heart-lung preparations. The dose threshold in isolated cat hearts, for positive chronotropic and inotropic effects, is a caffeine concentration of 0.5 mM (STAUB and GRASSMAN 70). Rabbits are even less sensitive, positive chronotropism being the only effect seen with 5 mM caffeine (STAUB and GRASSMAN 70). Cat papillary muscle appears somewhat more sensitive than isolated cat heart ; threshold positive inotropic effect can be obtained with caffeine, 0.12 mM (KUSCHINSKY and MUSCHOLL 53-54). The latter authors also found that theophylline is approximately four to five times more potent than caffeine. Furthermore, theophylline increased excitability (measured by strength-duration curves) of the cat auricle whereas caffeine was without effect on this parameter.

Heart-lung preparations (HLP) of cat, rat and dog have also been used to assay caffeine's effect on cardiac performance. LÜLLMAN's (56) investigation of caffeine in the rat HLP demonstrated positive chronotropic and inotropic effects in approximately half of many experiments with small to moderate doses (0.05-0.2 mg injected into the inflow close to the heart). No change, or a decrease in amplitude of contraction (negative inotropic) was observed in the rest. The magnitude of changes was small, and higher doses yielded mostly negative inotropic effects together with diminution or disappearance of the positive chronotropism. Most significant, the effects over much of the dose range did not lead to an increase in cardiac output ; but very high doses (1-2 mg) halved the output. One of the **theophylline** group of experiments, the only one to show an increase in cardiac output, provides an important clue ; HLP's in this group were made insufficient by barbiturate administration. Other authors have speculated that positive inotropic and chronotropic effects of the xanthines, caffeine especially, are only prominent in insufficient, failing, or spontaneously weakened hearts (BRUNS and ROSENCRANTZ 39), and this suspicion will again be evident below.

FUNCTION IN HEARTS OF INTACT ANIMALS

J. D. PILCHER (89) explored a wide range of caffeine dosage in anesthetized, open-chest dogs, utilizing a ventricular plethysmograph and myocardiograph. His experiments are of value principally in support of LÜLLMAN's (56) observation that positive chronotropic effects of caffeine are obtained more regularly than are positive inotropic. Caffeine, I. V., to 20 mg/kg, usually increased blood pressure and heart rate moderately, but the amplitude of cardiac excursions was unaffected or only slightly increased (PILCHER 89). Effects of I. V. caffeine, 4-10 mg/kg, on the rate parameter also predominated in SALANT and NADLER's study (93) in dogs, cats and rabbits.

JOURDAN, *et al.* (87) and SCHAFF and FAUCON (94) established that xanthine effects on heart are largely direct ; also that caffeine « possesses only feebly the properties of aminophylline ». Chloralosed dogs with acutely denervated hearts and adrenal vessels ligated were given caffeine, 8-16 mg/kg, or aminophylline, 8-12 mg/kg I. V. Caffeine still increased contractile force and heart rate by 15 and 7 % respectively, with an average effect duration of approximately 15 minutes. Aminophylline figures, in the same sequence, were 46 and 33 %, and 17 minutes.

Anesthesia is, of course, a potentially complicating factor in animal studies. C. PILCHER, *et al.* (89) attempted to avoid this by measuring cardiac output (FICK principle) in trained unanesthetized dogs. Some of the animals received morphine prior to the experiment. I. V. and subcutaneous caffeine sodium benzoate, 7.5, 15 and 30 mg/kg were employed, which correspond approximately to total doses of caffeine base, in man, of 0.25, 0.5 and 1.0 gm. Six minutes after the I. V. and 30 minutes after the subcutaneous administration of the two lower doses, cardiac output was reduced less than 10 % on the average, within the limits of error. Caffeine, 30 mg/kg, caused a larger decrease in cardiac output.

Contrary results were obtained by SCHMID, *et al.* (19) in two unanesthetized dogs. Caffeine, 7 and 12 mg/kg, I. V., caused a slight increase in cardiac minute volume (output). These doses are equivalent to 0.5 and 0.8 gm, total, in man. The effect on cardiac output occurred in conjunction with a fall in blood pressure, tachycardia and reduction in peripheral resistance. Succeeding this was a phase in which blood pressure and peripheral resistance increased, probably reflexly.

In summary, experiments in intact animals support the observations on isolated cardiac tissue that moderate doses of caffeine elicit positive chronotropic effects of slight magnitude. Whether inotropic effects occur, whether they are positive or negative, and of what degree, depend largely on dose, route of administration, and state of the heart and circulatory system. One may note again that caffeine doses, given I. V., producing little or no change in cardiac output of animals, represent peak instantaneous blood and tissue levels beyond those that man might reasonably be expected to encounter in other than therapeutic situations.

CARDIAC ARRHYTHMIAS

Irregularities in cardiac rhythm can occur via many different mechanisms. Principal ones include changes (in either auricle, ventricle or specialized conduction tissue) in refractory period, conduction time, conduction pathway, excitability, or automaticity. Drug-induced arrhythmias in the intact animal reflect the direct and/or indirect production of one or more such changes. Caffeine is no exception. Direct effects of caffeine on cardiac rhythm have been demonstrated in chick embryo (BRINLEY 38) where 10 mM caffeine causes A-V dissociation. 1.0 and 0.1 mM solutions produce irregularities of the ventricle after long soaking. CHENEY (101), however, found that caffeine concentrations of 25 mM and higher were required to produce rhythm irregularities in the toad ventricle strip. Mechanisms were not examined in this study, but GIES (105) has shown that caffeine, 1-5 mM, lengthens the refractory period of frog heart. Caffeine also may increase the conduction velocity in frog heart (BENTHE 99), though this requires increased potassium concentrations and 4 mM caffeine.

Other work in animals sheds only minimal light on the mechanism of caffeine arrhythmias. KUSCHINSKY and MUSCHOLL (54) measured a 5 % decrease in the refractory period of cat papillary muscle, exposed to 0.12 mM caffeine. One cannot say whether this is an absolute difference from effects on the frog heart (GIES 105) noted above, or a difference due to dose. Arguments in favor of dose dependence could be adduced from experiments on guinea pig atria (de GUBAREFF and SLEATOR 103). Action potential duration was distinctly increased only at caffeine concentrations of 2.5 and 5 mM, and this situation would necessarily increase the refractory period. If conduction velocity were also increased, as in frogs (BENTHE 99), the conducted impulse in the atria might take aberrant pathways, or possibly ectopic foci might prevail. The ventricle obviously represents a different situation, for here action potential duration was not increased by caffeine (de GUBAREFF and SLEATOR 103).

As the preceding data indicate, high concentrations of caffeine are generally necessary to alter electrical parameters of cardiac function. Such is also the case in intact animals. SOLLMAN and PILCHER (21-24) observed that arrhythmias in the intact unanesthetized dog may be sudden in onset but usually require doses greater than 20 mg/kg, I. V., for provocation. BEATTIE, *et al.* (98) produced extrasystoles in cats with I. V. caffeine at levels of 35-45 mg/kg, and UEDA, *et al.* (112) initiated cardiac irregularities in anesthetized dogs with I. V. caffeine in the dose range 25-100 mg/kg. This study was notable in showing that the arrhythmias did not occur after caffeine in spinal dogs. Considering DIKSHIT's report (6) that intraventricular (cerebral) injection of caffeine, 10-12 mg/kg, produced pressor responses and arrhythmias in chloralosed cats, we must conclude that caffeine may also induce arrhythmias indirectly via actions on cardiovascular control centers in the central nervous system.

Nevertheless, both direct and indirect modes of arrhythmia production by caffeine entail the use of extremely large doses. With regard to man, extrapolation of the above doses in intact animals stands as the equivalent of approximately 10-15 cups of coffee at one time.

Interaction of caffeine with other drugs capable of either producing or controlling arrhythmias has also been studied. Most pertinent are epinephrine and cardiac glycosides. Caffeine may diminish epinephrine-induced arrhythmias or prevent the fatal ventricular fibrillation of epinephrine-hydrocarbon anesthetics (DAUTREBANDE and CHARLIER 102 ; MARTINETTI 12-13). The mechanism apparently centers on caffeine hypotension preventing the pressor response to epinephrine. Time and dose factors are critical, for others have observed augmented arrhythmias with caffeine-epinephrine combinations (UEDA, *et al.* 112 ; MEZZASALMA 108).

Caffeine-digitalis interactions have yielded conflicting results. PREOBRAZHENSKII (110) found I. V. caffeine, 2-50 mg/kg, to raise the minimal lethal dose (MLD) of strophanthin in frogs and cats, depending on the manner of administration of caffeine. HAAG and WOODLEY (106)

showed, in cats, reduction of MLD's of cardiac glycosides, but noted that results are a function of caffeine dose and the particular digitalis body.

This field is therefore controversial, but perhaps its importance is minimized by HAAG and WOODLEY's observation that caffeine doses approaching 50 % of the acute fatal dose are necessary to decrease MLD's of digitalis.

PATHOLOGICAL CHANGES IN THE HEART AND MAJOR VESSELS

Microphysical changes in myofibrils of frog heart followed a 30-minute soak in 2 % caffeine (CHENEY 114). The nature of the change was a clot formation within some of the myofibrils. Since a 2.2 % solution of caffeine is saturated, the above results have no practical significance. However, the author notes that cardiac muscle is much more resistant than skeletal muscle in which a 0.03 % solution of caffeine produces clot formation in ten minutes.

LEVI and CABRINI (118) claimed that caffeine citrate administration (10 or 40 mg/kg/day) for 30 days to rabbits led to vascular alterations in the capillaries, and slight fatty degeneration in a few myocardial fibers, especially at the higher dose level. Unfortunately, their report does not indicate whether histological examinations were also done on the controls. However, WENZEL, *et al.* (124) failed to detect myocarditis in rabbits given caffeine, 5 mg/kg I. V., once a week for 24 weeks. Nor did this regimen enhance subintimal lipid deposition in the small-medium coronary arteries when the animals were on a hypercholesterolemic diet. Indeed, SERANOVA (122) showed that 80 days of caffeine administration (either 0.6 mg/kg or 100 mg total, subcutaneously) together with oral cholesterol yielded cholesterol blood levels lower than those in animals receiving only cholesterol. Blood cholesterol levels within the caffeine group were, however, higher in the animals receiving the larger caffeine dose. Surprisingly, aortic atherosclerotic changes were less, within the caffeine group, at the higher caffeine dose level. This work confirms earlier, identical conclusions (SHKHVATSABAYA 123 ; CZOCHRA-LYSANOWICZ, *et. al.* 115).

Effects on specific vascular beds

PERIPHERAL, VISCERAL AND PULMONARY VESSELS

Evidence, neither abundant nor detailed, exists to show that caffeine directly dilates these vessels ; it is further known that the intensity of effect differs from bed to bed, and it also depends on the preexisting tonus state of the vessels.

SOLLMAN and PILCHER's (21-24) plethysmographic studies revealed dilation of peripheral, intestinal, splenic and renal vessels by caffeine. The order of effect intensity in the viscera was intestinal > splenic ⩾ renal, with the intestinal vasodilation outlasting the systemic blood pressure change. In these perfusions of isolated organs it was necessary, however, to heighten vasoconstriction by means of epinephrine in order to demonstrate dilator actions of caffeine. Under these conditions 0.5 mM caffeine gave a distinct renal vasodilation. High doses (20 mg, intraarterially) for dilation of renal and paw vessels of dog were also the case in BECQ and PLUMIER's study (127).

A number of Japanese investigators have demonstrated dilating effects of caffeine on isolated mesenteric arteries of frog, cat and cow ; for example, FUJIMORI (132) with 0.5 and 5 mM caffeine in bovine vessels. Veins were little affected.

Other studies (see References), indicating caffeine effects on lymph vessels and veins, are insufficiently detailed to warrant conclusions.

Similarly, the pulmonary vessels have received scant attention with respect to caffeine action. More information is available on xanthines other than caffeine (aminophylline, for example), from which it may be inferred that caffeine would differ only in potency. The recent study of QUIMBY, *et al.* (151) typifies this situation ; caffeine was part of an investigation of 40 xanthines in anesthetized dogs, and it is stated that caffeine was a potent pulmonary vasodilator. Two other significant findings emerged : pulmonary and leg vessels reacted in qualitatively similar fashion to a given xanthine ; and caffeine was more potent than aminophylline as a pulmonary vasodilator but weaker as a dilator of femoral vessels.

CEREBRAL VESSELS

Reviewing drug action on the cerebral circulation, SOKOLOFF (171) noted that conflicting evidence for vasoconstriction and vasodilation exists in animal studies with xanthines ; the result obtained depends on dose, animal, systemic pressure changes, anesthesia, etc. Examples of the conflict are reflected in key studies in this field. Finesenger (162) explored the caffeine dose range 2.5-63 mg/kg I. V. in cats anesthetized with amytal, wherein he obtained roughly dose-related increases in diameter of the pial artery. Coincidentally, systemic blood pressure fell and cerebrospinal fluid pressure rose. Vasodilation was not obtained when the experiments were repeated under ether anesthesia, instead slight vasoconstriction occured. After recovery from ether, caffeine elicited a brief constriction followed by a longlasting dilation. Here is a classic illustration of caffeine's ultimate effect depending on preexisting vascular tonus. Ether dilates cerebral vessels (caffeine thus constricts) and its elimination is followed by marked constriction (caffeine thus dilates).

SCHNEIDER (170) measured an increase, then a decrease, in carotid blood flow in anesthetized dogs after caffeine sodium benzoate, 2-4 mg/kg, I. V. But carotid blood flow reflects extracranial as well as intracranial changes, and is therefore not an ideal measure of cerebral circulation. DUMKE and SCHMIDT (161),

however, used this measure in their classic examination of cerebral blood flow in monkeys anesthetized with pentobarbital. Cerebral blood flow was increased only slightly in three of five animals by caffeine, I. V., approximately 2-5 mg/kg. Intraarterial caffeine, 6 mg, elicited a flow increase with rapid onset and a duration of three to four minutes. GOTTSTEIN, *et al.* (163) confirmed this by intraarterial injection of caffeine (0.5-1 mg/kg) in anesthetized dogs. However, intravenous administration (1-3 mg/kg) did not alter blood flow. Higher doses decreased flow in connection with the depressed blood pressure.

Thus, SOKOLOFF's views (17) are substantiated, and the numerous factors in the discordant results are evident. Beside those mentioned previously, one might also consider nonhomogeneous effects of caffeine in the cerebral vascular bed. Recent work of BIRZIS, *et al.* (158) demonstrated an increase in cortical, but a decrease in subcortical, blood flow after intraperitoneal caffeine, 25 mg/kg, in unanesthetized cats.

CORONARY VESSELS

The technical difficulties of analysing coronary flow changes in the beating heart are well known. Control of rate and amplitude of contraction, or elimination of activity as in the use of fibrillating hearts, represent possible solutions, albeit unsatisfactory. Another approach is the dissociation of mechanical and flow events by careful attention to dose considerations. Such was the method used by STAUB and GRASSMAN (70), who also summarized the earlier literature in this field. Coronary flow in isolated rabbit hearts was increased, throughout the caffeine concentration range of 0.05-5 mM and was separable, by dose, from the caffeine effects on rate and amplitude. Dissociation was not possible in cats, however, for all three parameters had the same caffeine threshold (0.5 mM). Except for concentration, this confirms IWAI and SASSA's earlier study (177) of isolated cat hearts.

Isolated hearts may be more favorable for displaying coronary vasodilation by caffeine than those of intact animals. And even in the isolated heart the pre-existing tonus of coronary vessels is a critical factor as shown superbly by HEIMANN and WILLBRANDT (175) for the guinea pig heart.

No less important is the distinction between experiments in dogs with open chests and closed chests. JOURDAN and FAUCON (178) reported a 20 % increase in coronary flow in chloralosed open-chest dogs after I. V. caffeine, 5-7 mg/kg. Though this occurred without an increase in heart rate, the results are marred by the fact that the dogs were in shock. Much more skill is evident in the work of LOCHNER, *et al.* (180) on anesthetized dogs with closed hearts. Oxygen saturation of coronary sinus blood was used as the indicator of coronary flow, and it was unaltered by caffeine doses to 5 mg/kg. LOCHNER, *et al.*, concluded that « higher doses did not appear of interest to us — 10 mg/kg is 0.7 gm in a 70 kg man ; with this dose there appear strong central nervous system effects ».

Thus the strong belief that caffeine dilates coronary vessels rests largely on experiments with isolated hearts. Some studies in intact animals support this belief, but are not unequivocal. **The sum of present data suggests** then that caffeine produces either no change or an increase in coronary blood flow ; and it remains to be seen whether any increase is always overcome by the increase in cardiac work.

STUDIES IN MAN

CAFFEINE AND COFFEE

Interest in the cardiovascular effects of these substances in man is relevant to two areas of concern. One is the purely therapeutic ; does caffeine have value in the treatment of one or more cardiovascular or cardiopulmonary disease states ? The other area has much broader implications ; is coffee-drinking beneficial, indifferent, or harmful with respect to the cardiovascular system ? And, should coffee-drinking be prescribed or proscribed in some normal individuals, or inthose with certain cardiovascular diseases ? Moreover, it is apparent that many investigators make the simple equation that cardiovascular effects of coffee are those of caffeine. This appears to be substantially true, for acute effects at least, but there is little knowledge in animals or man about actions of the other coffee components.

In the following sections, where the amount and quality of literature warrants, caffeine will be considered first, followed by results with coffee. Investigations with caffeine frequently utilize one of the several salts of this alkaloid ; sodium benzoate, salicylate or citrate. To simplify the presentation, however, all doses are expressed in terms of the base.

Effects on blood pressure and heart rate

CAFFEINE

Intravenous administration

In the period 1931-1960, thirteen investigations provided data about these parameters. The experimental population was composed of normal subjects and hospitalized patients with and without cardiovascular disease. A wide age span was represented. Dosage ranged from 0.1 to 0.5 gm, though the predominant part of the population was explored with doses of 0.1 to 0.25 gm. In all, reactions were observed in 132 normotensive individuals and more than 26 with hypertensive cardiovascular disease.

With rare exception the consensus of these studies is that caffeine, within the above dose range, produces relatively slight variations in blood pressure and heart rate. Nor is the direction of variation consistent. This could be attributed to normal population variations, with respect to both general cardiovascular reactivity and responsiveness to caffeine ; plus the fact that time course of caffeine injection varied widely.

Examples of low dose studies are those of DENKER (200) and FUCHS (201) in normotensive individuals. The former administered 0.15 gm caffeine to each of 50 subjects and observed no marked pulse or blood pressure changes. FUCHS (201), however, found that pulse slowing (10 beats, minute) and blood pressure decrease (18 mm Hg systolic, 14 mm Hg diastolic) occurred within 10 seconds after injection in four young men. Recovery to initial levels ensued within 1-2 min. Both investigations lacked adequate controls.

Intermediate doses were used by BRANDT (198) and GIBBS (202), among others. Twenty-eight normotensive patients showed no blood pressure change, and a very slight increase in heart rate after 0.2 gm caffeine (BRANDT 198). Measurements were made in the period five to twenty minutes after injection. BRANDT was one of the very few to record venous pressure changes. Seventy per cent of the subjects manifested a decrease, averaging 20 mm H_2O, the remainder had an average increase of 13 mm H_2O. GIBBS (202) injected 0.25 gm caffeine rapidly (30 seconds) in six normotensive patients who responded only with a slight increase of systemic blood pressure. One might compare this with the study of MOYER, *et al.* (213) in which a slow injection (ten minutes) of 0.25 gm caffeine produced slight pressure rise (systolic 11 mm Hg, diastolic 4 mm Hg, average) in seven patients, five having hypertensive cardiovascular disease. Venous pressure and heart rate were essentially unchanged. SHENKIN (219), using the same dose in nine normotensive patients, observed an average blood pressure increase of 8 mm Hg (systolic) ($P < 0.02$). MAKINO (208), however, found a blood pressure decrease averaging 4 mm Hg in eight patients and this was not statistically significant.

Six normotensive patients examined by LOMAN and MYERSON (206) received 0.5 gm caffeine. They illustrate the population variation factor, in that : one subject exhibited an initial blood pressure rise followed by a slight fall ; blood pressure was elevated in one ; two showed a transient decrease, and blood pressure was unchanged in the remaining two. Venous pressure again showed little or no shift.

One subject in one study requires special comment. BÖGER, *et al.* (197) administered caffeine, 0.15 gm, rapidly to a 34-year-old healthy male. Within one minute blood pressure had increased by 44 mm Hg and the heart rate accelerated by 45 beats per minute. Recovery proceeded over the next five minutes. The author noted that this is not a « typical » reaction to caffeine, but presented it to illustrate the similarity in cardiovascular reactions to epinephrine and caffeine. Since this was also the most extreme reaction among the 132 normotensive subjects in the thirteen studies, it is concluded that this individual belongs either to one tail of the normal population distribution or to a separate hypersensitive population.

Intramuscular and subcutaneous administration

Of the three investigations in which this route has been employed, that of STARR, *et al.* (220) is still the classic reference. Measurements of many parameters of cardiovascular function were made in four patients, 20 to 40 minutes after intramuscular caffeine, 0.5 gm. The average decreases in heart rate and blood pressure, 2.5 % and 4 % respectively, were not statistically significant. Indeed, STARR, *et al.* (220) point out that the absence of marked pulse rate and blood pressure effects gave them no guidepost for selecting the optimal time to measure other cardiovascular functions.

Oral administration

Beside the studies in which oral caffeine and coffee have been compared stands another group in which caffeine alone was investigated. One of these (WOOD 231) superb for its recognition of the many extraneous factors modifying the experimental situation, is also the first, and one of the few, to be aware that the subject's caffeine-drinking practices might be relevant to the outcome. Two of WOOD's subjects were abstainers and two consumed coffee regularly. Caffeine, 0.08-0.36 gm, or an identical capsule containing placebo, was given. Very slight pulse slowing and an average blood pressure increase of 2 mm Hg developed after the caffeine, peaking at 45 minutes and returning to baseline approximately two hours after drug. The maximum blood pressure increase, shown by one individual, was about 9 mm Hg. Differences between coffee users and nonusers were slight, and Wood noted further that each individual's type of response was consistent in repeat trials.

GROLLMAN's experiments (204) on four healthy subjects demonstrate the significance of dose. Caffeine,

0.16 and 0.32 gm, left the pulse rate and blood pressure comparatively unaffected, whereas 0.65 gm and 0.97 gm produced small but significant (0.97 gm) increases in both measures. Peak effects occurred 10-40 minutes after drug, obviously an absorption-determined characteristic, and declined gradually to control within 2 hours.

At the other extreme, low dosage, SEBOK's work (217) is the sole example. Caffeine was given to seven normotensive and thirty-two hypertensive patients, in doses of 0.05 and 0.1 gm. Blood pressure dropped 5-35 mm Hg in the normals, and the decrease was greater in hypertensives. Pulse rate changes were slight or absent in both groups. Lack of controls mars this study, but time course of drug effect is in line with those noted above. It is possible that SEBOK's small doses of caffeine have achieved dissociation of vascular and cardiac effects, and that dose-effect curves at these two sites may be slightly more separated in hypertensives than in normotensives.

COFFEE AND CAFFEINE

The minimal crossover design in experiments to evaluate cardiovascular effects of coffee would be comparison of the beverage with decaffeinated coffee and caffeine. Addition of placebo to this regimen constitutes the optimal design.

HORST and co-workers (229) met the minimal design requirements but the studies suffered from the great variation in the times at which effects were measured. Several very general conclusions appear warranted, however, referable to the dose investigated, 3-4 mg/kg (coffee and caffeine). Blood pressure and pulse changes in young healthy subjects were slight, but generally an increase seldom exceeding 10 mm Hg in the former and a decrease averaging 5 per minute in the latter. These effects, not duplicated by decaffeinated coffee (hereafter designated as decaff), tended to diminish on repeat testing in subsequent weeks of study. Individual differences were evident, such that decaff and coffee had identical effects in some subjects. Evaluation of the age factor suggested that older men (53-77 years) showed a greater blood pressure rise than young men (21-25 years) after coffee ; but half of the older subjects had very high control blood pressure levels.

These studies also illustrate a failing typical of many investigations in this area ; lack of information about coffee habits of the subjects. This deficiency would minimize the work of VALLE and MELLO (234) and FLEISCH and WENNER (228) were there not compensation in the materials studied. VALLE and MELLO (234) examined coffee, decaff and decaff plus trigonelline in 18 normal subjects ; the caffeine and trigonelline doses were approximately 2-4 mg/kg. All three beverages produced very small peak effects, averaging only 1-3 % for pulse rate decreases and blood pressure increases.

Equally small, but statistically significant, changes were found in FLEISCH and WENNER's study (228) of 25 normal subjects. Comparing filtered and soluble coffee (caffeine, 0.34 and 0.24 respectively) they observed that most subjects had maximum reactions one hour after ingestion. Pulse rate declined 5-7 beats per minute with all beverages, but blood pressure increased 3-4 mm Hg with the two coffee preparations. Decaff lowered blood pressure about 2 mm Hg (not significant).

BUHR's report (224) represents the only instance of optimal experimental design, and is enhanced by the division of subjects into coffee users and non-users. Twenty-one of the sixty subjects were hypertensive, the remainder normotensive and those with several forms of heart disease, but not decompensated. Coffee, caffeine and brown colored water were given as a volume of 300 ml, the caffeine content (coffee, caffeine) being 0.22 gm. Normotensive patients accustomed to coffee showed no significant change in heart rate after coffee or caffeine. Those not accustomed to coffee exhibited an increase in both blood pressure and heart rate, maximum 15 minutes after coffee and caffeine. Decaff and control solutions produced no effect or a slight reduction of the parameters. Pulse rate and blood pressure changes in the hypertensive and cardiac patients are not described in detail. BUHR's discussion (224) cites several papers with conflicting results on the blood pressure effects of caffeine/coffee in hypertensive patients. Clearly, this area merits further and more careful study.

Effects on cardiac function

CARDIAC OUTPUT — CAFFEINE AND COFFEE

Cardiac output, i. e., the volume of blood delivered per stroke or per unit time, may be measured in man in a variety of ways, none of which is absolutely ideal. Dye dilution, gas uptake and the sphygmographic method of WEZLER and BOGER (197) are the more common, the last named perhaps having slightly more error than the other two.

Three representative studies of cardiac output, and the effects of caffeine alone, are those of MEANS and NEWBURGH (212), GROLLMAN (204), and STARR, *et al.* (220). GROLLMAN (204) criticized the MEANS and NEWBURGH experiments, justifiably, for the execution of control and drug runs on different days. In GROLLMAN's experiments (acetylene method) oral caffeine increased cardiac output in young healthy subjects by 15 % after 0.65 gm, and by 11 % after 0.97 gm. With 0.16 and 0.32 gm there were no measurable changes in output. The time course of drug action showed a peak at 10 minutes and a gradual recovery over 1-2 hours, similar to the time course of blood pressure effects noted earlier.

GROLLMAN (204) used one subject per dose, whereas STARR, *et al.* (220) used the same dose (0.5 gm caffeine, intramuscularly) in each of four patients, including one with hypertensive heart disease. The average

increase in cardiac output (15 %) was not statistically significant. Estimation of left ventricular work and heart volume revealed no significant change after caffeine.

Reference was made previously to a highly sensitive subject with dramatic blood pressure increase after caffeine (BÖGER, *et al.* 197). One to two minutes after intravenous caffeine, 0.15 gm, this subject's cardiac output rose by 50-60 %. Partial recovery had occurred after six to seven minutes. Cardiac work was calculated to have doubled.

Only two worthwhile studies have compared the effects of coffee and caffeine on cardiac output. BUHR's report (224), details of which are described in the preceding section, shows that decaff and a water control beverage do not increase cardiac output in normotensive patients and those with hypertensive and other forms of heart disease, regardless of their coffee habits. Cardiac output and cardiac work in normotensives accustomed to coffee were unaffected by caffeine or coffee (0.22 gm caffeine). Non-accustomed normotensives, however, manifested a peak 40-50 % increase in cardiac output 15 minutes after either caffeine or coffee. Similar effects were obtained in hypertensives, both accustomed and non-accustomed, though the degree of change was smaller in coffee-users. Patients with heart disease, and accustomed to coffee, were intermediate (20-30 % increase) in their reaction with respect to normotensives and hypertensives. The report does not make clear what level of effect is significant.

The lack of effect of BUHR's (224) control solutions, water and decaff, suggests that his sample population was an average one. This important function of control data, missing in so many caffeine and coffee studies, is emphasized by the second cardiac output report (NEUTHARD and HOEN 239). NEUTHARD was the subject, described as « sensitive to coffee », and cardiac output was determined by the acetylene method. Ten minutes after 0.1 gm caffeine orally, cardiac output had tripled ! Decline from this high level was slow, and three hours after drug the output was 20 % greater than control. During the peak response, and for two hours, subjective sensations were especially marked : pressure and fullness in the head, pulsation in particular vessels, tremors of the hands and twitching of small muscles (orbicularis oculi, fingers).

Theobromine and theophylline, orally, induced similar but less marked elevations of cardiac output, differing from caffeine in time course.

Coffee with caffeine content of 0.1 gm duplicated the effect of caffeine. Even decaff and malt coffee led to a doubling of cardiac output, as did ingestion of 200 ml of hot water, but the latter effect dissipated rapidly.

The NEUTHARD and HOEN paper (239) therefore reveals another complexity in interpreting cardiovascular reactions to drinking coffee, namely, cardiovascular responses to temperature or volume of the ingested beverage. Explorations in this area were summarized briefly by DRETTNER (236) who concludes that volume effects (vasoconstriction and vasodilation) are more prominent than temperature effects.

CARDIAC ARRHYTMIAS

Experimental production of arrhythmias in man, by caffeine, is obviously not a feasible or desirable approach. Consequently, knowledge in this area is somewhat limited and has been gained indirectly. The cases reported by REED, *et al.* (247) and BENNETT and WALKER (242), for caffeine, are irrelevant since these arrhythmias occurred in patients being treated for barbiturate and narcotic poisoning ; and other central nervous system stimulants were also being used in the treatment regimen.

One should note, however, that nearly all cardiovascular studies of caffeine and coffee in man have included EKG recording. Only very rarely have EKG alterations been mentioned.

MATHIEU, *et al.* (244) have reported their extensive experience with cases of rhythm disturbances in relation to coffee-drinking, drawn from a large population of night workers, principally railroad employees. The authors point out the importance of individual variation in the population, and the importance of distinguishing between tolerant and intolerant populations. Their major findings concern prolonged abuse of coffee, or intoxication, in 113 individuals. In this series the **minimum** daily intake of coffee was 4-6 cups. But size of the cup varied widely and MATHIEU, *et al.* found the modal volume to be 1 liter, with the distribution tailing to as much as 3 liters per day.

Tachycardia, though not literally an arrhythmia, was present in 24 of the 113 (24/113) subjects, with rates of 105-120/minute common at rest. Bradycardia (44-56/minutes) only appeared in 7/113.

Extrasystoles, evident in 26/113, were predominantly ventricular, and usually unaccompanied by other rhythm disturbances. Less frequently seen were complete arrhythmias (8/113) and auricular ectopic beats (8/113). Though associated factors (smoking, drugs) were recognized as possibly contributory, the relation to coffee was established by noting that nearly all arrhythmias resolved rapidly after reducing or stopping coffee intake.

The work of POLONOVSKI, *et al.* (246) offers the first real clue to the possibility that all cardiovascular reactions to coffee may not be due to its caffeine content. Their comparisons of coffee, decaff, and soluble extracts also included a division into lightly and highly roasted material. Eleven of 261 patients exhibited extrasystoles one-half hour after drinking the highly roasted material, including one out of 36 patients given highly roasted decaff. Extrasystoles did not occur in the 41 patients given lightly roasted coffee or lightly roasted soluble extracts.

The role of caffeine was tested further. A patient « sensitive to coffee » developed extrasystoles while

on coffee (caffeine, 0.2 gm), but not when given 0.2 gm caffeine in soup. Another patient not sensitive to coffee was given soluble coffee for ten-day periods in the following sequence : highly, lightly, and then highly roasted. Extrasystoles appeared only during the first and last periods.

Since DALLA TORRE and BOLDRINI (227) were also able to produce extrasystoles with decaff, it is conceivable that something other than the caffeine in coffee is responsible, either by itself or as a potentiator of caffeine.

Effects on specific vascular beds

Surprisingly little quality information exists about the actions of coffee or caffeine on specific vascular beds, with the exception of the cerebral circulation.

A decrease in cerebral blood flow after 0.25 gm caffeine, I. V., was observed by GIBBS, *et al.* (202) in five of six patients with epilepsy. The thermoelectric flow recorder allowed only qualitative indication of cerebral vasoconstriction. Stimulation of respiration also occurred, and the authors questioned whether cerebral vasoconstriction by caffeine was secondary to decreased pCO_2. DENKER (200) and LOMAN and MYERSON (206) inferred cerebral vasoconstriction from recordings of cerebrospinal fluid pressure, which declined after caffeine, 0.15, 0.25 and 0.5 gm, I. V. Fifty patients were tested with the 0.15 gm dose in DENKER's study (200) and the average peak reduction in CSF pressure was 36 % (range 8-68 %), occurring 5 minutes after drug and returning to control levels 30 minutes later. Since systemic blood pressure did not change materially the results point to cerebral vasoconstriction.

Three more recent studies, with the Kety-Schmidt nitrous oxide method, agree that caffeine can cause cerebral vasoconstriction and thus decrease cerebral blood flow. SHENKIN (219) obtained an average peak decrease in cerebral blood flow of 7 ml/100 gm/minute ($P < 0.02$) in nine patients given 0.23 gm caffeine, I. V. The same dose and route produced a significant ($P < 0.05$) decrease (25 %) in cerebral blood flow in MAKINO's study (208) of eight patients. Systemic blood pressure increased (8 mm Hg) significantly in SHENKIN's trials, but not in MAKINO's. Patients with hypertension also experienced a decrease in cerebral blood flow (concurrently with reduction in CSF pressure) after slow intravenous caffeine, 0.25 gm (MOYER, *et al.* 213). The average flow decrease, 7 ml/100 gm/min., was the same as SHENKIN (219) observed but was not significant ($P = 0.12$) in this series of seven patients. Most important, morning hypertensive headaches were completely relieved by the caffeine injection in four of the patients, and diminished in the remaining three. Relief by caffeine of the morning headache associated with hypertension is documented elsewhere as well (FUORTES and MASPES 253 ; DMITRENKO 250 ; SOKOLOFF 171 ; LIEBERMAN 256). A possible corrolary may exist in the caffeine withdrawal headache (DREISBACH and PFEIFFER 251).

It is not known what mechanism underlies the morning headache of hypertensive individuals, though venous stasis and/or postarteriolar dilation have been suggested. In any event, the question of whether caffeine or coffee is indicated for relief depends on how these agents affect the rest of the circulatory system. Thus it would seem desirable to settle the controversy about their effects on blood pressure and cardiac function in hypertensives.

Effects of caffeine on the human coronary circulation are virtually unknown. Studies in isolated human hearts (KOUNTZ 255 ; TRUSSEWITCH 264) have dubious, if any, value. One is forced to rely on extrapolation from animal studies, or on results obtained with aminophylline. The latter may either dilate or constrict coronary vessels in man, concurrently with positive inotropic effects on the heart ; hence the increase in cardiac work may outstrip any increase in coronary flow. MODELL (258) has summarized the field, concluding that aminophylline and other xanthines have « failed to survive trial under clinical fire ».

Coffee, caffeine and coronary artery disease

Coronary artery disease (CAD) is a general diagnostic classification encompassing entities such as angina pectoris and myocardial infarction. The etiology of CAD is obscure and therefore controversial. Most authorities agree, however, that etiology is multifactorial. Briefly, the pathological lesion is a deposition of lipid material (Atheromata) in the intimal portion of the coronary vessels leading to narrowing, rigidity, and/or occlusion. Symptoms develop as the oxygen supply of the myocardium is compromised, hence the more recent substitution of the term « ischemic heart disease » for CAD. Whether preceding vascular injury is a necessary condition for the development of atheromatous plaques is also a controversial question.

In an attempt to pinpoint etiologic factors, PAUL *et al.* (277) conducted a long-term study of a relatively stable population, numbering almost 2,000 men between the ages of 40 and 55. The men, moderately uniform ethnically, were studied carefully for nearly five years ; relevant data included family history, body type, regular physical examination, laboratory tests, diet, and other environmental factors. At the end of the study period, ischemic heart disease had developed in 88 men, of whom 13 had died as a result. Comparison of the data from the 88 (coronary group) with that from the remainder of the population (noncoronary) revealed several statistically significant correlations. In the coronary group systemic blood pressure, body fatness, blood cholesterol levels, cigarette consumption, and monthly coffee intake, were all greater than in the

noncoronary group. Additional significant correlations in the coronary group were histories of peptic ulcer, chronic cough, shortness of breath, chest discomfort and age of death of father.

The authors' discussion of their findings is responsible and objective, as evidenced, for example, by the use of the term « association » for the significant correlations. Association does not necessarily mean a cause-effect relationship. The authors are also obviously aware that in multifactorial associations such as this there are undoubtedly interactions between the separate factors. In other words, any single factor may not be significant unless one, two or more of the other factors are present. Therefore, it would be unjustifiable to quibble about any single correlation in this carefully performed study.

Subsequently, BELLET and co-workers (266-268) reported that caffeine or coffee increased serum free fatty acids (FFA) in dogs and man. The 1965 paper describes results in 34 fasting, normal male subjects, 18-63 years of age. Twelve were given instant coffee, containing 218 mg of caffeine, to which 150 mg sodium cyclamate and 15 mg saccharin were added. Venous blood samples were drawn before, and at 30-minute intervals after the beverage. For control values each subject drank an equal volume of hot water (500 ml) containing the same amounts of sweeteners, and blood samples were drawn as above. However, it is important to note that control and test runs were made on different days.

The results are interpreted as showing a significant ($P < 0.05$; Student's t test) increase in FFA after coffee compared to the FFA increase after water ; 67 % in the former and 20 % in the latter. A similar, but less marked, increase (46 %) in FFA followed intramuscular caffeine, 250 mg, in a separate group of 11 subjects.

Examination of the raw data (BELLET, *et al.*, 267, table 2) shows that FFA control levels are extremely variable in the test population as a whole, and also in the same subject on different days of testing (coffee *vs.* water). Some of the control values are so low as to raise doubt that subjects were fasting. The authors have focused on maximal FFA increments which they note to occur 120 to 180 minutes after coffee. However, this is not true of all subjects, and the tabulated data reveals five subjects in which it is unlikely that any real increase in FFA has occurred. Moreover, there is a suggestion of an early **fall** in FFA in some individuals, a point not mentioned by the authors. It is also known that serum FFA levels are extremely labile, and subject to alteration by a great many factors.

An F, or variance ratio, test on the control data in BELLET's table 2 (267) indicates that the 12 subjects are different populations on the coffee and on the water test days. Consequently, the t test is statistically invalid. Nevertheless, it appears that at least some of the subjects show real increments in FFA after coffee. This suggests that the FFA response to coffee or caffeine is, like other cardiovascular responses, one in which the normal population shows variation.

BELLET's work is of interest, as he states, because of the possible relationship between elevated FFA levels and subsequent development of coronary atherosclerosis. However, a newspaper account of his 1966 abstract stated that BELLET found the FFA increase to be much less marked when sugar was added to the coffee.

Two unusual reports on dietary sugar (YUDKIN 280 ; YUDKIN and RODDY 231) provide a link between the BELLET and PAUL studies. YUDKIN (280) shows that national sugar and fat intake in 41 countries are perfectly correlated. He concludes that « statistics relating fat intake to ischemic heart disease or diabetes mellitus in different populations may therefore express only as an indirect relationship, and the causal relationship may be with sugar ». YUDKIN and RODDY (281) then proceed to show that patients with occlusive atherosclerotic disease take more sugar in more cups of coffee or tea per day than do control patients. The difference, almost double the amount, is highly significant statistically ($P < 0.001$).

Possibly, therefore, sugar in coffee, rather than coffee *per se*, may be the real association in PAUL's study (277). If so, sugar's prevention or diminution of the coffee-induced rise in FFA means that elevation of serum FFA levels may not predispose to atherosclerosis. It suffices to say that any cause-effect relation between coffee-drinking and development of ischemic heart disease is at best tenuous.

SCHROEDER and his coworkers (282, 283) have observed that cadmium consumed in the diet tends to accumulate in the kidneys of man and animals and, in animals at least, appears to be associated with the production of hypertension. This effect of cadmium appears to be blocked if the zinc-cadmium ratio is high. There is some evidence that the zinc-cadmium ratio in human kidneys from hypertensive individuals is low. SCHROEDER has indicated that coffee and tea have a low zinc-cadmium ratio and may contribute to the cadmium load for man. It would appear from his data that only a very small percentage of man's daily cadmium intake would be contributed by coffee, but does indicate that coffee processing, in particular for instant coffees, should not include equipment which would introduce cadmium as an impurity.

CONCLUSIONS

It is clear that caffeine and coffee interact with the cardiovascular system in accordance with well-known pharmacologic principles. Foremost among these is the variability of response among individuals from a normal population. For example, some animals and men show a blood pressure rise, some a fall, and still others no effect, with the same dose of caffeine. A second principle, that the effect is proportional to dose, is also evident, though not strikingly so. The data suggest that the dose-effect curves for caffeine action on cardiovascular parameters are relatively flat. In other words, a small change in dose does not produce a large change in the effect. While this may indicate something about the intrinsic potency of caffeine, it is more likely a reflection of opposing actions of the drug within the cardiovascular system. Either way, the practical meaning is that the difference between one and two, or two and three, cups of coffee might not be readily detected in tests on the circulatory systems of most normal men. « Normal » men are those with no symptoms of cardiovascular disease, and accustomed to some regular intake of caffeine-containing beverages ; coffee, tea, coca-cola, etc.

