



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Validierung eines Fragebogens zur Abschätzung der Coffeinexposition
der österreichischen Bevölkerung

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Andrea Färbinger
Studienrichtung /Studienzweig Ernährungswissenschaften
(lt. Studienblatt):
Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Wien, im September 2010

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Jürgen König, der es mir ermöglicht hat, eine so interessante und herausfordernde Diplomarbeit zu verfassen, und mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Weiters möchte ich mich bei den MitarbeiterInnen des Institutes bedanken, besonders bei Patrick Auernigg, der mich bei technischen Angelegenheiten unterstützte, sowie bei Elisabeth Rudolph und Martina Köberl, an die ich mich bei Fragen wenden konnte.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, die mich während meines Studiums immer motiviert und unterstützt haben.

Den größte Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern die mir immer beiseite gestanden sind, stets an mich geglaubt und mir mein Studium ermöglicht haben sowie meinen beiden Brüdern.

Meinem Freund, Peter Karner, danke ich für seine Unterstützung, sein Verständnis und seinen Rat in allen Phasen meines Studiums.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	III
III.	Tabellenverzeichnis.....	IV
1.	Einleitung.....	1
2.	Literaturübersicht.....	3
2.1.	Coffein	3
2.1.1.	Kaffee	4
2.1.2.	Colanuss	5
2.1.3.	Guarana	5
2.1.4.	Schwarzer Tee.....	5
2.1.5.	Grüner Tee	6
2.1.6.	Maté	6
2.1.7.	Kakaobohnen	6
2.2.	Paraxanthin.....	7
2.3.	Entcoffeinierung von Kaffee.....	7
2.4.	Synthese von Coffein	8
2.5.	Absorption von Coffein	10
2.5.1.	Wirkung im Körper	11
2.6.	Ausscheidung des Coffein	13
2.7.	Cytochrom P450	15
2.8.	Speichelkonzentrationen	15
2.9.	Festphasenextraktion.....	16
2.10.	Analyse von Coffein	18
2.11.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	19
2.12.	Coffein Assesment Tool (CAT).....	20
2.13.	Salivette®.....	20
3.	Material und Methoden.....	22
3.1.	Chemikalien und Geräte.....	22
3.2.	Etablierung der Methode zur Analyse von Coffein	25
3.2.1.	Herstellung der Standardlösungen Coffein	26

3.2.2.	Herstellung der Standardlösung Paraxanthin.....	28
3.2.3.	Herstellung eines internen Standard	29
3.2.4.	Probenbereitung mittels Festphasenextraktion	30
3.3.	Wiederfindung	31
3.4.	Validierung der Methode	31
3.5.	Statistik	32
4.	Coffein in Lebensmittel	34
4.1.	Analyse der coffeinhältigen Getränke.....	34
4.1.1.	Aufbereitung von Colagetränken und Eistee	34
4.1.2.	Aufbereitung von Energiedrinks	34
4.1.3.	Aufbereitung von Kaffeegetränken.....	34
4.1.4.	Aufbereitung von Schokolade.....	35
4.1.5.	Aufbereitung von Kaffeejoghurts	35
4.1.6.	Aufbereitung von Tee	35
4.2.	HPLC Bedingungen der Analyse.....	36
5.	Erhebung des Kaffeekonsums der Probanden.....	37
5.1.	Probenaufbereitung der Speichelproben	38
6.	Ergebnisse.....	40
6.1.	Ergebnisse Lebensmittel	40
6.2.	Ergebnisse Speichelproben	47
6.3.	Ergebnisse Fragebogen	50
6.4.	Ergebnisse Tagesprotokolle	51
6.5.	Beschreibung der Stichprobe	54
6.6.	Ergebnisse Coffeinaufnahme laut Fragebogen	54
6.7.	Verlauf der Coffeinkonzentration einzelner Probanden	58
7.	Diskussion und Schlussfolgerung	62
8.	Zusammenfassung.....	65
9.	Summary.....	66
10.	Literaturverzeichnis.....	67
11.	Anhang	

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Coffein und Derivate.....	3
Abbildung 2	Paraxanthin.....	7
Abbildung 3	Synthese von Coffein.....	9
Abbildung 4	Synthese nach Traube	10
Abbildung 5	Die Hauptabbauwege des Coffein.....	13
Abbildung 6	Abbau des Coffeins.....	14
Abbildung 7	Arbeitsablauf bei Anwendung einer Festphasenextraktion	18
Abbildung 8	Salivette®.....	21
Abbildung 9	Abbildung Schema einer HPLC-Anlage.....	24
Abbildung 10	Gradient während Analyse.....	26
Abbildung 11	Ausgleichsgerade Coffein.....	28
Abbildung 12	Ausgleichsgerade Paraxanthin	29
Abbildung 13	0,5ppm Coffein Standard, 100ppm interner Standard	30
Abbildung 14	Chromatogramm Coca Cola.....	45
Abbildung 15	Chromatogramm Red Bull Energiedrink	45
Abbildung 16	Chromatogramm Verlängerter	46
Abbildung 17	ChromatogrammSpeichelkonzentration Proband 1	49
Abbildung 18	Vergleich Fragebogen und Protokolle Frauen	52
Abbildung 19	Vergleich Fragebogen und Tagesprotokolle Männer.....	52
Abbildung 20	Korrelation des Fragebogen und der Tagesprotokolle.....	53
Abbildung 21	Korrelation zwischen Fragebogen und Speichelkonzentration.....	55
Abbildung 22	Korrelation zwischen Tagesprotokolle und Speichelkonzentration...	55
Abbildung 23	Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 1.....	58
Abbildung 24	Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 4.....	59
Abbildung 25	Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 31.....	59
Abbildung 26	Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 33.....	60
Abbildung 27	Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 50.....	61