A third pharmacologic principle is that some drugs induce a state of tolerance, in which the original effect diminishes or disappears upon repeated usage. This is so for caffeine. But we do not know how long it takes to acquire caffeine tolerance, or, once acquired, how long it takes to lose it. In sum, all the preceding principles probably underlie the fact that cardiovascular reactions to caffeine/coffee are negligible in the majority of the normal population.

Intolerant individuals generally show more marked cardiovascular reactions to caffeine-containing beverages. Within this group are some individuals considered « sensitive », and so they frequently describe themselves. Invariably aware of their state, they voluntarily avoid caffeine-containing beverages. That their number is not large may be inferred from the fact that in all the studies examined only two out of a great many subjects were truly « sensitive ».

The effects of caffeine-containing beverages may also be more marked, according to one study, in humans with hypertensive cardiovascular disease. But the issue is controversial. One should recall that hypertensive patients were included in many studies which showed no particularly distinctive reactions in these subjects. Factors other than reactivity, though, are important in evaluating caffeine effects on hypertensive patients. Thus, the cerebral vasoconstricting action may relieve their headaches, but could be viewed as a potentially dangerous type of reaction in hypertensives.

The preceding remarks, indeed almost all the studies of caffeine and coffee, relate to acute effects. Virtually nothing is known about chronic cardiovascular effects. Functionally, it appears that chronic abuse of coffee will provoke cardiac arrhythmias in a small fraction of the human population. Histopathological effects of chronic caffeine administration are uncertain in animals, and unknown in man, at least with respect to the cardiovascular system. Though the degree of coffee consumption may be one of many associative factors in some patients with ischemic heart disease, the interaction of the multiple factors is obscure. That is to say, the relevance of individual factors is not established. And it may be that sugar in coffee, rather than coffee *per se*, is the underlying factor. Cadmium (particularly when the Zn/Cd intake ratio is low) has been reported to cause cardiovascular disease in animals and to be present in coffee. Present evidence indicates that only a very small percentage of man's total daily cadmium intake would be provided by coffee.

The matter of sugar in coffee illustrates a final point. Whereas the acute cardiovascular effects of coffee appear to depend largely on the caffeine content, we cannot say that the other components are inert. They have simply not been investigated. Nor can they be dismissed from consideration in terms of chronic effects of coffee-drinking. There is no *a priori* reason to assume that chronic effects of coffee-drinking, if such exist, are attributable to caffeine. Therefore it seems highly desirable to establish both the acute and chronic effects of coffee components other than caffeine.

REFERENCES

INTRODUCTION

1. GOODMAN, L. S. and A. GILMAN. — The Pharmacological Basis of Therapeutics, 3rd edition, The Macmillan Co., New York, 1965.

ANIMAL STUDIES

Heart rate and blood pressure

2. BUNAG, R. D. and E. J. WALASZEK. — Cardiovascular effects of substance P in the chicken. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 104 : 437-48, 1963.

3. BUNIN, K. V. — Action of ephedrine, cordiamine and caffeine on the circulatory system in typhus. *Sovet. Med.*, **13** : 18-19, 1949.
4. CHARLIER, R. — Contributions à l'étude des propriétés tonicardiaques de la caféine, de la théobromine et de la théophylline. *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, **62** : 370-76, 1939.
5. CRAVER, B. N. *et al.* — Kymographic registration of cerebrospinal fluid pressure (in dogs and cats) : effects of antihistaminics and common drugs. *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, **80** : 310-19, 1949.
6. DIKSHIT, B. B. — The production of cardiac irregularities by excitation of the hypothalmic centers. *J. Physiol.*, **81** : 382-94, 1934.
7. ESVELD, L. W. and V. G. BYLSMA. — Influence of some medicaments on the irritability of the vasomotor center. *Arch. Neirland. Si. Exactes et Nat. Sci.*, **3** : C 14, 321-23, 1929.
8. HAHN, F. — Comparative studies of the action of various analeptics on convulsions and blood pressure. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **198** : 491-508, 1941.
9. HAHN, F., D. PLESTER and W. RUMMEL. — Further investigations on the blood pressure effects of centrally acting analeptic substances. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **211** : 223-34, 1950.
10. JUNKMANN, K. and W. STROSS. — Toxic stimulation of the vasomotor center, I. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **131** : 1-17, 1928.
11. JUNKMANN, K. and W. STROSS. — Toxic stimulation of the vasomotor center, II. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **131** : 18-24, 1928.
12. MARTINETTI, R. — Vasomotor effects of caffeine. *Arch. di Fisiol.*, **38** : 373-88, 1938.
13. MARTINETTI, R. — Azione inhibitrice di derivati purinici sull'impertensione arteriosa e sull' apnea da adrenalina. *Arch. di Fisiol.*, **38** : 389-96, 1938.
14. MIRANO, G. C. — L'azione della caffeina sulla pressione del pulso. *La Riforma Medica*, **21** : 38, 1906.
15. PEGEL, V. A., E. SILANT and K. A. LUKOVSKAYA. — Effect of different concentrations of caffeine and adrenaline on the cardiac and respiratory systems and the interrelation of these drugs in rabbits. *Trudy Tomsk. Univ.*, **123** : 139-59, 1953.
16. PILCHER, J. D. — The action of caffeine on the mammalian heart. *J. Pharmacol.*, **3** : 609-24, 1912.
17. SAFONOVA, A. D. — The effect of bromine, caffeine and several of their combinations on blood circulation and respiration with the intravenous administration of these preparations, Sbornik Trudox Omsk. Filiala Vsesoyuz. *Obshchestva Fiziologov, Biokhimikov i Farmakologov*, **1** : 297-301, 1958.
18. SALANT, W. — The effect of caffeine on the circulation. *J. Pharmacol.*, **3** : 468-69, 1912.
19. SCHMID, E., M. BUBNOFF and R. TAUGNER. — The effect of purine compounds on the circulation in the non-narcotized dog. *Arzneim. Forsch.*, **5** : 194-201, 1955.
20. SOKOLOVA, L. N. — Action of caffeine, camphor and corasol (metrazole) on the cardiovascular system of rabbits treated with diptheria toxin. *Farmakol. i Toksikol.*, **3** : 22-28, 1940.
21. SOLLMAN, T. and J. D. PILCHER. — Influence of caffeine on the mammalian circulation. I. Persistent effects of caffeine on the circulation. *J. Pharmacol.*, **3** : 19-48, 1912.
22. SOLLMAN, T. and J. D. PILCHER. — Influence of caffeine on the mammalian circulation. II. Influence of blood pressure on cardiac and vascular reactions. *J. Pharmacol.*, **3** : 48-51, 1912.
23. SOLLMAN, T. and J. D. PILCHER. — Influence of caffeine on the mammalian circulation. III. Influence of caffeine on blood pressure reactions. *J. Pharmacol.*, **3** : 51-64, 1912.
24. SOLLMAN, T. and J. D. PILCHER. — Acute effects of intravenous caffeine injections on the circulation. *J. Pharmacol.*, **3** : 66-93, 1912.
25. SPERANSKAJA-STEPANOVA, E. N. — The reactions of blood pressure to intravenous and intra-arterial injections. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **88** : 616-21, 1933.
26. SWIRSKI, G. — Über die Beeinflussung des Vaguszentrums durch das Coffein. *Arch. für Gesamte Physiologie*, **104** : 260-93, 1904.
27. TANIGUCHI, K. — Pharmacological studies on the central vasoregulatory organization. *Yonago Igaku Zasshi*, **10** : 357-74, 1959.
28. TIFFENEAU, M. and A. BEAUNE. — Sympathomimetic action of caffeine. *Rev. Soc. Argent. de Biol.*, **10** : 525-29, 1934.
29. TSUBOI, S. — (Caffeine effect) on blood pressure. *Jap. J. M. Sc. IV, Pharmacol.*, **12** : 161-63, 1940.
30. VOLYNSKII, B. G. — Effects of caffeine on blood pressure in changing functional states of the body. *Farmakol. i Toksikol.*, **19** : 5-6, 1956.
31. WAELE, H. — Influence de l'alcoose et de l'acidose sur le mécanisme modérateur et accélérateur du cœur et sur l'action des substances vago- et sympathicomimétiques. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **94** : 1041-42, 1926.
32. WALTON, R. P. and O. J. BRODIE. — The effect of drugs on the contractile force of a section of the right ventricle under conditions of an intact circulation. Measurement of isometric systolic tension by means of calibrated springs attached to myocardiograph levers. *J. Pharmacol.*, **90** : 26-41, 1947.
33. YAMANOUTI, Y. — Über den pharmakologischen Wirkungsmechanismen von Kampfer und verwandten Onaleptica. *Fukuoka Acta Med.*, **31** : 1541-1620, 1938.
34. YAMANOUTI, Y. — Pharmacological action of camphor and related drugs. *Fukuoka Acta Med.*, **31** : 161-64, 1938.
35. ZHMURKIN, V. P., *et al.* — (On the effect of caffeine on blood circulation and regional vascular tonus). *Klin Med.*, **42** : 20-25, 1964.

Cardiac function

Isolated hearts

36. ARRIGO, L. — Impedographic equivalents of the activity of so-called membrane acting drugs on the isolated rabbit heart. *Arch. di Fisiol.*, **60** : 81-86, 1960.
37. BALEHRADEK, J. — The effect of caffeine on the size of the temperature coefficient of heart rhythm. *Arch. Intern. Physiol.*, **35** : 1-8, 1932.
38. BRINLEY, F. J. — The effect of caffeine on the prevagus and postvagus Chick hearts. *Amer. J. Physiol.*, **100** : 357-61, 1932.
39. BRUNS, O. and H. ROSENCRANTZ. — Action of drugs on weakly contracting and overworked hearts. *Zeitschr. Ges. Exptl. Med.*, **49** : 430-45, 1926.
40. BÜLBRING, I. — Effect of some new substances with cardiac action on perfused frog hearts. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **152** : 257-72, 1930.
41. CHOPRA, R. N., N. N. DAS and B. MUKERJI. — The action of certain cardiac drugs on embryonic heart explants. *Indian J. Med. Res.*, **26** : 271-78, 1938.
42. DAVID, I. — The action of caffeine on the work of the isolated frog heart. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **28** : 1977-79, 1952.
43. DE AGAZIO, A. — The action of histamine, insulin, ephetonine, caffeine and camphor on the isolated heart of Bufa vulfaris. *Atti Accad. Lincei*, **19** : 656-60, 1934.
44. EISMAYER, G. and H. QUINCKE. — Heart muscle tone. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **137** : 362-79, 1928.
45. FLAUM, E. and R. RÖSSLER. — The cardiac action of the purine bodies. *Klin. Wochschr.*, **12** : 1489-91, 1933.
46. FUJII, M. — Pharmacological study of embryonal chicken hearts at different stages of development. I. *Folia Pharmacol. Japon.*, **4** : 309-30, 1927.
47. HARDMAN, H. F. — Molecular form of theophylline responsible for positive inotropic activity. *Circulation Res.*, **10** : 598-607, 1962.
48. KIESE, M. and H. GUMMEL. — The effect of caffeine on the heart. *Klin. Wochschr.*, **17** : 927-28, 1938.
49. KIKUCHI, I. — Pharmacologic study of the absolute pressure of the heart. I. Study of the frog heart. *Tohoku J. Exptl. Med.*, **11** : 116-41, 1928.
50. KIKUCHI, I. — Pharmacologic study of the absolute pressure of the heart. II. Study of the rabbit heart. *Tohoku J. Exptl. Med.*, **11** : 293-307, 1928.
51. KÖNIG, W. — Herzarbeit ohne Sauerstoff. III. Mitteilung. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **127** : 346-65, 1928.
52. KUKOVETZ, W. R., N. HAUGAARD, M. E. HESS and J. SHANFELD. — Relation between contraction and phosphorylase activity of the rat heart. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **238** : 119-21, 1960.
53. KUSCHINSKY, G. and E. MUSCHOLL. — Action of purine substances on cardiac contraction force. *Klin. Wochenschr.*, **34** : 895-96, 1956.
54. KUSCHINSKY, G. and E. MUSCHOLL. — Effect of theophylline, caffeine and theobromine on contractility, sensitivity, refractory time, and spontaneous frequency of the isolated heart muscle in the cat. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **229** : 348-59, 1956.
55. LJUBUSCGEN, A. A. — Influence of the actual reaction of certain poisons. *Zhurnal Exptl. Biol. Med.*, **10** : 277-83, 1929.
56. LÜLLMAN, H. — The effect of caffeine and theophylline on the heart muscle. *Arch. Kreislaufforsch.*, **23** : 12-76, 1955.
57. McCARTNEY, E. and F. RANSOM. — Sodium citrate and the action of certain drugs upon the frog heart. *J. Physiol.*, **51** : 287-93, 1917.
58. MATANO, M. — Effects of anaphylaxis and various drugs on the potassium contraction of the atria in guinea pigs. *Nagasaki Med. J.*, **39** : 486-95, 1964.
59. NAYLER, W. G. — Effect of caffeine on cardiac contractile force, activity and radiocalcium movement. *Amer. J. Physiol.*, **204** : 969-74, 1963.
60. NEUROTH, G., K. WEZLER and G. SEIGLITZ. — Action of purine compounds and their substituents on the dynamics of the isolated spontaneously beating frog heart. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **220** : 378-90, 1953.
61. NIIMOTO, I. — The combined cardiac effects of odorin and quinine, metrazole and caffeine. *Mitt. Med. Ges. Okayama*, **51** : 2231, 1939.
62. OELSSNER, W. — Dye permeability in isolated beating frog hearts. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **212** : 195-204, 1951.
63. OSWALD, L. — Über die Beeinflussung des Koronarkreislaufs durch Gifte. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **51** : 64-83, 1904.
64. PELTOLA, P. and A. VARTIAINEN. — Action of antipyrine on the isolated frog heart. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **3** : 219-24, 1947.
65. PIETRO, C. — Action of caffeine on the isolated frog heart. I. Spreading of diastolic action on the isolated toad heart by very small doses of caffeine : the so-called caffeine benzoate and sodium obstruct the action of pure caffeine. *Arch. Farm. Sper.*, **81** : 137-49, 1953.
66. PIETRO, C. — Research on the action of caffeine. II. The mechanism of action of caffeine on the isolated frog heart. *Arch. Farm. Sper.*, **82** : 58-66, 1954.
67. SANDERS, R. — Dynamics of the frog heart : action of strophanthin, caffeine, camphor and cardiazole. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **125** : 358-80, 1927.
68. SASAKI, M. — (Caffeine effects) on auriculoventricular conduction of toad's heart : perfusion experiments. *Jap. J. M. Sc. III. Biophysics*, **4** : 88-90, 1938.
69. SIMON, I. and C. PIETRO. — Action of caffeine on the isolated frog heart. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **29** : 310-11, 1953.

70. STAUB, H. and W. GRASSMAN. — The minimum effective dose of some toxins on isolated mammalian hearts (with contributions as to method). *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **154** : 317-341, 1930.
71. SUSANNA, V. — Action of caffeine upon the frequency of heart beat. *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **27** : 265-75, 1922.
72. TAKABE, T. — Dynamic studies of the action of cardiotonics on frog hearts. *Jap. J. M. Sc. IV. Pharmacol., S. Proc. Jap. Pharmacol. Soc.*, **4** : 138-41, 1934.
73. TAKABE, T. — Dynamische Studien über Kardiotonika am Froschherzen. *Mitteil Med. Ges.* Tokio, **49** : 510-44, 1935.
74. TSUDA, Y. — Pharmacological investigation of heart strip preparations according to Loewe. I. Influence of drugs on the release of automaticity and the pulse. *Folia Jap. Pharmacol.*, **3** : 456-77, 1926.
75. ZAKRIVIDOROGA, S. P. — Comparative influence and therapeutic range of action of some drugs on isolated hearts of cold-blooded animals (frogs). *Farmakol. i Toksikol.*, **8** : 10-14, 1945.

Hearts of intact animals

76. BARRY, D. T. — Influence of certain drugs on the work done by the heart on conditions of experimental mitral lesion. *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, **38** : 111-21, 1930.
77. BOCK, J. — Über die Wirkung des Coffeins und des Theobromins auf das Herz. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **53** : 367-99, 1900.
78. BRINLEY, F. J. — The effect of caffeine upon the cardiac rhythm of adult fish hearts. *Physiol. Zool.*, **7** : 400-7, 1934.
79. CHAUCHARD, P. — Changes in the excitability of the cardioinhibitor and cardioaccelerator nerves of the dog under the influence of various types of drugs which modify the cardiac rhythm. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **128** : 50-53, 1938.
80. CHAUCHARD, P., *et al.* — Influence of sugars on excitation of the heart by caffeine. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **139** : 394-95, 1939.
81. CUSHNEY, A. R. — On the action of caffeine on the mammalian heart. *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, **9** : 169-80, 1901.
82. FREDERICQ, H. — The excitation of the cardiac vagus and its modification under the influence of caffeine. *Arch. Intern. Physiol.*, **13** : 107-14, 1913.
83. FREDERICQ, H. and Z. M. BACQ. — Caffeine effect on cardiac vagus of turtle. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **124** : 269-71, 1937.
84. FREDERICQ, H. and Z. M. BACQ. — On cardiac vagus of turtle. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **124** : 1256-57, 1937.
85. HASKELL, C. C. — The action of caffeine on the poisoned heart. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, **15** : 744-47, 1926.
86. HUKUDA, T. — The central origin of the cardiotonic action. *Hukuoka Acta Med.*, **32** : 86-87, 1939.
87. JOURDAN, F., G. FAUCON and G. SCHAFF. — Cardiac stimulating action of some vasodilator agents. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **156** : 1855-59, 1962.
88. KIESE, M. and R. S. CARAN. — Mechanical work, size and oxygen consumption of the warm-blooded heart. *Klin. Wochschr.*, **16** : 1219-20, 1937.
89. PILCHER, C., C. P. WILSON and T. R. HARRISON. — The action of drugs on cardiac output. III. The effect of caffeine sodiobenzoate on the cardiac output of dogs. *Amer. Heart J.*, **2** : 618-30, 1927.
90. REGGIANI, G. — Action on the ergograph of antipyrine and caffeine. *Bull. Scienze Med.*, **98** : 289-312, 1926.
91. ROTH, G. B. — Cardiac effects of acetanilide, caffeine and its citrate. *J. Pharmacol.*, **27** : 249, 1926.
92. SAITO, C. — The alteration of the electrical excitability of the heart vagus by various means. I. The action of heart remedies. *Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kioto*, **16** : 145-51, 1933.
93. SALANT, W. and J. E. NADLER. — The relation between cardiac reactions to drugs and the hydrogen-ion concentration of the blood. *Amer. J. Physiol.*, **78** : 308-21, 1926.
94. SCHAFF, G. and G. FAUCON. — Comparison of the action of vasodilators on the contractions of the myocardium (in dogs). *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **145** : 213-32, 1963.
95. SUBBOTIN, P. M. — Specific activity of cardiac glucoside preparations in their most commonly prescribed combinations with other drugs. *Farmakol. i. Toksikol.*, **3** : 13-19, 1940.
96. Van EGMOND, A. — Action of several drugs in complete heart block. *Arch. Ges. Physiol.*, **154** : 140-62, 1914.
97. WATANABE, T. — Effect of various drugs on the refractory phase of heart muscle, I-IV and Supplement. *Zyuzenkai Zassi*, **45** : 2947-57, 1940.

Arrhythmias

98. BEATTIE, J., G. BROW and C. LONG. — The vegetative nervous system. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 249, 1930.
99. BENTHE, H. F. — Dromotropic effect of caffeine on the heart muscle of the frog explained as sensitization to potassium. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **223** : 285-93, 1954.
100. BOSE, B. C., R. VIJAJVARGIYA, A. W. BHAGWAT and N. M. ROY. — Effects of purines and ATP (ase, osine, triphosphate) on heart. *Current Sci.* (India), **33** : 526-27, 1964.
101. CHENEY, R. H. — Cardiac automaticity effects of caffeine and nicotine. I. Caffeine influence upon the response of the sinoauricular strip. *J. Pharmacol.*, **54** : 213-21, 1935.
102. DAUTREBANDE, L. and R. CHARLIER. — Le nitrite d'anyle et la caféine facteurs empêchants de la syncope adrénalino-chloroformique et de la syncope adrénalino-benzolique. *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **66** : 29-40, 1941.

103. De GUBAREFF, T. and W. SLEATOR. — Effects of caffeine on mammalian atrial muscle, and its interaction with adenosine and calcium. *J. Pharmacol.*, **148** : 202-14, 1965.
104. DMITRIEVA, N. M. — Reaction of the organism to cardiac glycosides on stimulation of the central nervous system. Fisiol. i. Patol. Serdechno-Sosudistoi Sistemy v Klin i Ekspt., Sbornik Trudov 227-37, 1958.
105. GIES, K. — Action of toad poison and strophanthin on the refractive phase of isolated frog heart. *Z. Biol.*, **86** : 427-46, 1927.
106. HAAG, H. B. and J. D. WOODLEY. — Effect of caffeine and theobromine upon digitalis toxicity ; experimental study. *J. Pharmacol.*, **33** : 465-73, 1935.
107. MARFORI, P. — Pharmacological basis of therapeutic combinations of cardiac remedies. *Rass. Clin.-Sci.* (Inst. Biochim. Ital.), **17** : 531-37, 1939.
108. MEZZASALMA, G. — Pathogenic points on experimental arrhythmia from caffeine-adrenaline. *Boll. Soc. Ital. Sper.*, **32** : 1637-39, 1956.
109. OURY, A. — Modifying effects of caffeine on action of acetylcholine on heart of tortoise and striped muscle of frog. *Arch. Internat. Physiol.*, **44** : 488-94, 1937.
110. PREOBRAZHENSKII, A. M. — The tonic action of caffeine on the frog heart *in situ*. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **71** : 49-71, 1930.
111. THER, L., R. MUSCHAWECK, and J. HERGOTT. — Antagonism between adenosine and methylxanthines on the stimulus conductivity of the heart. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **231** : 586-90, 1957.
112. UEDA, I., R. W. LOEHNING and H. UEYAMA. — Relation between sympathomimetic amines and methylxanthines inducing cardiac arrhythmias. *Anesthesiology*, **22** : 926-32, 1961.

Pathological changes

113. BECKE, W., *et al.* — An electrocardiographic study of experimental heart disease. *Amer. Heart J.*, **2** : 302-10, 1927.
114. CHENEY, R. H. — Myofibrillar modifications induced by caffeine in cardiac muscle of the frog. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **18** : 15-20, 1941.
115. CZOCHRA-LYSANOWICZ, Z., M. CORSKI and M. KEDRA. — Effect of nicotine and caffeine on development of arteriosclerosis in rabbits. *Ann. Marie Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia Sec.*, **D14** : 181-206, 1961.
116. KRETSCHMER, W. — Observations on the vasocardiac effect of caffeine ; the origin of idiopathic cardiac hypertrophy. *Deut. Arch. Klin. Med.*, **180** : 318-26, 1937.
117. KROKHINA, E. M. — Histopathology of the nervous elements in the heart and the aorta of dogs after intravenous injection of adrenaline and caffeine. *Bull. Eksp. Biol. Med.* (Eng.), **52** : 967-71, 1962.
118. LEVI, A. and G. CABRINI. — The survival and the histological changes of the heart through the use of caffeine. *Boll. Soc. Ital. Sper.*, **6** : 594-96, 1931.
119. MEHES, G., L. SZEKERES, J. KOVACSICS and F. VANGA. — Heart injury caused by caffeine after single and chronic administration. *Acta Physiol. Hung.*, **6** : 113-21, 1954.
120. MILERE, M. and D. IONCHEV. — Effect on various drugs on electrocardiographic tracing in hypoxia. *Suvaem Med. Sofia.*, **5** : 47-54, 1954.
121. MROZIKIEWICZ, A., A. MAZUROWA and W. KAZIMIERZ. — Electrocardiographic and histological changes in the heart muscle of rabbits after glutamic acid administration. *Patol. Polska*, **15** : 327-38, 1964.
122. SERANOVA, A. I. — Experimental study of the effect of certain neurotropic pharmacological preparations on development of hypercholesterolemia and atherosclerosis. I. Effect of preparations stimulating the central nervous system ; caffeine and phenamine. *Ezhegodnik Inst. Eksperim. Med., Akad. Med. Nauk SSSR*, Leningrad, **7-8** : 220-23, 1963.
123. SHKHVATSABAYA, I. K. — The effect of some neurotropic substances upon the development of experimental atherosclerosis. *Biull. Eksptl. Biol. i. Med.*, **41** : 39-42, 1956.
124. WENZEL, D. G., J. D. MacCARTHY and C. O. RUTLEDGE. — Evaluation of caffeine and ouabain as permissive agents in the production of myocardial necrosis. *J. Pharm. Sci.*, **53** : 567 68, 1964.

Effects on specific vascular beds

Peripheral, visceral, pulmonary

125. ANSCHUTZ, H. F. and W. SCHROEDER. — Effect of various pharmacological substances on the circulation in the capillaries and the arteriovenous anastomoses in the extremities of dogs. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **116** : 291-99, 1950.
126. BARKSDALE, I. S. — The effects of certain drugs on the capillaries : atropine, eserine, sparteine, digitalis, caffeine, and cucurbocitrin. *Southern Med. and Surg.*, **89** : 27-32, 1927.
127. BECQ, L. and L. PLUMIER. — Action cardiovasculaire de quelques dérivés xanthiques. *J. de Physiologie et Pathologie Générale*, **8** : 10-21, 1906.
128. BOCK, H. E. — The vascular effect of strophanthin, theocin and caffeine. Studies on the surviving extremity and lung (of dogs). *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **166** : 634-48, 1932.
129. BURGI, S. — Acceleration, inhibition and disorganization of spontaneous rhythmic arterial contractions. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **3** : 215-29, 1945.
130. BURGISON, R. M., W. E. O'MALLEY, C. K. HEISSE and J. C. KRANTZ, Jr. — Pharmacologic studies with 8-(para-aminobenzyl)-caffeine and certain related compounds. *J. Pharmacol.*, **119** : 107-13, 1957.
131. EBBECKE, U. and A. JAGER. — *Pfluger's Arch. Ges. Physiol.*, **232** : 36-41, 1933.

132. FUJIMORI, K. — The reaction of blood vessels. II. The effect of several nerve and muscle poisons. *Acta Schol. Med. Univ. Imp.*, Kioto, **15** : 126-27, 1932.
133. HATTA, H. and O. KENICHI. — Contractibility of the lymphatic vessels of dogs. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **2** : 319-22, 1954.
134. IMAI, H. — The action of various substances on the vessels of the isolated perfused bone marrow. *Folia Endocrinol. Japon.*, **12** : 58, 1936.
135. ITO, N — Influence of drugs on electrical stimulation of the nervous auricularis magnus. *Folia Jap. Pharmacol.*, **3** : 27-53, 1926.
136. ITO, N. — Effect of caffeine sodiobenzoate on blood vessels of lungs, *Jap. J. M. Sci., IV, Pharmacol.*, **9** : 76-78, 1936.
137. ITO, N. — The action of sodium caffeine benzoate on the lung blood vessel. *Nagoya Igakkai Zasshi*, **45** : 1, 1937.
138. JOURDAN, F. and G. FAUCON. — Ephemeral character of the effect of vasodilators administered intra-arterially. *Therapie*, **14** : 844-53, 1959.
139. KADZIELA, W. and Z. BARGIEL. — Vasomotor reactions of the vascular network of the rabbit ear during acute fatigue under the influence of certain neurovasotropic substances. *J. Physiol.* (Paris), **55** : 193-94, 1963.
140. KOIZUMI, Z. — The effect of organic acid derivative of purine bases on the blood vessels of surviving hind legs of frog, *Sei-i-Kai Med. J.*, **55** : 2607-24, 1936.
141. KONOVALOV, P. F. — Reflex effect of cardiovascular drugs arising from the venous receptors of the frog. *Bull. Exptl. Biol. Med.* (USSR), **45** : 209-13, 1958.
142. KÜSTNER, H. and H. SIEDENTOPF. — Untersuchungen über die Biologie und Pharmakologie der Plazenta. III. Mitteilung, Reaktionsfähigkeit der Plazentagefässe auf pharmakologische Mittel. *Arch. Gynakol.*, **140** : 298-312, 1930.
143. LANGENDORF, H., H. G. HOHMANN and R. K. ZAHN. — Reaction of individual capillaries in frogs' webs under influence of drugs with vasomotor activity, recorded with an objective method of registration. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **122** : 178-98, 1953.
144. MALOFF, G. and C. WAINSTEIN. — Pharmakologische Untersuche an isolierten Froschvenen. *Pfluger's Arch. Ges. Physiol.*, **229** : 33-37, 1931.
145. MICHALEVSKAYA, P. V. — Action of poison on the pulmonary blood vessels and the effect of pressure upon the vasomotor reaction. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **71** : 489-95, 1930.
146. MISLIN, H. and D. RATHENOW. — Modification of the spontaneous rhythm of isolated mesenteric lymph vessels of *Cavia porcellus* by various drugs. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **19** : C87-C90, 1961.
147. OCHIAI, A. — The pharmacological reactions of arteries, veins and capillaries, I., *Folia Pharmacol. Japon.*, **7** : 19-20, 1928.
148. OKADA, M. — The action of some drugs upon the arterioles and capillaries. *Okayama-Igakkai-Zasshi*, **40** : 205-14, 1928.
149. PLESTER, D. — Mechanism of action of procaine and procaine-caffeine (impletol) in vascular disturbances. *Klin. Wochschr.*, **29** : 391, 1951.
150. PREOBRAZHENSKII, A. M. — Materials for the comparative pharmacology of vascular systems ; effect of poisons on the vessels of the ear in sheep. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **122** : 198-206, 1928.
151. QUIMBY, C. W., *et al.* — Effects of aminophylline and other xanthines on the pulmonary circulation. *J. Pharmacol.*, **122** : 396-405, 1958.
152. SAKAMOTO, M. — The action of vasoconstrictors and vasodilators on the vessels of the rabbit testis. *Folia Endocrinol. Japon.*, **11** : 40-41, 1935.
153. TERASAKI, M. — Pharmacological contribution to mesenteric circulation in comparison with cerebral circulation. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **55** : 78-91, 1959.
154. TROFIMOVA, Z. G. — Venous blood circulation in dogs under action of substances which alter the level of arterial pressure. *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, **111** : 232-35, 1957.
155. VALEEVA, Z. T. — Effects of some drugs on lymph ducts. *Farmakol. i. Toksikol.*, **23** : 258-64, 1960.
156. YOSHIYUKI, K. — Electric stimulation of the blood vessels. *Acta Schol. Med. Imp.*, Kioto, **17** : 22-26, 1934.

Cerebral

157. BEREZIN, V. I. — Action of poisons on the vessels of the brain. *Russky Vratch*, **15** : 513, 1913.
158. BIRZIS, L., *et al.* — The action of stimulating and depressing drugs on local cerebral impedance and circulation. *Psychopharmacologia*, **6** : 256-66, 1964.
159. BOUCKAERT, J. J. and F. JOURDAN. — Action of caffeine, papaverine and barium chloride on the cerebral blood vessels. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **120** : 257-59, 1935.
160. BOUCKAERT, J. J. and F. JOURDAN. — The physiology and pharmacology of the cerebral vessels. IV. The action of adrenaline. *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **54** : 109-28, 1936.
161. DUMKE, P. R. and C. F. SCHMIDT. — Quantitative measurements of cerebral blood flow in the macoque monkey. *Amer. J. Physiol.*, **138** : 421 31, 1943.
162. FINESENGER, J. E. — Effect of caffeine on cerebral vessels. The vagal pathway of the vasodilator impulses. *Arch. Neurol. and Psychiatr.*, **28** : 1290-1325, 1932.
163. GOTTSTEIN, U., W. NIEDERMAYER and A. BERNSMEIER. — The cerebral circulation under the influence of vasoactive substances ; animal experiments with Euphyllin, Cordain, caffeine, Roniacol, papaverine and Hydergine. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **131** : 430-39, 1959.
164. KUHN, J. — Action of medicinal substances and their combinations upon the intracranial vessels. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **94** : 74-96, 1922.
165. NOELL, W. — The action of theophylline and other drugs on the blood circulation in the brain. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **110** : 589-600, 1942.

166. NORCROSS, N. C. — Intracerebral blood flow. An experimental study. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, **40** : 291-299, 1938.
167. POPESCU, M. — The vascular action of caffeine : the mechanism and the sensitivity of the cerebral vessels to caffeine, Acad. Rep. Populare Romine Baza Cercetari Stiint. Ti, Isoara. *Studii Cercetari Stiint., Ser. Stiinte Med.*, **3** : 47-55, 1955.
168. SAISHO, A. — Cerebrospinal fluid pressure and cerebral circulation as related to headache and vomiting. II. *Folia Pharmacol. Japon.*, **48** : 133-40, 1952.
169. SCHMIDT, C. F. and J. HENDRIX. — The action of chemical substances on cerebral blood vessels. *Proc. Soc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, **18** : 229-76, 1937.
170. SCHNEIDER, M. — The regulation of blood flow through the brain. I., *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **175** : 606-39, 1934.
171. SOKOLOFF, L. — The action of drugs on the cerebral circulation. *Pharm. Rev.*, **11** : 1-85, 1959.

Coronary

172. BODO, R. — The effect of the « heart tonics » and other drugs upon the heart tone and coronary circulation. *J. Physiol.*, **64** : 365-87, 1928.
173. DATE, Y. — The action of certain drugs on the coronary flow of the dog. *Igaku Kenkyu*, **28** : 885-95, 1958.
174. HEATHCOTE, R. St. A. — The action of caffeine, theobromine and theophylline on the mammalian and betrachian heart. *J. Pharmacol.*, **16** : 327-44, 1921.
175. HEIMANN, W. and W. WILBRANDT. — Untersuchungen über coronardilatierende Wirkungen am Langendorff-Präparat und ihre Deutung auf der Grundlage eines Verdrängungs-Antagonismus. *Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta*, **12** : 230-41, 1954.
176. IHASHI, S. — An age factor in susceptibility of the heart and coronary vessel of rabbits to heart stimulants. *Sei-i-Kai Med. J.*, **56** : 909-27, 1937.
177. IWAI, M. and K. SASSA. — Modification of the coronary circulation by purine derivatives. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **99** : 215-25, 1923.
178. JOURDAN, F. and G. FAUCON. — Xanthine derivatives and coronary dilatation. *Arch. Internat. Pharmacodynamie*, **116** : 423-49, 1958.
179. LINDEN, E. and L. N. KATZ. — Further observations on the action of drugs on the caliber of coronary vessels. Papaverine hydrochloride, digitalis derivatives, aminophylline, caffeine, glucose, calcium gluconate, and metrazole. *J. Pharmacol.*, **72** : 306-10, 1941.
180. LOCHNER, W., H. MERCKER and E. SCHURMEYER. — Effect of vasomotor active substances on the oxygen saturation of the blood in the coronary sinus. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **227** : 373-82, 1956.
181. LOCHNER, W. and H. HIRCHE. — Stimulatory action of some substances on the chemical receptors of the carotid sinus and on the dilation of the coronary artery. *Naturwissenschaften*, **49** : 259, 1962.
182. MALORNY, G. — New ergotamine and calcium effect on the Langendorff heart. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **225** : 139-42, 1955.
183. MUSCHAWECK, R., W. PFAFF and J. HERGOTT. — Effect of purine compounds on the coronary-constricting effect of potassium chloride and cardiac glycosides. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **236** : 226-29, 1959.
184. NUKI, B. — Pharmacology of the coronary circulation. *Sogo Igaku*, **14** : 1056-65, 1957.
185. OETTEL, H. — The dynamics of coronary dilating substances. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **113** : 181-93, 1943.
186. OKI, T. — The action of xanthine derivatives on respiration, blood pressure and coronary blood vessels. *Igaku Kenkyu*, **28** : 2017-30, 1958.
187. RABE. — The reaction of coronary vessels to drugs. *Zeitschrift für Experimentelle Pathologie*, **11** : 175, 1912.
188. ROZIN, D. G. — Mechanism of action by antiffeine on cardiac coronary vessels. *Farmakol. i. Toksikol.*, **27** : 232-35, 1954.
189. SAKAI, S. and S. SANEYOSHI. — The action of several heart drugs (strophanthin, caffeine, diuretin) upon the coronary vessels. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **78** : 331-46, 1915.
190. SEGRE, G. — Coronary dilation and constriction induced by methylxanthines with respect to sodium nitrite. *Arch. Ital. Sci. Farmacol.*, **9** : 369-88, 1959.
191. SMITH, F. M. — The coronary circulation. *Arch. Internal Med.*, **40** : 281-91, 1927.

Coffee studies in animals

192. BALTACEANO, G. and C. VASILIU. — Action of coffee on arterial pressure. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **113** : 1247-49, 1933.
193. BUSQUET, H. and M. TIFFENEAU. — The role of caffeine in the cardiac action of coffee. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **155** : 362-65, 1912.
194. CAMPOS, F. and D. De OLIVEIRA. — Acção do infuso de café sobre o sistema vascular. *Brasil-Med.*, **46** : 241-43, 1932.
195. PACHON, V. and E. PERROT. — Sur l'action cardiovasculaire du café vert, comparée à celle des doses correspondantes de caféine. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **150** : 1703-5, 1910.

STUDIES IN MAN

Blood pressure and heart rate

Caffeine

196. BAICHENKO, I. P. and G. E. VLADIMIROV. — The blood supply of the tissues of the organism at high altitudes and its changes after caffeine administration. *Klin. Med.* (USSR), **17** : (11) 99-112, 1939.
197. BÖGER, A., B. DEPPE and K. WEZLER. — Die Dynamik des menschlichen Kreislaufes unter der Wirkung von Kreislaufmitteln. I. Typische Reaktionsablauf. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **189** : 480-508, 1938.

198. BRANDT, F. — Die Abhängigkeit des Venedruckes von der Grösse der zirkulierenden Blutmenge, zugleich ein Beitrag zu seiner klinischen Bedeutung. *Zeitschr. Klin. Med.*, **116** : 398-448, 1931.

199. BUSSE, H. — Effect of some drugs affecting the circulation on the rhythmic blood pressure fluctuations in men. *Z. Kreislaufforsch.*, **36** : 233-46, 1944.

200. DENKER, P. G. — The effect of caffeine on the cerebrospinal fluid pressure. *Amer. J. Med. Sci.*, **181** : 675-81, 1931.

201. FUCHS, E. — Action of caffeine on the blood pressure of healthy individuals. *Med. Monatssch.*, **2** : 46-50, 1948.

202. GIBBS, F. A., E. S. GIBBS and W. G. LENNOX. — The cerebral blood flow in man as influenced by adrenaline, caffeine, amyl nitrite and histamine. *Amer. Heart J.*, **10** : 916-24, 1935.

203. GILMAN, A. — Caffeine and health. II. *Hygea*, **13** : 878, 1935.

204. GROLLMAN, A. — The action of alcohol, caffeine and tobacco on the cardiac output (and its related functions) of normal men. *J. Pharmacol.*, **39** : 313-29, 1930.

205. KLEPZIG, H., *et al.* — Circulatory changes during and after exercise following administration of energizing substances. *Z. Klin. Med.*, **155** : 506-12, 1959.

206. LOMAN, J. and A. MYERSON. — The action of certain drugs on the cerebrospinal fluid and on the internal jugular venous and systemic arterial pressures of man. *Arch. Neurol. and Psychiatr.*, **27** : 1244, 1932.

207. LUCAS, W. P. — Cardiac stimulants : strychnine and caffeine. *Amer. J. Diseases of Children*, **7** : 208-29, 1914.

208. MAKINO, K. — Effects of various vasodilator drugs on cerebral circulation. *J. Jap. Soc. Int. Med.*, **47** : 768-79, 1958.

209. MARBACH, G., G. SCHAFF and M. T. SCHWARTZ. — Effects of alcohol and caffeine on cardiac frequency and respiratory frequency during sleep, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **156** : 1522-25, 1962.

210. MARTINETTI, R. — Modificazioni pressorie immediate all iniezione endovenosa di caffeina nell uomo. *Arch. Farmacol. Sperim e Sci. Aff.*, **66** : 59-68, 1938.

211. MARTINETTI, R. and A. FORCONI. — Action of caffeine in healthy or hypertensive subjects. *Policlinico (Med.) Sect.*, **44** : 286-98, 1937.

212. MEANS, J. H. and L. H. NEWBURGH. — The effect of caffeine upon the blood flow in normal human subjects. *J. Pharmacol.*, **7** : 449-65, 1915.

213. MOYER, J. H., *et al.* — The effect of theophylline with ethylene-diamine (amino-phylline) and caffeine on cerebral hemodynamics and cerebrospinal pressure in patients with hypertensive headaches. *Amer. J. Med. Sci.*, **224** : 377-85, 1952.

214. PELLEGRINI, M. — The antagonism between caffeine and adrenaline. Experiments on man. *Sperimentale*, **93** : 549-57, 1939.

215. PROKOP, L. — Altering the effect of adrenaline with caffeine. *Med. Klin.* (Munich), **59** : 2016-20, 1964.

216. PROPP, M. V. — Effect of small doses of bromide and caffeine on the vascular reflexes in man during ageing period. *Zhur. Vysshei Nervnoi Deyatel Nosti Im. I. P. Pavlova*, **9** : 191-95, 1959.

217. SEBOK, I. — Effects of caffeine in hypertension. *Deutsche Med. Wschr.*, **75** : 1067-70, 1950.

218. SCHWEISHEIMER, W. — Effect of caffeine on the heart. *Tea and Coffee Trade J.*, **111** : 12, 1956.

219. SHENKIN, H. A. — Effects of various drugs upon cerebral circulation and metabolism in man. *J. Appl. Physiol.*, **3** : 465-67, 1951.