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Trennmechanismen	17
Tabelle 2	Coffeinkonzentration in Standardlösungen.....	27
Tabelle 3	Paraxanthinkonzentration in Standardlösung.....	28
Tabelle 4	Konditionierung SPE	31
Tabelle 5	Wiederfindungsrate von Coffein.....	31
Tabelle 6	10-er Bestimmung von CocaCola	32
Tabelle 7	10-er Bestimmung Standard und interner Standard.....	32
Tabelle 8	Konditionierung der SPE	39
Tabelle 9	Coffeinkonzentration im Kaffee	40
Tabelle 10	Coffeinkonzentration in Colagetränken	41
Tabelle 11	Coffeinkonzentration in Energiedrinks	42
Tabelle 12	Coffeinkonzentration in Eistees	42
Tabelle 13	Coffeinkonzentration in Kaffeegetränke.....	43
Tabelle 14	Coffeinkonzentration in Tees.....	43
Tabelle 15	Coffeinkonzentration in Kaffeejoghurts	44
Tabelle 16	Coffeinkonzentration in Schokolade.....	44
Tabelle 17	Coffeinkonzentrationen im Speichel.....	48
Tabelle 18	Paraxanthinkonzentration im Speichel.....	48
Tabelle 19	Coffeinaufnahme in mg/Tag des Fragebogens	50
Tabelle 20	Coffeinaufnahme in mg/Tag des.....	51
Tabelle 21	Statistische Auswertung nach Pearson.....	56
Tabelle 22	Statistische Auswertung nach Pearson.....	56
Tabelle 23	Statistische Auswertung nach Spearman-Rho	57
Tabelle 24	Statistische Auswertung nach Spearman-Rho	57

1. Einleitung

1.1. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Coffein ist ein weltweit verbreiteter Inhaltsstoff der in über 60 verschiedenen Pflanzenspezies vorkommt und gehört zu der Gruppe der Methylxanthine.

Das Coffein ist nicht nur in Kaffeebohnen und Kaffee zu finden, sondern auch in einer Vielzahl anderer Pflanzen. Neben Kaffee enthalten auch Tee, Eistee, Colagetränke und sogar Schokolade Coffein.

Aufgrund der Vielzahl der Anbieter variiert auch der Gehalt des Coffeins des jeweiligen Getränkes. Zur Abschätzung der Coffeinaufnahme der Österreicher mussten somit als erstes die coffeinhaltigen Getränke erfasst und analysiert werden, um einen Überblick zu bekommen.

Eine Methode, um die Coffeinaufnahme feststellen zu können, war nötig. Das sogenannte Coffein Assesment Tool. Dies ist ein Fragebogen aus dem Englischen der schon dafür verwendet wurde, die Coffeinaufnahme bestimmter Personengruppen (in diesem Fall Schwangeren) abzuschätzen. Um diesen auch im deutschsprachigen Raum verwenden zu können, musste dieser übersetzt werden und an unsere Produktpalette angepasst werden.

Mit Hilfe dieses Fragebogens soll die Coffeinaufnahme der Österreicher abgeschätzt werden. Um dessen Richtigkeit festzustellen sollte er mittels verschiedener Methoden überprüft werden.

Der Coffeingehalt unterschiedlicher Lebensmittel musste herausgefunden werden, um mit Hilfe dieser Daten die tägliche Aufnahme des Coffeins abzuschätzen.

Es sollten unterschiedliche Methoden zur Validierung des Fragebogens herangezogen werden.

Auf der einen Seite sollte von den Probanden ein 3-Tages-Ernährungsprotokoll geführt werden, der Fragebogen ausgefüllt werden, der die Coffeinaufnahme in einem Monat abschätzen sollte.

Zur Absicherung sollten Speichelproben von den Probanden genommen werden um die Konzentration des aufgenommenen Coffeins zu überprüfen.

Als nächster Schritt mussten die konsumierten Getränke betrachtet werden. Im Anschluss wurden die genommenen Speichelproben von den Probanden analysiert, damit die Daten der Protokolle und die Daten aus dem Fragebogen verglichen werden konnten um zu sehen in wie weit die Daten miteinander übereinstimmen.

2. Literaturübersicht

2.1. Coffein

Das Coffein ist ein Inhaltstoff des Kaffees und gehört ebenso wie Theobromin und Theophyllin zu den Purinderivaten. Der chemische Name des Coffeins lautet 1,3,7-Trimethylxanthin.

Coffein kommt auch noch in Tee, Guarana, Maté und in Colanüssen vor. [EICHLER, 1976]

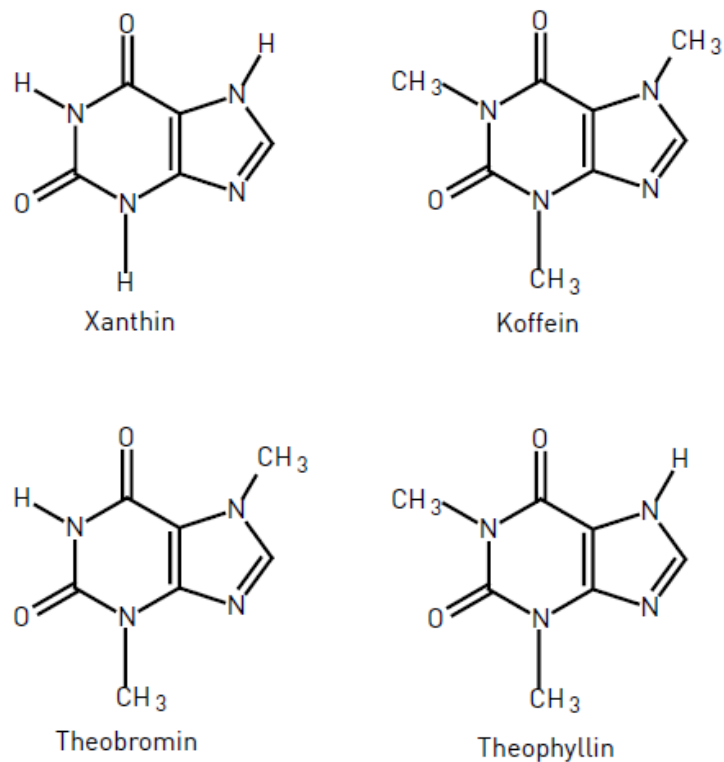


Abbildung 1 Coffein und Derivate [WEISS 2007]

Entdeckt wurde Coffein im Jahr 1820 in Kaffeebohnen von dem Chemiker Friedlieb Ferdinand Runge und im Jahr 1895 wurde die Synthese von Coffein durchgeführt.

[CZOK, 1966]

Die chemischen Eigenschaften von Coffein sind:

- Sublimationstemperatur liegt bei 180°C,
- Schmelzpunkt bei 236,5°C, kristallisiert in 1 Mol Kristallwasser,
- das Molekulargewicht beträgt 194,19,
- die Löslichkeit in Wasser ist 1,3% bei 15°C und bei einer Temperatur von 40°C sind es 4,6%. [EICHLER, 1976]

Coffein ist ein weißes, leicht bitterschmeckendes und geruchloses Pulver.

Die Gehalte des Coffein (im Trockengewicht) variieren in den verschiedenen Quellen: Kaffeebohnen haben einen Coffeingehalt von ca. 0,9 – 2,1%, Blätter vom schwarzen Tee 3-5%, Maté circa 1,63%, Kolanuss einen Gehalt von 1-2% und Guarana etwa 10%. [ESTLER, 2000, CZOK, 1966]

2.1.1. Kaffee

Kaffee – darunter versteht sich der von der Samenhaut befreite, rohe oder geröstete Samen von *Coffea* ssp. Es gibt verschiedene *Coffea*-Arten, wobei *Coffea arabica* rund 75% der Welterzeugung ausmacht. Im Rohkaffee, den grünen Bohnen sind etwa 1,16% Coffein enthalten, daneben kommen noch Chlorogensäure (5,5-7,6%), Kaffeeöl und Aromastoffe vor. Durch den Röstprozess, bei dem die Bohnen durch Wasserdampf und Röstgas auf das doppelte aufgebläht werden und sich dunkel färben, wird der Coffeingehalt geringfügig verringert. Während diesem Schritt bilden sich die kaffeetypischen Aromastoffe. Das Kaffeearoma ergibt sich vor allem durch Carbonyl-Amino-Reaktionen im Verlauf der Maillard-Reaktion. Bei dieser nicht enzymatischen Bräunung werden primär reduzierende Zucker mit Proteinen, Peptiden und Aminosäuren umgesetzt. Die unterschiedlichsten Stoffklassen sind bei den Aromastoffen vertreten, wie zum Beispiel heterozyklische Verbindungen, Pyrrole und Pyrazine. Es können während der Röstung auch Bitterstoffe entstehen, die Folgeprodukte der Maillard-Reaktion sind.

[ESTLER 1996, HÄNSEL und HÖLZL 1996]

2.1.2. Colanuss

Die Colanuss ist ein getrockneter Samenkern verschiedener Cola-Arten. Die Stammpflanzen sind *Cola nitida*, *Cola acuminata* und *Cola verticillata*. Der Coffeingehalt liegt bei circa 1,2 – 1,5% und der Geschmack ist leicht bitter.