220. STARR, I., C. GAMBLE, A. MARGOLIES, D. DONAL, Jr, N. JOSEPH and E. PARK. — A clinical study of the action of 10 commonly used drugs on cardiac output, work and size, on respiration, on metabolic rate, and on the electrocardiogram. *J. Clin. Invest.*, **16** : 799-823, 1937.

221. WOOD, H. C. — The effects of caffeine on the circulatory and muscular systems. *Therapeutic Gazette*, **36** : 6-13, 1912.

Coffee and caffeine

222. ARCHANGELSKY, C. T. — Die Wirkung des Destillats von Kaffee und von Tee auf Atmung und Herz. *Arch. Internatl. Pharmakodynamie*, **7** : 405-24, 1900.

223. BINZ, C. — Die Wirkung des Destillats von Kaffee und Tee auf Atmung und Herz. *Zentralblatt für innere Medizin*, **21** : 1169-76, 1900.

224. BUHR, G. — The action of caffeine and coffee on the heart and circulation in man. *Arztl. Forsch.*, **12** : 584-90, 1958.

225. BUHR, G. — Modification by condensed milk or a protein-valerian-polyphosphate complex of the effect of caffeine on the circulation in man. *Med. Ernahrung.*, **4** : 118-22, 1963.

226. CASSINIS, U. — Azione del caffè della caffeina, del cloruro di sodio nello sforzo degli atleti. *La Ric Sci.*, **1** : 353, 1933.

227. DALLA TORRE, L. and R. BOLDRINI. — Effect of natural coffee and decaffeinated coffee on cardiovascular system. *Minerva Med.*, **1** : 853-56, 1952.

228. FLEISCH, A. and V. WENNER. — Les effets physiologiques du café et des extraits de café. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **84** : 223-30, 1954.

229. HORST, K., *et al.* — The effect of habitual use of coffee or decaffeinated coffee upon blood pressure and certain motor reactions of normal young men. *J. Pharmacol.*, **52** : 322-37, 1934.

230. HORST, K., R. J. WILLSON and R. G. SMITH. — The effect of coffee and decaffeinated coffee on oxygen consumption and blood pressure. *J. Pharmacol.*, **58** : 294-304, 1936.

231. SEIBOLD, M. — Die Wirkung des Kaffees auf den Kreislauf aus klinischer Sicht. *Die Heilkunst.*, **2** : 61-65, 1965.

232. SCHWEISHEIMER, W. — Coffee and the heart. *Coffee and Tea Ind.*, **81** : 16-43, 1958.
233. SCHWEISHEIMER, W. — Coffee and low blood pressure. *Coffee and Tea Ind.*, **81** : 48-67, 1958.
234. VALLE, J. R.. and R. F. MELLO. — Effects on metabolism, pulse and arterial pressure. *Brasil Med.*, **53** : 8-10, 1939.

Cardiac function

Cardiac output

235. ATZLER, E. and G. LEHMANN. — Experiments on the effects of caffeine on the healthy heart. *Med. Welt.*, **8** : 525, 1934.
236. DRETTNER, B. — Vascular reactions on the intake of food and drink of various temperatures. *Acta Otlaryng.* (Stockholm), *Suppl.*, **188** : 249-57, 1964.
237. GROBER. — Coffee as a cardiac stimulant for athletics. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **63** : 91, 1933.
238. MATTHIAS, E. — Effect of ordinary coffee and « Kaffee Hag » on function capacity of circulatory organs before and after athletic sports. *Munch. Med. Wchnschr.*, **81** : 555, 1934.
239. NEUTHARD, A. and E. HOEN. — Pharmacological studies on the minute volume of normal human hearts. I. The effect of caffeine, theobromine, theophylline, coffee and Kaffee-Hag. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **185** : 293-301, 1937.
240. POTTHOFF, F. and G. BERENS. — Functional studies in the field of maximum activity. The effect of caffeine on circulation during bodily work. *Z. Ges. Inn. Med.*, **6** : 616-20, 1952.
241. STEPP, W. — Coffee and caffeine as poisons and as drugs. *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, **190** : 156-70, 1938.

Cardiac arrhythmias

242. BENNETT, I. L. and W. F. WALKER. — Cardiac arrhythmias following the use of large doses of central nervous system stimulants. *Amer. Heart J.*, **44** : 428-31, 1953.
243. GRANATA, G. — Experimental study of the cardiovascular reaction to normal coffee and caffeine-free coffee in children. *Minerva Pediat.*, **5** : 915-22, 1953.
244. MATHIEU, L., S. HADOT and E. HADOT. — Cardiac repercussions of coffee drinking. *Actualities Cardiol. Angeiol. Int.*, **11** : 219-26, 1962.
245. NATHANSON, W. H. — Effect of drugs on cardiac standstill induced by pressure on the carotid sinus. *Arch. Internatl. Med.*, **51** : 387-402, 1933.
246. POLONOVSKI, M., *et al.* — The comparative effects of coffee and soluble extracts of coffee on normal persons and on cardiacs. *Cardiologia*, **21** : 809-16, 1942.
247. REED, C. E., M. F. DRIGGS and C. C. FOOTE. — Acute barbiturate intoxication : a study of 300 cases based on a physiologic system of classification of the severity of intoxication. *Ann. Internal Med.*, **37** : 290-303, 1952.
248. STORZ, H. — Über die Wirkung des Coffeins auf das digitalisierte Herz. *Zeitschr. Ges. Innere Med.*, **4** : 41-50, 1949.

Effects on specific vascular beds

249. AIZAWA, T. and S. HAMAYA. — Cerebral sclerosis and cerebral circulation. *Japan Heart J.*, **2** : 133-46, 1961.
250. DMITRENKO, L. F. — Caffeine (use) in morning headaches in hypertensive disease. *Vrachebnoe Delo*, **27** : 545-50, 1947.
251. DREISBACH, R. and C. PFEIFFER. — Caffeine withdrawal headache. *J. Lab. Clin. Med.*, **28** : 1212-19, 1943.
252. EICHLER, K., *et al.* — Experimental studies on the question of the behavior of sensory and vasoconstrictor stimulus threshold. The effects of coffee and coffee-containing substances on the heart, circulation and blood vessel system. *Arztl. Forsch.*, **18** : 598-603, 1964.
253. FUORTES, M. G. F. and P. E. MASPES. — Therapeutics of intracranial hypertension. *Riv. Patol. Nervosa e Ment.*, **63** : 208-24, 1944.
254. HEUPKE, W. — Effect of drugs on the cerebral vessels in man. *Z. Ges. Exptl. Med.*, **44** : 198-214, 1924.
255. KOUNTZ, W. B. — Studies on the coronary arteries of the human heart. *J. Pharmacol.*, **45** : 65-76, 1932.
256. LIEBERMAN, T. Yu. — Effects on cerebrovascular tonus caused by some headache remedies in hypertensive patients. *Farmikol i. Toksikol.*, **26** : 573-78, 1963.
257. MALOFF, G. — Pharmacological investigations of isolated human veins. *Arch. Ges. Physiol.*, **229** : 38-42, 1931.
258. MODELL, W. — Clinical pharmacology of antianginal drugs. *Clin. Pharm. Therap.*, **3** : 97-108, 1962.
259. RAPHAEL, T. and J. M. STANTON. — Action of certain drugs on brain circulation in man. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, **2** : 389-92, 1919.
260. SAVADSKII, S. P. — Experiments on the coronary vessels of the human heart. *Russ. J. Physiol.*, **3** : 219-30, 1921.
261. SCARSELLI, E., *et al.* — The action of coffee and of intravenously and intracarotidally administered caffeine on the cerebral circulation of man. *Giorn. Gerentol.*, **8** : 776-88, 1960.
262. SCHWEISHEIMER, W. — Role of caffeine in relief of headache. *Coffee and Tea Trade J.*, **110** : 24, 1956.
263. SUGIYAMA, S. — On the study of the pressure volume curves of the peripheral blood vessels. *Med. Univ. Imp.* Kioto, **2** : 579-86, 1929.
264. TRUSSEWITSCH, B. I. — Über die Wirkung des Papaverins und einiger anderer gefässerweiternder Gifte auf die Coronargefässe des isolierten Menschenherzens. *Zeitschr. Ges. Exptl. Med.*, **75** : 167-76, 1931.
265. WEPF, R. and RAAFLOUB. — Zur Frage der pharmakologischen Beeinflussung der Gehirngefässe des Menschen. *Helv. Med. Acta*, **17** : 159-66, 1950.

Coffee, caffeine and coronary artery disease

266. BELLET, S., J. ASPE, A. KERSHBAUM and D. ZANUTTINI. — Effect of caffeine on free fatty acids. *Circulation*, **30** : Suppl. 3, III-45, 1964.

267. BELLET, S., A. KERSHBAUM and J. ASPE. — The effect of caffeine on free fatty acids. *Arch. Intern. Med.*, **116** : 750-52, 1965.

268. BELLET, S., A. KERSHBAUM and M. E. FINCK. — Effect of caffeine on free fatty acids. *J. A. M. A.*, **196** : 206, 1966.

269. CLOETONE, W. — Remote therapeutic results of the plant steroid cafesterol in four cases of rheumatismal carditis. *Bruxelles Med.*, **34** : 645-60, 1954.

270. FURST. — Die Gefahren des Kaffees bei Herz- und Arterien-Leiden. *Deutsche Medizinische Presse*, **9** : 91, 1905.

271. GORECKI, Z. — Recherches comparées sur l'action de la caféine, de la strychnine, du cardiazol, de la coramine et de l'huile sur l'appareil circulatoire et respiratoire des cardiaques décompensés. *Bull. Internat. Acol. Polonaise Sce et Leth. Cl. Med.* 317-31, 1930.

272. IZSO, Z. — The effect of caffeine on the blood pressure of cardiac and kidney patients. *Orv. hetil.*, **93** : 752-54, 1952.

273. IZSO, Z. and I. ZARDAY. — The effect of caffeine on blood pressure of persons without vascular disease. *Orv. hetil.*, **93** : 755-56, 1952.

274. LEE, S. — Coffee related to coronary disease? *Tea and Coffee Trade J.*, **126** : 18, 74, 76-78, 80, 82-83, 1964.

275. LEVY, R. — Coffee as a cause of cardiac pain. *Ann. Internal Med.*, **11** : 833-37, 1937.

276. MYASNIKOV, A. L. — The influence of some neurotropic drugs on the cholesteremia of atherosclerotic patients. *Klin. Med.*, **34** : 65-69, 1956.

277. PAUL, O., *et al.* — A longitudinal study of coronary heart disease. *Circulation*, **28** : 20-31, 1963.

278. SHARLAI, R. I. — Physiological basis for use of bromide, caffeine and calcium chloride in cardiovascular pathology. *Vrachebnoe Delo*, **10** : 1009-14, 1957.

279. TURNER, C. — According to Camp Hill physician-heavy coffee drinkers « living dangerously ». *Patriot*, Thursday, Oct. 14, 1965 (newspaper, Harrisburg, Pa.) no page number.

280. YUDKIN, J. — Dietary fat and dietary sugar in relation to ischemic heart disease and diabetes. *Lancet*, **2** : 4-5, 1964.

281. YUDKIN, J. and J. RODDY. — Levels of dietary sucrose in patients with occlusive atherosclerotic disease. *Lancet*, **2** : 6-8, 1964.

282. SCHROEDER, H. A. — Cadmium, chromium, and cardiovascular disease. *Circulation*, **35** : 570-580, 1967.

283. SCHROEDER, H. A., A. P. NASON, I. H. TIPTON, and J. J. BALASSA. — Essential trace metals in man : zinc. Relation to environmental cadmium. *J. chron. Dis.*, **20** : 179-210, 1967.

RIKER (W.), KENSLER (C. J.). — **Les effets cardiovasculaires de la caféine et du café chez les animaux et l'Homme.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris) 1968, p. 351-373, 283 réf.

La caféine et le café ont une action marquée sur le système cardiovasculaire et agissent suivant des principes pharmacologiques connus :

— la réaction varie d'un individu à l'autre dans une population normale ;

— l'effet est proportionnel à la dose, mais pas de façon frappante : la différence entre l'effet d'une et deux tasses ou de deux et trois tasses de café peut ne pas être immédiatement détectée lors d'expériences sur le système circulatoire de la majorité des individus normaux ;

— certaines drogues créent un état d'accoutumance tel que l'effet initial diminue ou disparaît à la suite d'absorptions répétées. C'est le cas de la caféine,

RIKER (W.), KENSLER (C. J.). — **Cardiovascular actions of caffeine and coffee in animals and man.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris) 1968, p. 351-373, 283 réf.

It is clear that caffeine and coffee interact with the cardiovascular system in accordance with well-known pharmacologic principles. Foremost among these is the variability of response among individuals from a normal population. A second principle, that the effect is proportional to dose, is also evident, though not strikingly so. The practical meaning is that the difference between one and two, or two and three, cups of coffee might not be readily detected in tests on the circulatory systems of most normal men.

A third pharmacologic principle is that some drugs induce a state of tolerance, in which the original effect diminishes or disappears upon repeated usage. This is so for caffeine. But we do not know how long it takes to acquire

RIKER (W.), KENSLER (C. J.). — **Die kardiovaskuläre Wirkung des Coffeins und des Kaffees beim Tier und beim Menschen.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 351-373,283 réf.

Coffein und Kaffee haben eine ausgeprägte Wirkung auf das kardiovaskuläre System und wirken gemäss bekannten pharmakologischen Grundsätzen :

— die Reaktion ist von einem Menschen zum anderen bei einer normalen Bevölkerung verschieden ;

— die Wirkung ist proportional mit der Dosis, jedoch nicht auf auffällige Weise : der Unterschied zwischen der Wirkung von einer und zwei oder von zwei und drei Tassen Kaffee kann bei den meisten normalen Menschen nicht immer sofort bei Experimenten am Kreislaufsystem wahrgenommen werden ;

— gewisse Drogen bewirken einen derartigen Toleranzzustand, dass die ursprüngliche Wirkung bei wiederholter Einnahme abnimmt oder ganz verschwindet. Dies ist der Fall bei dem

mais on ne sait pas combien de temps il faut pour acquérir cette tolérance et combien de temps il faut pour la perdre.

En résumé, les réactions cardiovasculaires à la caféine ou au café sont négligeables chez la majorité des gens ; seuls les individus peu tolérants présentent des réactions marquées. On ne sait virtuellement rien au sujet des effets cardiovasculaires chroniques. Il apparaît que l'abus répété du café provoque une arythmie cardiaque chez une petite fraction de la population. Les effets hystopathologiques de l'administration chronique de caféine sont incertains chez l'animal et inconnus chez l'Homme, tout au moins en ce qui concerne le système cardiovasculaire. Bien que le niveau de la consommation de café puisse être un des facteurs liés à l'ischémie du cœur, l'interaction de nombreux facteurs reste à déterminer.

Si les effets cardiovasculaires marqués du café semblent largement dépendre de la teneur en caféine, on ne peut pas dire que les autres éléments soient inactifs ; ils n'ont pas été étudiés. Il semble donc très souhaitable d'étudier les effets marqués et chroniques des composants du café, autres que la caféine.

caffeine tolerance, or, once acquired, how long it takes to lose it.

In sum, all the preceding principles probably underlie the fact that cardiovascular reactions to caffeine/coffee are negligible in the majority of the normal population.

Intolerant individuals generally show more marked cardiovascular reactions to caffeine-containing beverages.

Virtually nothing is known about chronic cardiovascular effects. Functionally, it appears that chronic abuse of coffee will provoke cardiac arrhythmias in a small fraction of the human population. Histopathological effects of chronic caffeine administration are uncertain in animals, and unknown in man, at least with respect to the cardiovascular system. Though the degree of coffee consumption may be one of many associative factors in some patients with ischemic heart disease, the interaction of the multiple factors is obscure.

Whereas the acute cardiovascular effects of coffee appear to depend largely on the caffeine content, we cannot say that the other components are inert. They have simply not been investigated. Therefore it seems highly desirable to establish both the acute and chronic effects of coffee components other than caffeine.

Coffein. Es ist jedoch nicht bekannt wieviel Zeit es braucht, um diese Toleranz zu erreichen und wieviel Zeit um sie zu verlieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die kardiovaskuläre Reaktionen auf den Coffein oder den Kaffee bei den meisten Menschen belanglos sind ; nur Menschen die eine geringe Toleranz aufweisen zeigen eine ausgeprägte Reaktion. Man weiss virtuell nichts über die chronische kardiovaskuläre Wirkung. Wiederholter übermässiger Genuss von Kaffee scheint bei einem kleinen Teil der Bevölkerung zu Herzarythmie zu führen. Die histopathologische Wirkung der chronischen Verabreichung von Coffein ist beim Tier ungewiss und beim Menschen unbekannt, wenigstens was das kardiovaskuläre System anbelangt. Obwohl die Menge eingenommenen Kaffees ein mit Herzischämie verbundener Faktor sein kann bleibt die Wechselwirkung zahlreicher Faktoren noch festzusetzen.

Wenn auch die ausgeprägte kardiovaskuläre Wirkung des Kaffees weitgehend vom Coffeingehalt abzuhängen scheint, kann nicht gesagt werden, dass die übrigen Grundstoffe unwirksam sind, nur wurden sie nicht untersucht. Es empfiehlt sich daher, die ausgeprägte und chronische Wirkung der übrigen Komponenten des Kaffees ausser dem Coffein ebenfalls zu untersuchen.

DISCUSSION

M. NAVELLIER : Je voudrais simplement attirer l'attention sur un détail qu'a signalé le Dr Kensler, détail qui me paraît très important : au cours des études qui ont été rapportées, on a pris en considération le nombre de tasses de café consommées par les sujets en cause. Le Dr Kensler a remarqué qu'il semblait y avoir une différence dans l'action du café selon que celui-ci était plus ou moins torréfié. Je pense qu'il entre tout à fait dans les attributions de notre association d'étudier d'une part comment les différents composants du café peuvent avoir un effet physiologique, et d'autre part comment tous les facteurs qui influent sur cette composition du café, depuis l'origine de la plante jusqu'à la technologie et à la préparation de la boisson, sont également en fin de compte des facteurs qui influent sur les effets physiologiques. Nous avons à notre programme un rapport de M. Adrian sur les différentes teneurs en vitamine PP selon l'origine du café et sa préparation. Je pense que ce genre d'études devrait être en corrélation étroite avec les études physiologiques et à ce point de vue, entre autres, le rapport du Dr Kensler me semble d'un intérêt extrêmement élevé.

M. LANG : Sie haben betont, dass es wünschenswert ist, dass auch die Begleitstoffe des Coffeins im Kaffee hinsichtlich ihrer akuten und chronischen Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem untersucht werden und haben auch schon die mögliche Bedeutung von Zucker und Cadmium erwähnt. Darf ich fragen, ob Sie schon einen bestimmten Verdacht auf die Beteiligung anderer Substanzen oder Substanzgruppen haben ?

M. KENSLER : After listening to the analytical chemists finding so many new compounds, I suppose that some of them may be biologically active at certain doses. But the one thing that I noticed is that nobody reported how much was present.

However, I think that in that field of circulation, there are materials such as chlorogenic acid affecting rates of absorption and peak concentration levels which may be important.

M. ADRIAN : Je voudrais savoir si l'on dispose de statistiques concernant les effets physiologiques et cardiovasculaires du café en fonction des niveaux alimentaires des populations, notamment dans les régions où la ration est riche en matières d'origine animale et celles où la ration est essentiellement végétale ?

M. KENSLER : With respect to the question about variation of the activity of caffeine dependant on the nutritional status of the population, we have not found any publication which throws any light on this at all. Perhaps some of the experiments on rats could give an idea.

M. PAOLETTI : At least in the rats, the effects of the methylxanthines are much more pronounced in starving rats than in well fed rats.

M. CZOK : Ich möchte noch auf den folgenden Befund hinweisen : Prof. Heyden hat bei Kaninchen durch Verabreichung einer entsprechenden Diät eine Erhöhung des Cholesterinspiegels im Blut gefunden und konnte ausserdem nachweisen, dass durch Verabreichung von Kaffee eine deutliche Senkung des erhöhten Cholesterinspiegels hervorgerufen wird.

M. KENSLER : All that I am familiar with is an experiment on rabbits involving cholesterol levels.

When 4-5 % cholesterol was administered in the diet, plaques of cholesterol appeared in the vessels. The administration of caffeine decreased the incidence. So one might think that caffeine should tend to reduce the coronary disease. But unfortunately we have not that kind of epidemiologic data.



G. MALORNY

ZUR EMETISCHEN WIRKUNG FRAKTIONIERTER KAFFEERÖSTSTOFFE

G. MALORNY, W. WALTER

Pharmakologisches Institut und Chemisches Staatsinstitut der Universität, Hamburg

Es ist seit langem bekannt, das magenempfindliche Menschen den Kaffee vielfach schlecht vertragen. Nach LICKINT (1931) kommt es nach Genuss grösserer Kaffeemengen auf nüchternen Magen sowohl zu erhöhter Magensaftproduktion als auch zu Übelkeit, Brechreiz und Nausea, ja selbst zu Erbrechen. Das gleiche gilt nach LICKINT auch für coffeinfreien Kaffee. HARNACK (1911) betont, dass auch die von Nervösen und Herzkranken geklagte Kaffeeunverträglichkeit auf Magenempfindlichkeit beruhe.

In gemeinsamen Versuchen mit BEHRENS (1940) gelang es uns, die Brechwirksamkeit des Kaffeegetränks im Tierexperiment nachzuweisen. Als verantwortlich für die emetische Wirkung erkannten wir die Röstprodukte. Versuchstiere waren Hund und Taube. Der Hund reagiert, wenn man die Brechdosis auf Kilogramm Körpergewicht bezieht, etwa 3-4mal weniger empfindlich als der Mensch.

Es zeigte sich, dass die mittlere Brechdosis für einen unbehandelten Columbiakaffee 4,25 g Kaffee pro kg Hund betrug. Der Kaffee wurde in Form eines Kaffeefiltrats 10 : 100 per Schlundsonde verabfolgt. Die Kaffeebrechdosen lagen für Sorten mit höherem Säuregehalt (Costarica) erheblich niedriger als für den sehr mild schmeckenden Menadokaffee. Von diesem Kaffee, der durch langjährige Lagerung in geschützten Trockenhallen gleichsam einem Fermentierungsprozess unterworfen war, benötigten wir grössere Mengen, um Erbrechen auszulösen.

Diesen sogenannten Menadoeffekt kann man auch durch ein abgekürztes Verfahren erzielen, indem man normale Rohbohnen 2 Stunden lang mit gespanntem Wasserdampf behandelt (LENDRICH-Verfahren). Im Hundeversuch liess sich zeigen, dass nach LENDRICH behandelter Columbiakaffee emetisch weniger wirksam war als unbehandelter Kaffee gleicher Provenienz.

Bei einer besonderen Versuchsserie wurde die Brechwirkung des unbehandelten Columbiakaffees mit coffeinfreiem Handelskaffee verglichen. Es wurden praktisch identische Brechdosen ermittelt ; damit scheidet Coffein als ursächlicher Faktor der Magenunverträglichkeit aus.

Da der Hund grosse Prüfmengen benötigte und für umfangreiche Versuchsserien nicht zur Verfügung stand, führten wir in der Folgezeit unsere Versuche an der Taube durch. Über die Ergebnisse unserer Bemühungen zur Isolierung der brechwirksamen Substanzen aus den Röstprodukten soll im folgenden berichtet werden.

MATERIAL UND METHODEN

Taubenversuche

Vom Frühling bis zum Spätsommer ist die Taube für Brechversuche gut verwendbar (induzierter Reflex im Rahmen der Brutpflege). Im Winter ist der Brechreflex schwerer auslösbar. Dafür tritt aber eine andere Form der Schleimhautreizung stärker in den Vordergrund. Es kommt zu heftigen Diarrhoen. Als Begleiterscheinung des Erbrechens treten auch sonst Diarrhoen bei Hund und Taube auf.

In Tab. 1 ist unser Vorgehen bei der Bestimmung der mittleren Brechdosis (BD_{50}) wiedergegeben. Es wird die Dosis bestimmt, bei der 50 % aller Tauben erbrechen. Als Testsubstanz dient hier Furfurol, ein in den flüchtigen Röstprodukten vorkommender Stoff. Zur Bestimmung der BD_{50} wird zunächst die Dosis ermittelt, bei der alle Tauben erbrechen, und danach, bei gleitender absteigender Dosierung, schliesslich die Dosis, bei der keine Taube mehr erbricht. Aus den Zwischendosen lässt sich dann die BD_{50} bestimmen. Sie liegt für Furfurol, in 20 ml Wasser gelöst, bei 68,4 mg/Taube. Bei Lösung in 5 ml ist wegen der höheren Konzentration, die die Magenwand stärker reizt, die Brechwirksamkeit grösser. Die BD_{50} ist hier mit 60,4 mg/Taube niedriger als bei grösseren Verdünnungen.

Bei der Herstellung der Kaffeefiltrate wurde darauf geachtet, dass die zu verabfolgende Gesamtflüssigkeitsmenge das Volumen von 30 ml pro Taube nach Möglichkeit nicht überschritt. Für die Taubenversuche wurde stets coffeinfreier Kaffee gewählt, um die zentral toxische Wirkung hoher Coffeindosen, wie sie in den starken Aufgüssen (100 ml heisses Wasser auf 20-40 g Kaffee) enthalten wären, auszuschalten.

Abb. 1. — *Verfahren zur Gewinnung von Kaffeefraktionen.*

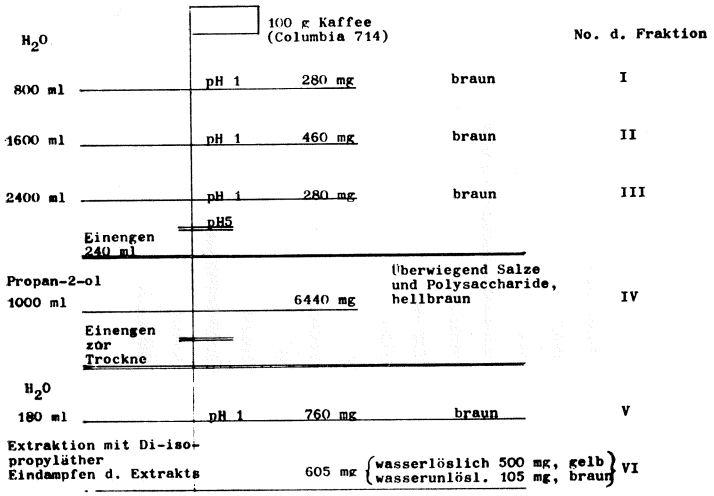


TABELLE 1

Bestimmung der mittleren Brechdosis (BD_{50}) von Furfurol an Tauben

a) **Furfuroldosis in 20 ml Wasser gelöst**

Dosis Furfurol in ml	n	Erbrechen	kein Erbrechen	z	d	z.d
0,09	6	6	0	—	—	—
0,08	6	5	1	5,5	0,01	0,055
0,07	6	4	2	4,5	0,01	0,045
0,05	6	2	4	3,0	0,02	0,060
0,04	6	1	5	1,5	0,01	0,015
0,03	6	1	5	1,0	0,01	0,010
0,02	6	0	6	0,5	0,01	0,005
						0,190

$$BD_{50} = D_n - \frac{(z.d)}{n} = 0{,}09 - \frac{(0{,}19)}{6} = 0{,}059 \text{ ml/20 ml}$$
$$= 68{,}4 \text{ mg/20 ml}$$

b) **Furfuroldosis in 10 ml Wasser gelöst**

$$BD_{50} = D_n - \frac{(z.d)}{n} = 0{,}09 - \frac{(0{,}175)}{6} = 0{,}061 \text{ ml/10 ml}$$
$$= 70{,}7 \text{ mg/10 ml}$$

c) **Furfuroldosis in 5 ml Wasser gelöst**

$$BD_{50} = D_n - \frac{(z.d)}{n} = 0{,}09 - \frac{(0{,}23)}{6} = 0{,}052 \text{ m/5 ml}$$
$$= 60{,}4 \text{ mg/5 ml}$$

D_n = Dosis, bei der alle Tiere erbrechen.
z = die halbe Summe der positiv reagierenden Tiere von je zwei aufeinanderfolgenden Dosen.
d = Differenz der Zahlenwerte von aufeinanderfolgenden Dosen.
n = Anzahl der Tiere in jeder Gruppe.

Chemische Aufbereitung des Kaffeefiltrats

Zur Differenzierung der chemischen Inhaltsstoffe des Kaffeegetränks wandten wir ein Fraktionierungsverfahren an, das auf die Anreicherung der braungefärbten Stoffe, die sogenannten Melanoidine, zielte. Das Verfahren beruht darauf, dass diese braunen Stoffe mit Salzsäure fällbar sind. Aufschluss über den Arbeitsgang gibt Abb. 1.

100 g Röstkaffee der Provenienz Columbia 714 wurden mit 800 ml Wasser von etwa 95° C übergossen. Nach dem Abkühlen wurde das Filtrat mit Salzsäure auf pH 1 angesäuert. Hierbei trat eine starke Trübung auf, die aber

nicht spontan sedimentierte ; durch Zentrifugieren bei 3.000 U/min konnte jedoch eine weitgehende Sedimentierung erreicht werden (Fraktion I). Die zweite Fällung, die aus einer erneuten Extraktion im wesentlichen in der gleichen Weise erhalten wurde, setzte sich bereits ohne Zentrifugieren ab. Sie wurde aber dennoch auf der Zentrifuge gewonnen (Fraktion II). Das gleiche gilt für die aus einer nochmaligen Extraktion gewonnene dritte Fällung (Fraktion III).

Nach Einstellung des pH-Wertes der Uberstände auf pH 5 und Einengen auf 240 ml wurden 1.000 ml Propan-2-ol zugesetzt, wobei überwiegend Salze und Polysaccharide als hellbraune Fällung erhalten wurden (Fraktion IV).

Nach Einengen des Überstandes unter vermindertem Druck zur Trockne wurde mit 160 ml Wasser aufgenommen und durch Zufügen von Salzsäure ein pH von 1 eingestellt. Aus dem Gesamtvolumen von 180 ml fiel nochmals ein brauner Niederschlag (Fraktion V).

Der Überstand wurde mit Di-isopropyläther extrahiert und lieferte nach Eindampfen einen gelb-braunen Rückstand (Fraktion VI).

ERGEBNISSE

Emetische Wirkung von Kaffeefiltraten

In gemeinsamen Versuchen mit D. KUDSI (1964) wurden die mittleren Brechdosen (BD_{50}) für coffeinfreien Santoskaffee und für Kaffeesurrogate an der Taube bestimmt (s. Abb. 2). Es ergab sich ein nicht zufallsbedingter Unterschied in der Brechwirkung von unbehandeltem und mit gespanntem Wasserdampf behandeltem Santoskaffee gleicher Provenienz. Die BD_{50} für coffeinfreien Pulverkaffee lag niedriger als für gemahlenen Kaffee. Die Ursache ist darin zu sehen, dass sich die BD_{50} auf g Extrakt und nicht auf g Ausgangsdroge bezieht. Man erkennt ferner aus Abb. 2, dass auch Malzkaffee und Cichorienauszüge, wenn auch erst in grösseren Dosen, brechwirksam sind. Dies deutet darauf hin, dass als Ursache für den emetischen Effekt die in diesen Produkten gemeinsam vorhandenen Röststoffe in Frage kommen.

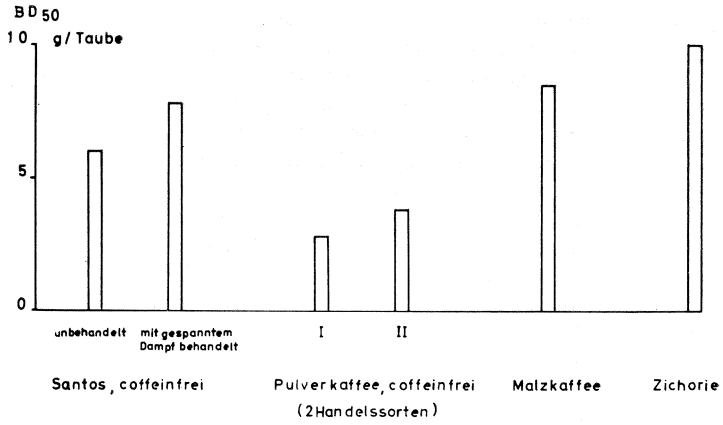


Abb. 2. — *Mittlere Brechdosen für coffeinfreien Kaffee und Kaffee-Surrogate.*

Untersuchung der Melanoidine

Die nach dem Fraktionierungsschema (vgl. Abb. 1) erhaltenen Fraktionen I, II, III und V wurden auf ihre Brechwirksamkeit an der Taube untersucht. Die genannten Fraktionen erwiesen sich, selbst bei hoher Dosierung (bis 500 mg pro Taube), als brechunwirksam.

Dieser zunächst überraschende Befund lässt sich indessen leicht erklären. Die Melanoidine des Kaffeegetränks werden nämlich unter den physiologischen Bedingungen des salzsauren Magensekrets in ähnlicher Weise gefällt wie bei ihrer Gewinnung im Versuchsansatz.

Lediglich die Fraktion VI, die nach Extration mit Di- isopropyläther erhalten worden war und aus einem wasserlöslichen

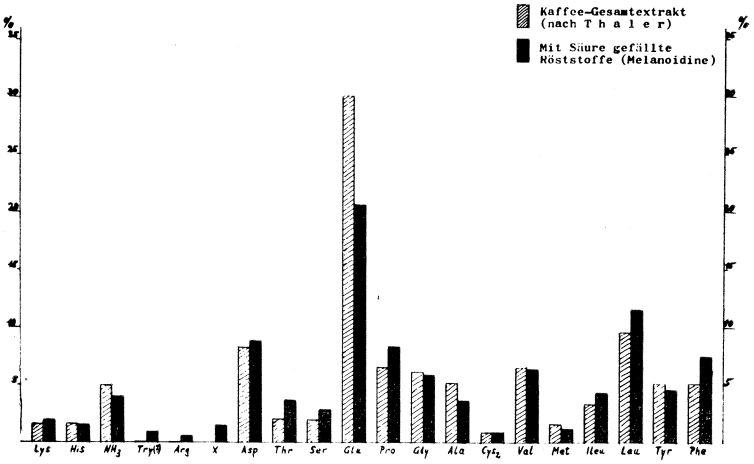


Abb. 3. — *Prozentuale Verteilung der Aminosäuren (Gewichts-%) in Kaffee-Extrakten und in mit Säure fällbarenRöststoffen (Melanoidinen).*

und einem wasserunlöslichen Anteil bestand, führte zu heftigem Erbrechen. Die Brechdosen lagen zwischen 105 und 235 mg pro Taube. Auf unsere umfangreichen Versuche mit Ätherextrakten aus Kaffeeaufgüssen soll im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen werden.

Zu den chemischen Eigenschaften der Melanoidinfällungen I, II, III und V ist noch zu bemerken, dass sie relativ proteinreich sind und bei der Hydrolyse 20-30 % Aminosäuren liefern. Der Aminosäuregehalt der Melanoidine entspricht etwa 30-50 % der im Kaffeegetränk enthaltenen Proteine.

Die aus den Melanoidinen durch Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren werden nach der Methode nach MOORE und STEIN an Ionenaustauschern analysiert. In Abb. 3 sind die Mittelwerte unserer Bestimmungen den Werten gegenübergestellt, die THALER und GAIGL (1963) bei einer entsprechenden Analyse des Gesamtextraktes von 5 verschiedenen Kaffeesorten erhalten hatten. Als qualitativer Unterschied fällt auf, dass zwischen dem Ammoniak und der Asparaginsäure in den mit Säure gefällten Röststoffen 3 weitere Aminosäuren festgestellt werden konnten, von denen eine Arginin ist, eine zweite wahrscheinlich Tryptophan und eine dritte noch unbekannt ist. Im übrigen ergeben sich gewisse quantitative Unterschiede, die besonders deutlich bei der Glutaminsäure hervortreten.

Unsere Untersuchungen ergeben noch einen weiteren interessanten Befund. Bei der fraktionierten Extraktion lässt sich zwischen einem unbehandelten und einem mit gespanntem Wasserdampf behandelten Röstkaffee auf einfache Weise ein reproduzierbarer Unterschied nachweisen, der in Abb. 4 dargestellt ist. Die Fällung aus Fraktion I ist bei einem behandelten Kaffee grösser als beim unbehandelten, während bei der Fällung aus der Fraktion II die Verhältnisse gerade umgekehrt sind. Die Gesamtfällung aus den Fraktionen I bis III ist indessen für beide Kaffees gleich.

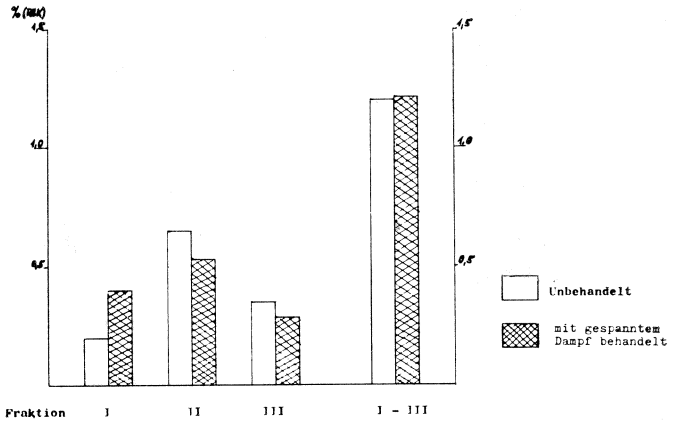


Abb. 4. — *Menge der Melanoidine bei fraktionierter Extraktion des Kaffees (% von Röstkaffee).*

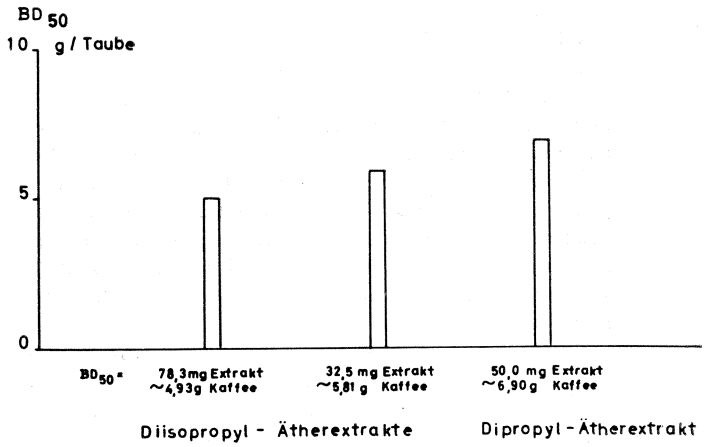


Abb. 5. — *Brechwirksamkeit von Ätherextrakten. Die Extraktmengen sind in Beziehung gesetzt zu den Kaffee-Ausgangsmengen.*

Emetische Wirksamkeit der ätherlöslichen Röstprodukte

Bereits in früheren Versuchen an Hund und Taube konnte festgestellt werden, dass die brechwirksamen Stoffe des Kaffeefiltrats nach Ansäuerung mit verdünnter HCl in Äther übergehen (BEHRENS und MALORNY, 1940). Da die Ätherextrakte jedoch noch viele wasserlösliche Substanzen enthalten, wählten wir für die vorliegenden Versuche höhere Äther als Extraktionsmittel, und zwar den Di-isopropyläther und den Di-propyläther. Es zeigte sich, dass die Gesamtextraktmenge geringer war, die Brechwirksamkeit aber praktisch voll erhalten geblieben war. In Abb. 5 sind die mittleren Brechdosen für 3 derartige Extrakte dargestellt ; sie sind bezogen auf die jeweiligen Kaffeeausgangsmengen.

Es interessierte nun die Frage, welche Stoffe in den Di-isopropylätherextrakt übergehen. MOSIMANN und HÖGL (1958) haben in einem derartigen Extrakt einige Stoffe mit phenolischen Gruppen identifizieren können

TABELLE 2

Im Di-isopropyläther-Extrakt aus Röstkaffee-Aufgüssen identifizierte Substanzen
(nach MOSIMANN und HÖGL, 1958)

Substanz	mg/100 g Kaffee
Brenzcatechin	5 d-10
Hydrochinon	0,2- 1
Pyrogallol	0,2- 1
Kaffeesäure	0,2
Maltol	keine Mengenangaben
5-Hydroxymethylfurfurol	keine Mengenangaben

(vgl. Tab. 2). Hier interessiert besonders das Brenzcatechin, das in ziemlich hoher Konzentration nachweisbar ist. Letzteres entsteht erst beim Röstprozess, und zwar bei der Pyrolyse der Chlorogensäure und Kaffeesäure. Wir haben die Angaben von MOSIMANN und HÖGL nachgeprüft und können sie im wesentlichen bestätigen.

Interessanterweise war in unseren Versuchen Brenzcatechin im nach LENDRICH vorbehandelten Kaffee nicht nachweisbar. Dieser Befund soll an grösserem Versuchsmaterial nachgeprüft werden.

Von den in Tab. 2 angegebenen Substanzen erwiesen sich Brenzcatechin, Kaffeesäure und Maltol als brechwirksam an der Taube.

Emetisch wirkende Stoffe, aus Röstprodukten isoliert

In den flüchtigen und nichtflüchtigen Röstprodukten ist eine Vielzahl organischer Verbindungen nachgewiesen worden, unter denen sich aromatische Stoffe mit alkoholischen Gruppen, mit Aldehyd- und Ketongruppen sowie mit phenolischen Gruppen befinden. Wir haben durch Stichwahl einige dieser Stoffe an der Taube geprüft. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Tab. 3.