[ESTLER, 1996]

Die Kerne erhalten beim Trocknen ihre typische colarote Farbe. Sie werden frisch, getrocknet oder gemahlen verzehrt. Die Colanuss wird zur Herstellung von Tinkturen, und Extrakten verwendet sowie zur Herstellung von Colapräparaten, Tabletten und Pastillen mit anregender Wirkung. Auch in der Lebensmittelindustrie wird die Colanuss eingesetzt, zum Beispiel in der Likör-, Kakao- und Schokoladenindustrie. [BELITZ et al, 2001]

2.1.3. Guarana

Aus den Samen von *Paullinia cupana* H.B.K. wird Guarana gewonnen. Dieser Kletterstrauch ist im Amazonas-Gebiet beheimatet und wird in Paraguay, Brasilien und Venezuela kultiviert. Aufgebaut ist der Samen aus Kotyledonen, diese werden geröstet, zerkleinert und mit Wasser zu Brei vermengt um das Guarana zu gewinnen. Der Brei wird als Stange oder in Form von Kugeln getrocknet. Bei Bedarf wird Pulver abgeraspelt und in Flüssigkeit gelöst. Guarana enthält 4 – 6% Coffein. Bei der stimulierenden Wirkung von Guarana-Präparaten handelt es sich auch um die Coffeinwirkung und 3-5g dieses Produktes entsprechen in etwa 200 mg Coffein (2 – 3 Tassen Kaffee) [ESTLER, 1996]

2.1.4. Schwarzer Tee

Tee besteht aus den Blättern von *Camellia sinensis*, die in einzelnen Stufen nämlich: Welken, Rollen, Fermentieren und Trocknen verarbeitet werden. Beim Fermentieren entstehen Oxidationsprodukte (Theaflavine und Thearubigene), die über die Teequalität bestimmen.

Das Hauptalkaloid ist im Tee das Coffein, es wurde früher als Thein bezeichnet. Der Gehalt kann variieren und liegt zwischen 3 – 4%.

Das Coffein wird aus dem Tee ebenso wie aus Kaffee aufgenommen, jedoch beklagen manche Personen nach dem Genuss von Tee, ebenso wie bei anderen Coffeinquellen, im Vergleich zu Coffeinaufnahme aus Kaffee nicht schlafen zu können.

Die Inhaltsstoffe des Tees schwanken je nach Herkunft, Alter und Behandlung (fermentiert oder nicht fermentierte Blätter). [BELITZ et al, 2001, HÄNSEL und HÖLZL 1996, ESTLER, 1996]

2.1.5. Grüner Tee

Grüner Tee wird anders als der schwarze Tee gleich nach der Ernte gedämpft. Enzyme werden somit inaktiviert und es findet keine Fermentation statt, die dabei entstehenden Oxidationsprodukte (Theaflavine und Thearubigene) fehlen im grünen Tee damit.

[HÄNSEL und HÖLZL 1996]

2.1.6. Maté

Maté besteht aus getrockneten Blättern des *Ilex paraguariensis* var. *genuina*. Die Pflanze wird in Brasilien, Paraguay und Nordargentinien angebaut. Der Coffeingehalt liegt bei etwa 0,9 – 2,2%.

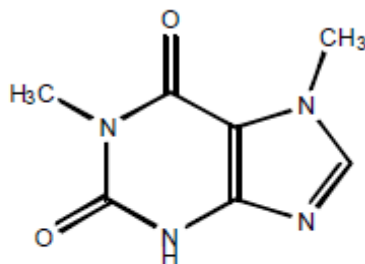
Es werden die Blätter, Blattstiele, Blütenstiele und jungen Triebspitzen gebrochen und über Feuer getrocknet. Dadurch entwickelt sich der Geschmack und Oxidasen werden inaktiviert. Das getrocknete Produkt wird zerstampft und zermahlen. [BELITZ HD et al, 2001, ESTLER, 1996]

2.1.7. Kakaobohnen

Kakaobohnen sind Samen der *Theobroma cacao*, die in Südamerika beheimatet ist. Nach der Ernte lässt man die Früchte fermentieren, danach werden sie geröstet und in Brech- und Reinigungsanlagen zerkleinert. Die Kakaokerne werden vermahlen, um daraus Kakao zu gewinnen. Kakaomasse enthält im Durchschnitt 0,21% Coffein. In einer Tasse Kakao sind rund 64 mg Coffein enthalten. [ESTLER, 1996]

2.2. Paraxanthin

Paraxanthin ist das Hauptabbauprodukt von Coffein im ersten Schritt. Rund 80% des Coffeins werden mit diesem Schritt abgebaut. Dieser Metabolit steht in Zusammenhang mit der Coffeinaufnahme. Paraxanthin ist im Vergleich zu Serum-Coffein weniger sensibel bei der Messung unmittelbar vorhergehender Einnahme. Dies könnte ein Grund sein, dass Paraxanthin ein besserer Marker als Coffein zur Bestimmung der Coffeinaufnahme sein könnte. [LELO et al. 1989, BENOWITZ et al. 1995]



Paraxanthin

Abbildung 2 Paraxanthin [HÄNSEL, STICHER, 2010]

2.3. Entcaffeinierung von Kaffee

Es gibt unterschiedliche Methoden Kaffee zu entcaffeinieren. Die dadurch anfallenden Coffeinmengen reichen nicht aus um den steigenden Bedarf an Coffein zu decken, deshalb wird dieses auch synthetisiert. Das Coffein kann auf mehrere Arten aus Kaffee entfernt werden. Die direkten Verfahren sind die Bohnen-Entcaffeinierung, angewendet bei einem Wassergehalt unter 40%, und die Entcaffeinierung mit CO₂.

Ein indirektes Verfahren ist die Extrakt-Entcaffeinierung bei einem Wassergehalt über 60%.

Die Bohnen-Entcoffeinierung ist die häufigste verwendete Methode, bei der die Bohnen bei einer Temperatur von 20 – 100°C mit Wasser aufgequollen (zu circa 40%) werden. Durch das Wasser wird die Zellstruktur geöffnet und die Diffusion von Coffein wird erleichtert. Dann wird mit einem Lösungsmittel (Dichlormethan, Essigester, Methylenchlorid, Aethyl-Acetat) extrahiert. Dies kann zwischen 2 und 12 Stunden dauern. Der Restcoffeingehalt muss weniger als 0,1% sein. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt, das Coffein kann aus dem Lösemittel gewonnen werden und die Bohnen werden getrocknet.

Ein weiteres direktes Verfahren stellt die CO₂-Extraktion dar. Mit überkritischem Kohlendioxid wird das Coffein aus den befeuchteten Bohnen herausgelöst und danach wird in einem Aktivkohlebehälter das Coffein aus dem Gasstrom adsorbiert. Der Zeitaufwand für diese Technik beträgt etwa 12 -16 Stunden.

Bei der Extrakt-Entcoffeinierung wird mit Wasser extrahiert und anschließend mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe von Methylenchlorid und darauf folgender Wasserdampf-Desodorierung oder selektiven Adsorption das Koffeins entfernt.

[FALBE RÖMPP 1996, HEISS 1990]

2.4. Synthese von Coffein

Die Synthese von Coffein erfolgt durch das Verfahren nach BREDERECK et al (1959) und stellt eine gute Alternative zu der sonst verwendeten Synthese nach Traube dar. Harnsäure wird mit Formamid umgesetzt und dadurch wird Xanthin gebildet. Dieses wird durch Methylierung mit Dimethylsulfat in 1,3,7-Trimethylxanthin umgewandelt.

[EICHLER, 1976]

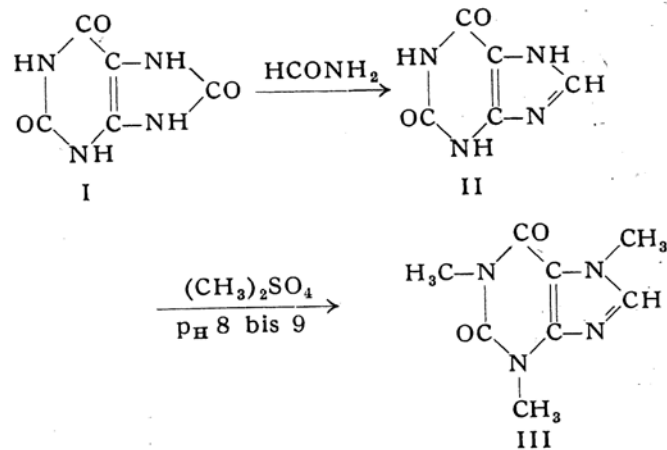


Abbildung 3 Synthese von Coffein [Bredereck et al. Angew.Chemie]
(I Harnsäure, II Xanthin, III Coffein)

Bei der Synthese nach Traube wird Harnstoff kondensiert mit Cyanessigester zu 4-Aminouracil, das in Formamid als Lösungsmittel nitrosiert, reduziert und zum Xanthin cyclisiert wird. Abschließend wird durch Methylierung mit Demethylsulfat das Coffein hergestellt. [BLASCHEK et al., 2007]

Xanthin besitzt 3 sekundäre Amin-Stickstoffatome, diese können durch Alkylierung in das 1-Methylxanthin und das 7-Methylxanthin umgewandelt werden. In weiterer Folge führt das 1-Methylxanthin zum 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin) und dann zu Coffein. Ebenso kann Coffein auch aus dem 7-Methylxanthin über das 1,3,7-Methylxanthin (Theobromin) hergestellt werden.