Wie man sieht, befinden sich gerade unter den flüchtigen Aromastoffen zahlreiche brechenerregende Substanzen : Furfurol und verwandte Verbindungen, ferner Derivate des Pyrrol und Thiophen. Am stärksten wirksam ist Acrolein, das neben Dimethylacrolein im Kaffee in Spuren nachgewiesen wurde. Die flüchtigen Röstprodukte sind jedoch nicht allein für die emetische Wirkung verantwortlich zu machen. Denn die Pulverkaffee's des Handels, denen die flüchtigen Röststoffe weitgehend fehlen, rufen bei den Tauben ebenfalls Erbrechen hervor.

Unter den nichtflüchtigen Röstprodukten, die Erbrechen auslösen können, sind in erster Linie zu nennen : Brenzcatechin, Maltol und Kaffeesäure. Chlorogensäure und Chinasäure sind emetisch unwirksam.

Kaffeesäure führt erst in verhältnismässig hohen Dosen zum Erbrechen. Das Bild ändert sich jedoch, wenn Kaffeesäure pyrolysiert wird. Die Brechwirksamkeit steigt. Bereits 1/4 der Dosis führt jetzt zum Erbrechen. Wie bereits erwähnt, entstehen bei der Pyrolyse der Kaffeesäure als Spaltprodukte : Brenzcatechin Hydrochinon und Pyrogallol.

Genaue Angaben über die Zusammensetzung der Röststoffe, vor allem in quantitativer Hinsicht, waren bisher nicht zu erhalten. Zahlreiche Stoffe sind auf ihre biochemisch-pharmakologische Wirksamkeit noch nicht geprüft. Vielleicht wird es einmal gelingen, mit Hilfe der ermittelten Einzelbrechdosen mosaikartig eine einheitliche Brechdosis der gesamten Röststoffe zusammenzustellen.

TABELLE 3

Brechversuche an Tauben mit isolierten Röststoffen

	n	BD_{50} mg/Taube
a) **Flüchtige Röstprodukte**		
α-Furfurylmercaptan	42	38,2
Furfurylalkohol	30	43,4
Furfurol	126	66,5
5-Methylfurfurol	16	53,0
5-Methyl-acetyl-furan	17	51,0
2-Pyrrol-aldehyd	12	70,0
2-Propionyl-pyrrol	6	50,0 (?)
2-Acetyl-pyrrol	12	71,0
n-Methyl-pyrrol-aldehyd	13	69,0
Thiophen-aldehyd	16	25,0
2-Acetyl-thiophen	16	26,0
Methyl-cyclopentan-1,2-dion	18	100,0
Acrolein	30	2,0
b) **Nichtflüchtige Röstprodukte**		
Brenzcatechin	36	25,0
Styrol	30	101,0?
Maltol	16	170,0
Chlorogensäure	24	—
Kaffeesäure	36	254,2
Kaffeesäure-Pyrolysat	30	62,1
Chinasäure	14	—

LITERATUR

BEHRENS, B., und G. MALORNY. — *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.*, **194**, 369 (1940).

HARNACK, E. — *Münch. med. Wschr.*, **58**, 187 (1911).

KUDSI, D. — Inaugural-Dissertation Hamburg 1964.

LICKINT, F. — *Med. Klin.*, **27**, 387 (1931).

MOSIMANN, W., und O. HÖGL. — *Mitt. Lebensmitt. Hyg.*, **49**, 433 (1958).

THALER, H., und R. GAIGL. — *Z. Lebensmitt.-Untersuch.*, **120**, 449 (1963).

MALORNY (G.), WALTER (W.). — **Action émétique de produits fractionnés de la torréfaction du café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris) 1968, p. 374-380, fig., tabl., réf.

La teneur en produits de torréfaction est déterminante pour l'action stimulante de la boisson de café sur l'estomac

MALORNY (G.) WALTER (W.). — **The emetic effects of the fractional products formed during the roasting of coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 374-380, fig., tabl., réf.

The content in by-products formed during roasting is a determining factor in the stimulating effect of the coffee

MALORNY (G.), WALTER (W.). — **Zur emetischen Wirkung fraktionierter Koffeeröststoffe.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris) 1968, p. 374-380, fig., tabl., réf.

Massgebend für die Reizwirkung des Kaffeegetränks auf den Magen und auch auf den Darm ist der Gehalt an Röststof-

et l'intestin. Avec des doses suffisamment élevées qui excitent les terminaisons nerveuses émétiocosensibles de la muqueuse stomacale, il est possible de provoquer des vomissements chez des animaux.

La caféine n'est pas un facteur influant puisque aux mêmes doses que le café torréfié contenant normalement de la caféine, le café décaféiné provoque des vomissements chez le chien et le pigeon. Le faible rôle de la caféine est également démontré par le fait que les infusions de malt et de chicorée sont émétiques.

La dose moyenne active de café Santos décaféiné, non traité, est 6,0 g chez le pigeon et du même café traité par la vapeur d'eau, 7,8 g ; pour la boisson de malt, 8,5 g et pour la chicorée, 10,0 g. Le café et ses succédanés ont été administrés sous forme de filtrats concentrés analogues.

Les produits de torréfaction solubles dans l'eau, pouvant être précipités par les acides sous forme de mélanoïdines, ne sont pas émétiques.

Par contre les produits de torréfaction extraits par le di-isopropyléther possèdent la même efficacité que celle des filtrats préparés à partir de quantités correspondantes de café.

On a pu évaluer des doses émétiques moyennes chez le pigeon pour plusieurs produits de torréfaction identifiés comme les produits volatils : α-furfurylmercaptan, alcool furfurylique, furfural, thiophénaldéhyde , pyrrolaldéhyde , acroléine et les produits de torréfaction non volatils : pyrocatéchine, maltol, acide caféique et quelques pyrolysats.

Les substances aromatiques se présentant à des concentrations très réduites dans le café, elles n'agissent pas de façon néfaste sur l'être humain qui absorbe des boissons de café préparées normalement. A trop fortes doses et dans des cas d'hypersensibilité stomacale, elles peuvent cependant entraîner des irritations de l'estomac.

beverage on the stomach and the intestines. With sufficiently high doses which excite the emetic-sensitive nerve ends of the stomach mucous membrane, it is possible to cause vomiting in the case of animals.

Caffeine is not an influential factor, since at the same dose as for roasted coffee with a normal caffeine content, decaffeinated coffee causes vomiting in dogs and pigeons. The unimportance of the part played by the caffeine is also shown by the fact that infusions of malt and chicory are emetic.

The average active dose of decaffeinated Santos coffee, untreated, is 6.0 g for pigeons and the one of the same coffee treated with water vapour, is 7.8 g ; for the malt beverage, 8.59 g and for the chicory beverage, 10.0 g. Coffee and its substitutes have been administered in the form of similar concentrated filtrates.

The by-products of roasting, which are soluble in water and capable of being precipitated by acids in the form of melanoïdins, are not emetic.

On the other hand the by-products of roasting extracted by di-isopropyl-ether possess the same efficacity as that of the filtrates prepared from corresponding amounts of coffee.

It has been possible to estimate the average emetic doses for pigeons in the case of several by-products of roasting, identified as the following volatile substances : α-furfurylmercaptan, furfurylic alcohol, furfural, thiophenaldehyde, acrolein and the non-volatile by-products of roasting such as : pyrocatechin, maltol, caffeic acid and a few pyrolysats.

The aromatic substances being present only in very small concentrations in coffee, they have no deleterious effects on human beings who drink coffee prepared in the normal manner. With excessive doses and in the case of hypersensitive stomachs, they can however lead to gastric irritation.

fen. Mit entsprechend hohen Dosen gelingt es im Tierversuch, durch Reizung der emeticosensiblen Nervenendigungen der Magenschleimhaut, Erbrechen auszulösen.

Da coffeinfreier Kaffee in Versuchen an Hund und Taube in der gleichen Dosis Erbrechen erzeugt, wie normaler coffeinhaltiger Röstkaffee, entfällt Coffein als Erbrechen auslösender Faktor. Die geringe Bedeutung des Coffeins geht auch daraus hervor, dass Malzkaffee und Cichorienaufgüsse ebenfalls emetisch wirksam sind.

Die mittleren Brechdosen betragen für coffeinfreien, unbehandelten Santos-Kaffee 6,0 g pro Taube, für den gleichen, aber mit gespanntem Wasserdampf behandelten Santos-Kaffee 7,8 g pro Taube, für Malzkaffee 8,5 g und für Cichoriensurrogat 10,0 g pro Taube. Der Kaffee bzw. die Kaffee-Ersatzstoffe werden in Form entsprechend konzentrierter Filtrate verabfolgt.

Die wasserlöslichen Röststoffe, die durch Säure als Melanoidine gefällt werden können, sind emetisch unwirksam.

Die in den Di-isopropylätherextrakt übergehenden Röstprodukte besitzen hingegen die gleiche Brechwirksamkeit, wie die aus den entsprechenden Kaffeemengen hergestellten Kaffeefiltraten.

Für mehrere identifizierte Röstprodukte — wie z. B. für die flüchtigen Röststoffe α-Furfurylmercaptan, Furfurylalkohol, Furfurol, Thiophen-aldehyd, Pyrrol-aldehyd, Acrolein, ferner für die nichtflüchtigen Röststoffe Brenzcatechin, Maltol, Kaffeesäure und einige Pyrolysate — können mittlere Brechdosen bei der Taube angegeben werden.

Da diese Aromastoffe im Kaffee nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, wirken sie sich im normal bereiteten Kaffeegetränk für den Menschen nicht nachteilig aus. Lediglich bei besonderer Magenempfindlichkeit oder bei zu hoher Dosierung können sie zu Magenreizungen führen.

DISCUSSION

M. WALTER : Es wird die Zusammensetzung des durch Hydrolyse der Melanoidine erhaltenen Aminosäure gemisches erläutert und ein Vergleich mit den von Thaler und Mitarbeitern aus dem Gesamtkaffeeinfus festgestellten Aminosaüren demonstriert. Ausser den schon nachgewiesenen Aminosäuren wurde Arginin nachgewiesen, Tryptophan wahrscheinlich gemacht und eine noch unbekannte, wahrscheinlich basische Aminosäure festgestellt.

M. CALZOLARI : Se ho ben capito sarebbe stato rilevato che nel caffè decaffeinato non si ha più la presenza di quelle sostanze che provocano il vomito. Vorrei chiedere se è stato tenuto onto della possibilità di avere la controprova, eccioè se è stato in qualche modo esaminato il residuo della decaffeinizzazione.

M. MALORNY : Also damit ich richtig verstanden werde, im entcoffeinierten Kaffee sind die brechwirksamen Stoffe in vollem Umfange enthalten, sie werden nicht durch die Entcoffeinierung entzogen. Sie können jeden beliebigen Kaffee wählen, ob mit Coffein oder ohne Coffein, die Brechdosen sind praktisch gleich ; es wird also

nichts entfernt an diesen Stoffen. Wenn die Röstprodukte die emetisch wirksamen Substanzen darstellen, so können sie gar nicht entfernt werden, sonst würde der Kaffee sehr leer schmecken. Nun was die Rückstände von den Extraktionsmitteln anlangt, so sind diese kaum verantwortlich zu machen für die Brechswirkung, denn die Dosen sind da sicherlich sehr gering, aber genau untersucht wurde diese Frage von mir bisher nicht. Denn man müsste dann verschiedene Verfahren prüfen, beispielsweise die Entcoffeinierung mit chlorierten Kohlenwasserstoffen, wie Trichloraethylen oder Dichloraethan und ähnlichen Stoffen, und sowie anderseits die Entcoffeinierung mit Estern. Das wurde, glaube ich, eine sehr lohnende Untersuchung sein.

M. CALZOLARI : La traduzione era nel senso che io ho capito. Domando scusa.

M. REYMOND : L'acroléine doit-elle être considérée comme une substance présentant un fort pouvoir émétique ou existe-t-il d'autres corps chimiques qui présentent une activité beaucoup plus poussée ?

M. MALORNY : Die Mengen an Acrolein in den Röstprodukten sind äusserst gering, und ich möchte sagen dass wahrscheinlich dies kaum einer des wesentlichen Ursachen für die Brechswirksamkeit für Kaffee ist. Das Acrolein selbst allerdings ist eine der stärksten brecherregende Stoffe die wir überhaupt kennen. Aber im Kaffee spielt es sicher eine sehr untergeordnete Rolle.

M. STREULI : Auf einem der ersten Diapositive wurden die Brechwirkungen von Santos, Pulverkaffee, Malz und Zichorie miteinander verglichen. Die Dosen die links auf der Abszisse angegeben waren, bezogen sie sich auf die genannten Produkte oder nur auf dem löslichen Anteil ?

M. MALORNY : Bei dem Pulverkaffee bezogen sie sich auf den löslichen Anteil. Sie wurden in einem bestimmten Flüssigkeitsvolumen aufgenommen. Die anderen Säulen bezogen sich auf das Ausgangsprodukt den fein gemahlenen Kaffee selbst der nur mit Wasser ausgezogen wurde in einem Verhältnis 10 Teile Kaffee auf 100 Teile heisses Wasser.

M. STREULI : Dann darf ich Ihren Angaben entnehmen dass also, bezogen auf den löslichen Anteil, Bohnenkaffee bedeutend stärker brecherregend wirkt als Pulverkaffee, denn von Santos-Kaffee ist ja nur etwa ein Viertel wasserlöslich. Wenn Sie nun die Brechwirkung nur auf den löslichen Anteil beziehen, so haben Sie tatsächlich für den löslichen Röstkaffee-Anteil eine etwa doppelt so grosse Brechwirkung wie für den Pulverkaffee. Ich möchte daraus schliessen dass also der Pulverkaffee während der Extraktion auf die Brechwirkung bezogen, eine Verbesserung erfährt.

M. MALORNY : Diese Auffassung ist meines Erachtens nicht zutreffend. Immerhin betrug die Brechdosis beim Santos-Kaffee etwa 6 g pro Taube und beim Pulverkaffee 2,5 g pro Taube. Nimmt man an, dass bei der Pulverkaffeegewinnung die Extrakt-Ausbeute 40 % beträgt, so entsprechen 2,4 g Pulverkaffee genau 6 g Original-Röstkaffee. Wegen der intensiven Extraktion enthält der Pulverkaffee zusätzlich wasserlösliche Füllsubstanz, die aber nicht brechwirksam ist. Sie entspricht in etwa dem im Kaffeegrund zurückgehaltenen Anteil, der ebenfalls nicht brechwirksam ist. Ein echter Vergleich zwischen dem normalen Kaffeefiltrat und dem Pulverkaffee ist also nur möglich, wenn man sich auf den Original-Röstkaffee als Ausgangssubstanz bezieht. Es besteht also kein Unterschied.

M. FISCHBACH : Die emetische Wirkung beruht auf einer lokalen Reizwirkung der Magenschleimhaut. Sind zentrale Reizwirkungen von Kaffee-Röststoffen bekannt ?

M. MALORNY : Wie Sie richtig sagen, übt das Kaffeegetränk einen direkten Reiz auf die Magenschleimhaut aus. Von hier aus kann der Reiz nur reflektorisch zum Brechzentrum gelangen, also auf indirektem Wege. Es ist durchaus möglich, dass dieses Zentrum auch direkt erregt werden kann, beispielsweise durch parenterale Zufuhr der Röststoffe. Derartige Versuche sollen noch durchgeführt werden. Mir ist bekannt, dass andere Untersucher, zu denen auch Herr CZOK gehört, die zentralen Wirkungen des Gesamtkaffees, also nicht nur des Coffeins, geprüft haben.

M. LANG : Röststoffe haben nicht nur eine emetische Wirkung, also Wirkungen an bestimmten Receptoren, sondern auch ganz allgemeine cytotoxische Wirkungen, die man zum Beispiel an Zellkulturen in vitro nachweisen kann. Die Aufklärung der physiologischen bzw. pharmakologischen Wirkung von Röststoffen, Produkten der Maillard-Reaktion usw. ist von grosser Wichtigkeit, weil solche Substanzen nicht nur beim Kaffee, sondern ganz allgemein bei der Ernährung, vor allem auch bei der parenteralen Ernährung, eine Rolle spielen.

CHOIX DES ÉPREUVES D'APPRÉCIATION ORGANOLEPTIQUE

F. DEPLEDT
Paris

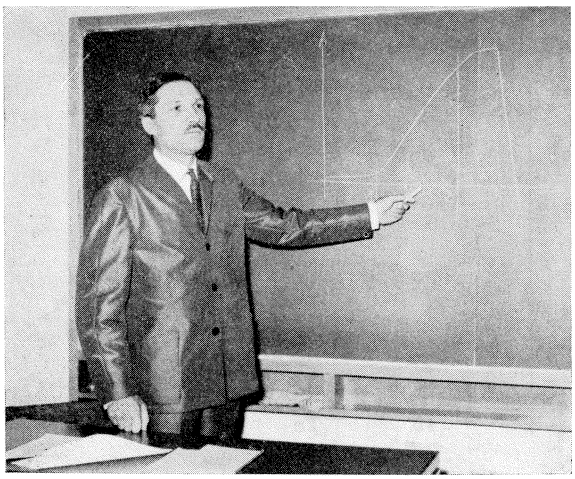
Le sujet de cette communication est très complexe, car il fait appel à la fois à des principes de physiologie, dont M. LE MAGNEN a parlé au second colloque ; à la composition chimique du café, souvent exposée, et à ce troisième colloque par M. d'ORNANO, aux origines culturales du café, à son grillage, à la préparation de son infusion et enfin à des techniques d'appréciation, dont je parle uniquement ici.

Il s'agit en effet d'utiliser des moyens d'appréciation organoleptique, basés sur des méthodes précises d'examen, de réponse et d'interprétation.

L'analyse sensorielle comprend un ensemble de méthodes utilisables dans différents cas pour tous les produits alimentaires et aussi pour leurs emballages ou modes de conditionnement.

Dans cette réunion sur la chimie du café nous ne parlerons pas des examens visuels du café en grains ou de la solubilité des poudres, mais uniquement des cas de dégustation des boissons obtenues à partir du café ou de l'introduction du café comme aromatisant des produits alimentaires (biscuits, pâtisseries, crèmes glacées, bonbons...). Il s'agit d'indiquer les méthodes souhaitables et d'attirer l'attention sur des problèmes difficiles à résoudre, sur le choix des épreuves ou leur intérêt.

BREF RAPPEL DES CONDITIONS PRATIQUES DE L'EXAMEN ORGANOLEPTIQUE



Cet examen est effectué par plusieurs personnes qualifiées, disposant d'un matériel approprié, dans une salle bien aménagée, isolée, ventilée et bien éclairée. Les examinateurs ou appréciateurs, qui ont été spécialement sélectionnés et entraînés pour l'appréciation particulière du café, se réunissent pour effectuer ensemble, mais séparément, la même dégustation à une heure bien déterminée.

Les techniques sont simples mais rigoureusement suivies, les questions et réponses doivent aussi être précises pour éviter toute confusion. Les épreuves sont répétées lorsqu'il y a doute ou si l'on craint l'influence d'un caractère variable dominant.

L'ÉCHANTILLON ET SA PRÉPARATION

Il faut toujours apporter beaucoup de soins à la préparation des échantillons. Les prises d'essais, leur identification précise et exacte, les quantités nécessaires, la conservation sont établies d'avance. La préparation des échantillons à déguster, mode d'emploi, quantités à préparer, temps de préparation, température à la dégustation sont précises et invariables pour que la comparaison des résultats puisse être possible. On s'entoure aussi de toutes les mesures physico-chimiques (humidités, résidus, cendres, acidités, colorations, granulations, etc...) pour déterminer les caractères de l'échantillon. Ceci est indispensable, mais souvent oublié ou non mentionné, ce qui empêche toute répétabilité ou même reproductibilité. Il est alors possible de comparer des résultats obtenus à différentes dates ou par différents laboratoires.

C'est principalement lorsqu'il y a des petites différences que l'analyse sensorielle est utile. Lorsqu'on peut savoir par un dosage ou une mesure objective si un élément déterminé est responsable d'une modification organoleptique, il n'est pas nécessaire de pratiquer la dégustation, sauf dans le cas où l'on rechercherait la corrélation pouvant exister entre la présence de cet élément et la flaveur perçue. Parfois l'analyse sensorielle peut être plus rapide que l'analyse chimique, dans ce cas il n'est pas non plus nécessaire de recourir à une dégustation par un groupe ; une personne qualifiée peut très bien effectuer ce triage sur une base simple ; absence ou présence d'un caractère, surtout s'il s'agit d'un défaut. On peut citer en exemple le triage du lait acide, les biscuits trop cuits, la mauvaise répartion du sel, l'absence de mousse, etc...

Les courbes de réponses des dégustateurs et celles tracées à partir de résultats chiffrés ne sont pas obligatoirement parallèles ou linéaires. C'est une des particularités qui posent encore des problèmes, que seules de nombreuses expériences pourront peut-être résoudre.

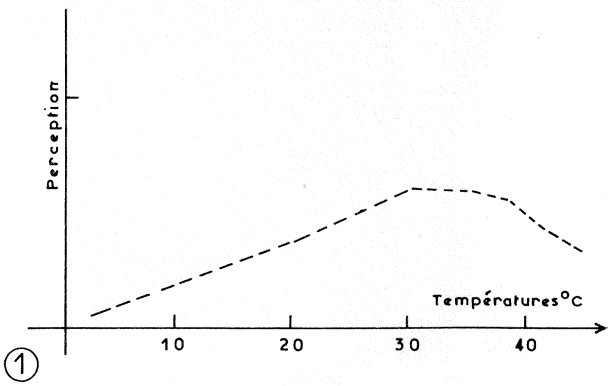
CAS PARTICULIERS DE LA DÉGUSTATION DU CAFÉ OU DES PRODUITS ALIMENTAIRES CONTENANT DU CAFÉ

La **saveur amère** présente plusieurs particularités. Elle est perçue par l'arrière de la langue, au niveau des grandes papilles du V lingual, donc par contact au moment de la déglutition. Il y a un retard dans la perception et par suite dans l'identification, ce qui fait dire souvent qu'il s'agit d'un « arrière-goût » et par suite d'un défaut. Ce cas n'est pas unique avec le café, puisque de nombreuses études ont été faites avec la bière.

On retrouve encore cette difficulté pour les apéritifs, les farines grillées, les olives noires, les amandes, etc..

De plus, la saveur amère qui est souvent perçue à un **seuil très faible** est aussi très différemment perçue par les individus (origines, régions, sexes, âges, habitudes alimentaires...) et encore plus diversement appréciée. Très répulsive pour certains, elle est considérée comme agréable par d'autres, tout au moins pendant un temps souvent assez court.

La saveur amère est perçue aussi différemment suivant la **température** du produit. S'il s'agit d'un liquide telle qu'une infusion de café pur ou une boisson aromatisée au café, la perception est continue, mais souvent augmentée par la chaleur. C'est pourquoi la bière très froide paraît peu amère. Cette saveur est encore perçue après absorption du liquide par suite du réchauffement des traces persistant au niveau de la langue (figure 1). S'il s'agit d'un solide (confiserie, gâteau) ou d'une crème (gélifiée, cuite) et surtout des crèmes glacées, la perception est retardée et même parfois presque supprimée par l'action paralysante du froid. Ceci est important à savoir pour les quantités de café à incorporer dans chaque produit et il arrive que certaines paraissent exagérées pour cette raison. Il reste là encore tout un sujet de recherches dont nous espérons pouvoir obtenir des résultats plus précis si l'on procure suffisamment d'échantillons et les moyens correspondants.



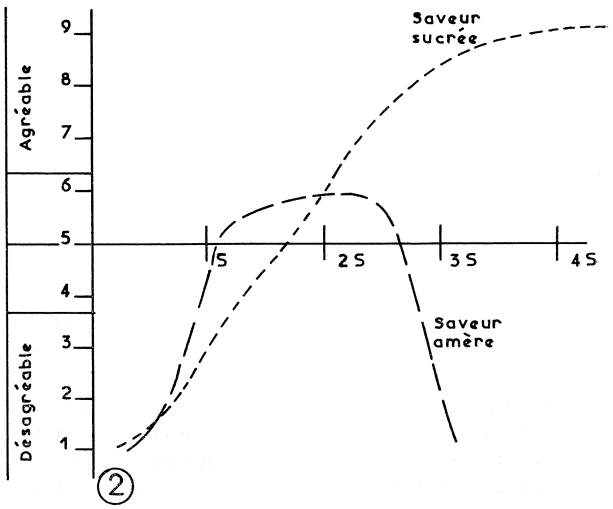
1

Les autres constituants de l'aliment influencent aussi la perception amère suivant leur **état physique** (sucre en grains, en sirop, en poudre), le milieu acide, neutre ou alcalin, le pH, la présence de certains constituants plus ou moins libérés par la chaleur.

La **persistance** de la saveur est un caractère encore peu étudié par suite du manque de précision des moyens techniques utilisables. Cependant certains expérimentateurs ont pensé pouvoir exprimer en secondes, dans le cas des vins, ce temps de persistance. Ils attribuent une part de la qualité à ce temps, qui, lorsqu'il est long, est un indice de supériorité. Ce temps semble plus résulter des combinaisons de produits aromatiques fixés par des substances de rétention que de l'existence de produits à haute masse moléculaire ou en quantités dominantes élevées.

Il ne faut pas négliger non plus l'**accoutumance** et le phénomène d'accumulation. Certaines boissons ne sont amères qu'au début, surtout pour la personne peu sensible, mais certains aliments sont refusés parce qu'à chaque déglutition, la perception amère augmente par accumulation. Ceci est aussi en relation avec le temps de persistance et la sensibilité du sujet.

La saveur amère est souvent considérée comme non seulement acceptable, mais souhaitable, même lorsqu'elle est assez forte. Cette notion est très subjective et beaucoup de personnes essaient aussi de masquer l'amertume soit par addition d'autres arômes ou l'apport de sucre. Or il peut y avoir décalage dans le temps de perception des différents caractères. On sait aussi par exemple que l'augmentation en masse devient bien plus vite désagréable pour la saveur amère que pour la saveur sucrée (figure 2).



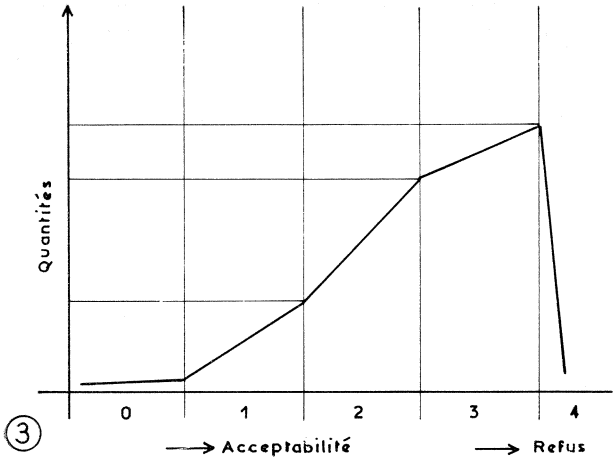
CATÉGORIES D'ÉPREUVES

Il faut distinguer dans l'utilisation des épreuves l'un des deux buts que l'on désire atteindre : contrôle ou recherche. Le contrôle peut consister en un classement un triage, une élimination, tandis que la recherche peut être celle d'une amélioration technologique, culturale, de conservation, etc. Avant toute épreuve il est donc indispensable de connaître et de définir l'objet, le sujet ; car les épreuves peuvent être différentes, mais surtout l'interprétation des résultats sera en relation avec la question posée. Assez souvent aussi on constate une abondance de questions, un questionnaire trop long. Les demandes doivent être claires, précises et simples pour que les réponses puissent être nettes, directes et statistiquement exploitables.

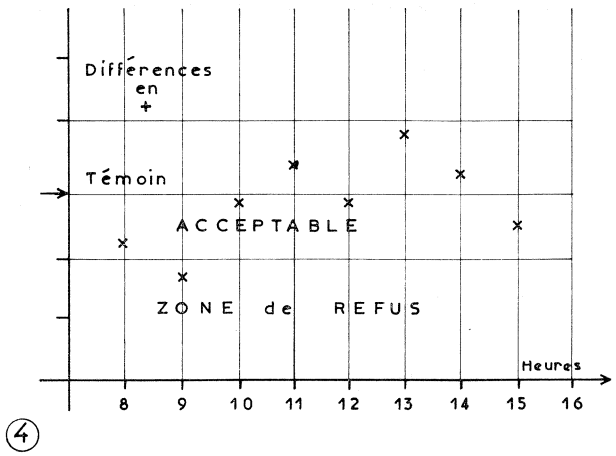
Examinons, par exemple, le cas d'un **contrôle** ayant pour but de faire un choix aboutissant à un classement. Cela revient aussi à un triage sélectif où l'on pratique une séparation entre ce qui est accepté et ce qui est refusé. Il doit donc y avoir critère de choix et définition des éléments constitutifs du choix. Il est évident que plus il y aura de facteurs retenus, plus la réponse sera difficile, aussi faudra-t-il séparer les questions et les décomposer en autant de caractères à examiner. De plus, il faut bien s'entendre sur la perception des propriétés à analyser, car il faut pouvoir définir et retrouver individuellement ce qui constitue le ou les éléments de la distinction, sans pour cela faire intervenir la quantité. Le rôle de l'animateur est capital, l'entraînement des dégustateurs-appréciateurs doit être soigné et continuel. Toute improvisation dans ce domaine est dangereuse et ne peut aboutir qu'à donner des résultats, sinon contestables, du moins non généralisables pour ne pas dire inutilisables. Dans d'autres cas il s'agit de déterminer le rapport entre la quantité avec l'acceptabilité du produit. On passe ainsi par des zones de non-perception, de satisfaction, de dominante, d'excès, enfin de refus (figure 3). Remarquons que pratiquement on isole plus facilement des défauts que des qualités. C'est souvent d'ailleurs le seul rôle qu'on attribue à un jury de laboratoire, d'où un entraînement à percevoir les défauts qui peut aboutir à une exagération sans rapport avec les exigences du consommateur.

Il est possible d'utiliser deux sortes d'épreuves : soit l'identité, soit l'évaluation.

Par le procédé reposant sur la constatation d'une **identité** on essaie d'observer s'il y a continuité, par exemple dans une suite de fabrications. En principe l'identité est le cas normal, la différence étant le cas



③



④

particulier. Cependant la différence peut être négative ou positive. Nous avons ainsi établi un questionnaire comportant la demande suivante : l'échantillon différent est-il inférieur ou supérieur au témoin ? Bien entendu le caractère de différenciation est précisé. En réalité, il s'agit de savoir si l'échantillon différent est plus ou moins quelque chose, ou possède plus ou moins tel caractère déterminé. Il est donc nécessaire de disposer d'un ou de plusieurs témoins de référence. Ceci est parfois très difficile, aussi bien pour l'ensemble des dégustations que pour une suite de dégustations s'échelonnant dans le temps, les échantillons se conservant mal. Il faut aussi s'accorder sur la grandeur possible de la différence perçue. Lors de l'interprétation, il est aussi possible de déterminer les écarts admissibles, car si la différence est faible (ce qui est le cas normal, sinon l'examen ne nécessite pas un jury), on aura une dispersion des résultats (figure 4).

Par une épreuve basée sur l'**évaluation** on peut aussi obtenir des réponses intéressantes. Si l'on veut en effet chiffrer les différences, on utilise une échelle de valeur, en faisant attention de séparer les différents caractères pour leur attribuer à chacun une notation. Ceci afin d'accorder les appréciations du jury, d'éviter les notes moyennes et pouvoir le cas échéant déceler les propriétés antagonistes.

Echantillons	A	B	C	D
Exemple : goût spécifique				
force du goût				
texture du produit.....				
.....				

SORTES D'ÉPREUVES

Pour obtenir les réponses il peut être proposé plusieurs sortes de questionnaires, qu'on s'efforcera de bien adapter au cas dans lequel on se trouve. En particulier on veillera à ce qu'il corresponde au produit, mais il est aussi souhaitable pour éviter la lassitude des appréciateurs de varier ces épreuves pour ne pas obtenir des réponses par routine.

— Épreuve par paires

Elle nécessite plusieurs répétitions, beaucoup de personnes et de temps ainsi que de matériel. Les échantillons sont proposés et comparés deux par deux. Cependant c'est la seule épreuve possible pour un groupe peu habitué.

— Épreuve avec témoin

Cette technique que nous avons précédemment recommandée aboutit à un classement simple à trois niveaux : inférieur, égal, supérieur. C'est la combinaison ou le développement du duo-trio avec témoin de référence. Elle est intéressante parce qu'elle oblige à prendre position, à donner une réponse nuancée mais décisive. La répétition donne d'excellents résultats et constitue un bon entraînement pour un groupe qui devient facilement très homogène dans son comportement et aussi très rapide dans ses réponses. Nous avons aussi constaté que par ce moyen les appréciateurs deviennent de plus en plus sensibles, sans aller jusqu'à l'exagération fréquente chez les spécialistes.

— Épreuve triangulaire

Bien connue et à notre avis trop exclusivement utilisée, nous ne ferons que remarquer que si elle est faite pour rechercher une différence par la présence de deux échantillons identiques, il faut aussi pouvoir l'utiliser lorsqu'il n'est perçu aucune différence. Cependant il ne faut pas traiter de la même manière les résultats. De plus, l'identité totale des trois peut être causée par la non-perception d'un caractère (anosmie, agueusie partielle et momentanée, antagonismes).

— Épreuve par cotation

L'épreuve par cotation qui comporte plusieurs sortes d'échelles de notes est parfois difficile à manier, par contre elle semble très pratique à exploiter mathématiquement. Il faut toujours isoler chaque caractère et les coter successivement. Il est important de savoir que la cotation est fluctuante aussi bien dans le temps que pour chaque individu. Souvent utilisée pour faire des comparaisons entre jurys, elle est sans valeur, à notre avis (d'après plusieurs expériences), parce qu'il n'y a pas d'accord sur l'appréciation des caractères. Cela ne serait possible que s'il y avait sélection des dégustateurs et formation technique par stages. Une autre difficulté rencontrée est celle de l'absence de réponses précises, car souvent les notes sont proches de la moyenne et laissent dans l'indifférence. De plus, s'il y a niveau élevé (qualité supérieure des échantillons) les produits légèrement inférieurs sont défavorisés, ou vice-versa. Ceci conduit à des sélections trop rigoureuses et à une exagération des différences.

RÉSULTATS

En ce qui concerne l'élaboration des résultats, nous ferons les remarques suivantes :

— L'**interprétation** des résultats doit toujours être faite avec les seuls moyens dont on dispose. Ne pas se laisser influencer par certaines réponses considérées plus ou moins inconsciemment comme prépondérantes, d'où aussi la nécessité de l'anonymat. De même il ne faut pas se laisser entraîner à des conclusions dépassant ce que les données apportent. Extrapoler est parfois très tentant et l'on oublie de contrôler le résultat par une répétition.

— Les résultats doivent aboutir aussi à une **discussion**. Celle-ci peut être brève, mais doit permettre de marquer la cohérence, la logique de l'épreuve. Toute anomalie doit être mentionnée, elle peut être parfois un élément de recherche. Ne pas vouloir rechercher la valeur (symbolique ou émotionnelle) du chiffre ou du nombre, mais l'ordre de grandeur, le rapport des propriétés ou la tendance.

— Enfin la **reproductibilité** et la **répétabilité** qui ne doivent pas être confondues, méritent d'être signalées. Il est certain qu'il faut pour cela des moyens importants et disposer de temps, ce qui n'est pas souvent malheureusement possible. Il faut ajouter que ces épreuves ne sont pas valables pour tous les produits, pour toutes les propriétés et qu'elles ne peuvent répondre à toutes les questions. Bien des recherches restent encore à faire et il est souhaitable qu'une entente, qu'une normalisation se produise pour la simplification et la diffusion de ces méthodes.

Pour **conclure** on peut dire que les méthodes d'appréciation organoleptique, les techniques de l'analyse sensorielle, même si elles ont un champ d'action et même une valeur limités, sont très utiles pour ne pas dire indispensables. Les conditions opératoires limitent beaucoup leur développement, mais leur caractère fréquemment évident doit permettre leur diffusion, puis leur évolution. Les méthodes subjectives peuvent être perfectionnées par leur utilisation rationnelle et systématique.

DEPLEDT (F.). — **Choix des épreuves d'appréciation organoleptique.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A.S.I.C. (Paris), 1968, p. 381-386, fig.

Après un bref rappel des conditions de l'examen organoleptique, des problèmes posés par l'échantillon et son mode de préparation, il est signalé les particularités de l'appréciation des

DEPLEDT (F.). — **The choice of tests for the organoleptic valuation.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 381-386, fig.

After a brief reminder of the conditions pertaining to organoleptic examinations, of the problems set by the samples and their method of preparation, the peculiarities inherent in the valuation of the organoleptic characteristics of coffee are pointed out :

DEPLEDT (F.). — **Wahl der Proben organoleptischer Beurteilung.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 381-386, fig.

Nach einem kurzen Hinweis auf die Bedingungen der organoleptischen Prüfung und auf die durch das Muster und seine Vorbereitungsweise aufgeworfenen Probleme werden die Besonderheiten der Beurteilung der organoleptischen Eigenschaften des Kaffees, Temperatur, Wahrnehmung des Aromas,

caractères organoleptiques du café : température, perception de l'arôme, la saveur amère et sa persistance.

On discute ensuite de trois sortes d'épreuves types de trois cas posés : triage, identité, évaluation. La discussion montre l'inégalité d'intérêt et de valeur pratique des différents moyens. Le choix de l'épreuve est en liaison avec le but recherché et l'utilisation des réponses. Quant aux résultats ils doivent être discutés et interprétés méthodiquement.

temperature, perception of the aroma, the bitter flavour and its persistence.

Then follows a discussion of three kinds of typical tests in three specific cases : grading, identification, valuation. The discussion exposes the disparity of the advantages and of the practical value of the various methods. The choice of the test is linked with the objective in view and for what purposes the answers are to be used. As to the results, they must be discussed and methodically interpreted.

Bittergeschmack und dessen Beständigkeit, hervorgehoben.

Sodann werden die Arten von Probetypen in drei gesetzten Fällen erörtert : Verlesen, Kennzeichnung, Beurteilung. Die Diskussion zeigt die Ungleicheit des Interesses sowie des praktischen Wertes der verschiedenen Mittel. Die Wahl der Probe steht in Verbindung mit dem erstrebten Ziel und der Verwertung der Antworten. Die Ergebnisse müssen ihrerseits besprochen und methodisch ausgelegt werden.

DISCUSSION

M. WILBAUX : Je tiens à remercier M. Depledt pour son très intéressant exposé. J'indiquerai qu'à l'I. F. C. C. nous avons essayé de séparer les goûts élémentaires en : corps et force (ensemble, car les dégustateurs ne font généralement pas la distinction), amertume, acidité, astringence. Nous ajoutons une colonne supplémentaire pour les goûts particuliers qui sont très nombreux : malpropre, terreux, aigre, rioté (c'est-à-dire iodé), etc. Nous donnons alors une cotation hédonique de 1 à 8.

Je signalerai encore que pour les cafés excelsoïdes par exemple, l'amertume augmente lorsque la liqueur refroidit, peut-être à cause de l'hydrolyse de certains composants dans la boisson.

M. DEPLEDT : Je vous remercie des renseignements que vous venez d'ajouter. Je crois qu'il est en effet très important de faire ce genre de séparations. Je ne vous ai pas parlé des échelles de notes, car cela constitue tout un problème que j'ai d'ailleurs déjà traité.

La note 1, par exemple, est très rarement mise et très difficile à mettre, parce que je pense que cette échelle de 1 à 9, par exemple, n'est pas arithmétique, mais beaucoup plus logarithmique.

M. WILBAUX : L'échelle hédonique devrait être en effet logarithmique et je reconnais l'exactitude de cette remarque.

M. ILLY : Je voudrais seulement insister sur le fait que, pour la dégustation, il faut aussi tenir compte de la concentration de l'échantillon, qui influence beaucoup la persistance du goût, et du temps qui s'écoule entre la préparation de l'échantillon et le moment de la dégustation, temps qui peut influencer très fortement le goût par suite de phénomènes d'hydrolyse que vous connaissez tous.

M. DEPLEDT : Je ne vous ai pas parlé de l'échantillonnage, car je sais que dans vos précédents travaux, vous vous êtes inquiétés de la préparation de l'échantillon. Il est en effet indispensable de connaître la concentration, le temps d'infusion. Les quantités à respecter sont capitales dans la détermination de la saveur.

M. WOODMAN : J'aimerais demander si M. Depledt pourrait indiquer l'analyse statistique (ou la référence à la littérature) qu'il a employée pour prouver l'identité de deux échantillons quelconque. J'insiste sur la différence entre la situation « pas de différence démontrable » et « équivalence ou identité ».

M. DEPLEDT : Oui cela est très important du point de vue discussion mathématique. L'identité n'est pas toujours facile à apprécier alors que la différence est souvent beaucoup plus facile à déterminer. C'est pourquoi, dans le cas d'un simple triage, il est plus facile d'isoler un défaut sur lequel tout le monde est d'accord que d'essayer de voir si les différentes propriétés sont toutes présentes.

Si l'on fait la somme des résultats obtenus, ou bien en consultant les tables de Fisher, ou bien en faisant une analyse de variance pour savoir si les différences perçues proviennent des dégustateurs ou de l'échantillon, cela permet d'éliminer les réponses éloignées, ou bien d'en tenir compte si elles entrent dans l'écart-type acceptable.

M. FOBÉ : La relation entre la dégustation et les acides aminés a-t-elle été étudiée ?

M. DEPLEDT : Ces expériences ne m'ont pas été demandées, mais une expérience sur d'autres produits m'a montré la possibilité d'une corrélation entre le dosage des acides aminés et la saveur perçue.

M. NAVELLIER : M. Fobé vient de parfaitement placer le problème qui est à l'origine de l'invitation de M. Depledt à notre colloque. Il nous a montré les effets physiologiques sur les sens de la perception et son exposé nous prouve qu'il est inutile de poursuivre le travail en profondeur sur la composition de l'arôme du café si on ne dispose pas de méthodes très scientifiques pour apprécier les caractères organoleptiques. Il est tout aussi indispensable de posséder ces méthodes que d'avoir des méthodes de chimie analytique.



EFFECTS OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF COFFEE AND CAFFEINE IN RATS

B. F. DAUBERT
Technical Center, General Foods Corporation, White Plains

Two year chronic toxicity studies were conducted in rats administered diets containing soluble coffee, decaffeinated coffees, brewed coffee beverages and caffeine. The instant coffee dietary levels ranged from 0.5 to 5.0 % and the equivalent caffeine levels from 0 to 0.177 %.

Rats which consumed regular and decaffeinated coffee beverage as the sole fluid intake for two years demonstrated no adverse growth responses. Growth was impaired by diets containing the highest soluble coffee solids and equivalent caffeine levels only during the initial weeks of study. Intermediate dietary levels of caffeine, alone or as coffee components stimulated growth, food consumption and food efficiency. Low dietary levels of instant coffee e. g. 0.5 % were without effect on growth factors. Mortality was increased between the 12th and 18th months by caffeine levels at or exceeding 0.083 % of the diet.

The highest dietary level of soluble coffee solids induced liver and kidney weight increases after 43 days administration. Both coffee and its caffeine component exert an influence on liver and kidney weight although the caffeine effect was greater.

Histopathological lesions were limited to the liver and kidney only in those terminal rats which were maintained at the high caffeine level.

The severity of chronic nephritic lesions, common to aged rats, was linearly related to the dietary concentration of caffeine.

Effets chez les rats d'une administration de longue durée de café et de caféine

Des études de toxicité chronique furent poursuivies pendant deux ans sur des rats qui recevaient une alimentation contenant du café soluble, du café décaféiné, du café boisson et de la caféine.

La ration comportant du café soluble en contenait 0,5 à 5,0 % et les taux équivalents de caféine étaient 0 à 0,177 %. Les rats qui absorbèrent du café normal et du café décaféiné comme seule boisson pendant deux ans eurent une croissance normale. La croissance fut entravée pendant les premières semaines par les rations contenant les plus fortes doses de café instantané solide et celles contenant le taux équivalent de caféine.

Les rations comportant des taux intermédiaires de caféine, seule ou en tant que composant du café, stimulent la croissance, la prise de nourriture et l'assimilation. Les faibles doses de café instantané (0,5 %) n'eurent pas d'effet sur les facteurs de croissance. La mortalité était accrue, entre les douzième et dix-huitième mois, par une dose de caféine de 0,083 % et plus dans la ration.

Les rations contenant les taux les plus élevés de café instantané solide provoquèrent au bout de 43 jours une augmentation du poids du foie et des reins. Le café et la caféine exercent une influence sur le poids du foie et sur celui des reins ; celle de la caféine est plus grande.

On a constaté des lésions histopathologiques limitées au foie et aux reins chez les rats ayant reçu la plus forte dose de caféine pendant toute l'expérience.

La gravité des lésions dues à une néphrite chronique, fréquente chez les rats âgés, était liée de façon linéaire à la concentration en caféine de l'alimentation.

N. B. : le texte de l'exposé n'est pas parvenu en temps voulu pour être inclus dans la publication.

Die Wirkung einer Verabreichung von langer Dauer von Kaffee und Coffein bei Ratten

Untersuchung über chronische Toxizität wurden während zwei Jahre bei Ratten durchgeführt deren Nahrung löslichen Kaffee, coffeinfreien Kaffee, Kaffee-Aufgüsse und Coffein enthielt.

Die Ration mit löslichem Kaffee enthielt 0,5 bis 5 % eines derartigen Kaffees und der entsprechende Gehalt an Coffein betrug zwischen 0 und 0,177 %. Die Ratten, die während der zwei Jahre normalen und coffeinfreien Kaffee als einziges Getränk aufnahmen, verzeichneten einen normalen Wuchs. Während der ersten Wochen wurde das Wachstum durch die Rationen mit den stärksten Gaben an löslichem Kaffee und durch jene, die einen entsprechenden Gehalt an Coffein verzeichneten gehemmt.

Die Rationen mit einem mittleren Gehalt an reinem oder in Kaffee enthaltenem Coffein fördern das Wachstum, die Ernährung und die Assimilation. Die geringen Gaben löslichen Kaffees (0,5 %) hatten keine Auswirkung auf die Wachstumfaktoren. Eine Gabe von 0,083 % Coffein und darüber erhöhte die Sterblichkeit zwischen dem zwölften und dem achtzehnten Monat.

Die Rationen welche die grössten Prozentsätze an löslichem Kaffee enthielten bewirkten nach 43 Tagen eine Gewichtserhöhung der Leber und der Nieren. Kaffee und Coffein haben einen Einfluss auf das Gewicht der Leber und der Nieren ; jener des Coffeins ist grösser.

Bei den Ratten welche die stärksten Coffeingaben während der ganzen Versuchsperiode verabreicht bekamen wurden histopathologische auf Leber und Nieren beschränkte Schädigungen festgestellt.

Die Gefährlichkeit der durch eine bei älteren Ratten häufig vorkommenden chronischen Nierenentzündung bewirkten Schädigungen stand linear in Zusammenhang mit der Coffeinkonzentration der Ernährung.

DISCUSSION

M. RÖHRBORN : Es erscheint mir nützlich von den Ratten, die Sie 2 Jahre lang behandelt haben, die Teste aufzuarbeiten und eine Chromosomenanalyse zu machen, um das Auftreten von Chromosomenobservationen zu prüfen.

M. DAUBERT : We may do have one in our files.

M. KENSLER : With the respect to your increased body weight of the intermediate group and to your decrease in body weight in the high group, have you any information on the ratio percentage of fatty tissues in these two groups ?

M. DAUBERT : I think we do, but I do not have it here.

M. MALORNY : Ich hätte gern etwas näheres erfahren über den Wassergehalt der Gewebe. Es ist bekannt, dass Coffein den Wassergehalt von Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration ändert, bei sehr niedrigen Konzentrationen kommt es eher zu einem Wasserverlust der Zellen, das würde die eine Phase der Coffeinwirkung. Bei hohen Konzentrationen beobachtet man Schwellungen und diese Schwellungen sind eben Ausdruck einer Zunahme von Wasser. Ich weiss nicht ob da der Wassergehalt der einzelnen Organe bestimmt wurde.

M. DAUBERT : I do not think that we have determined the water content ; this is I think very well known too. I have no information on that water content.

M. AMMON : Die weissen Maüsen, die über 6 Wochen eine Coffeinlösung an Stelle von Trinkwasser erhielten (tägl. Coffeindosis 150 mg/kg) waren Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme, während der ersten 3 Wochen, geringer als bei den Kontrollen.

Die Dosis von 75 mg/kg hatte keinen Einfluss.

INFLUENCE OF THE ROASTING DEGREE ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF COFFEE

L. A. FOBÉ, J. P. NERY, J. S. TANGO
Tropical Centre for Food Research and Technology, Campinas

INTRODUCTION

In the available literature on the chemistry of coffee, few experimental works could be found on variations occuring in the different components of coffee when submitted to different roasting intensity of known values.

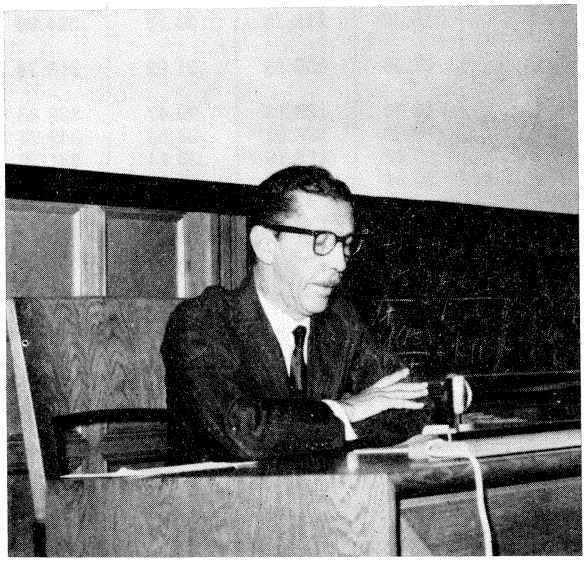
We find usually chemical analytical data on roasted coffee, whithout any reference to the most important, « the roasting degree » expressed in terms of loss by weight correlated to raw coffee. Clear roasting — dark roasting — or others are normally used that are of no value to differentiate the different samples.

On this specific work we have tried to study the modifications occuring in some components of the raw coffee when submitted to different roasting degrees (expressed in loss by weight for 100 g of green coffee), looking principally for the obtention of data of interest for the industry of instant coffee.

Being the loss by weight by roasting the only connecting point between raw and roasted samples, the authors recommend that, in research work, the loss would be always expressed or, if possible, fixed, to serve as an objective specification of the roasted sample.

The authors expect to study in the future in complement to this first work, the variation in other components of coffee such as : trigonelline, chlorogenic acid, caffeic acid, caffetannic acid, etc.

J. P. NERY



MATERIAL AND METHODS

The raw material, used for this work, was of the *Coffea arabica* species, harvest 66/67, given by the « Cooperativa dos Cafeicultores da Região de Campinas », located in Campinas, State of São Paulo, Brazil. The beans were sun dried and decorticated, giving the following commercial specifications :

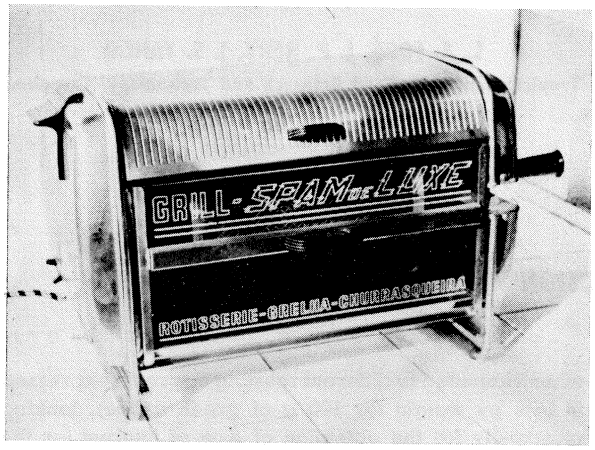
Type	Santos 2/3
Sieve	17/18
Beverage	soft
Roasting	good
Colour	green

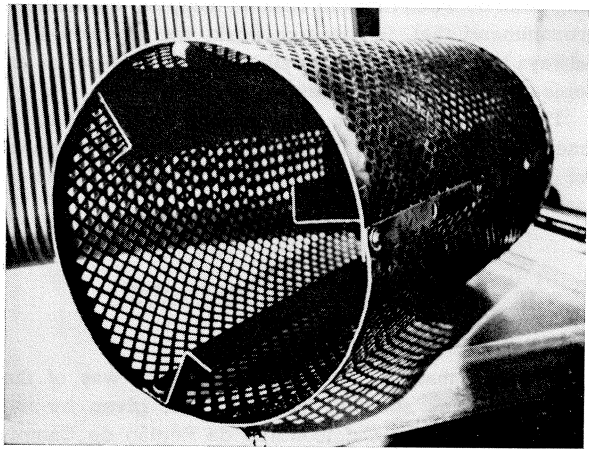
This coffee presented the following chemical composition :

TABLE I

Moisture	11.50 %
Soluble solids	28.45 %
Total sugars (glucose)	5.45 %
Caffeine	1.26 %
Protein (N × 6.25)	12.28 %
Ether extract	14.79 %

The samples where roasted in a meat grill « Grill SPAM de Luxe » (Sociedade Paulista de Artefatos Metalúrgicos S.A., São Paulo, Brazil), mounted with a perforated rotatif cylinder adequate for roasting seeds and grains, with a total capacity of 1.000 g per sample.





To obtain a sufficient sample for all the analytical determinations, we have used 800 g of green coffee beans for each roasting. In the centre of the empty roaster the temperature was at a range from about 230° C and the rotation of the charged cylinder with green coffee was about 7 r. p. m.. It was not possible to take the temperature inside the perforated cylinder, this one being completely closed.

The figure n° 1 gives an idea of the roasting curve with the grill mentioned before.

After roasting we have determined on the cold roasted coffee, in relation to the raw coffee : the loss by weight — the volume increase — the weight in hectolitres and the volume in 100 kg. This could be appreciated in the table II.

The samples were ground in a Brazilian made laboratory mill (Rod-Bel S. A., São Paulo, Brazil) fixed for medium granulation, and passing through a 30 mesh sieve. The ground coffee after passing through the sieve was kept in plastic bags for immediate analyses.

TABLE II

Some characteristics of the coffee

	Loss in weight %	Increase of volume	Hectolitric weight kg	Volume 100 kg LTs
A - 1	9.87	10.54	59.22	168.86
2	9.87	17.02	55.94	178.76
3	10.12	20.76	54.21	184.47
4	10.50	19.89	54.60	183.15
Mean	10.09	17.05	55.99	178.81
B - 1	11.62	21.79	53.75	186.05
2	12.12	43.91	45.49	219.83
3	12.12	34.51	48.67	205.47
4	12.37	33.19	49.15	203.46
Mean	12.06	33.35	49.26	203.70
C - 1	13.62	82.91	35.79	279.41
2	14.00	57.63	41.53	240.79
3	14.37	58.89	41.20	242.72
4	14.50	83.52	35.67	280.35
Mean	14.12	70.74	38.55	260.82
D - 1	15.75	98.55	32.97	303.31
2	16.75	89.64	34.52	289.69
3	16.45	97.47	33.15	301.66
4	16.45	101.67	32.46	308.07
Mean	16.22	96.83	33.27	300.68
E - 1	17.50	97.30	33.18	301.39
2	17.62	98.25	33.02	302.85
3	18.31	113.23	30.70	325.73
4	18.37	112.75	30.77	324.99
Mean	17.95	105.38	31.92	313.74
F - 1	19.50	122.13	29.47	339.33
2	19.62	128.97	28.59	349.77
3	20.18	117.19	30.14	331.78
4	20.31	134.47	27.92	358.17
Mean	19.90	125.69	29.03	344.76
Green coffee	—	—	65.46	152.76

Fig. 1. — *Roasting curve of green coffee beans*

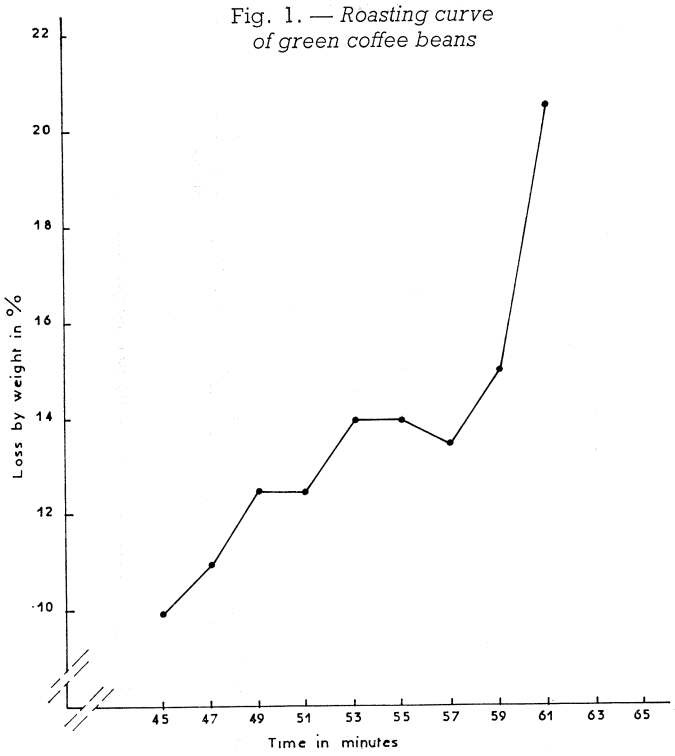
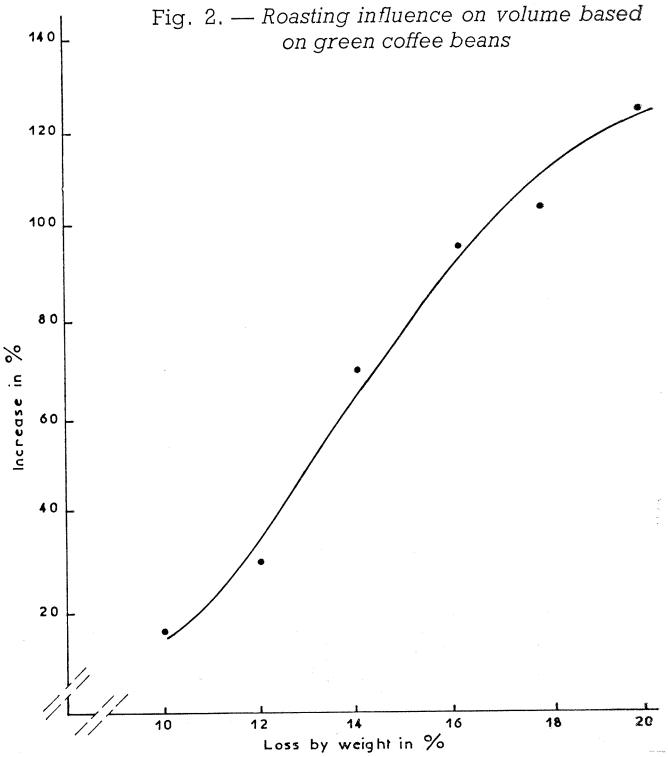


Fig. 2. — *Roasting influence on volume based on green coffee beans*



By this way, we have obtained, twenty-four samples distributed in six groups of four samples each, denominated by the letters A-B-C-D-E-F, with respectively, the following loss of weight by roasting : 10.09 %-12.06 %-14.12 %-16.22 %-17.95 % and 19.90 %.

On the above mentioned samples and the green coffee samples the following determinations were made :

1) Moisture — A. O. A. C. method (1)
2) Soluble solids — Jakober and Staub method (3)
3) Total sugars — A. O. A. C. method (1)
4) Caffeine — Ishler, Finucane and Borker method (2)
5) Protein — A. O. A. C. method (1)
6) Ether extract — W. Stoldt and M. Weibull method (6)

To complete the present work, the following determinations were made on the oil of the green and roasted coffee samples : the fatty acids — the free fatty acids — the unsaponifiable matter and the peroxide number.

RESULTS

The data obtained can be appreciated in the tables III-IV-V and correspondent graphics n° 3 up to 8.

Based on the obtained means, the occuring variations were the following :

On the roasted coffee

The maximum content of **moisture** (4.34 %) occurs in the A sample and the minimum (1.78 %) in the E sample.

With the **soluble solids** the maximum content (24.38 %) occurs in the A sample and the minimum (21.40 %) in the E sample.

In relation to the **total sugars**, the maximum content occurs (7.75 %) in the A sample and the minimum (3.27 %) in the D sample.

The maximum content (1.39 %) of **caffeine** was observed in the A sample with a minimum of (1.25 %) in the F sample.

With the **protein** the maximum content (13.22 %) was observed in the F sample, when the minimum (12.86 %) was found in the A sample.

In relation to the **ether extract**, we obtain a maximum of 18.16 % in the F sample and a minimum of 15.70 % in the A sample.

With the **weight in hectolitre**, a maximum of 55.99 kg was obtained in the A sample and a minimum of 29.03 kg

TABLE III

Chemical composition of the roasted coffee and increase or decrease of its components in relation to the raw coffee

Sample	Loss in weigth on roasting %	Moisture %	Increase or decrease %	Soluble solids %	Increase or decrease %	Total sugars %	Increase or decrease %	Caffeine %	Increase or decrease %	Protein %	Increase or decrease %	Ether extract %	Increase or decrease %
A - 1 ...	9.87	4.59	— 64.03	24.95	— 20.99	8.69	+ 43.64	1.51	+ 7.86	12.86	— 5.65	15.27	— 7.00
A - 2 ...	9.87	4.12	— 67.71	24.09	— 23.72	8.65	+ 42.98	1.45	+ 3.58	13.04	— 4.33	15.62	— 4.87
A - 3 ...	10.12	4.70	— 63.28	24.42	— 22.87	7.52	+ 23.89	1.43	+ 2.14	12.68	— 7.24	15.77	— 4.19
A - 4 ...	10.50	3.96	— 69.18	24.07	— 24.26	6.14	+ 0.82	1.19	— 15.60	12.86	— 6.27	16.16	— 2.18
Mean ..	10.09	4.34	— 66.05	24.38	— 22.96	7.75	+ 27.83	1.39	— 0.53	12.86	— 5.87	15.70	— 4.56
B - 1 ...	11.62	3.25	— 75.02	24.02	— 25.36	6.79	+ 10.23	1.19	— 16.78	12.68	— 8.71	16.51	— 1.32
B - 2 ...	12.12	3.90	— 70.21	23.38	— 27.79	5.96	— 3.87	1.46	+ 2.10	13.04	— 6.66	16.93	+ 0.59
B - 3 ...	12.12	3.19	— 75.63	23.34	— 27.92	5.89	— 5.00	1.42	— 0.70	13.04	— 6.66	16.40	— 2.55
B - 4 ...	12.37	3.53	— 73.09	22.88	— 29.51	6.95	+ 11.74	1.45	+ 0.70	13.04	— 6.92	16.86	— 0.12
Mean ..	12.06	3.47	— 73.49	23.40	— 27.64	6.40	+ 3.27	1.38	— 3.66	12.95	— 7.24	16.67	— 0.85
C - 1 ...	13.62	3.37	— 74.70	22.32	— 32.26	4.86	— 22.98	1.32	— 9.59	13.04	— 8.30	17.27	+ 0.82
C - 2 ...	14.00	3.17	— 76.29	22.04	— 33.39	4.76	— 24.92	1.30	— 11.56	13.16	— 7.87	17.11	— 0.52
C - 3 ...	14.37	3.28	— 75.58	22.21	— 33.16	3.46	— 45.68	1.28	— 12.93	12.86	— 10.32	17.08	— 1.10
C - 4 ...	14.50	3.36	— 75.02	23.20	— 30.31	3.49	— 45.30	1.26	— 14.29	13.04	— 9.26	17.18	— 0.69
Mean ..	14.12	3.29	— 75.40	22.44	— 32.28	4.14	— 34.72	1.29	— 12.09	13.02	— 8.93	17.16	— 0.38
D - 1 ...	15.75	1.91	— 86.01	23.43	— 30.62	3.45	— 46.92	1.27	— 15.33	12.86	— 11.80	17.09	— 2.68
D - 2 ...	16.25	2.28	— 83.39	22.37	— 34.15	3.18	— 51.15	1.29	— 14.00	13.40	— 8.59	17.18	— 2.72
D - 3 ...	16.45	2.08	— 84.89	23.27	— 31.66	3.23	— 50.46	1.34	— 11.26	13.04	— 11.29	17.17	— 2.99
D - 4 ...	16.45	2.52	— 81.70	23.51	— 30.95	3.23	— 50.46	1.34	— 11.26	13.04	— 11.29	16.61	— 6.16
Mean ..	16.22	2.20	— 84.00	23.14	— 31.84	3.27	— 49.75	1.31	— 12.96	13.08	— 10.74	17.01	— 3.64
E - 1 ...	17.50	1.44	— 89.67	20.60	— 40.26	3.14	— 52.50	1.33	— 13.07	13.04	— 12.37	17.06	— 4.85
E - 2 ...	17.62	1.63	— 88.32	21.14	— 38.80	3.11	— 53.02	1.29	— 13.99	13.16	— 11.74	17.41	— 3.06
E - 3 ...	18.31	2.51	— 82.17	21.40	— 38.54	3.58	— 46.33	1.29	— 16.23	12.86	— 14.44	17.71	— 2.15
E - 4 ...	18.37	1.56	— 88.93	22.48	— 35.49	3.64	— 45.51	1.25	— 18.83	13.16	— 12.50	17.75	— 2.04
Mean ..	17.95	1.78	— 87.27	21.40	— 38.27	3.37	— 49.34	1.29	— 15.53	13.05	— 12.76	17.48	— 3.02
F - 1 ...	19.50	1.97	— 86.20	22.74	— 35.64	3.45	— 49.04	1.31	— 16.03	13.16	— 13.70	17.80	— 3.10
F - 2 ...	19.62	1.80	— 87.42	23.25	— 34.30	3.67	— 45.87	1.27	— 19.11	13.16	— 13.87	18.14	— 1.41
F - 3 ...	20.18	1.94	— 86.54	23.31	— 34.62	3.44	— 49.63	1.24	— 21.52	12.86	— 16.44	18.30	— 1.24
F - 4 ...	20.31	2.40	— 83.37	23.37	— 34.54	3.23	— 52.78	1.18	— 25.32	13.71	— 11.03	18.40	— 0.86
Mean ..	19.90	2.03	— 85.88	23.17	— 34.77	3.45	— 49.33	1.25	— 20.49	13.22	— 13.76	18.16	— 1.65

TABLE IV

Coffee oil composition (in %)

Fatty acids	Green	A	B	C	D	E	F
Myristic	0.14	0.09	0.09	0.08	0.10	0.11	0.11
Palmitic	35.47	36.67	36.47	36.81	35.43	36.72	34.82
Stearic	8.31	7.98	7.87	7.87	7.83	7.55	8.40
Oleic	9.35	8.75	8.78	8.85	9.18	8.55	9.13
Linoleic	41.88	42.40	42.58	41.72	41.96	42.06	42.65
Arachidic ..	3.04	2.28	2.42	2.84	3.29	2.93	3.03
Linolenic ...	1.64	1.35	1.42	1.54	1.91	1.75	1.56
Behenic	0.17	0.45	0.36	0.35	0.28	0.33	0.28

TABLE V

	Free fatty acids	Unsaponifiable matter	Peroxide number
A - 1	1.37	11.45	0
2	1.21	11.01	0
3	1.42	10.35	0
4	1.56	10.26	0
Mean	1.39	10.77	0
B - 1	1.24	10.53	0
2	1.58	10.93	0
3	1.44	10.33	0
4	1.40	10.20	0
Mean	1.42	10.50	0
C - 1	1.82	9.93	0
2	1.59	11.06	0
3	2.60	10.71	0
4	1.72	10.43	0
Mean	1.94	10.28	0
D - 1	2.77	10.07	0
2	2.24	9.72	0
3	2.10	9.71	0
4	2.30	9.37	0
Mean	2.35	9.72	0
E - 1	3.32	9.25	0
2	2.56	9.45	0
3	2.77	8.95	0
4	3.02	9.34	0
Mean	2.92	9.25	0
F - 1	3.00	9.59	0
2	2.99	9.51	0
3	2.76	9.17	0
4	3.47	9.20	0
Mean	3.06	9.37	0
Green coffee	1.11	11.00	3.32

in the F sample, against 65.45 kg for the green coffee beans.

About the **volume of 100 kg** of roasted coffee, the maximum of 344.76 litres was obtained in the F sample and a minimum of 178.81 litres in the A sample against 152.76 litres for the green coffee beans.

In relation to the **free fatty acids** the maximum oil content (3.06 %) was observed in the F sample, and the minimum (1.39 %) in the A sample, the green coffee sample showing a value of 1.11 % of the acids.

As far as the **unsaponifiable matter** is concerned, the maximum of 10.77 % on the oil in the A sample and a minimum of 9.25 % on the oil in the E sample, the green coffee sample showed a value of 11.00 %.

Concerning the peroxide value from the oil of the roasted samples a 0 (zero) was obtained, while for the oil of the green coffee the value of 3.92 was registered.

In relation to the **fatty acids** of the oil, predominence of the linoleic acid was held against all the other acids, following by the palmitic acid, being the myristic acid found in less quantity.

In relation to the green coffee

The **loss in weight** by roasting was respectively of 10.09 %-12.06 %-14.12 %-16.22 %-17.95 % and 19.90 % in the samples A-B-C-D-E and F.

The **increase of volume** showed the maximum (125.69 %) in the F sample and the minimum in the A sample (17.05 %).

The maximum loss of **moisture** (87.27 %) was obtained with the E sample when the minimum loss was obtained with the A sample (66.05 %).

In relation to the **soluble solids**, the maximum of loss (38.27 %) was found in the E sample, when the minimum loss was met in the A sample (22.96 %).

With the **total sugars**, the maximum increase was observed in the A sample (27.83 %) and the minimum increase (3.27 %) was found in the B sample, when the maximum loss (49.75 %) appears in the D sample and the minimum (34.72 %) in the C sample.

Concerning the **caffeine**, the maximum loss (20.49 %) occurs in the F sample and the minimum in the A sample (0.53 %).

The **protein** had its maximum loss (13.76 %) in the F sample and the minimum in the A sample (5.87 %).

Finally in relation to the **ether extract**, the maximum loss was observed in the A sample (4.56 %) and the minimum in the C sample (0.38 %).

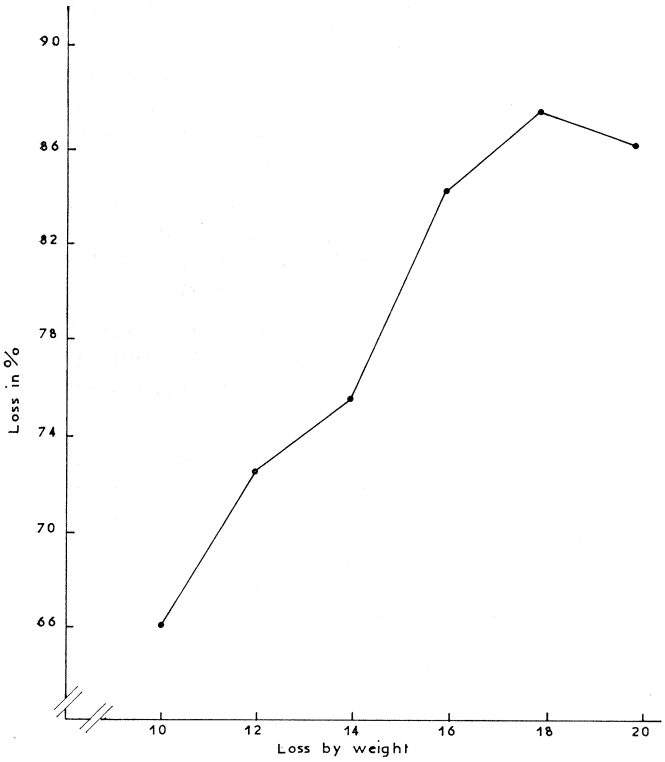


Fig. 3. — *Moisture content of roasted coffee beans*

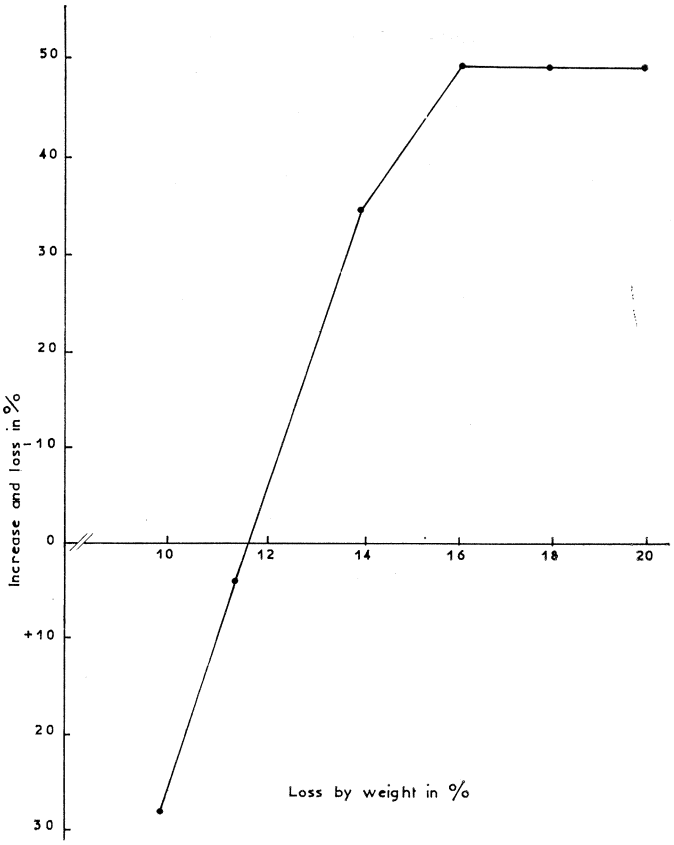
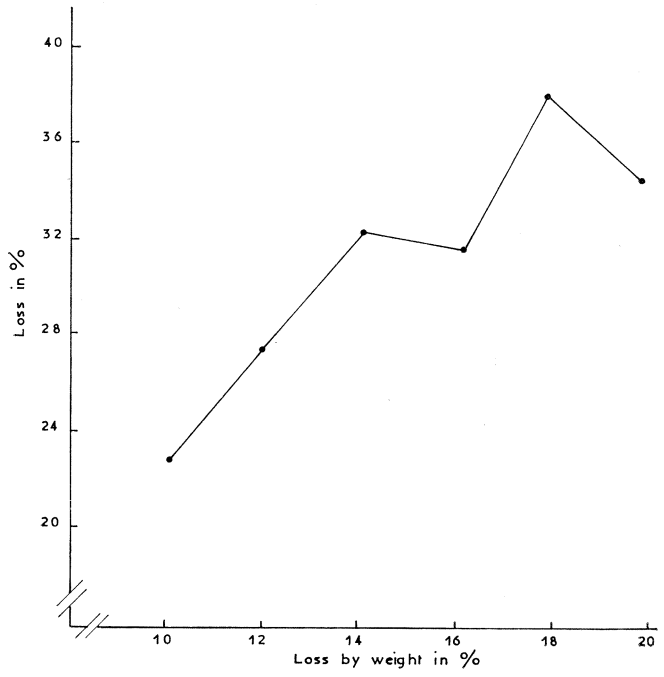


Fig. 5. — *Total sugar content of roasted coffee beans*

Fig. 4. — *Total soluble solid content of roasted coffee beans*

Fig. 6. — *Caffeine content of roasted coffee beans*



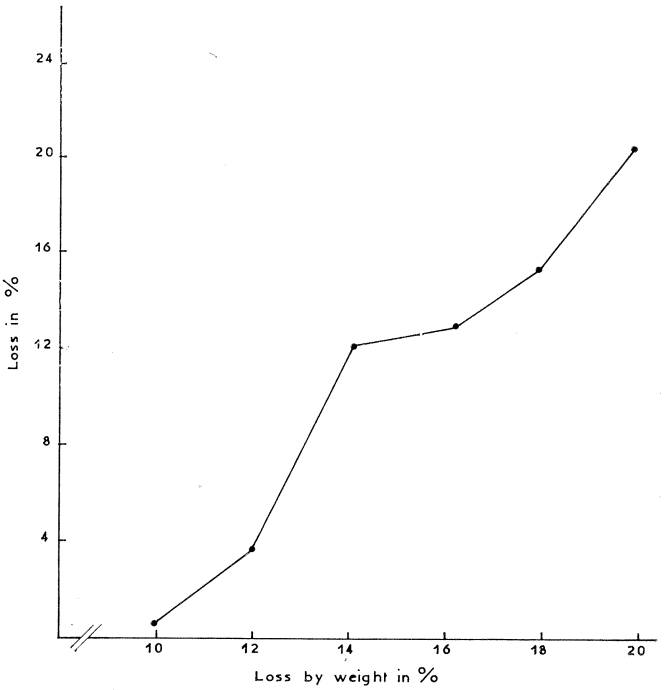


Fig. 7. — *Proteine content of roasted beans*

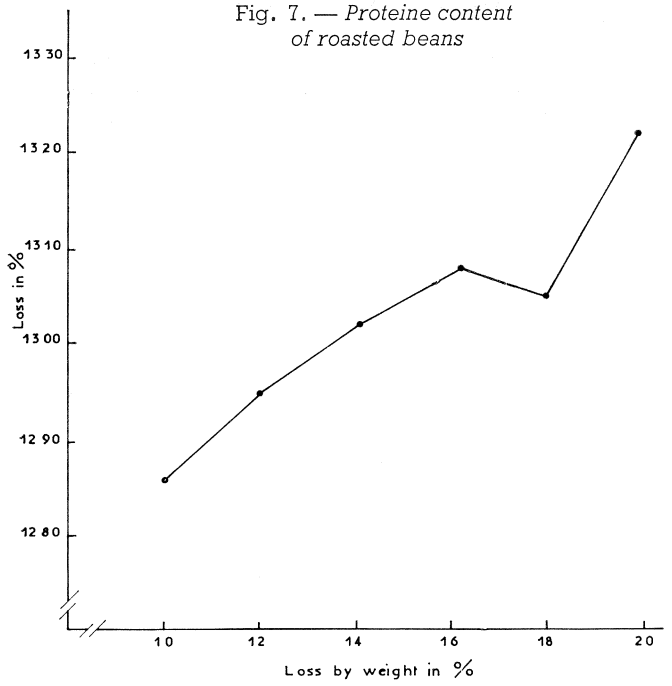
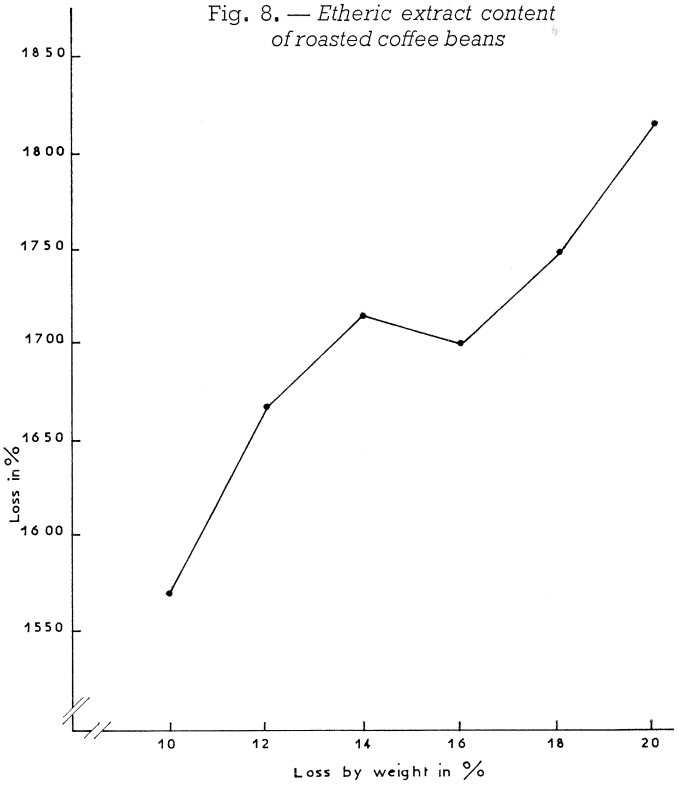


Fig. 8. — *Etheric extract content of roasted coffee beans*



CONCLUSIONS

The examination of the figures n° 3 to 8, showed :

1. Considering in one time all the components under study all the components had a proportional loss related to the intensity of roasting, with one exception for the **total sugars** that increased in the A sample (10.09 %) and in the B sample (12.06 %) being this increase in the range of 27.83 % for the A sample and 3.27 % for the B sample in relation to the green coffee.

2. The loss of **moisture** was practically gradual, until a maximum of 87.27 % of the occuring moisture of the green coffee.

3. The loss of the **soluble solids** was also practically gradual, until a maximum of 38.27 % of the existent contents on the original material.

4. The loss of **caffeine** was gradual, obtaining a maximum of 20.49 % of the existent content of caffeine on the green coffee.

5. The loss of **protein** was directly proportional to the intensity of roasting, with a maximum of 13.76 % of the existent protein in the raw coffee.

6. The loss of the components of the **ether extract** was small, with few variations, obtaining a maximum of 4.56 % of ether extract existent in the raw coffee.

7. Based on the statistical interpretation, we have observed the following correlations, on the roasted samples :

TABLE VI

Correlations

Correlation	r =
Total sugar × Caffeine	0,62**
— × Ether extract	— 0,81**
Soluble solids × Total sugar	0,64**
— × Ether extract	— 0,53**
Ether extract × Caffeine	— 0,57**

(**) P = 0,01.

a. Highly significant correlation (r = 0.64) between soluble solids and total sugars.

b. Highly negative significant correlation (r = 0.53) between soluble solids and ether extract.

c. Highly significant correlation (r = 0.62) between total sugars and caffeine.

d. Highly negative significant correlation (r = — 0.81) between total sugars and ether extract.

e. Highly negative significant correlation (r = — 0.57) between caffeine and ether extract.

8. A gradual increase was observed in the free **fatty acids** of the oil, from 1.39 % for the A sample to 3.06 % in the F sample, against 1.11 % in the green coffee oil.

In relation to the **unsaponifiable matter**, a little loss from the A sample (10.77 %) to the E sample (9.25 %). In the green coffee oil the value was of 11.00 %.

For the **peroxide number** we have obtained for the green coffee oil a value of 3.32 and 0 (zero) value for the roasted coffee oil samples.

The **fatty acids** of the oil, in general were not affected by the roasting degree.

9. In relation to the instant coffee industry, the lower the roasting degree the higher the yield would be, being this conditioned by the colour required by the market.

REFERENCES

1. Association of Official Agricultural Chemist. Official Methods of Analysis, 10 th ed. Washington D. C.
2. ISHLER N. H., FINUCANE T. P. and BORKER E. — Rapid spectrophotometric determination of caffeine. *Anal. Chem.*, 20 : 1162 (1948).
3. JAKOBER and STAUB, 1963. — Method suggested by the Association Scientifique Internationale du Café (1966).
4. LOCKHART E. E. — Chemistry of Coffee. Publication nº 25, 1957. The Coffee Brewing Institute, Inc., New York, N. Y.
5. MERRIT, M. C., PROCTOR, B. E. — Effect of temperature during the roasting cycle on selected components of different types of whole bean coffee. *Food Research*, 24 (6) : 672-678, 1959.
6. STOLDT, W. — *Dtsch Lebensmittel — Rdsch*, 45, 41 (1949).
7. JACOBS, M. B. — The Chemical Analysis of Foods and Food Products. 3e ed. September 1965.