[HÄNSEL und HÖLZL 1996]

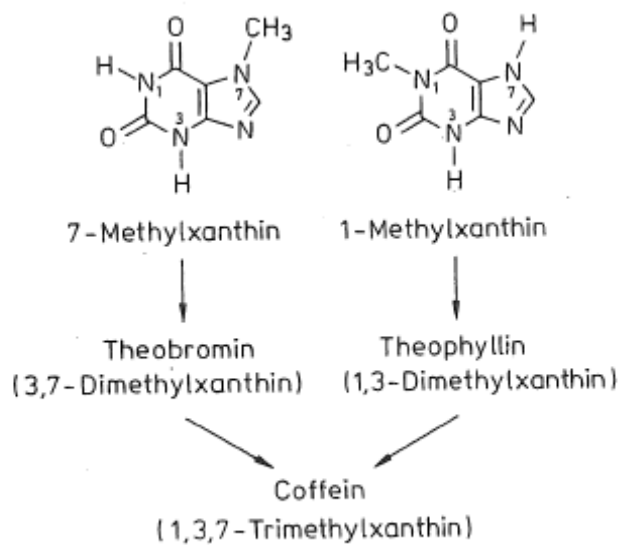


Abbildung 4 Synthese nach Traube [HÄNSEL und HÖLZL 1996]

2.5. Absorption von Coffein

Die Aufnahme des Coffeins beginnt im Magen. Die Geschwindigkeit der Absorption ist abhängig von der Verweilzeit in diesem. Nach etwa einer halben Stunde sind 89% des reinen Coffeins und 86% aus Kaffee absorbiert. Werden zu dem Kaffee auch noch andere Lebensmittel, wie zum Beispiel Rohrzucker oder Albumin gegeben, verzögert sich die Aufnahme. Ebenso wird die Coffeinaufnahme durch Schwangerschaft, Rauchen, Medikamente beeinflusst. Die Konzentration des Coffeins im Blutplasma steigt nach wenigen Minuten an und hat nach einer Stunde den Höhepunkt erreicht. Bei Tee fällt dieser Anstieg niedriger aus, fällt aber auch langsamer wieder ab. Ausgeschieden wird das Coffein über den Urin, nur ein kleiner Teil wird über die Galle eliminiert. [MAIER, 1981]

Coffein hat eine Bioverfügbarkeit von nahezu 100%, das meiste wird demethyliert, oxidiert und als Methylharnsäure und Methylxanthine über die Niere ausgeschieden. Das Cytochrom P450-Isoenzym ist an der Metabolisierung beteiligt, insbesondere das CYP1A2.

Die Halbwertszeit von Coffein liegt bei etwa 5 Stunden, durch individuelle Schwankungen kann sie zwischen 3 und 7 Stunden liegen. Bei verschiedenen

Personengruppen kann es zu sehr unterschiedlichen Zeiten kommen. Bei Schwangeren tritt im letzten Drittel eine längere Eliminationszeit auf und Frühgeborene haben eine Eliminationszeit von rund 50 Stunden. Ebenso ist die Metabolisierung bei Rauchern anders als bei Nichtrauchern. Raucher metabolisieren schneller und haben eine niedrigere Serumkonzentration. [ESTLER, 2000, MATISSEK 2006, KLEBANOFF 1998]

2.5.1. Wirkung im Körper

Im Körper wirkt Coffein auf das Herz, die Atemwege, den Magen-Darm-Kanal, die Niere und auf das Zentrale Nervensystem. Die Wirkung ist zurück zu führen auf eine Dämpfung des intralaminären mediotalamischen Systems. Bei hohen Dosen kommt es zur Erregung der Formatio reticularis. Die Phosphodiesterase wird gehemmt und dies hat einen Abbau von cAMP zur Folge. Die Hemmung der Diesterase wird für die periphere Wirkung verantwortlich gemacht. [ESTLER, 2000]

Methylxanthine haben 3 primäre Wirkungen:

- Sie blockieren Adenosin A1 und A2A-Rezeptoren
- Die Phosphodiesterase wird gehemmt
- Intrazelluläres Calcium wird in das Zytoplasma freigesetzt

Das Coffein wirkt als Blockade von Adenosinrezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren). Diese stimulieren die Adenylatcyclase oder hemmen den Kaliumstrom in der Zelle. Die Aktivität einiger Neurone wird erhöht und dadurch der Sympathikustonus gesteigert. Als Antagonist des Adenosin A2A-Rezeptors wirken sie verengend auf Blutgefäße des Gehirns, daher kann Coffein zur Behandlung von Kopfschmerz verwendet werden. [SCHAUDER und OLLENSCHLÄGER, 2006]

Verschiedene Hormone verwenden das cyclische 3'5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) als zweite Überträgersubstanz. Dies wird in der Zelle mittels der Adenylatcyclase aus ATP gebildet, wenn ein Hormon gebunden wird. Das cAMP bewirkt die Reaktion und

wird anschließend durch cAMP-Phosphodiesterase zum nicht mehr wirksamen 5'AMP hydrolysiert. Durch Coffein wird dieser Abbau gehemmt. Es verstärkt sich die cAMP-Wirkung. Beim Herzmuskel kommt es zu einer Steigerung der Kontraktilität, zum einen wird dies zurückgeführt auf die Hemmung der Phosphodiesterase, zum anderen auf eine Erhöhung der intracellulären Calcium Konzentration. Es ist nicht sicher, wie Coffein hier mitwirkt, möglich wäre eine Beteiligung des cAMP oder des Calciums. [MAIER, 1981]