FOBÉ (L. A.), NERY (J. P.), TANGO (J. S.). — **Influence du degré de torréfaction sur la composition chimique du café torréfié.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 389-397, fig,. tabl., réf.

L'effet causé par la torréfaction sur certains éléments du grain de café vert type Santos a été étudié. Entre autres, les teneurs en caféine, sucres totaux, solides solubles totaux, graisse et protéines.

Six niveaux différents de torréfaction, basés sur la perte de poids en pour cent, ont été considérés. Ces degrés sont : 10, 12, 14, 16, 18 et 20 % de perte par rapport au café vert. Les différentes augmentations de volumes provoquées par la torréfaction ont également été observées.

La caféine et les protéines diminuent avec l'augmentation de la torréfaction.

Les sucres totaux augmentent initialement puis diminuent jusqu'au niveau de 16 % et atteignent ensuite une concentration constante.

Les solides totaux solubles diminuent progressivement, présentent une étape intermédiaire au niveau de 14 %, puis augmentent finalement au dernier stade.

Les graisses présentent une forte augmentation dans tous les traitements appliqués.

FOBÉ (L. A.), NERY (J. P.), TANGO (J. S.). — **Influence of the roasting degree on the chemical composition of coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 389-397, fig., tabl., réf.

A study has been made of the effects of roasting on certain constituents of the raw beans of Santos coffee ; among others, the contents in caffeine, total sugars, total soluble solids, fats and proteins.

The experiment included six different degrees of roast, based on percentage loss in weight ; these were 10, 12, 14, 16, 18 and 20 % loss in weight in relation to the raw coffee. The various increases in volume caused by roasting were also noted.

Caffeine and protein become less with increased roasting.

The total sugars first of all increase, then diminish up to the 16 % level and afterwards reach a constant concentration.

The total soluble solids progressively diminish, reach an intermediate stage at 14 %, then finish up by increasing up till the last stage.

The fats show a considerable increase for all the degrees of roast employed.

FOBÉ (L. A.), NERY (J. P.), TANGO (J. S.). — **Einfluss des Röstgrads auf die chemische Zusammensetzung des Röstkaffees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 389-397, fig. tabl., réf.

Es wurde die Wirkung der Röstung auf gewisse Grundstoffe der rohen Kaffeebohnen der Art Santos und ganz besonders der Gehalt an Coffein, Gesamtzucker, löslichen Gesamtfeststoffen, Fett- und Eisweisstoffen untersucht.

Sechs verschiedene Röstgrade, die auf einem Gewichtsverlust von je 12, 14, 16, 18 und 20 Prozent im Vergleich zum Rohkaffee beruhen, wurden berücksichtigt. Die verschiedenen durch die Röstung hervorgerufenen Umfangszunahmen wurden ebenfalls geprüft.

Coffein und Eiweisstoffe nehmen bei steigender Röstung ab.

Der Gesamtzucker nimmt zuerst zu, geht sodann bis an 16 % zurück und erreicht schliesslich einen konstanten Gehalt

Die löslichen Gesamtfeststoffe nehmen fortschreitend ab, erreichen eine Zwischenstufe bei 14 % und nehmen schliesslich im letzten Stadium zu.

Die Fettstoffe weisen eine starke Erhöhung bei allen angewandten Verfahren auf.

DISCUSSION

M. SOLÉ : When you say that the fatty acids (oil) of coffee do not change with roasting, do you refer to the distribution of fatty acids or to the total content of oil ?

M. NERY : There is no variation in the fatty acids considered one by one, and the oil content is not affected by roasting.

M. NAVELLIER : Les auteurs ont-ils considéré les variations du taux de cendres au cours de la torréfaction et ont-ils rapporté leurs résultats à la matière sèche du café mis en œuvre ?

M. NERY : We did not determine the ashes in this experiment and the data that we obtained were calculated on the raw coffee as we wanted to know the variation in relation to the green coffee.

A REPORT BY THE WORKING GROUP ON THE WET-PROCESSING OF COFFEE

A. E. WOOTTON
East African Industrial Research Organization, Nairobi

At a meeting of the Third Commission (Chemistry and Technology) of the International Scientific Coffee Association held at the second Chemistry of Coffee Conference, Paris, May, 1965, a working-group was formed to pursue research into the wet-processing of coffee.

An experimental programme was finally approved by the participating countries by March, 1966 and was distributed for application to the coffees produced during the ensuing year.

The object of the programme was to compare at least five wet-processing procedures applied to a variety of coffees at about the same time in order to discover whether or not the conclusions reached earlier in East Africa (1) are of universal application. The processed coffees were to be evaluated by the normal subjective liquoring procedures in the country of origin, in East Africa and elsewhere if at all possible.

All told, the five participating countries carried out 28 separate experiments producing 159 samples. The quality evaluations of the samples have involved some difficulty. Unfortunately, only two countries were able to liquor their own samples, although they also forwarded all samples to Nairobi. As a result very many more samples were despatched to Nairobi than could be dealt with conveniently. Instead of the originally anticipated maximum of 30 samples, all 159 arrived in Nairobi most of them some time after the original, rather optimistic, deadline of 28th February, 1967.

Two opinions were considered desirable for each sample thus requiring a total of 318 liquorings. Some of these were still to be received at the time of writing the report.

EXPERIMENTAL

Each experiment involved the sub-division of a homogeneous bulk of pulped coffee for the following treatments :

A. Mucilage first removed by 0.1 N sodium hydroxide and :

1. Sun-dried,
2. Soaked under distilled water for 24 hours ; sun-dried,
3. Soaked under 0.5 % w/v sodium metabisulphite ; sun-dried.

B. Mucilage first removed by a standard « dry » fermentation (fermentation in the wet state but with free drainage of surplus liquor allowed for) and :

4. Sun-dried,
5. Washed ; soaked under distilled water for 24 hours ; sun-dried.

C. Any other treatment normally employed and which might be included as a control procedure.

Between two and six experiments were required.

RESULTS

TABLE 1

Experiments conducted and samples prepared by each country

Country	Experiments	Samples
A	2	14
B	4	21
C	13	74
D	5	30
E	4	20
Totals	28	159

The countries that participated in the programme were Angola, Colombia, French Cameroons, Kenya and Tanzania.

Table 1 lists the details of experiments and samples attributable to the five coffee-producing countries.

Quality evaluations have been sought from four liquoring centres, two of which are based in Nairobi.

One of the Nairobi liquorers (L.1) reports an overall quality, being a summation of raw appearance, roast appearance and liquor flavour and which is expressed in terms of a standard, with standard one as the most desirable. Table 2a lists the standards awarded to samples from many of the experiments from countries B, C, D and E. For the sake of simplicity a « plus » and « minus » notation normally employed to qualify the standards has been replaced by grading the final quality into thirds of standards, a procedure which allows means to be calculated. Numerical values have been ascribed to the final liquor flavours for the samples from countries B, D and E and these are listed in table 2b ; as for the standards, the smaller the number the more desirable the liquor.

TABLE 2a

Standards awarded by liquorer L.1 for experiments carried out in countries B, C, D and E

Country	Expt.	Standard — Treatment A1	A2	A3	B4	B5	C
B	1	5	3	2	3	2	—
	2	6	5	5	7	5	6
	3	7	5	5	8	5	—
	4	7	7	6	8	6	—
	Mean	6.3	5.0	4.5	6.5	4.5	—
C (High altitude)	1	6	5 2/3	5 2/3	6	5	—
	2	6	5 2/3	5 2/3	6	5 2/3	—
	3	6	5 2/3	5 2/3	6	5 2/3	—
	Mean	6	5.7	5.7	6	5.4	—
C (Low altitude)	4	6	6	6	6 1/3	6	—
	5	6	5 2/3	5 1/3	5 2/3	5 2/3	—
	6	5 2/3	5 2/3	4 2/3	—	5 1/3	—
	Mean	5.9	5.8	5.3	—	5.7	—
D (repeat liquorings on expts. 1, 2 and 3)	1	4 1/3	4	4	4	4	—
		7	7	6	7	6	—
	2	6 2/3	6	5	6 1/3	5 2/3	—
		5 1/3	4 2/3	5	5	4 2/3	
	3	6	5 2/3	5	5 2/3	5 2/3	—
		6	5	4 2/3	5	5	—
	4	6	5 2/3	5 2/3	6	5 2/3	
	Mean	5.9	5.4	5.1	5.6	5.2	—
E	1	6	5	3	5 2/3	5	5 2/3
	2	6	5 1/3	5 1/3	5 2/3	4	4
	3	6	3 2/3	3 2/3	5	5	5 2/3
	4	4 1/3	3 2/3	4 1/3	5	4	3 2/3
	5	3 2/3	3 2/3	3 2/3	4 2/3	3 2/3	3 2/3
	Mean	5.4	4.3	4.0	5.2	4.3	4.5

TABLE 2b

Liquor flavours awarded by liquorer L.1 for experiments carried out in countries B, D and E

Country	Expt.	Liquor flavour — Treatment A1	A2	A3	B4	B5
B	1	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	2	7	6	6	7	7
	3	6 1/2	6 1/4	6 1/4	6 1/4	6
	4	6 1/2	7	6 1/2	7	6 1/2
	Mean	6.5	6.3	6.2	6.6	6.3
D	1	6	6	6	6	6
		6	6	6	6	6
	2	7	7	6	6 1/2	6 1/4
		6	6	6	6	6
	3	6 1/4	7	7	6 1/4	6 1/4
		6 1/4	6	6	6	6
	4	7	6 1/2	7	7	6
	Mean	6.4	6.4	6.3	6.3	6.1
E	1	7	6 1/2	5	6	6 1/4
	2	7	7	6	6 1/4	5 1/4
	3	7	5	6	6 1/4	6
	4	6	5	5	6	5 1/4
	5	5	5	6	6	5
	Mean	6.4	5.7	5.6	6.1	5.6

The other Nairobi liquoring centre (L.2) reports an overall quality which again reflects a summation of raw appearance, roast appearance and liquor flavour, ranging between « fine » and « poor », there being eight levels altogether. These categories have been transformed to numerical values, with « fine » equivalent to one, and these results are recorded in table 3a. The liquor flavours have also been expressed numerically in table 3b.

TABLE 3a

Overall quality assessments by liquorer L.2 for experiments carried out in countries B, C and D

Country	Expt.	Overall quality					
		Treatment					
		A1	A2	A3	B4	B5	C
B	2	5.0	4.5	4.5	6.0	5.0	5.5
C (High altitude)	1	5	4.5	5.5	5.5	4.5	—
	2	6	5	5	5	5.5	—
C (Low altitude)	4	6.5	6	6	6.5	6	—
	5	6	5.5	5	5.5	6	—
D	4	5.5	5.0	4.75	5.5	5.0	—
	Mean	5.7	5.1	5.1	5.7	5.3	—

TABLE 3b

Liquor flavours awarded by liquorer L.2 for experiments carried out in countries B, C and D

Country	Expt.	Liquor flavour				
		Treatment				
		A1	A2	A3	B4	B5
B	2	5.5	4.5	5.0	6.0	6.0
C (High altitude)	1	5.0	4.0	5.0	5.5	6.0
	2	6.0	5.0	6.0	5.5	5.5
C (Low altitude)	4	6.5	7.0	7.0	7.0	7.0
	5	6.0	5.5	5.0	5.5	6.0
D	4	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0
	Mean	5.7	5.1	5.4	5.8	5.9

The third liquoring centre, L.3, which is based in Europe, assesses quality in a very different way. The liquor flavour is assessed overall using a simple numerical order of preference, number one being the most preferred. Raw appearance and roast appearance are not involved at all in this evaluation. The results are reported in table 4.

TABLE 4

Liquor assessments by liquorer L.3 for experiments carried out in countries A, B, C, D and E

Country	Expt.	Liquor quality						
		Treatment						
		A1	A2	A3	B4	B5	C1	C2
A	1	4	4	3.5	3.5	3.5	4	4.5
	2	4	4.5	4	4.5	4.5	4.5	5.5
B	2	3	2.5	2.5	2.5	3	4.5	
C (High altitude)	1	5	4	5	5	5	—	—
	2	4	4.5	5	4.5	4.5	—	—
	3	5	4	4	4.5	3.5	—	—
	1*	4.5	4	3	3	5	—	—
	2*	3.5	4	3	4.5	4	—	—
	3*	4.5	4.5	3.5	3.5	2.5	—	—
C (Low altitude)	4	4.5	4	3.5	—	2	—	—
	5	5	3	4.5	4	3.5	—	—
	6	4.5	4	3.5	4.5	5	—	—
	4*	2	3.5	4	—	2.5	—	—
	5*	4.5	2.5	3	3	3.5	—	—
	6*	2.5	3	3	4	3	—	—
D	4	2.5	3.5	3.5	2	3	—	—
E	3	3.5	4	4.5	3.5	4	3	—
		3	3.5	4	3	3.5	2.5	—

* Liquored after a grading.

A second Europe-based liquoring centre, L.4, notes characteristics of raw and roast appearance, but examines in detail only the liquor. The evaluations of liquor quality from L.4 are listed in table 5.

TABLE 5

Liquor assessments by liquorer L.4 for experiments carried out in countries A, C and E

Country	Expt.	Liquor quality						
		Treatment						
		A1	A2	A3	B4	B5	C1	C2
A	1	1	1	2	3	1.5	1	3
C (High altitude)	3	1.5	2	3	4	1	—	—
C (Low altitude)	6	2	1	2.5	—	1	—	—
E	4	1	1.5	2	3	2	2	—
	5	1.5	1	2	1.5	1.5	2	—

In order to avoid the confusion that could be created by the introduction of the limited amount of quality evaluation carried out at the research stations responsible for the experiments themselves, this material has not been tabulated in this report. However, this important data will be commented upon where appropriate to the following discussion.

Much more information on the agronomic and climatic conditions forming the background to many of the experiments has been collected, in addition to pH and temperature detail noted during the course of the processing experiments. Amongst this extra data, perhaps of greatest value is the information made available by liquoring centre L.3 on raw coffee colour characteristics, roast coffee soluble extract and pH determinations, etc. A critical survey of all this material has yet to be completed.

DISCUSSION

Liquoring centre L.1

For all experiments in all countries, no treatment produced coffees with an overall quality poorer than those of A1 and B4. On average, treatment A1 resulted in coffees somewhat less desirable than B4. Thus it can be concluded that the removal of mucilage by alkali followed by an immediate sun-drying led to a relatively poor final quality, characterised in particular by an undesirable raw bean colour. The dry fermentation of coffee carried out with only a limited washing after pulping and with no intermediate washes provided only a slight improvement on the alkali-cleaned material. However, for both cases, a soaking of 24 hours duration under water led to a pronounced improvement in final quality, the dominant aspect of which was a much better raw bean colour. A further improvement was brought about by the use of 0.5 % sodium metabisulphite solution in place of water following the removal of mucilage by alkali.

In general, changes in overall quality, to which the raw appearance is of greatest importance, were supported by concomitant changes in liquor quality. The range of liquor qualities covered within any one experiment was limited, but the mean values show a distinct improvement due to a soaking following the removal of mucilage either by alkali or by a dry fermentation. A further marginal improvement can also be attributed to the use of sodium metabisulphite.

The few exceptions to the trend of these results from liquoring centre L.1 are of interest. For country C, for example, it is noticeable that the results for experiment 1 are typical of the general result ; on the other hand, the remaining experiments all produced their poorest coffees by dry fermentation. On receipt of the samples in Nairobi it was observed that the silverskin residues adhering to the coffee beans were of an unusually deep red-brown colour, an effect which is regarded as highly undesirable in East Africa and which is possibly a varietal characteristic. The liquor evaluations of experimental 1 are shown bracketed in table 2b. This is because the liquors were masked by a chemical taint ascribed to the packing material by the assessors. The samples had indeed arrived in Nairobi in polythene bags although they were transferred to paper bags in the normal way for submission to L.1.

All the liquors for the samples from country C have been omitted from this report since not only were they so poor as to be below the normal range experienced by L.1 but were swamped by a taint which has been previously traced to the use of certain formulations of benzene hexachloride insecticide in the field.

Liquoring centre L.2

L.2 differs in a few respects from the results reported by L.1. Although the overall quality assessments present a similar pattern and although the flavour of the liquor correlates with the overall quality in general, nevertheless there are two differences in detail. Following the removal of mucilage by alkali, the use of sodium metabisulphite led to an overall quality no better than that achieved by the simple underwater soak and the liquor achievement was, on average, somewhat poorer. Although the under-water soaking after a dry fermentation provided a distinct improvement in overall quality, this was not accompanied by an enhancement of liquor flavour.

Only six experiments were liquored by L.2, four of which emanated from country C. Within the detail of the liquoring reports it is evident that the liquorings of country C samples were made difficult to assess by tainting as was the case for L.1.

Liquoring centre L.3

The liquoring reports from L.3 can be conveniently divided into two sections.

For the group of countries A, B and C, the liquor qualities tabulated in table 4 do not display any clear-cut pattern, but the calculated average values do indicate conclusions similar to those of L.1 and L.2. The soaking

of coffees cleaned either by the alkali procedure or by a dry fermentation produced an improvement in the liquor quality. The use of sodium metabisulphite solution was no better than a simple soak under water. For country C, the samples have been examined before and after a grading. After grading, little difference was observed between the soaked coffees and their unsoaked counterparts. The use of sodium metabisulphite led to a consistent improvement for the graded samples grown and processed at a high altitude.

The liquorings of the samples from countries D and E, which were limited to three experiments only, produced results almost the exact opposite to those of L.1 and L.2. Liquorers L.1 and L.2 were assessing the quality of coffees very familiar to them (mild arabicas of the East African territories D and E) whereas L.3 is accustomed to coffees supplied to the French market. It has been suggested by L.3 that he was marking down the East African coffees for one of the qualities held in high regard elsewhere, namely the acidity of the liquor. It should be mentioned here that the desirable acidity of East African arabicas is often excessive to the average palate and it is customary for the roasters of these coffees to dilute this acidity by suitable blendings for supply to the normal consumer outlets.

Liquoring centre L.4

Although only five experiments were liquored by L.4, a number of deductions can be made from the assessments listed in table 5. It is apparent that the coffees resulting from a dry fermentation only were ranked low, by L.4, although a subsequent under-water soaking improved the liquor characteristics appreciably. Coffees treated with sodium metabisulphite were consistently considered to be inferior to their counterparts soaked under water only, after the removal of mucilage by alkali.

The liquors of the samples prepared by alkali treatment followed immediately by sun-drying were highly favoured, on average, a result which is contrary to the reports discussed earlier.

Other liquoring reports

The samples from country A, in addition to being liquored by L.3 and L.4 (experiment 1 only), were assessed by another East African liquorer (L.5) and also in the country of origin (L.6). All were agreed that the « control » treatment C2, for which the samples were dried in the cherry, provided the poorest liquor. L.5 and L.6 agreed with L.4 that an underwater soaking improved the liquors of dry-fermented coffee, but in contrast to the other assessors, also consistently reported an improvement resulting from an underwater soak following the alkali treatment. No simple conclusion can be drawn concerning the use of sodium metabisulphite.

CONCLUSIONS

The reports from the various liquoring centres supplied a formidable mass of data, the presentation of which in full would have proved difficult to organise and confusing to read. This report has therefore been limited to simple expressions of overall quality and liquor quality and the discussion has been restricted to the more significant results only.

It is evident that in general, the processing condition produced similar results in all countries.

It can be concluded that the coffee flavour assessments vary greatly between liquoring centres situated in different countries.

Evidence for a positive correlation between overall quality and liquor quality has been collected. There is no doubt that coffee quality is greatly dependent upon processing conditions.

In general, the conclusions reached earlier in East Africa have been corroborated.

REFERENCE

1. WOOTTON, A. E. — The Fermentation of Coffee, Report C. R. 12, E. A. Industrial Research organization (1963).

WOOTTON (A. E.). — **Rapport du groupe de travail sur la préparation du café par voie humide.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 398-404, tabl., réf.

Le programme du groupe de travail sur la préparation du café par voie humide (créé en mai 1965 au second colloque sur la chimie des cafés) a été définitivement fixé en mars 1966 : il comprenait la comparaison d'au moins cinq procédés appliqués à une même variété de café à peu près à la même époque, afin de voir si les résultats antérieurement trouvés en Afrique Orientale étaient universellement valables.

Cinq pays participèrent à cette étude, vingt-huit expériences isolées furent réalisées et cent cinquante neuf échantillons examinés. L'évaluation de la qualité à la tasse des échantillons a soulevé quelques difficultés ; quatre centres de dégustation ont pris part à l'essai.

L'essentiel des nombreuses données recueillies est présenté dans ce rapport : qualité générale du café (somme de l'aspect en vert, de l'aspect torréfié et de la qualité de la boisson) et qualité à la tasse, suivant les procédés appliqués.

Il apparaît que les différents procédés de préparation par voie humide donnent des résultats similaires dans les différents pays producteurs ; que l'appréciation de la qualité à la tasse varie beaucoup suivant le pays dans lequel est situé le centre de dégustation ; qu'il existe une corrélation positive entre la qualité générale et la qualité à la tasse ; que la qualité du café dépend très largement du procédé de préparation. Les observations faites précédemment en Afrique Orientale ont été confirmées.

WOOTTON (A. E.). — **Report by the working group on the wet processing of coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 398-404, tabl., réf.

The programme of the working group on the wet processing of coffee (formed in May 1965 at the second symposium on the chemistry of coffee) was finally drawn up in March 1966 : it included a comparison of at least five processes applied to one single variety of coffee and at roughly the same time so as to see if the results previously found valid in East Africa, were universally applicable.

Five countries took part in this study, twenty eight separate experiments were made and one hundred and fifty nine samples were examined. The evaluation of the cup qualities of the samples caused certain difficulties : four liquoring centres took part in the tasting.

The essentials of the numerous data assembled are set forth in this report : overall quality of the coffee (taking together its appearance in the green state, in the roasted state and the quality of the beverage) and the cup quality, for each of the processes employed.

It appears that the different wet processes give similar results in the various producing countries ; that the evaluation of cup quality varies considerably according to the country in which the coffee is tasted ; that there exists a positive correlation between the overall quality of the coffee and the cup quality ; that the quality of coffee depends very largely on the process used in the preparation. The observations made previously in East Africa have been confirmed.

WOOTTON (A. E.). — **Bericht der Arbeitsgruppe für die nasse Aufbereitungsverfahren des Kaffees.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. I. F. C. C. (Paris), 1968, p. 398-404, tabl., réf.

Das Programm der Arbeitsgruppe für die nasse Aufbereitung des Kaffees (die im Mai 1965 beim zweiten Kolloquium für Kaffeechemie gebildet worden war) wurde endgültig im März 1966 festgesetzt. Es enthielt den Vergleich zwischen wenigstens fünf Verfahren, die ungefähr zur selben Zeit auf die selbe Kaffeesorte angewendet wurden, um festzustellen ob die zuvor in Ostafrika festgestellten Resultate allgemein massgebend sind.

Fünf Länder waren an der Untersuchung beteiligt, acht und zwanzig Einzelversuche wurden durchgeführt und hundert neun und fünfzig Muster untersucht. Die Bewertung der Tassenqualität der Muster bot einige Schwierigkeiten ; vier Sinnenprüfungsstellen nahmen an der Untersuchung teil.

Dieser Bericht gibt das Wesentliche der zahlreich gesammelten Daten bekannt : allgemeine Qualität des Kaffees (Summe des Aussehens des Kaffees roh und geröstet und der Qualität des Getränkes) und Tassenqualität je nach dem benutzten Verfahren.

Es zeigte sich, dass die verschiedenen nassen Aufbereitungen in den verschiedenen Erzeugerländern die gleichartige Resultate ergeben ; dass die Tassenqualitätsbeurteilung öfters verschiedenargig ausfällt je nach dem Land in welchem sich die Sinnenprüfungsstelle befindet ; dass zwischen der allgemeinen Qualität und der Tassenqualität eine positive Korrelation besteht ; dass die Qualität des Kaffees weitgehend vom Aufbereitungsverfahren abhängt. Die zuvor in Ostafrika gemachten Beobachtungen wurden bestätigt.

DISCUSSION

M. LEVENSON : The subject of your experiment is a very interesting one Mr Wootton, and I shall be looking with great interest for the results of the analytical work that has been done. I hope and I would encourage you to do just as much analytical work as you can possibly manage with the amount of samples that you have. You may not get an opportunity in the near future again to have such an interesting array of material to work with.

Now, your present evaluation in this preliminary report has to do primarily with something you call « quality ». Frankly, I don't know what you mean. I would sincerely appreciate if you would give us a few remarks about just what is involved in quality and what your liquorers are looking for when they taste these samples.

M. WOOTTON : The quality of coffee refered to in this report is limited to the subjective assessments by coffee liquorers. In the case of liquorer LI, his evaluation is made prior to the auctioning of Kenya coffee in Nairobi. The standard awarded, which is not known to the buyers, correlates very closely with the price realized in the auction room. Since W. Germany is the most important customer for E. African arabicas, a definition of quality is presumably linked closely to the requirements of W. German coffee consumers.

Your question about the availability of supporting analytical data is a very pertinent one. This first experimental programme included no analyses apart from some raw coffee content measurements along with some pH, moisture content and soluble extract values. Further experiments might include more ambitious chemical analyses, both of the green and roasted bean, but perhaps also of coffee mucilage which is so important to the fermentation process.

In addition to liquorers' comments, it would certainly be desirable to collect information on the chemical analysis of coffee flavour. Gas chromatographic techniques immediately spring to mind and I have imagined collaborating with the working party on coffee odour research in the rather distant future in order to relate subjective tests and aroma analysis to processing conditions.

M. REYMOND : What species of coffee beans were analysed. Were they arabica coffee beans ?

M. WOOTTON : B, C and D groups all reported on Arabica coffee. A, for which we have not enough details to report on, refers to Robusta samples. The liquorers we have in Nairobi are not sufficiently used to Robusta coffee and I had to seek other centres for the Robusta reports.

M. LOCKHART : It seems that we are beginning to find ourselves with a great detail of information. It is almost impossible for a human being to handle this kind of data and to observe the differences, to make the correlations in a proper manner. I have learned from works that I have been doing recently that the only way of handling that kind of things usefully is to use a computer. It would therefore be necessary for us perhaps now to think about the details also of the documentation of the samples and a reference description of the methods.

M. WOOTTON : In Kenya, we already do use a computer for this sort of data analyses.



RAW BEAN COLOURS AND THE QUALITY OF KENYA ARABICA COFFEE

J. M. NORTHMORE
Coffee Research Station, Ruiru, Kenya

All Kenya Arabica coffee is sampled and assessed for quality by the liquorer of the Kenya Coffee Marketing Board before being offered on the market. He assesses this quality under the three main headings of the raw bean, the roast bean and the liquor. Each of these main headings is further sub-divided and, for the raw bean in particular, the assessment of quality is made under the sub headings of size, colour and « quality ». Of these subheadings, colour is considered to be of more importance than size (1) and would appear to lend itself more easily to critical examination in the laboratory than « quality ».

The colours normally found in varying mixtures in the raw Kenya bean are blue, green, yellow and brown. As is well known, the best quality Arabicas are predominantly bluish in colour. The correlation between the amount of blue colour in the raw bean and its liquoring characteristics is so well known amongst coffee buyers, that in some cases raw beans of indifferent colour (not from Kenya) have been known to have been dyed a faint blue to improve their appearance. However, this artificial colour easily dissolves out if the raw beans are placed in water for a few minutes and may be presumed to have no beneficial effect on the liquor obtained from the original coffee sample.

At the other end of the scale, predominantly yellow or brown beans are indicative of a bean with poor liquoring characteristics. Yellow or « amber » beans give liquors described as « common » and « lacking acidity » (2) whilst brown beans have long been known to give poor liquors which are light in both body and acidity.

It is thus to be expected that a close correlation exists between the colour of the raw bean and its quality and in Kenya this has been confirmed statistically (3). In view of the existence of this correlation, part of the quality research programme undertaken over the last two years in Kenya has been devoted to the investigation of raw bean colours and some of the factors controlling their development. The method used in pursuing this investigation has been to extract components of the raw bean into solution and to develop in these solutions, by suitable processes, similar colours to those found in the raw bean. It is then assumed that the colours obtained in solution and those observed in the raw bean were derived from the same basic substances and developed by a similar type of chemical reaction.

Through this method of approach, it was considered that an understanding could be obtained of many of the factors contributing to raw bean colour. Attempts to obtain a similar understanding by the classical method of extraction of bean pigments, purification and subsequent analysis, had previously been largely unsuccessful. This was due to the strong adsorption characteristics exhibited by these pigments making it difficult to extract them with common solvents. In addition, their extraction in a pure state was hindered by their sensitivity to external conditions, particularly their ease of oxidation which is usually catalysed by enzymes that are present in all raw beans.

Some of the results obtained from this investigation have been reported upon elsewhere (4, 5, 6) but are reproduced here for the sake of continuity together with some more recent results of further research. In addition a brief report is made of an attempt to obtain a method for measuring raw bean colours in the laboratory.

EXPERIMENTAL

Ground raw coffee beans were extracted with hot water (4), whilst whole raw beans were extracted with N/10 HCl solution (5). In each case after centrifuging the crude extract, the supernatent solution was made alkaline and left exposed to the air. The colour development that occured on atmospheric oxidation of these solutions was then followed on a spectrophotometer. The effects of acidification of these solutions was noted.

Effect of pH

The rate and intensity of colour development at different pH levels was followed by buffering the N/10 HCl extracts to different levels of pH, with triethanolamine solution (28 gm/litre).

Addition of ions or reducing agents

The effect was noted of the addition of various ions or reducing agents on the colour development in N/10 HCl extracts buffered to pH 8.7 with triethanolamine solution.

Effect of exposure to light

In one experiment magnesium sulphate solutions at two different concentrations were added to 20 ml aliquots of N/10 HCl bean extracts and the mixtures buffered to pH 8.7. After diluting to 50 ml the solutions were placed in the dark for 46 hours, when maximum colour development was found to have occurred. Readings were taken at 660 mμ and 600 mμ. A bean extract solution containing no added magnesium was given identical treatment. The solutions were then exposed to daylight for 3 1/2 hours and readings again taken at 660 mμ and 600 mμ. Comparisons were then made between the two sets of readings.

In a second experiment the visible spectrum was obtained of a green blue solution from an N/10 HCl bean extract that had been developed in the dark. The solution was then exposed to the light for an hour and a fresh spectrum obtained. The two spectra were then compared.

Use of pure chlorogenic acid

A solution was prepared containing 100 ppm of pure chlorogenic acid in N/50 HCl.

5, 10 and 20 ml aliquots were mixed with a solution of $MgSO_4$ containing 0.40 m eq Mg. The mixtures were then buffered to pH 8.7, diluted to 50 ml and placed in the dark for maximum colour development to occur.

Readings at 660 mμ and 600 mμ were taken and compared with those obtained with solutions of chlorogenic acid treated identically but containing no added magnesium.

The solution with the highest readings was exposed to bright sunlight for one hour and fresh readings taken.

Attempts to measure bean colour

Thirty whole raw beans, previously polished free of silver skin, were extracted with 50 ml N/10 HCl solution for ten hours when it was found that all colour had been extracted and the beans had become white. 20 ml aliquots of the centrifuged extracts were diluted to 100 ml and 20 ml aliquots of these diluted solutions were buffered to pH 8.7. The colours that developed in these solutions after standing exposed to the air were measured at 660 mμ. Attempts were then made to correlate these measurements with the colour description of the bean sample as previously given by the liquorer. A comparison was also made between measurements made on pale and dark coloured beans separated by hand from the same composite raw bean sample.

RESULTS

Hot water extracts of ground bean or N/10 HCl extracts of whole bean, after centrifuging, were found to give colourless solutions. However, on the addition of alkali to give a pH of above 7.0, yellow colours developed in these solutions. On standing these oxidised to a deep emerald green colour giving a peak absorption value in the visible at 660 mμ. By careful acidification of the green solution obtained from a hot water extract of ground bean to a pH of about 5.5, a blue precipitate was obtained, whilst the supernatent solution was colourless. Similar acidification of the green solution obtained from an N/10 HCl extract of whole beans however, resulted in a blue solution without any precipitation. The peak absorption value in the visible of this solution was 600 mμ.

An examination of the infra red spectrum of the blue precipitate indicated that it was not a single substance. Spectrographic analysis showed the presence of the

following trace elements : Fe, Si, Al, B, Mg. The ultra violet spectrum in dilute acetic acid was very similar to the spectrum of chlorogenic acid.

When an excess of acid was added to the green solutions obtained either from ground or whole beans, a pink coloured solution was obtained.

Effect of pH

The effect of the level of pH of the solution on the rate and extent of colour development is shown in figure 1.

It is seen that both the rate of colour development and the maximum readings obtained are pH dependent. The optimum pH value appears to be between 8.6 and 8.9. Below this range the rate of development is slower whilst the maximum intensity of colour is probably never achieved. Above this pH range the rate of development appears to be at a constant maximum but the peak colour values obtained decrease with increasing pH. At the higher pH values also it was noticed that there was increasing production of a brown coloration in the solutions.

Addition of ions or reducing agents

The effect on colour development of the addition of various ions or reducing agents to N/10 HCl extracts of whole raw beans prior to buffering to a pH value of 8.7 is given in table 1.

TABLE 1

Effect of the addition of various ions or reducing agents on colour development in N/10 HCl extracts of whole beans

Solution No.	Substance added	Final concentration of added substance	Reading at 660 mμ
1	—	—	.286
2	K_2SO_4	3.84 m eq K	.262
3	Na_2SO_4	3.84 — Na	.262
4	NaF	3.84 — Na	.262
5	$Na_2S_2O_5$	1.28 — Na	0
6	$MgSO_4$	0.04 — Mg	.310
7	$MgSO_4$	0.26 — Mg	.378
8	$MgSO_4$	0.38 — Mg	.405
9	Ascorbic acid	1 gm/l	0

An inspection of these results reveals that sodium or potassium ions added to the bean extracts to give a final concentration of 3.84 m eq/litre of the cation, have slightly depressed the colour development, whilst sulphate and fluoride ions do not appear to have had any effect at the concentrations used. The metabisulphite

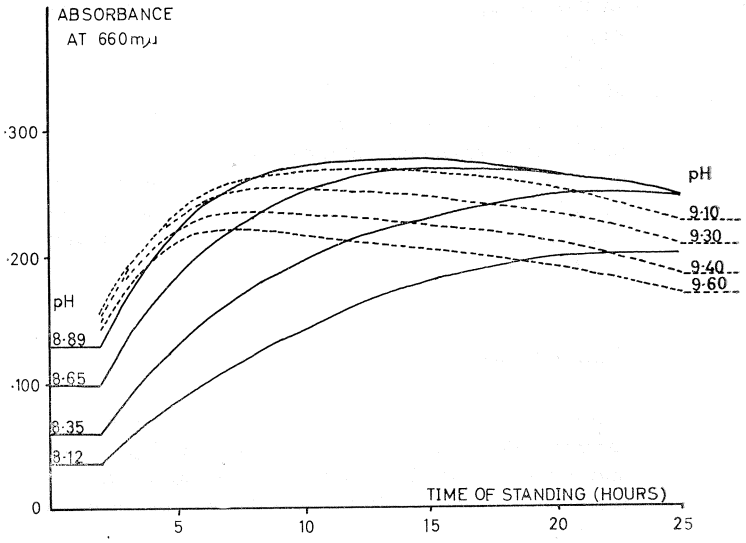


Fig. 1

ion and ascorbic acid have completely suppressed the development of green colours causing the solutions to remain yellow throughout.

The addition of magnesium has markedly increased the reading at 660 mμ, the extent of the increase being related to the amount of magnesium added. In this connection it was noted that even the smallest amount of magnesium added markedly increased the visible green colour of the solutions whilst at the higher concentrations of added magnesium the solutions became visibly more blue in colour.

Effect of exposure to light

The effect of exposure to light of coloured solutions obtained from bean extracts with added magnesium, is shown in table 2.

TABLE 2

Effect of exposure to light for 3 ½ hours on the coloured solutions obtained from bean extracts with added magnesium

Solution No.	Mg added	Reading at 660 mμ		Reading at 600 mμ	
		Before exposure	After exposure	Before exposure	After exposure
1	+ Mg	.465	.238	.370	.340
2	+ Mg	.509	.271	.425	.385
3	Nil	.248	.107	.164	.153

These results show that the effect of exposure to light on the reading at 660 mμ is very large but only slight on the reading at 600 mμ. This results in a shift

of the absorption peak from 660 mμ to 600 mμ after exposure. This effect is clearly demonstrated in figure 2 which shows the visible spectra obtained before and after exposure.

As would be expected the green colour of the solution became less intense after exposure, and the solution appeared visibly more blue. However, the figures given in table 2 rule out a corresponding increase in the blue reading (at 600 mμ) at the expense of the green reading (at 660 mμ).

Use of pure chlorogenic acid

All the solutions containing added magnesium gave distinct yellow colours on being made alkaline. Green and blue colours then developed on standing. The readings obtained at 660 mμ and 600 mμ are given in table 3.

TABLE 3

Colour development in chlorogenic acid/magnesium mixture

Solution No.	Chlorogenic acid (ppm)	Magnesium (m eq/l)	Reading at660mμ	Reading at600mμ
1	10	0	.008	.005
2	10	8	.051	.043
3	20	0	.030	.024
4	20	8	.137	.106
5	40	0	.055	.029
6	40	8	.322	.249

These results demonstrate the development of green and blue colours with added magnesium as well as the increased colour development with increasing concentration of chlorogenic acid. The effect of exposure to bright sunlight of solution number 6 is shown in table 4.

TABLE 4

Effect of exposure to light on chlorogenic acid/magnesium mixture (solution no 6, table 3)

Reading at 660 mμ		Reading at 600 mμ	
Before exposure	After exposure	Before exposure	After exposure
.322	.151	.249	.228

The large drop in the reading at 660 mμ and the relatively small drop in the reading at 600 mμ are shown to lead to a reversal of the relative positions of the readings at these wavelengths.

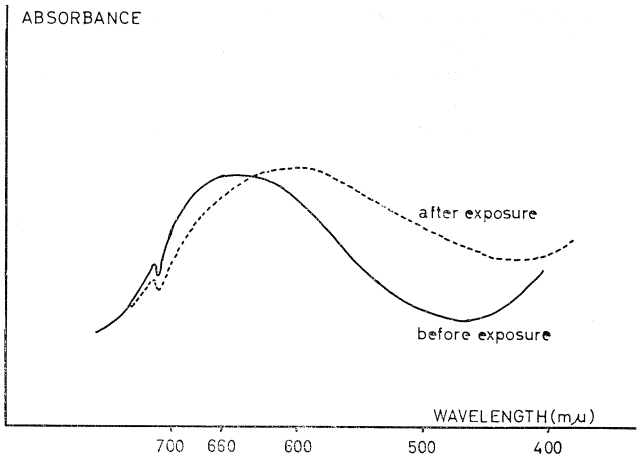


Fig. 2.

Attempts to measure bean colour

TABLE 5

Optical density readings at 660 mμ of solutions obtained from beans of varying colour descriptions

Bean sample no.	Raw bean colour description	Reading at 660 mμ	Mean Reading
B/26	Greyish green and faint grey blue	.257 .206	.232
B/17	Greyish green	.296 .289	.293
B/18	Greenish	.302 .293	.298
B/19	Greyish green and greenish	.339 .399	.369

TABLE 6

Optical density readings at 660 mμ of solutions obtained from « pale » and « dark » coloured beans

Bean sample	Reading at 660 mμ	Mean reading
Pale	.176	.165
—	.150	
—	.172	
—	.163	
Dark	.126	.115
—	.109	
—	.119	
—	.105	

The readings obtained at 660 mμ with extracts of beans of different raw colour descriptions are given in table 5. Readings obtained from duplicate bean samples are given to indicate the extent of variation between samples.

It will be seen that the best colour description, greyish green with faint grey blue, corresponded to the lowest reading at 660 mμ, whilst the description of « greenish » or poorer quality colours indicated much higher readings.

This pattern is repeated in table 6, where the mean readings obtained from quadruplicate samples of pale and dark coloured beans are compared.

DISCUSSION

It was shown by WILBAUX (7) that aqueous extracts of Robusta coffee beans gave yellow solutions on being made alkaline and that these solutions quickly oxidised to green or green brown colours according to the pH of the solution. It has been shown in this paper that similar results were obtained when hot water or N/10 HCl extracts of raw Kenya Arabica beans were made alkaline. Furthermore, it has been shown that the green solutions obtained in this way from extracts of Kenya beans contain a blue component and by analogy, it has been assumed that this blue component is the same substance that is responsible for imparting the desirable blue colour to the finest quality raw beans. If this assumption is valid then a knowledge of the composition of the blue component and a study of the factors that lead to its development are likely to be of great value in suggesting methods whereby the coffee tree in the field or the raw coffee bean in the factory may be treated in order to obtain the best quality coffee.

It was demonstrated many years ago that a solution of chlorogenic acid, when made alkaline, would oxidise to a green colour on standing. This green substance in solution has been named « viridic acid » but it has never been isolated and its constitution is unknown. The raw bean extracts used in this investigation contained chlorogenic acid and the crude blue pigment obtained from ground bean, gave an ultra violet spectrum very similar to that of chlorogenic acid. This pigment also contained some metal ions of which one was magnesium. The addition of magnesium to bean extracts has been shown to increase the concentration of the blue component and furthermore, blue colours were developed when alkaline mixtures of chlorogenic acid and magnesium were allowed to oxidise under similar conditions to the bean extracts. When these blue solutions were acidified it was found that pink colours were obtained in solution. Similar colours had been obtained from bean extracts. Finally, green solutions obtained from both bean extracts and chlorogenic acid-magnesium mixtures were all shown to react similarly when exposed to light. From all these facts it is suggested that the desirable blue pigment of raw Kenya Arabica beans is probably formed in the bean from chlorogenic acid and magnesium.

Contrary to the results obtained from the addition of magnesium to bean extracts, it has been shown that by adding sodium or potassium ions to the extract a slight depression in the intensity of the green colour occurs, together with a hastening of the development of brown colours in the solution. It is of interest to relate these laboratory findings to conditions known to occur in the field.

Excess potassium in the raw bean has been shown to be indicative of a poorer quality coffee — mainly through the occurrence of undesirable brown colours in the raw bean (4). In Kenya it is thought that excess potassium may be introduced through the common practise of heavily mulching with Napier grass (*Pennisetum purpureum*) (8). In this connection it has also been demonstrated that the addition of magnesium to heavily mulched coffee can considerably improve the quality of the coffee (9).

The effect on colour formation of the exposure to light is of interest.

It has been shown that green solutions, after exposure to light undergo a shift of the visible absorption spectrum peak and become more blue in colour. However, it does not appear that the « blue reading » (at 600 mμ) is intensified at the expense of the « green reading » (at 660 mμ) but rather that it remains virtually unchanged.

This result may be explained if one assumes that the original green solution was made up of a mixture of two colours, yellow and blue. Then, if the yellow colour is light sensitive the green colour would diminish on exposure to light leaving the solution apparently more blue.

It is of interest to relate these findings to results obtained in the coffee factory by McCLOY (10). In experiments on the drying of coffee, McCLOY demonstrated that wholly artificially dried coffee, that is, coffee dried in the dark, was always inferior to coffee that had been exposed to sunlight for some hours during drying. This inferior quality was characterised by increased « yellowish green » colours in the raw bean. On subjecting these poorer quality beans to a subsequent period of exposure to sunlight, the yellowish green colours decreased and the quality of the coffee improved. McCLOY came to the conclusion that it was light within the wavelength band of 410 mμ to 470 mμ that was responsible for this improvement. It is significant that this wavelength band is at the « blue » end of the

spectrum and would therefore be **absorbed** by yellow colours in the bean or by the yellow component of a mixture of blue and yellow colours in solution. It is a well known concept of photochemical theory that it is only the light that is **absorbed** that is responsible for producing a chemical change.

If one pursues further the concept that the green colour in solution is a mixture of blue and yellow components, then a possible explanation of the constitution of « viridic » acid presents itself. During this investigation it was noticed that if a chlorogenic acid solution was made alkaline with ammonium hydroxide solution, a pale green colour appeared on standing. No such colour was obtained when sodium hydroxide solution was used even in the presence of added magnesium. However, if some ammonium chloride was added to the chlorogenic acid/sodium hydroxide mixture a green colour did then appear. These reactions may be explained by reference to the solubility of magnesium hydroxide as follows.

In all these colour reactions, the colours are developed in alkaline solution. Any magnesium that may be present will then be in the form of the hydroxide. In this form it is extremely insoluble, more so in sodium hydroxide solution but much less so in the presence of ammonium salts, especially the chloride. It would appear then that colour formation is a function of the solubility of magnesium in the solution in which the colours are being developed. Under conditions leading to increased solubility of magnesium more blue complex will be formed and hence more green colours. According to this explanation, the formation of « viridic acid » by the oxidation of chlorogenic acid under alkaline conditions would be due to the presence of magnesium as an impurity.

Finally it may be stated that green solutions obtained from bean extracts have been separated into yellow and blue components by column chromatography using alumina (9) and silica gel (R. Z. PATEL private communication) columns.

Oxidation process

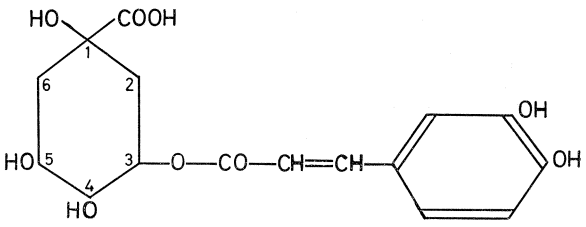
On present evidence it would appear that the blue pigment is formed when one of the chlorogenic acid isomers is partially oxidized. This partially oxidized molecule then forms a blue complex with the magnesium ion. It is of interest to speculate upon the structure of the partially oxidized molecule.

At first it would seem that quinone formation may take place by ionisation of the hydroxyl groups from the caffeic acid half of chlorogenic acid (figure 3). However, this probably does not contribute to the partial oxidation state since blue colours in solution tend to persist over only a restricted range of pH from about 7.5 to 9.5. Above pH 9.5 blue and green colours are restricted and the solutions quickly become brown. It is unlikely that ionisation of the hydroxyl groups occurs to any extent below a pH of about 9.0. Above this level quinone formation probably occurs more rapidly and then either by further oxidation or polymerisation, brown substances are formed. At the moment however, this is hypothesis and the elucidation of the true nature of the blue magnesium complex must await its extraction in a pure form and subsequent analysis.

Measurement of raw bean colour

Since the colour of the raw bean is correlated with its quality, it is obviously desirable in any investigation into bean quality to have a method of measuring raw bean colour. The need for such a method was realised several years ago in Kenya and various attempts have been made to devise one. Generally speaking these attempts have all followed the same pattern by attempting to use some kind of colour measuring machine in the laboratory to measure the overall colour of a raw bean sample. Up to the present time however, none of these attempts have been successful, and colour differences between bean samples which are so apparent to the liquorer cannot be differentiated in the laboratory. It is true that some machines will easily differentiate between extremes of colour, between brown and green for example, but so will the untrained human eye. However, the need is for a measuring device to assess finer differences, differences that as yet only a trained liquorer can discern and describe.

One approach to this colour measuring problem that does not appear to have received attention was the method of extraction of colour into solution followed by its accurate measurement on a spectrophotometer. The classical approach to this method is to extract a colour with a suitable solvent, obtain the visible spectrum of the solution and thereafter read at the appropriate peak wavelength. Unfortunately this was not possible with raw coffee beans as colour extraction was always hindered by the presence in the beans of a polyphenol oxidase that quickly turned all the bean extracts brown.



CHLOROGENIC ACID

Fig. 3

When precautions were taken to exclude oxidase action then a colourless solution was obtained. This solution had then to be treated in some way in order to measure the components of colour that had gone into solution.

This is the approach that has been used in this investigation, with, it must be admitted, only limited success.

It has been shown that it is probably possible to differentiate between good and bad coloured beans by this method but much more work remains to be carried out if it is to prove of practical use.

The fact that good colours give lower readings than bad colours indicates that one or more precursors of bean colours are being extracted into solution. On the present evidence, two of these precursors are likely to be chlorogenic acid and magnesium. Of these it is probable that magnesium is the limiting factor.

REFERENCES

1. DEVONSHIRE, C. R. — Explanation of the coffee report form. *Mon. Bull. Coffee Bd. Kenya*, **21**, 186, (1956).
2. ROBINSON, J. B. D. — Amber beans. *Kenya Coffee*, **25**, 91, (1960).
3. WOOTTON, A. E. and WORMER T. M. — (1967). The quality of Kenya coffee as defined by the out-turn report (1953-1963). *East Afr. Ind. Res. Org. Report*, C. R. 13.
4. NORTHMORE, J. M. — Some factors affecting the quality of Kenya coffee, *Turrialba*, **15**, 184, (1965).
5. NORTHMORE, J. M. — Raw bean colours and chlorogenic acid. Paper presented at the First Specialist Meeting on Coffee Research in East Africa, Nairobi, Feb. 1966.
6. NORTHMORE, J. M. — Photochemical aspects of coffee quality research, *Kenya Coffee*, **31**, 368, 339, (1966).
7. WILBAUX, R. — Technologie du Café, 22, (1956).
8. ROBINSON J. B. D. and CHENERY, E. M. — Magnesium deficiency in coffee with special reference to mulching. *Empire Journal of Exp. Agric.*, **26**, 259, (1958).
9. BLORE, T. W. D. — Some agronomic factors affecting the quality of Kenya coffee, *Turrialba*, **15**, 111, (1965).
10. McCLOY, J. F. — Mechanical drying of Arabica coffee, *Kenya Coffee*, **24**, 280, 117, (1959).

NORTHMORE (J. M.). — **La couleur des grains marchands et la qualité du café Arabica du Kenya.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 405-414, fig., tabl., réf.

La couleur des grains de café Arabica du Kenya est étroitement liée à leurs caractéristiques organoleptiques. Ce fait établi empiriquement a récemment été confirmé par une étude statistique.

Les grains de café du Kenya sont normalement bleus, verts, jaunes ou marron, ces couleurs étant données dans l'ordre décroissant de qualité : les grains de qualité supérieure sont à dominante bleue, tandis que le jaune et le marron révèlent une basse qualité.

Les composants du grain responsables de sa couleur à l'état brut ne sont pas identifiés, mais la présente étude montre que l'acide chlorogénique et le magnésium peuvent dans certaines conditions former un composé bleu et l'on suggère que c'est ce composé qui donne aux grains de bonne qualité leur couleur bleue. Les facteurs qui

NORTHMORE (J. M.). — **Raw bean colours and the quality of Kenya coffee.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 405-414, fig., tabl., réf.

The colour of the raw bean of Kenya Arabica coffee is closely correlated with its liquoring characteristics. This has long bean known from experience and has been confirmed recently through a statistical approach.

The colours found in normal Kenya beans are blue, green, yellow and brown. These colours are given in descending order of quality indicating that the best quality beans are predominantly blue whilst yellow and brown colours are indicative of poor quality beans. Components of the bean responsible for raw bean colours are unknown, but the present investigation shows that chlorogenic acid and magnesium can form a blue complex under certain conditions, and it is suggested that this complex is the blue of the good quality

NORTHMORE (J. M.). — **Die Farbe der handelsüblichen Bohnen und die Qualität des Kaffees Arabica aus Kenya.** Troisième Colloque International sur la Chimie de Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 405-414, fig. tabl., réf.

Die Farbe der Bohnen des Kaffees Arabica aus Kenya ist eng mit ihren organoleptischen Eigenschaften verbunden. Diese empirisch ermittelte Tatsache wurde neuerdings durch eine statistische Untersuchung bestätigt.

Normalerweise sind die Kaffeebohnen aus Kenya blau, grün, gelb oder kastanienbraun, wobei die Qualität in dieser Reihenfolge abnimmt : die Bohnen erstklassiger Qualität sind meistens blau während gelb und braun einer minderwertigen Qualität entsprechen.

Die für die Farbe der Bohne im Rohzustand verantwortlichen Komponenten wurden nicht identifiziert, aber die Untersuchung zeigte, dass unter gewissen Bedingungen Chlorogensäure und Magnesium einen blauen Komponenten bilden können und es wird angedeutet, dass dieser Komponent den Bohnen guter Qualität ihre blaue Farbe verleihen können. Die Faktoren

amènent le développement des couleurs dans des solutions d'extraits de grains ont été étudiés et on a fait une analogie avec le développement probable de couleurs semblables dans le grain marchand.

Les résultats obtenus en laboratoire ont été utilisés dans le but d'essayer d'expliquer différents résultats expérimentaux observés en champ et dans les usines de traitement. On a également tenté de mesurer en laboratoire la couleur des grains marchands par un procédé d'extraction.

bean. Factors leading to the development of colours in solutions of bean extracts have been investigated and an analogy drawn with the probable development of similar colours in the raw bean. Laboratory results have been used in an attempt to explain several experimental findings previously obtained in the field and in the factory.

An attempt has also been made to measure raw bean colour in the laboratory by an extraction method.

welche die Entwicklung der Farben in Lösungen von Bohnenextrakten herbeiführen wurden geprüft und eine Analogie mit der vermutlichen Entwicklung ähnlicher Farben bei handelsüblichen Bohnen festgestellt.

Die im Laboratorium erzielten Ergebnisse bezweckten verschiedene im Felde und in den Verarbeitungsbetrieben beobachten Versuchsergebnisse zu erklären. Es wurde ebenfalls versucht, im Laboratorium die Farbe der handelsüblichen Bohnen mit Hilfe eines Extraktionsverfahrens zu messen.

DISCUSSION

M. d'ORNANO : Nous avons effectué des essais analogues à ceux de M. Northmore, mais moins approfondis. Ils ont porté sur les pigments et l'acide chlorogénique du café Robusta et nous sommes arrivés à peu près aux mêmes conclusions. Au cours de nos essais, nous avons constaté que les pigments étaient plutôt détruits par les rayonnements ultra-violets, alors que les rayons infra-rouges n'avaient aucune influence sur les pigments. Je voudrais demander à M. Northmore s'il a constaté le même phénomène ?

M. NORTHMORE : I have not yet got round to investigating which part of the spectrum does affect the pigment, but it has certainly been found that on the bean, ultra-violet had no effect. It has been found that the ultra-violet affects the parchment. This rather lead us to feel that one of the functions of the parchment is to absorb ultra-violet and protect the bean from it. But I myself have not pursued this so I hope to do but in the coming year.

M. CALZOLARI : Vorrei chiedere al relatore a proposito del riferimento che ha fatto per le attrezzature impiegate nella misura del colore se potesse dare qualche delucidazione ?

M. NORTHMORE : Necessarily when I read this paper, I left out experimental details because it gets rather tedious but all colours were read on a Beckmann DB spectrophotometer with recorder, fitted for ultra-violet and visible.

M. CALZOLARI : Mi permetto chiedere se l'oratore non ritiene sia possibile applicare un metodo che è molto usato in altri settori nella definizione esatta del colore. Mi riferisco al metodo della tricromia che consente di avere risultati molto più precisi in quanto che noi sappiamo bene che il colore che noi analizziamo con la tecnica spettrofotometrica è un assorbimento di più colori che danno luogo a una miscella di colori che assorbe a una lunghezza d'onda che non è specifica né dell'uno né dell'altro. Quel metodo della tricromia è cioè un metodo da tre dimensioni e si ha la possibilità di individuare l'apporto dei singoli componenti al colore che viene analizzato con uno spettrofotometro normale. Dato l'interesse che può avere questo colore che si apprezza e il risultato che si ottiene nell'uso di questo caffè con quella data colorazione penso que forse questa via potrebbe essere estremamente interessante e potrebbe dare dei risultati un po' più correspondenti a ciò checi si aspetta dal colore che si vede.

M. NORTHMORE : I think that this is a very good idea. I'll be very interested to see what results are obtained and if you like to do this, we will willingly send you some samples of coffee.

One thing, are you talking about measurement of colour in solution or on the bean itself ?

M. CALZOLARI : Mi potrei riferire a tutti e due i tipi di misure perchè col metodo di tricromia si può utilizzare anche il campione solido e così si potrebbe valutare la variazione di colore che si ha tra solida e liquido cioè estratto.

M. NORTHMORE : Again we are looking for methods of measuring colour of raw beans and we are interested in anything that is suggested.

M. CALZOLARI : Ho capito che si è trovata una qualche correlazione tra la presenza di certi metalli e l'ottenimento di un dato colore successivo nell'infuso. Questo campo sarebbe di estremo interesse in quanto è notorio che la presenza di certi metalli catalizza certe reazioni fotochimiche. Si potrebbe studiare, anche con altri istituti, questa azione dei metalli nelle reazioni fotochimiche delle sostanze responsabili del colore del caffè.

M. NORTHMORE : It is an interesting subject, but a large one ; so far we have only just touched upon it.

I should point out that all our work has to have practical applications. We have not concentrated so far on the trace elements, but on the major nutrient elements in coffee beans and we had found a definite correlation between colour production in the bean and potassium, calcium, magnesium.

In my opinion, this can probably be explained by a stabilization of a partially oxidized chlorogenic acid molecule by magnesium to form a blue complex ; calcium can also form a complex which is probably yellow ; potassium inhibits the forming of this complex and accelerates the polymerization and further the oxidization of the molecule.

This is just an opinion and we have not yet looked at the trace elements. It is a large field, I'll be very interested to hear of information on it.

M. CALZOLARI : Noi possiamo pensare all'ipotesi di lei circa la formazione di un complesso magnesio-acido clorogenico. Sarebbe forse interessante di definire anche la struttura di questo complesso. Tutto questo insieme di dati offre ampie prospettive per un eventuale allargamento del campo del lavoro anche da parte da altri istituti interessati a questo problema.

M. STREULI : I have been fascinated by the lecture of Mr Northmore, because this might be a step contributing to the elucidation of the mystery of viridic acid and I think that he has to be highly congratulated not only for the practical implications, but also for the scientific point of view.

I should like to comment on his view that quinone structures are probably not contributing to colour formation. I must say I have a different point of view and if you permit I will explain :

Very unfortunately it is not known among chemists that chlorogenic acid is by no means a mono-basic acid, but that it is in fact a di-basic acid.

(commentaire d'un graphique tracé au tableau).

It has been assumed that the yellow colour, which you see in titration as soon as your coffee extract or pure chlorogenic acid is above pH 6.2, is the sign of decomposition by oxygen ; it is not. *We titrated chlorogenic acid under air and under nitrogen, and up to a pH of 11, within 1/2 h, there was no difference whether you titrated under nitrogen or under air.*

Now, what is the yellow colour which appears if it is not a decomposition by oxygen ? I think, I am convinced but I have not been so far able to prove it that this yellow colour is as a matter of fact the di-basic ion of the di-basic chlorogenic acid with a structure about of the following (formule développée tracée au tableau).

I think that this hypothetical *di-basic ion is about this. It is well possible that this structure explains why there is on the one hand an easier formation of metal complexes and on the other hand, why the oxygenation be heavier ; the substance as a whole is changed. To end up with my comment, I really do think that it is worth while looking into the quinone structure of these ions. Another thing, you know all quinones easily react with amines, and this might be a way in which ammonia or amine compounds are reacting with a hypothetical quinone structure. And then of course you will also have a change in colour. You will easily see if such a reaction is taking place : there should be a deepening of colour. And it is exactly what happens, because the reaction of the quinone compounds with amines need some time ; it is an organic reaction. May be the amine or the ammonium substance has to be set free from a precursor, let say a static amine. And who knows, one day veridic acid will turn up to be an amine compound of a quinone derivative of chlorogenic acid.*

M. NORTHMORE : This is very interesting.

M. VERHAAR : I think that part of my question was already discussed by Prof. Calzolari, but I just want to make a remark that you have shown that magnesium and chlorogenic acid formed this blue complex. Apart from that, there may have been a possible influence of magnesium on general oxidation process, using the water extract. And in this connection I wonder what a very small amount of either iron or copper would do in colour formation in the water extract. I would not be surprised if they would have a considerable influence, particularly on the formation of the yellow compound.

M. NORTHMORE : Iron and copper we have looked at. Iron obviously because in Kenya we have « amber » beans which are entirely yellow and which arise from iron deficient trees : there is a complete absence of blue colour of any kind whatsoever. So naturally we had to investigate the role of iron. I had the opinion through all this work that there is a factor which is missing, probably a catalyst. We all thought of copper, because in some of the oxydizing enzymes in tea, copper is a constituent. We did some rather tentative experiments with both of these : iron forms instantaneously a green colour with chlorogenic acid. There is no question of oxidation taking place to produce this colour and of course when you acidify you get a completely colourless solution. In bean extract you get a pink solution, as we do with magnesium. So if iron is involved as you remark, it is probably in the oxidation process, I do believe that there is a factor missing, it could well be iron. Copper, I rather doubt it. We had enzyme extracts examined and we have not been able to find any trace of copper.

M. WILBAUX : Si j'ai bien compris, le Professeur Calzolari a suggéré d'employer comme méthode de mesure de la couleur des grains de café, des mesures tri-stimulus. Nous avons commencé de telles mesures il y a un an et nous avons passé plusieurs centaines d'échantillons dans des appareils tri-stimulus XYZ de la commission internationale de l'éclairage. Les résultats sont assez décevants : à quelques exceptions près, les fèves ont une longueur d'onde dominante qui se situe vers 580 mμ, certaines donc dans le jaune. Certaines cependant se situent vers 574 mμ et d'autres vers 590 mμ, mais ce sont des cas exceptionnels qui se détectent facilement à l'œil nu. Les puretés d'émission sont malheureusement très faibles, ce qui prouve que la longueur d'onde dominante ne nous apprend pas grand chose, car on est en présence de nombreuses autres couleurs. Nous possédons maintenant un équipement qui va nous permettre de faire le spectre de réflexion. Nous en avons déjà réalisé cinq : ils ont une allure assez bizarre. Nous nous attendions à trouver un pique de réflexion dans le vert, puis des piques plus élevés dans le jaune. Nous avons au contraire obtenu une courbe régulière, un peu en forme de sigmoïde, puis brusquement une très forte réflexion dans le rouge. Avec ces cinq spectres nous avons simplement pu constater qu'ils seraient difficile à interpréter et que les recherches seront fort longues. Les mesures tri-stimulus sont décevantes et le passage du système XYZ au système AGB avec calcul des index de bleu, de vert qui ont été employés avec succès aux Etats-Unis pour la couleur des pois, ne nous ont pas donné satisfaction pour le café. La mesure objective de la couleur du café sera donc quelque chose de très difficile.

M. WOODMAN : I would just like to add a small refinement to the comment of Dr Streuli : working with highly purified chlorogenic acid the pK of the first phenolic group to ionise appears to be 8.35 ± 0.05 (25° : μ = 0.1, solvent = water). This ionisation is accompanied by the reversible formation of a yellowish-green colour which is considerably less intense than that formed in the presence of ammonia. I would further like to upgrade this acid to be tribasic, the ionisation of the second phenol rendering the measurement of the first phenolic pK slightly more complex.

M. STREULI : May I answer Dr Woodman ? He is right, I am right, we are speaking of different things : I speak of pH, he speaks of pK. I think that the figure of 8.3-8.4 is right ; I found exactly the same figures, so we agree.

M. LEVENSON : First, I would like to compliment Mr Northmore for his interesting and valuable contribution to our understanding of coffee. I think that the originality of his work is attested to by the amount of discussion it has evoked.

The second point I would just like to remind all of us who have been talking about chlorogenic acid during the last 10 or 15 minutes, that only a few years ago it has been quoted that there exist quite a large number of isomeric chlorogenic acids, and that when we talk about colour formation it need not take very many molecules of even some of the minor chlorogenic acid isomers to have an effect. I make this comment not to detract from what has been said, because I am sure that all speakers are valuable, but I do know that the past literature has been somewhat careless in speaking about chlorogenic acid.

Now the third point, if I may : there has been discussion of quality and the possible application of some of Mr Northmore's work to the estimation of quality. He himself very carefully pointed out, I believe at the introduction of his talk, that he was referring to a correlation between colour and the cup quality as determined by liquorers in Kenya. So I would respectfully suggest that if the knowledge that has been developed is going to have applications for the measurement of quality in commercial circles, as at the moment it would only apply to Kenya coffees. In support of this, I would like to refer to an experience we had some years ago : the soil in Jamaica in certain areas is very chalky (high pH). Apparently a considerable amount of the coffee from these areas turns out with a bleach colour which reasonably may be due to a deficiency of iron in the bean itself. However, when we had an occasion to evaluate these whitish beans in comparison to the normally coloured ones, in so far as quality is concerned, there was no difference. I am referring to the commercial quality as measured by a commercial company that roasts coffee for the consumers in the United States. For that purpose, there was no reason to pay one cent more or one cent less for the lighter or the darker coloured beans.

This does not mean to say that relationships cannot exist ; they do exist, I am sure of it, but the fundamental relationship I would like to suggest, is not the colour. The colour is merely an index of some other characteristics of the coffee beans. I would also like to suggest that if such a correlation does exist, its application must very carefully be taken into account, that the consumer does not drink the beverage prepared from the green bean, nor does the consumer drink the beverage prepared from a bean which has been processed in a single unique manner.

TENEUR EN VITAMINE PP DES CAFÉS GRILLÉS DE L'ANGOLA

RÔLE DES FACTEURS BOTANIQUES ET TECHNOLOGIQUES

J. ADRIAN, R. FRANGNE
C. N. R. S. — 92-Bellevue

J. XABREGAS, A. CORTE DOS SANTOS
Instituto do café de Angola, Luanda

INTRODUCTION

J. ADRIAN



TEPLY et coll. (16) furent vraisemblablement les premiers à déceler la présence de précurseurs de la vitamine PP (*) dans le grain de café vert et à observer une synthèse importante de ce facteur au cours de la torréfaction. Cette conversion se fait aux dépens de la trigonelline ainsi que l'ont montré HUGUES et SMITH (12) et ADAMO (1). Par la suite, de nombreux auteurs ont confirmé une augmentation massive de la vitamine PP pendant le grillage, le café torréfié contenant 13 à 25 fois plus de niacine que le grain à l'état vert (ADAMO, 1 ; ADRIAN et NAVELLIER, 4 ; BODDEKER et MISHKIN, 5 ;

(*) La vitamine PP ou acide nicotinique, ou niacine, est le facteur antipellagreux (*Protecting Pellagra factor*). Elle fait partie des vitamines du groupe B. Le besoin de l'Homme adulte en ce facteur est de l'ordre de 15 mg par jour.

La pellagre se rencontre surtout dans les régions où l'alimentation est à base de maïs (Amérique Centrale ou Latine, Afrique Centrale, sud de l'Europe, etc.).

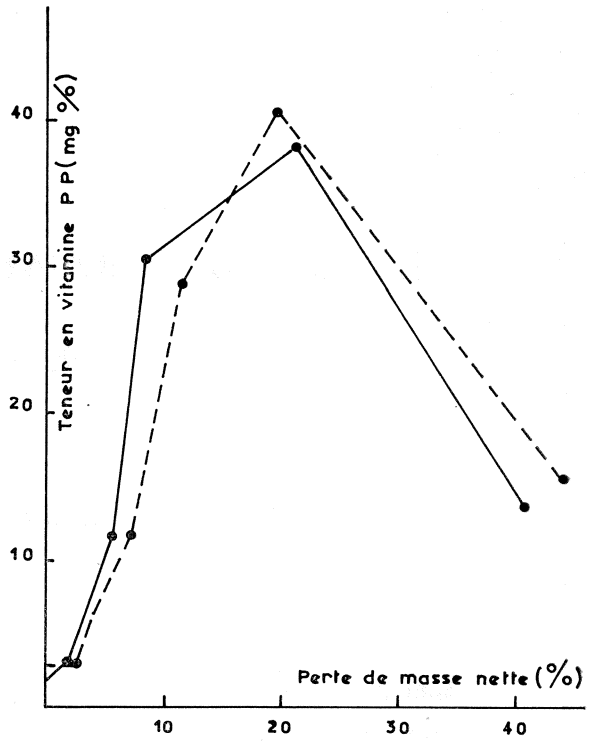
BRESSANI et coll., 6, 7 et 8 ; CRAVIOTO et coll., 9 ; DAUM, 10 ; HUGHES et SMITH, 12 ; SANTOS MOTA et DE ABREU, 15 ; TEPLY et PRIER, 17 ; etc.).

Au cours du grillage le taux de vitamine PP passe par un maximum, correspondant à une torréfaction telle qu'elle entraîne une perte de masse nette de l'ordre de 20 p. 100 (ADRIAN et NAVELLIER, 4). Ainsi, dans les cafés commerciaux la richesse en vitamine PP est-elle sensiblement proportionnelle à la sévérité du grillage : dans les échantillons peu grillés — de type américain — on trouve 13 mg de niacine p. 100 g alors que dans des produits très grillés — de type italien — le taux de vitamine PP atteint 42 mg p. 100 g (TEPLY et PRIER, 17).

En dehors du rôle primordial de l'intensité de la torréfaction, on sait également — d'après quelques analyses d'ADAMO (1) — que les données botaniques conditionnent dans une certaine mesure l'abondance de la niacine dans les cafés grillés.

Cependant, d'une façon générale, le rôle ou l'importance de nombreux facteurs botaniques ou technologiques n'est pas définie. La plupart des travaux ont porté sur des échantillons dont l'origine, les traitements préparatoires et la qualité commerciale n'ont pas été définis.

Dans quelle mesure ces facteurs peuvent-ils influencer la synthèse de la vitamine PP lors de la torréfaction ? Telle est la question que nous avons voulu étudier à l'aide de nombreux échantillons de café de l'Angola, parfaitement référenciés et dont la torréfaction est soigneusement définie.



Graphique n° 1. — Evolution de la teneur en vitamine PP dans C. arabica *(trait plein) et* C. robusta *(trait en pointillés) en fonction de l'intensité de la torréfaction (d'après ADRIAN et NAVELLIER, 4).*

NATURE ET TRAITEMENTS DES ÉCHANTILLONS

Liste et classification des échantillons

Nous disposons de soixante-trois échantillons de café grillé, originaires de l'Angola, et répartis en sept séries de neuf échantillons chacune.

Les échantillons constituant une série correspondent tous à une même variété régionale pour le café Robusta ou à des variétés et des cultivars très répandus pour le café Arabica. Tous les échantillons d'une même série subissent un traitement préalable identique : préparation par voie sèche, par voie humide sans fermentation (Raoeng) ou par voie humide avec fermentation.

A l'intérieur de chaque série les échantillons sont classés en accord avec la réglementation angolaise de classification du café vert (14) et en fonction de leur qualité commerciale et de la taille du grain.

Les séries étudiées correspondent aux espèces, variétés régionales et traitements suivants :

Série A : Robusta, variété régionale Ambriz — échantillons préparés par voie sèche ;

Série B : Robusta, variété régionale Ambriz — échantillons préparés par voie humide sans fermentation (Raoeng) ;

Série C : Robusta, variété régionale Amboim — échantillons préparés par voie sèche ;

Série D : Robusta, variété régionale Amboim — échantillons préparés par voie humide sans fermentation (Raoeng) ;

Série E : Robusta, variété régionale Cazengo — échantillons préparés par voie sèche ;

Série F : Arabica — échantillons préparés par voie sèche ;

Série G : Arabica — échantillons préparés par voie humide avec fermentation.

Chaque échantillon a été torréfié selon le « goût portugais » au cours d'une opération parfaitement contrôlée, se révélant assez légère, plus proche de celle pratiquée aux U. S. A. que de la torréfaction de type italien.

Description des espèces et variétés utilisées

Il y a en culture dans le territoire deux espèces de caféiers :

— *Coffea arabica* L. sur les plateaux du Nord — Camabatela, Negage et Malange (Nova Gaia) — et du Centre — Amboim (savane), Seles, Quibala, Cela, Huambo et Ganda (Andulo et Camacupa) — dans les régions d'altitudes supérieures à 1.000 m. Les variétés botaniques et les cultivars les plus répandus sont les suivants : var. *bourbon*, var. *bourbon* (43-7xRP13), var. *bourbon* (RP109-6), var. *bourbon* form. *xanthocarpa*, var. *caturra*, var. *caturra* form. *xanthocarpa* et var. *typica* ;

— *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (*robusta*) dont on a vu apparaître certaines « variétés régionales » sous l'influence des facteurs écologiques principalement : Cabinda dans le district de Cabinda, Ambriz dans les districts de Zaire, Luanda, Uige et Quanza Norte (Dembos), Cazengo dans le district de Quanza Norte (Golungo Alto et Cazengo), et Amboim dans le district de Quanza Sul (Amboim, Seles, Novo Redondo et Libolo).

A l'exception du Robusta/Cabinda, les diverses variétés mentionnées ont été utilisées dans notre travail. Nous avons limité cependant notre étude aux échantillons correspondant aux produits les plus représentatifs de la production angolaise.

Traitements préparatoires

Pour cette étude on a utilisé des cafés traités en accord avec les techniques usuelles en Angola : voie sèche et voie humide avec fermentation (naturelle) pour l'Arabica ; voie sèche et voie humide sans fermentation (Raoeng) pour le Robusta.

Pour donner une idée des modalités appliquées en Angola (*), nous pouvons dire que la moitié du café Arabica y est traité par voie humide tandis que 95 p. 100 du café Robusta est préparé par voie sèche.

Dans la voie sèche on pratique le système traditionnel de séchage au soleil du café en cerise — sur des aires de terre battue, cimentées ou de brique — pendant 25-30 jours. Dans la voie humide, pour la modalité avec fermentation, le café dépulpé reste dans les cuves en fermentation naturelle pendant 18-24 heures, selon les conditions climatiques de la région, le degré de maturation des drupes, etc. ; pour la modalité sans fermentation, on utilise le démucilaginateur Aquapulpa (type Raoeng). Dans ce cas le séchage dure 10-14 jours.

(*) La production de l'Angola peut être estimée à 5.000 t de café Arabica et à 220.000 t de café Robusta.

Expertise du café vert

L'expertise du café vert a été faite selon le « Regulamento para a Classificação dos Cafés Portugueses » (14). En ce qui concerne la taille des grains, la classification est la suivante pour les échantillons utilisés dans l'étude :

— **Gros** : quand 90 p. 100 (en poids) des grains sont retenus sur le tamis 17/64″ ;

— **Moyen** : quand 90 p. 100 (en poids) des grains passent à travers le tamis 17/64″ et sont retenus sur le tamis 15/64″ ;

— **Petit** : quand plus de 50 p. 100 (en poids) des grains passent à travers le tamis 15/64″.

Pour la qualité commerciale, la classification est basée sur les caractéristiques suivantes :

— **Supérieure** : grosseur du grain : gros ou moyen ; type : 6 (43-73 défauts) ou meilleur ; couleur : uniforme ; odeur : normale ; fèves piquées : 12 g (maximum) ; impuretés : 1 g (maximum) ; « fundos » : 2 g (maximum) ;

— **Première** : grosseur du grain : gros, moyen ou « corrente » (avec moins de 10 p. 100 de grains des tamis inférieurs à 14/64″) ; type : 7 (74-110 défauts) ou meilleur ; odeur : normale ; fèves piquées : 20 g (maximum) ; impuretés : 1,5 g (maximum) ; « fundos » 6 g (maximum) ;

— **Seconde AA** : type : 8 (111-150 défauts) ; odeur : normale ; fèves piquées : 24 g (maximum) ; impuretés : 1,5 g (maximum) ; « fundos » : 6 g (maximum) ;

— **Seconde BB** : type : 9 (151-220 défauts) ou meilleur ; odeur : normale ; fèves piquées : 24 g (maximum) ; impuretés : 1,5 g (maximum) ; « fundos » : 6 g (maximum).

Modalités de la torréfaction et mesures effectuées

La torréfaction est conduite selon les modalités commerciales pratiquées habituellement au Portugal pour les cafés destinés à la consommation.

Pour en contrôler l'intensité nous avons établi les coefficients suivants, en accord avec les suggestions de NAVELLIER et BRUNIN (18) : rendement brut et rendement net sur sec, perte de masse brute et perte de masse nette et gonflement apparent.

Dosage de la vitamine PP

Cette vitamine est dosée par la technique microbiologique classique, selon la méthode de KREHL et coll. (13) et les modalités précisées par ADRIAN (2). Elle est extraite du café grillé par autoclavage de 30 mn à 120° C en milieu chlorhydrique 1N. Nous obtenons ainsi la vitamine **totale** utilisable par *Lactobacillus arabinosus*, dont les 4/5 au minimum peuvent passer dans la boisson après extraction à l'eau bouillante (ADRIAN et NAVELLIER, 4).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Remarques générales

Les caractéristiques des torréfactions et la concentration en vitamine PP des échantillons figurent dans les tableaux I, II, III et IV, pages suivantes.

Le taux de niacine dans les cafés grillés de l'Angola se situe entre 11,8 et 24,8 mg p. 100 g de matière fraîche. Si on rapporte ces valeurs au graphique précédemment établi par ADRIAN et NAVELLIER (4), indiquant le taux de niacine en fonction de la perte de masse nette, on constate que les cafés angolais se comportent d'une façon tout à fait comparable à ceux étudiés par ces auteurs.

Par ailleurs, malgré une excellente reproductibilité de la torréfaction au cours de ces essais — si on en juge par les pertes de masse — les échantillons torréfiés offrent une variabilité notable de la teneur en niacine, la moyenne générale étant 16,27 mg p. 100 g avec un écart type de ± 3,08 mg, ce qui donne un coefficient de variation de 19 p. 100.

En conséquence, si la perte de masse constitue le principal responsable de la richesse en niacine après la torréfaction, cette donnée n'est pas le seul facteur déterminant le taux de vitamine PP du café torréfié. Nous allons précisément mettre en évidence le rôle de certains autres facteurs dans la génèse de la niacine.

TABLEAU I

Robusta — variété régionale Ambriz

Nature de l'échantillon		Caractéristiques de la torréfaction				Teneur en niacine (en mg p. 100 mat. fraîche)
Taille du grain	Qualité commerciale	Durée (en min.)	Perte de masse brute (p. 100)	Perte de masse nette (p. 100)	Gonflement apparent (p. 100)	
	SÉRIE A : *échantillons traités par voie sèche*					
Gros	première	9	17	9,5	58,7	17,0
	2e AA	8	17	9,4	65,5	17,3
	2e BB	7	17,4	10,0	54,1	19,3
Moyen	première	9,5	17,4	10,1	72,6	19,8
	2e AA	7	17,7	10,6	70,9	19,5
	2e BB	6,5	17,7	9,9	64,4	19,8
Petit	première	10	18	10,3	78,7	24,8
	2e AA	7,5	17	9,6	75,0	20,3
	2e BB	7	17	9,5	70,4	21,0
	Moyenne		*17,3*	*9,9*	*67,81 ± 7,5*	*19,87 ± 2,14*
	SÉRIE B : *échantillons traités par voie humide sans fermentation (Raoeng)*					
Gros	supérieure	8,5	15,7	10,1	65,9	13,3
	première	7	15,7	9,5	65,1	11,8
	2e AA	7,5	16	9,7	70,9	13,5
Moyen	supérieure	7	16	9,8	66,6	13,8
	première	7	16,4	10,3	72,3	15,5
	2e AA	7	15,7	10,5	72,3	13,8
Petit	supérieure	9	16	10,3	67,4	15,3
	première	8	16,4	12,3	72,3	17,0
	2e AA	9	16,4	10,1	70,2	15,8
	Moyenne		*16*	*10,3*	*69,22 ± 2,8*	*14,42 ± 1,50*

TABLEAU II

Robusta — variété régionale Amboim

Nature de l'échantillon		Caractéristiques de la torréfaction				Teneur en niacine (en mg p. 100 mat. fraîche)
Taille du grain	Qualité commerciale	Durée (en min.)	Perte de masse brute (p. 100)	Perte de masse nette (p. 100)	Gonflement apparent (p. 100)	
	SÉRIE C : *échantillons traités par voie sèche*					
Gros	supérieure	9	17,7	8,1	71,2	12,5
	première	8	17,4	7,9	68,3	12,8
	2e AA	8	17,4	7,2	63,9	12,3
Moyen	supérieure	7,5	17,4	8,1	70,5	12,3
	première	8,5	17,7	8,3	71,2	14,3
	2e AA	6,5	17,7	8,7	75,0	13,3
Petit	supérieure	8	17	7,6	71,8	14,0
	première	7,5	16,4	6,5	75,0	12,0
	2e AA	7	18	8,7	78,0	15,0
	Moyenne		*17,4*	*7,9*	*71,68 ± 3,3*	*13,17 ± 0,98*
	SÉRIE D : *échantillons traités par voie humide sans fermentation (Raoeng)*					
Gros	supérieure	10	17,4	9,8	70,0	14,0
	première	9	17	9,5	76,2	12,0
	2e AA	6,5	16,7	9	78,7	14,5
Moyen	supérieure	9,5	18	10,5	70,5	13,8
	première	10	17,7	10,1	76,2	16,3
	2e AA	7,5	16,7	9,6	83,3	13,8
Petit	supérieure	6,5	16,4	10,5	97,3	14,5
	première	7	16,7	10,1	100,0	16,0
	2e AA	7	17	9,6	89,4	12,5
	Moyenne		*17,1*	*9,9*	*82,40 ± 10,3*	*14,17 ± 1,33*

TABLEAU III

Robusta — variété régionale Cazengo

SÉRIE E : *échantillons traités par voie sèche*

Nature de l'échantillon		Caractéristiques de la torréfaction				Teneur en niacine (en mg p. 100 mat. fraîche)
Taille du grain	Qualité commerciale	Durée (en min.)	Perte de masse brute (p. 100)	Perte de masse nette (p. 100)	Gonflement apparent (p. 100)	
Gros	première	7,5	17	11,6	61,6	15,5
	2e AA	6	15,4	10,1	72,1	12,2
	2e BB	7	16,4	11,1	72,1	12,7
Moyen	première	8	16,7	10,4	69,8	16,2
	2e AA	7	15,7	9,2	74,7	14,0
	2e BB	7	15,7	9,5	81,9	14,7
Petit	première	8	16,4	10,1	76,8	17,2
	2e AA	7,5	16,7	11,2	79,2	18,4
	2e BB	6,5	15,7	9,6	81,5	17,2
	Moyenne		*16,2*	*10,35*	*74,41 ± 6,1*	*15,34 ± 2,00*

TABLEAU IV

Arabica

Nature de l'échantillon		Caractéristiques de la torréfaction				Teneur en niacine (en mg p. 100 mat. fraîche)
Taille du grain	Qualité commerciale	Durée (en min.)	Perte de masse brute (p. 100)	Perte de masse nette (p. 100)	Gonflement apparent (p. 100)	
	SÉRIE F : *échantillons traités par voie sèche*					
Gros	première	6	16,7	9,6	79,5	15,3
	2e AA	6,5	16,7	9,1	73,5	17,0
	2e BB	7	17,7	11,8	67,0	20,2
Moyen	première	6	16,7	8,7	82,5	22,0
	2e AA	6,5	17	9,5	85,5	22,7
	2e BB	6	16,7	9,9	77,2	20,5
Petit	première	6	17	10,0	84,9	18,5
	2e AA	6,5	17,4	10,2	86,0	22,3
	2e BB	6	17	9,6	90,9	21,8
	Moyenne		*17*	*9,85*	*80,78 ± 6,9*	*20,03 ± 2,44*
	SÉRIE G : *échantillons traités par voie humide avec fermentation*					
Gros	supérieure	6,5	17,4	11,2	81,1	18,7
	première	7	17	9,6	83,3	16,4
	2e AA	7,5	16,7	9,3	79,7	15,7
Moyen	supérieure	6,5	16,4	9,3	76,7	16,4
	première	7	17	9,5	77,0	17,2
	2e AA	8	16,7	9,3	80,4	17,2
Petit	supérieure	7,5	17	9,6	77,3	17,5
	première	6	16,7	9,4	80,2	16,2
	2e AA	6	16,7	9,4	79,0	16,7
	Moyenne		*16,8*	*9,65*	*79,41 ± 2,0*	*16,89 ± 0,85*

Influence des facteurs variétaux

Nous ne pouvons valablement comparer que des séries ayant subi un traitement préparatoire identique avant le grillage. C'est pourquoi nous ne retiendrons ici que les échantillons traités par voie sèche. Dans ces conditions, les facteurs raciaux se manifestent de la manière suivante :

	mg p. 100 frais	Valeur relative
	—	—
Série F : Arabica	20,03 ± 2,44	100
Série A : Robusta/Ambriz	19,87 ± 2,14	99
Série C : Robusta/Amboim	13,17 ± 0,98	66
Série E : Robusta/Cazengo	15,34 ± 2,00	77

Les teneurs du Robusta ne sont pas obligatoirement différentes de celles de l'Arabica. Mais à l'intérieur d'une espèce les facteurs variétaux peuvent provoquer des différences appréciables : les « variétés régionales » Amboim et Cazengo fournissent des cafés significativement moins riches que la « variété régionale » Ambriz.

Influence de la qualification commerciale

Ce point offre un intérêt en nutrition humaine appliquée. En effet, dans les régions tropicales où l'alimentation est basée sur le maïs, la consommation de café constitue un agent de lutte contre la pellagre (ADRIAN, 3 ; GOLDSMITH et coll., 11). Eventuellement on peut prévoir de réserver pour ces populations les cafés les plus riches en vitamine PP, surtout si ce projet était compatible avec les conditions économiques.

En fait, il semble que la qualification commerciale ne conditionne en rien la teneur en niacine. Nous illustrons cette affirmation en examinant les teneurs vitaminiques des cafés Robusta classés selon leur valeur commerciale :

Qualité commerciale :	Teneur en niacine (mg p. 100) Moyenne des séries B-C-D	Moyenne des séries A-E
Supérieure	13,7	—
Première	14,2	18,3
Seconde AA	13,8	17,0
Seconde BB	—	17,4

Influence du traitement préparatoire

Pour les cafés Robusta/Ambriz, Robusta/Amboim et Arabica, nous disposons d'une série d'échantillons ayant été préparés par voie sèche et d'une série identique ayant subi un traitement par voie humide, sans fermentation ou avec fermentation. Ces techniques préparatoires ont-elles une influence sur la teneur en niacine dans le produit après torréfaction ?

La réponse n'est pas d'une netteté parfaite :

	Préparation		
	Voie sèche	Voie humide	
		Sans fermentation	Avec fermentation
	(mg p. 100)	(mg p. 100)	(mg p. 100)
Robusta/Ambriz	19,87 (100)	14,42 (72)	—
Robusta/Amboim	13,17 (100)	14,17 (108)	—
Arabica	20,03 (100)	—	16,89 (84)

Dans deux cas sur trois, le traitement par voie sèche permet d'obtenir des taux de vitamine PP plus élevés que par une technique par voie humide avec ou sans fermentation. Le troisième cas, faisant exception, présente deux particularités : les cafés Robusta/Amboim traités par voie sèche ont une teneur en niacine faible, de plus, avant grillage ils contenaient 12,3 p. 100 d'eau contre 10,4 p. 100 dans les autres séries. Ce fait a-t-il eu une influence sur le comportement de ces cafés ? Nous ne pouvons l'affirmer.

Si l'on considère que d'une façon générale le traitement par voie sèche est plutôt favorable, cette supériorité pourrait s'expliquer de deux manières :

— ou bien les traitements par voie humide entraînent une perte sensible de trigonelline ou la rendent moins facilement convertible en niacine ;

— ou bien la pénétration de la chaleur est moins aisée dans les cafés traités par voie humide.

Nous observerons dans le paragraphe suivant une légère infériorité des grains préparés par voie humide par rapport à ceux subissant une préparation par voie sèche, ce qui confirmera la tendance enregistrée ici.

Influence de la taille du grain

A priori, la pénétration de la chaleur et la température atteinte à l'intérieur du grain pendant la torréfaction dépendent de la taille du grain : plus il sera petit, plus il accusera les effets du grillage. En conséquence, il est permis de prévoir que le taux de niacine sera fonction de la taille du grain de café. C'est ce qui apparaît ci-dessous :

Traitement par voie sèche

(Moyenne des séries A-C-E-F)

	Coeff. de gonflement apparent (p. 100)	Teneur en niacine (mg p. 100)
	—	—
gros grains	67,5 (100)	15,3 (100)
grains moyens	74,5 (110)	17,4 (114)
petits grains	79,0 (117)	18,5 (121)

Traitement par voie humide

(Moyenne des séries B-D)

gros grains	71,0 (100)	13,2 (100)
grains moyens	73,5 (103)	14,5 (110)
petits grains	82,5 (116)	15,2 (115)

En conséquence, plus le grain est petit plus son gonflement est important et plus la synthèse de niacine est intense ; ce sont là les conséquences directes d'un traitement thermique plus sévère.

Etant donné que la torréfaction adoptée pour ce travail est assez légère, on peut déduire des résultats ci-dessus que la quantité de chaleur pénétrant à l'intérieur du grain de grosse taille est insuffisante pour assurer une synthèse vitaminique dans la masse du grain.

Il est vraisemblable qu'avec des torréfactions très poussées les résultats soient différents, et peut-être même opposés si les pertes de masse enregistrées pendant la torréfaction dépassent 30 p. 100.

Quoi qu'il en soit, dans nos conditions expérimentales, la relation entre le gonflement apparent et la richesse en niacine apparaît également lorsqu'on calcule, pour chaque série, la corrélation entre les deux phénomènes. Bien que nos séries comprennent chacune un petit nombre d'échantillons, la valeur de « r » approche le seuil de signification pour quatre d'entre elles : il est égal à 0,60 pour la série A, à 0,64 pour la série B, à 0,50 pour la série C et à 0,49 pour la série F.

Cette notion précise les rapports unissant la technologie de la torréfaction et la synthèse de la niacine : si au cours du procédé la perte de masse constitue le principal facteur déterminant la synthèse de la vitamine, l'état de gonflement du grain accroît les possibilités de synthèse.

CONCLUSIONS

On savait déjà que la torréfaction s'accompagnait d'une synthèse de la vitamine PP, la perte de masse représentant un indice du taux vitaminique du café grillé.

Au cours de ce travail nous apportons les précisions suivantes relatives aux possibilités de synthèse vitaminique :

— les données botaniques sont un facteur important conditionnant le taux de vitamine PP ;

— les procédés technologiques de préparation du grain conditionnent également la richesse en niacine du café grillé, les traitements par voie sèche paraissant plus favorables que les techniques par voie humide (avec ou sans fermentation) ;

— le gonflement du grain est un facteur favorisant la synthèse de la niacine ;

— enfin, la teneur en vitamine PP est totalement indépendante de la qualité commerciale des échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMO (G.). — *Boll, soc. ital. biol. sper.*, 1955, **31**, 79.
2. ADRIAN (J.). — Le dosage microbiologique des vitamines du groupe B. — Paris 1959, Cahier Technique du CNERNA, C. N. R. S. éditeur.
3. ADRIAN (J.). — *Café, cacao, thé*, 1963, **7**, 359.
4. ADRIAN (J.), NAVELLIER (P.). — *Café, cacao, thé*, 1961, **4**, 263.
5. BODDEKER (H.), MISHKIN (A. R.). — *Anal. chem.*, 1963, **35**, 1662.
6. BRESSANI (R.), FIESTER (D.), NAVARRETE (D. A.), SCRIMSHAW (N.). — *Food. technol.*, 1961, **15**, 306.
7. BRESSANI (R.), GOMEZ-BREMES (R.), CONDE (R.). — *Arch. venezue. nutric.*, 1962, **12**, 93.
8. BRESSANI (R.), NAVARRETE (D. A.). — *Food. res.*, 1959, **24**, 344.
9. CRAVIOTO (R. O.) GUZMAN (J. G.), SUAREZ (M. L. S.). — *Ciencia*, 1955, **15**, 24.
10. DAUM (M. G.), — *Arc. venezue. nutric.*, 1959, **6**, 61.
11. GOLDSMITH (G. A.), MILLER (O. N.), UNGLAUB (W. G.), KERCHEVAL (K). — *Proc. soc. exp. biol. med.*, 1959, **102**, 579.
12. HUGHES (E. B.), SMITH (R. F.). — *J. soc. chem. id.*, 1946, **65**, 284.
13. KREHL (W. A.), STRONG (F. M.), ELVEHJEM (C. A.). — *Ind. eng. chem. anl. ed.*, 1943, **15**, 471.
14. Regulamento para a classificação dos cafés portugueses (Portaria, nº 17335) Lisboa, 1959.
15. SANTOS MOTA (J. M.), DE ABREU (M. L.). — *O Médico*, 1964, nº 679, 1.
16. TEPLY (L. J.), KREHL (W. A.), ELVEHJEM (C. A.). — *Arch. biochem.*, 1945, **6**, 139.
17. TEPLY (L. J.), PRIER (R. F.). — *J. agric. food chem.*, 1957, **5**, 375.
18. NAVELLIER (P.), BRUNIN (R.). — Premier Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, 1963, 90.

ADRIAN (J.), FRANGNE (R.), XABREGAS (J.), SANTOS (A. CORTE DOS). — **Teneur en vitamine PP des cafés grillés de l'Angola. Rôle des facteurs botaniques et technologiques.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin, 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 427-435, fig., tabl., réf.

On savait déjà que la torréfaction du café vert s'accompagnait d'une synthèse de la vitamine PP, la perte de masse représentant un indice du taux vitaminique du café grillé. Cependant, d'une façon générale, le rôle ou l'importance de nombreux facteurs botaniques ou technologiques n'est pas définie. La plupart des travaux ont porté sur des échantillons dont l'origine, les traitements préparatoires et la qualité commerciale n'ont pas été définis.

ADRIAN (J.), FRANGNE (R.), XABREGAS (J.), SANTOS (A. CORTE DOS). — **Vitamin PP content of Angolan roasted coffees. Part played by botanical and technological factors.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 427-435, fig., tabl., réf.

It is known that coffee roasting is followed by the synthesis of the vitamin PP. The loss of weight represents the index of the vitamin content in the roasted coffee.

However, the influence of many botanical or technological factors is not established. In fact, most test have been carried out on coffee samples, the

ADRIAN (J.), FRANGNE (R.), XABREGAS (J.), SANTOS (A. CORTE DOS). — **Der Gehalt an Vitamin PP der Röstkaffees von Angola. Rolle der botanischen und technologischen Faktoren.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 427-435, tabl., réf.

Man wusste schon, dass die Röstung von Rohkaffee eine Synthese des Vitamins PP mit sich bringt, wobei der Masseverlust ein Kennzeichen des Vitamingehalts des gerösteten Kaffees darstellt. Im allgemeinen jedoch ist die Rolle oder die Bedeutung von zahlreichen botanischen oder technologischen Faktoren nicht geklärt. Die meisten der Untersuchungen betrafen Proben deren Herkunft, Vorbehandlung und Handelseigenschaften nicht definiert wurden.

Dans quelle mesure ces facteurs peuvent-ils influencer la synthèse de la vitamine PP lors de la torréfaction ? Telle est la question que les auteurs ont voulu étudier à l'aide de nombreux échantillons de café d'Angola — Arabica et Robusta (Ambriz, Amboim et Cazengo) preparés par voie sèche et par voie humide — parfaitement identifiés et dont la torréfaction a été soigneusement définie.

Au cours de ce travail les précisions suivantes, relatives aux possibilités de synthèse vitaminique, ont été apportées :

a) Les données botaniques sont un facteur important conditionnant le taux de vitamine PP ;

b) Les procédés technologiques de préparation du grain conditionnent également la richesse en niacine du café grillé, les traitements par voie sèche paraissant plus favorables que les techniques par voie humide (avec ou sans fermentation) ;

c) Le gonflement du grain est un facteur favorisant la synthèse de la niacine ;

d) Enfin, la teneur en vitamine PP est totalement indépendante de la qualité commerciale des échantillons.

origin, preparation and commercial quality of which not beeing defined.

All these aspects were studied in defined samples of Angolan coffee — Arabica and Robusta (Ambriz and Amboim and Cazengo) — prepared by natural drying and in washed and fermented coffees, roasted at a known degree.

It was possible to draw the following conclusion :

a) The botanical data are an important factor conditioning the vitamin PP content ;

b) The field processing of coffee also influences the niacin content in roasted coffee ; it seems that coffee prepared by the dry methods possesses a higher content than washed or fermented coffees ;

c) The increase in volume of the bean through roasting helps the niacin synthesis ;

d) The content in vitamin PP is completely independent from commercial qualities of the coffee.

In welchem Masse können diese Faktoren die Synthese des Vitamins PP bei der Röstung beeinflussen ? Die Autoren suchten eine Antwort auf diese Frage indem sie zahlreiche nass und trocken aufbereitete Arabica und Robusta (Ambriz, Amboim, Cazengo) Kaffeemuster aus Angola, die vollkommen identifiziert und deren Röstung sorgfältig definiert worden war, untersuchten.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde folgende, die Möglichkeit einer Vitaminsynthese betreffende Angaben gemacht :

a) die botanischen Daten stellen einen wichtigen, den Prozentsatz an PP Vitamin bedingenden Faktor dar ;

b) die technologischen Herstellungsverfahren der Bohne bedingten ebenfalls den Gehalt an Niacin des Röstkaffees, wobei die trockene Aufbereitung günstiger scheint als die Technik der nassen Aufbereitung (mit oder ohne Fermentierung) ;

c) das Blähen der Bohnen fördert die Synthese des Niacin ;

d) Der Gehalt an Vitamin PP ist völlig unabhängig von der Handelsgüte der Muster.

DISCUSSION

M. WOODMAN : Vous nous avez montré que les teneurs en vitamine PP des cafés Robusta variaient selon leur origine ; est-ce que les régions de ces prélèvements présentent des caractéristiques géographiques ou agronomiques ; considérablement différentes ?

M. ADRIAN : Je vais passer la parole à M. Corte Dos Santos qui est un technicien, appartenant à l'Institut du café d'Angola, mieux à même de vous répondre que moi, qui suis nutritioniste.

M. CORTE DOS SANTOS : Les variétés régionales Ambriz, Cazengo et Amboim appartiennent au C. robusta. *Elles se différencient sous l'influence de facteurs écologiques locaux. On les dénomme « variétés régionales » étant donné que leurs caractéristiques ne se maintiennent que si elles sont cultivées dans leurs régions d'origine.*



M. CORTE DOS SANTOS

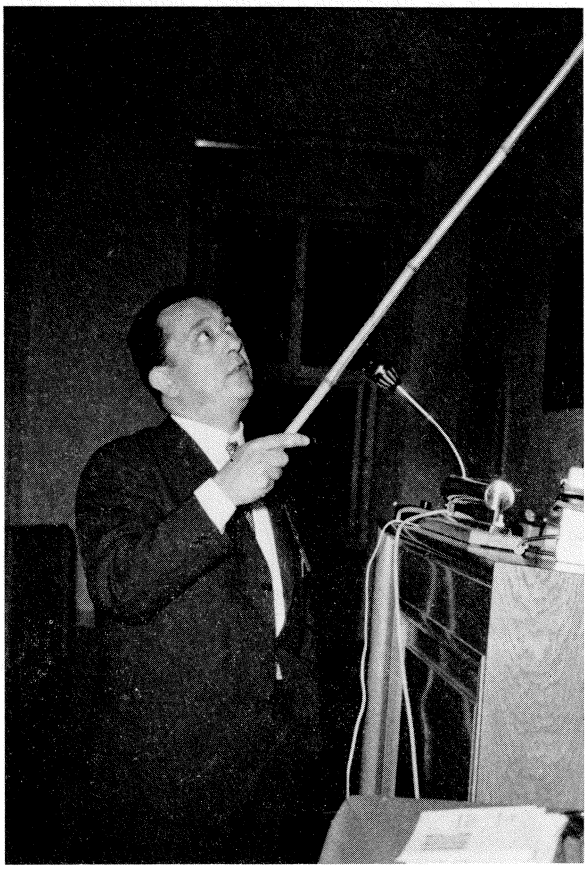
M. d'ORNANO : Chaque détermination de vitamine PP a-t-elle été unique, ou le chiffre mentionné est-il la moyenne de plusieurs répétitions ?

M. ADRIAN : Nous avons procédé à des prises en double, de l'ordre de 2 ou 3 g, sur une poudre homogénéisée et nous avons fait deux dosages. Je pense que chaque résultat a un écart type de l'ordre de 3 %.

GAS-VOLUMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE INTERNAL NON-ODOROUS ATMOSPHERE OF COFFEE BEANS

C. E. BARBERA
Istituto di Industrie Agrarie Università di Bologna

It is known since long that a rather large amount of odorless gases — namely, carbon dioxide, carbon oxide, nitrogen and oxygen — occurs in the roasted coffee bean. The available information about them, however, is meager and often conflicting as it has been already discussed in a previous communication where the pertinent literature has been reviewed (1).



The need of a satisfactorily deeper knowledge of the internal non-odorous atmosphere of the coffee bean is justified by a number of considerations of both basic and applied nature as it will be briefly exemplified later on in this paper.

Unfortunately, with the exception of two cases (2,3) in which, however, no experimental detail has been reported, a direct determination of the internal non-odorous atmosphere of the coffee bean seems to have never been attempted. Detailed procedures and data are given by CARTWRIGHT (4,5) but they are limited to the analysis of the odorless gases accumulated in the headspace of various kinds of coffee containers. All the other works performed on such important constituents of coffee are simply comparative measurements of the pressure developed after a certain time by samples of ground coffee each sealed in a separate container-manometer assembly (6,7).

Besides the fact that pressurimetric data cannot be converted into absolute volumetric figures, such pressurimetric methods are not advisable for most comparative investigations either. The reasons are :

1) the time to reach pressure equilibrium between the inside and outside of the whole beans is so long to be impractical ;

2) the composition of the bean gases may change during the time required to attain pressure equilibrium ;

3) the large number of bulb-manometer assemblies necessary to conduct a thorough investigation would result extremely expensive and space consuming.

By grinding the beans in an ermetically enclosed system it would have been possible to collect quickly a representative sample of their internal atmosphere. This partial solution of the problem, however, was also rejected *a priori* owing not only to the fact that such a system is difficult to realize with a minimum of dead space but, also, to the fact that the free space among coffee beans is rather large.

Gas-volumetric methods reported in the literature for determining gases in food products (8, 9, 10) cannot be resorted to for they are limited to fluid or fluidizable products or to carbon dioxide.

According to the methods frequently employed in plant physiology for investigating the internal atmosphere of tissues, oxygen and nitrogen are extracted by repeatedly subjecting the tissues to a high vacuum (11), whereas carbon dioxide is displaced by refluxing a separate sample under alcohol or water and is carried into a barium hydroxide solution by a stream of carbon dioxide-free air (12, 13). Neither such methods nor their successive modifications involving the use of alkali and acids (14) can be used for coffee.

The principle of displacing carbon dioxide by means of hot water appeared to be quite extensible to all the other coffee gases provided that an apparatus and procedure could have been developed in order to :

1) accomplish the complete removal of air before displacing the gases from coffee ;

2) keep as low as possible the amount of displacing water so that carbon dioxide can be recovered in a reasonably quantitative extent ;

3) work equally well for coffees both with a high gaseous content (for instance, freshly dark-roasted coffee) and a low gaseous content (for example, ground coffee, aged coffee or raw coffee) ;

4) allow a rapid determination on a single sample of both the total volume and composition of its odorless gases ;

5) be cheap.

Orientative experiments showed that, by introducing some modifications, the apparatus and procedure given by TREADWELL (18) for the determination of gases in mineral waters satisfy the above mentioned requisites. The method below described has been developed on this basis.

DESCRIPTION OF THE METHOD

Apparatus

The apparatus consists essentially of a system for displacing the gases from coffee and a gas buret for collecting and measuring them (fig. 1 and 2, next page).

Components of the former are a displacement flask and an evacuation bulb. The displacement flask (P), capacity 100-ml, communicates with a mercury reservoir through a side arm (E) and a vacuum rubber tubing. The rubber tubing is equipped with a hosecock. P is surrounded by a glass jacket (M) for steam heating, (T) and (C) being the steam inlet and condense outlet respectively.

P is closed by means of a rubber stopper (G) bearing a pyrex evacuation bulb (B). The bulb has an anti-spray glass disk (A) and two diametrically opposite glass tubings. The upper tube (Q) is bent at 90° ; the lower tubing (I) extends into and can slide up and down through G. The gas tightness of the system is secured by proper lubrication (for example, with glycerol or, even better, silicone grease).

The gas buret is of the Schellbach type, 100-ml capacity, .2-ml subdivision, with a three-way stopcock (Y). The buret is connected to a leveling bulb and can be water refrigerated.

Connection bewteen the displacement system and the gas buret is accomplished by means of a short length of vacuum rubber tubing permanently fastened to the end of Q.

Of course, the apparatus can be integrated by any of the well known gas analysers. In a recent paper by LOPEZ (17), for instance, specifications are given for the gas-chromatographic analysis of headspace gas in canned foods. In our studies we are employing a 4-pipet Orsat unit connected to the gas outlet capillary (W) of the buret.

Reagents

Water to be used for displacing the gases from coffee is boiled in a flask for 30 minutes while a stream of carbon dioxide-free air is bubbled through it. Carbon dioxide-free air is obtained by drawing air through at least three efficient gas-washing bottles containing 50 % KOH. The flask is then equipped with a rubber stopper bearing a soda lime tube and a siphon. Water is cooled down to room temperature before use.

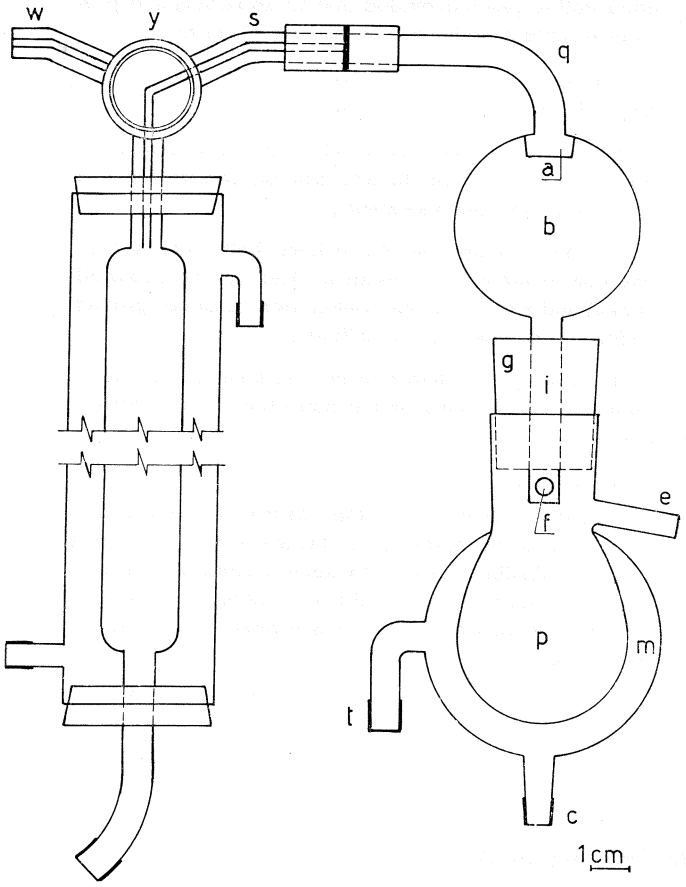


Fig. 1. — *Details of apparatus for determining internal odorless atmosphere of coffee*

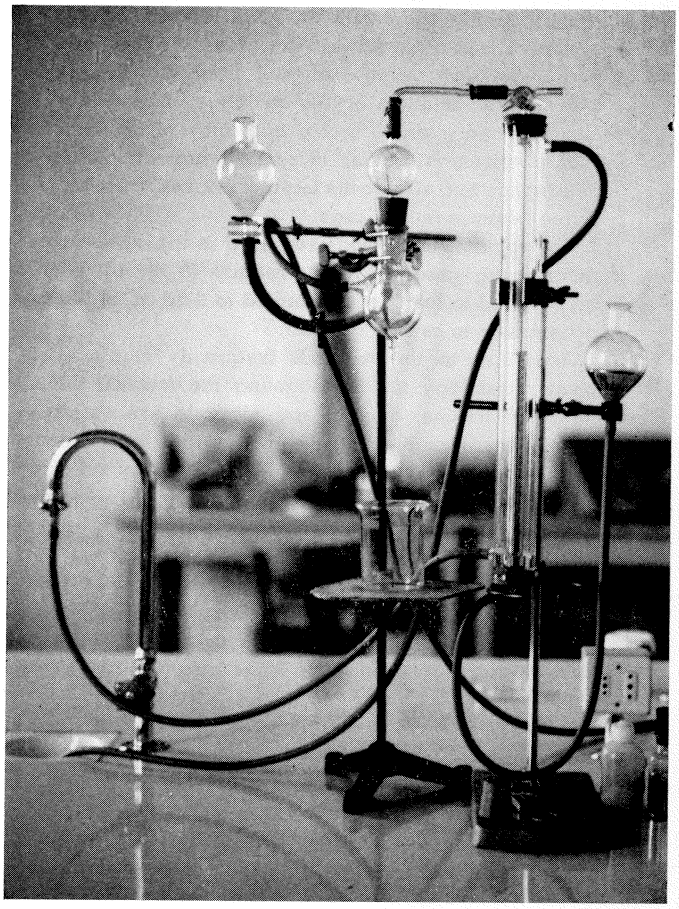


Fig. 2. — *Apparatus for determining the internal odorless gases of coffee*

Procedure

Evacuation bulb B is disconnected from both P and S. Tap water or, much better, water thermostated at the calibration temperature of the buret is circulated. If also gas composition is sought, the gas analyser is connected to W and air is drawn off from the absorption pipets in the customary way.

To remove the air from the gas buret its leveling bulb is raised slowly and when mercury starts dropping out from S, Y is closed by turning to the right. Now, the mercury reservoir connected to P is raised slowly and when mercury arrives in E to about one centimeter from the neck of P the rubber tubing is closed tightly by means of the hosecock.

Bulb B (which is still disconnected from P and S) is filled by immersing F in a beaker containing about 100 ml water and by aspirating from the end of Q. When B is half filled G is slid down to close F.

Weighed coffee (from about 8 gr for freshly dark-roasted coffee up to 30 gr for raw coffee or aged coffee or ground coffee) is introduced into P and added of about 60 ml water taken from a previously measured amount, say 100 ml. To remove the few air bubbles sticking to their surface or entrapped in their centre cuts the beans are stirred with a glass rod for a few seconds. In the case of ground coffee the temperature of water must not be higher than 2 or 3° C for, otherwise, gas displacement takes place immediately.

More water is poured into P and when it almost overflows the flask brim, P is immediately stopped with G, I being slid down at the same time in order to allow excess water to rise into B and no air remain entrapped in P. Soon after B is pulled back to reclose F. The volume and temperature of the water introduced in P is recorded.

P is now clamped at such a height that the end of the rubber tubing fastened to Q be at the same level and at a few millimeters from S. Water in B is gently heated

with a gas burner and kept boiling for three minutes in order to expel all the air and preheat the end of capillary S. While steam is still coming out from the end of Q, S is introduced into the rubber tubing and is fastened. B is lowered a little to communicate with P through F and the steam heating is started.

The buret leveling bulb is placed at about 75 cm below the level of S and Y is cautiously turned to the left to let displaced gases be collected in the buret. Usually after 60 minutes all the coffee beans have sunk to the bottom of P and contain no more gas. To check whether gas displacement is over, Y is closed, the gas volume is read after leveling and Y is opened again after having placed the leveling bulb in its former position. Readings are repeated at ten minute intervals and when the difference between two successive readings is not higher than .2 ml heating is stopped. All the gases occuring in B are displaced into the buret by allowing mercury to flow slowly into P, which is accomplished by cautiously releasing the hosecock placed between E and the mercury reservoir. Water is pushed upwards by mercury and, in turn, it pushes out the gases from B. When water arrives to Y, this is closed and the total volume of gas is read in the customary way.

The volume found is brought to normal pressure and temperature by the well known equation :

$$V_0 = \frac{V_t(P^o - W_t)\,273}{760\,(t + 273)} = 0{,}359\,\frac{V_t(P^o - W_t)}{t + 273}$$

where t = temperature of refrigerating water,
V = volume of gas,
W = water vapour tension,
$P^o = P_t - t/8$.

The volume so calculated is finally corrected for the air dissolved in the known amount of water used for displacing the gases from coffee and for the volume of the non graduated part of the buret.

Recovery of mercury

The content of P is poured into a Buchner funnel, the mercury and colored water being collected in a beaker. Water is decanted and mercury is washed with water. After decanting, last traces of water are removed by stirring small pieces of filter paper into the mercury. Same procedure can be followed to remove the blackish layer building up on the mercury of the buret after a certain number of determinations.

For less accurate and/or multiple determinations the rather expensive mercury can be replaced — for the buret at least — by a 20 % sodium sulfate solution containing 5 % of sulfuric acid. CO_2 solubility in such confining liquid is 0.263 ml/ml at 25° C and 760 mm (15).

Sources of errors

Experimental errors frequently encountered in this kind of analysis are imputable to leaks in the apparatus, inaccurate leveling of mercury, and/or erroneous readings. After a few determinations, however, these sources of errors are easily eliminated.

Coffee odorless gases are, as said, mainly CO_2, CO, N_2 and O_2. The solubility of the last three gases in hot water is so low that under the operating conditions of the present method their displacement from coffee and recovery can be assumed as quantitative. Also coffee volatiles are displaced, but their volume is negligible.

Possible sources of errors restrict, therefore, to carbon dioxide for the following reasons :

— Carbon dioxide cannot be removed completely from water even under reduced pressure (18). As it will be reported elsewhere in connection to the general applicability of the present method to other food products, recovery experiments on carbon dioxide evolved by acidifying known amounts of sodium carbonate show that a reasonable accuracy can be attained.

— According to BREDT (16) the wetting of roasted coffee causes the development of additional amounts of carbon dioxide. This statement seems not to be true since the composition of water-displaced coffee gases shows to be identical to that of the gases released by grinding coffee in a helium atmosphere.

CONCLUSIONS

The purpose of the present communication has been that of submitting a method for determining non-odorous gases in coffee to the attention of those who may be interested in its use and find it adaptable — with or without modifications — to their own specific purposes.

Before closing, however, it may result interesting to point out some of the problems to the solution of which a better knowledge of the internal non-odorous atmosphere of coffee might contribute. They may range :

— from gas permeability studies on coffee cell membrane to foaming problems in freeze-concentration of coffee extracts ;

— from the investigation on the influence of pressure inside the bean upon aroma development to aroma recovery problems in soluble processing ;

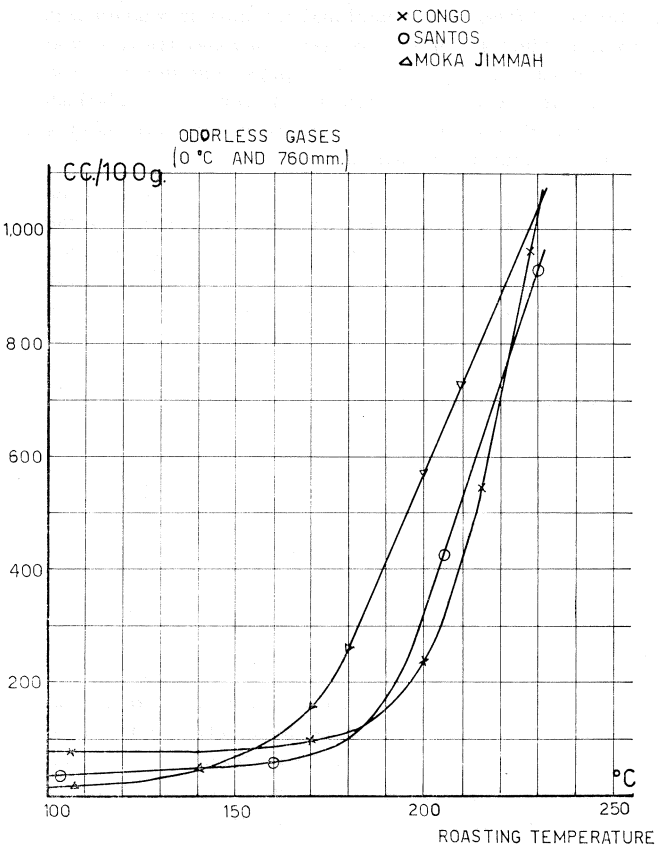


Fig. 3. — *Gaseous content of coffee at various temperatures*

— from the evaluation of roasting equipment and variables to problems of weight loss of roasted coffee during storage ;

— from the design of proper cooling equipment to experiments in raw coffee conditioning ;

— from the selection of suitable rigid containers for roasted whole beans to calculation of degasing time for flexible pouches packaging, etc..

Figure 3 shows the gaseous content of three different coffees roasted under identical conditions. It can be seen, for instance, that while at 100° C the gaseous content of Moka is about 25 % of that of Congo, at 155° C

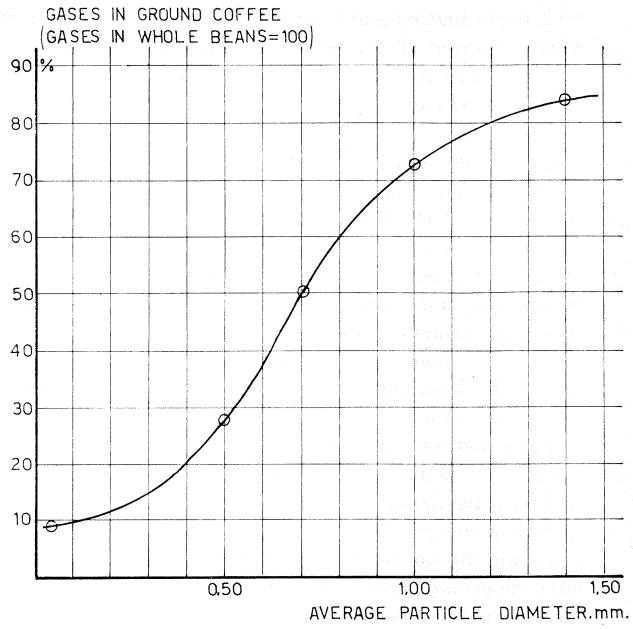


Fig. 4. — *Loss of odorless gases upon grinding*

it is the same, at 195 °C it is more than twice as much, and at the end of roasting it is only a little higher. Figure 4 shows the gaseous content of ground coffee (expressed as percent of the original gaseous content of whole beans) against the average diameter of its particles. By extrapolation, for instance, it can be predicted that coffee ground to subcellular particle size still contains 8 % of the whole bean original gases.

Of course, these data cannot give useful information if they are not correlated to other sets of data such as those pertaining to roasting time, roasting loss, composition, volume development, etc. Figures 3-4 are to be considered, therefore, merely as examples of the order of magnitude of coffee internal odorless atmosphere.

The results of a systematic investigation on the development and behaviour of the internal atmosphere of coffee in some of the various operations involved in regular, soluble and caffeine-free coffee processing will be reported in the future.

LITERATURE

1. BARBERA, C. E. — « I gas inodori del caffé tostato. Parte I. Importanza ed attuali conoscenze », *Industrie agrarie*, V, 541-544 (1967).
2. BLACK, J. W. — « Freshly ground coffee and blown tins », *Analyst*, 51, 403-404 (1926).
3. CARRASCO, O. — « Packing of ground coffee », *Food*, 2, 312-314 (1933).
4. CARTWRIGHT, L. C. — « Measurement and analysis of gases in vacuum-packed food containers », *Ind. Eng. Chem.*, An. Ed., 18, 779-785 (1946).
5. CARTWRIGHT, L. C., and SNELL, C. T. — « Gases from roasted coffee », *The Spice Mill*, 70, no. 2, 16, 26 ; no. 3, 16, 24 (1947).

6. PUNNETT, P. W., and EDDY, W. H. — « What flavor measurement reveals about keeping coffee fresh », *Food Industries*, 2, 401-404 (1930).
7. ROSELIUS, H. D. — « New coffee packing process based on use of venting closures », *The glass packer*, 14, 107-108 (1935).
8. LOEFFLER, H. J. — « Determination of air in citrus juices », *Ind. Eng. Chem.*, An. Ed., 12, 9, 533-534 (1940).
9. SHEETS, E. H., and LOPEZ, A. — « Apparatus for determining dissolved and dispersed gas content of food », *Food Technology*, 16, 1, 64-69 (1962).
10. PULLEY, G. N., and von LOESECKE, H. W. — « Gases in the commercial handling of citrus juices », *Ind. Eng. Chem.*, 31, 10, 1275-1278 (1939).
11. MAGNESS, J. R. — « Composition of gases in intercellular spaces of apples and potatoes », *Bot. Gaz.*, 70, 308-316 (1920).
12. WILLAMAN, J. J., and BROWN, W. R. — « Carbon dioxide dissolved in plant sap and its effects in respiration measurements », *Plant Physiology*, 5, 535-542 (1930).
13. GERHARDT, F. — « Simultaneous measurement of carbon dioxide and organic volatiles in the internal atmosphere of fruits and vegetables », *J. Agr. Res.*, 64, 207-219 (1942).
14. DENNY, F. E. — « Gas content of plant tissue and respiration measurements », Contr. Boyce Thompson Inst. for plant research, 14, 257-276 (1946).
15. KOBE, K. A., and WILLIAMS, J. S. — « Confining liquids for gas analysis », *Ind. Eng. Chem.*, An. Ed., 7 (1), 37-38 (1935).
16. BREDT, C. — « Where does the gas in roasted coffee come from ? », *Food Industries*, 6, 348-349 (1934).
17. LOPEZ, A., and KREBS, B. S. — « Determining the headspace gas composition in canned foods », *Food Technology*, 21, 3A, 365-371 (1967).
18. TREADWELL, F. P. — Chimica analitica, vol. II, Milano, 1949.

BARBERA (C. E.). — **Méthode volumétrique de mesure des gaz pour la détermination des gaz inodores inclus dans les grains de café.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 436-442, fig., réf.

Malgré son importance, l'atmosphère inodore interne des grains de café est encore mal connue.

L'A. décrit une méthode volumétrique qui permet de déterminer rapidement une telle atmosphère : les gaz sont extraits des grains par l'eau chaude dans un milieu anaérobie.

BARBERA (C. E.). — **Gas-volumetric method for the determination of the internal non-odorous atmosphere of coffee beans.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C., (Paris), 1968, p. 436-442, fig., réf.

Despite its importance, the internal non-odorous atmosphere of coffee beans is known very little. The method here described allows the rapid determination of such atmosphere, the gases being displaced from the beans by means of hot water and in the absence of air.

BARBERA (C. E.). — **Massanalytische Gasmessungsmethode für die Bestimmung des in der Kaffeebohne enthaltenen geruchlosen Gases.** Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, 2-9 juin 1967. A. S. I. C. (Paris), 1968, p. 436-442, fig., réf.

Trotz ihrer Bedeutung ist die innere geruchlose Atmosphäre der Kaffeebohnen noch wenig bekannt.

Es wird eine massanalytische Methode beschrieben, die eine rasche Bestimmung einer solchen Atmosphäre ermöglicht : die Gase werden durch warmes Wasser in einem anaerobischen Milieu aus den Bohnen extrahiert.

DISCUSSION

M. PYPKER : May be I missed something in your lecture, so I should like some more information about a certain stage in your procedure : after you have filled the balloon with coffee, you add cold water (2 °C). Aren't there some gases dissolved in this water that are driven off after heating it ?

M. BARBERA : Yes certainly, that is why the measure must be corrected for the air introduced with the water in the displacement flask, as I mentioned.

M. WOOTTON : Has Dr Barbera observed the occurrence of free hydrogen in samples of green coffee beans ? I say this because hydrogen has been observed to be evolved during the fermentation of arabicas in E. Africa. It probably results from microbiological attack upon simple sugars and might well survive in dried and stored green coffee.

M. BARBERA : Actually we have not yet made any analysis of the gases displaced from green coffee.

M. LOCKHART : Dr Barbera's presentation touched on the edge of two important topics existing in the United-States that have not yet been solved. The first concerns the packaging of roasted and ground coffee in flexible film. Unfortunately the fresher the coffee the greater the amount of gas contained in coffee. This contributes to swelling of packages which are not acceptable to the consumer. The alternative is the packaging of gas-free or « stale » coffee. The second problem is found in the automatic preparation of beverage. Brews are prepared in enclosed cylinders usually. Fresh coffee yields large amounts of gases causing back pressures in the cylinders and consequent failures. Again the solution has been the use of gas-free or « stale » coffee. In both cases the consumer receives coffee which is not at the peak of quality as related to aromatic content. We would hope that better methodology for the study of gases in coffee will lead to a solution of these problems.

M. BARBERA : I agree with Dr Lockhart.

Imprimé en France. — Imprimerie JOUVE, 12, rue de Tournon, PARIS (6e). — 5-1968
Dépôt légal : 2e trimestre 1968