Coffein hat eine diuretische Wirkung. Es wird eine gesteigerte Nierendurchblutung und Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate damit in Zusammenhang gebracht. [SCHAUDER und OLLENSCHLÄGER, 2006]

Coffein führt demnach in vernünftigen Dosen (50 – 200mg) zu einem besseren Gehirnleistung und unterdrückt Müdigkeit. Nach dem Verzehr von Kaffee oder Tee wird die Kreativität verbessert sowie die Wahrnehmung sensorischer Reize und die Reaktionszeit verkürzt. In höheren Dosen aufgenommen führt Coffein jedoch zu einem Konzentrationsverlust und es behindert den Schlaf. Die auftretenden negativen Folgen können Unruhe, Reizbarkeit, Tremor, Schmerzen in der Herzgegend, Übelkeit oder Magen-Darm-Störungen sein. [ESTLER, 2000]

Wenn Coffein langfristig in hohen Dosen (200 – 300 mg) zugeführt wird, kann sich eine Abhängigkeit entwickeln. Wie bei anderen Suchtstoffen kommt es auch hier zu einer Toleranzentwicklung, psychische und körperliche Abhängigkeit mit Entzugerscheinungen. Das könnten unter anderem verringerte Konzentration, Müdigkeit oder Kopfschmerzen sein. Bei Dosierungen von etwa 100 mg pro Tag können schon Kopfschmerzen als Entzugerscheinungen auftreten. [SCHAUDER und OLLENSCHLÄGER, 2006]

Coffeinabusus über längere Zeit (1,5 g– 1,8 g reines Coffein) führt zu unspezifischen Symptomen wie Angst, Ruhelosigkeit, Ohrenklingen und Kopfschmerzen, die jedoch nach Absetzen des Kaffees oder anderer coffeinhaltiger Produkte wieder verschwinden. Es werden Risiken kardiovaskulärer Erkrankungen, Kanzero-, Muta- und Teratogenität

diskutiert. Während der Schwangerschaft sollte der Kaffeeconsum eingeschränkt werden. [HÄNSEL und HÖLZL 1996]

In Konzentrationen von 5 – 10 g kann Coffein tödlich sein. Personen die an Angststörungen, Arrhythmien und Schlaflosigkeit leiden, sollten bei dem Genuss von Coffein vorsichtig sein. [AKTORIES et al, 2009]

2.6. Ausscheidung des Coffein

Coffein wird bei der Ausscheidung demethyliert zu Dimethyl- und Monomethylxanthinen. Danach werden diese zu den entsprechenden Methylharnsäuren oxidiert. Die Öffnung des Imidazolringes führt zur Bildung der substituierten Aminouracile. Es entsteht beim Abbau Teobromin zu einem Anteil von 6 – 10%, Theophyllin zu 3 – 4%, ebenso wie weitere Uracilderivate und N-Methylharnsäurederivate. [BLASCHEK et al, 2007]

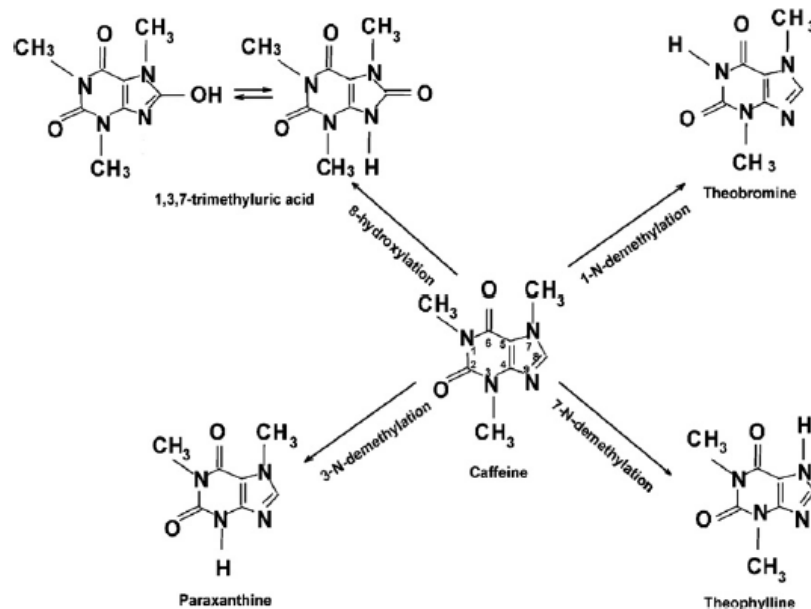


Abbildung 5 Die Hauptabbauwege des Coffein
[KOT and WLADYSLAWA 2008]

Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich in der Leber und ausgeschieden wird das Coffein über die Niere. Nur etwa 10% werden unverändert ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt in etwa 3,5 Stunden, wobei die Werte bei Kindern, Schwangeren, und älteren Menschen länger sind und bei Rauchern verkürzt. [JULIEN, 1997]

Es hat sich erwiesen, dass die 3-Demethylierung des Coffein zu Paraxanthin der Hauptabbauweg des Coffeinmetabolismus ist, der durch das Cytochrom P4501A2 katalysiert wird. Coffein wird jedoch auch über 1-Demethylierung zu Theobromin, 7-Demethylierung zu Theophyllin und über 8-Hydroxylierung zu 1,3,7-Trimethylharnsäure abgebaut. Des weiteren werden in abnehmender Reihenfolge folgende Substanzen gebildet: 1-Methylharnsäure, 1,3-Dimethylharnsäure, 1-Methylxanthin, 1,7-Dimethylxanthin und 7-Methylxanthin. Es wird keine Harnsäure gebildet und somit besteht für Gichtkranke kein Problem.

[KALOW und TANG 1991, KOT and WLADYSLAWA 2007, MAIER, 1981]

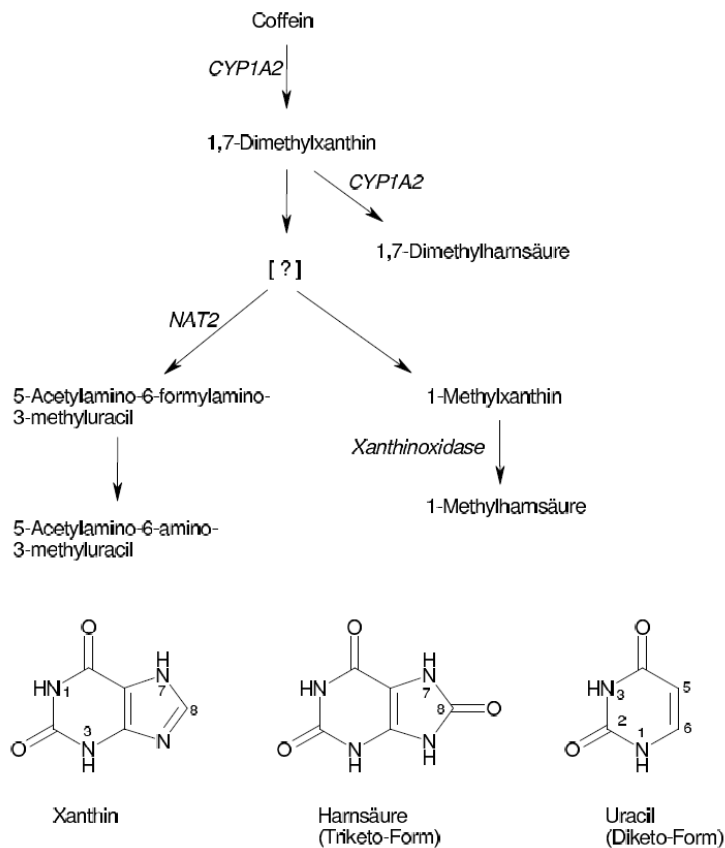


Abbildung 6 Abbau des Coffeins [HÄNSEL und STICHER 2010]

2.7. Cytochrom P450

Das Cytochrom P450 gehört zur Familie der Hämproteine. Die Proteine sind aus rund 500 Aminosäuren aufgebaut. Im Zentrum befindet sich ein dreiwertiges Eisenion. Im menschlichen Körper ist das P450 an verschiedenen Aufgaben beteiligt, wie im Metabolismus von Drogen und anderen Xenobiotika zur Ausscheidung aus dem Organismus. Ebenso bei der Biosynthese von Steroidhormonen und bei der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren.

Das Cytochrom P4501A2 ist am Abbau von verschiedenen Drogen wie zum Beispiel Coffein, Paracetamol, Phenacetin, Theophyllin, Imipramin oder Tacrin beteiligt. Ein verringerter Coffeinmetabolismus kann bei chronischen Lebererkrankungen auftreten, da sich besonders hohe Cytochrom-Konzentrationen in der Leber finden.

Das Cytochrom-P4501A2 katalysiert die demethylierende Reaktion des Coffeins zu 1,7-Dimethylxanthin. Dadurch kann die Aktivität des Cytochroms durch die Demethylierung von Coffein gemessen werden.

Es gibt Personen die das Coffein langsamer metabolisieren als andere, dies liegt an einem CYP-1A2-Polymorphismus. Polymorphismus ist eine genetische Variation und beruht meist auf Punktmutationen der DNA.

Coffein wird oft zum Messen der Aktivität des Cytochroms verwendet seitdem bekannt ist, dass dies beim Stoffwechsel beteiligt ist [BERTHOU et al. 1992 AKTORIES et al. 2009, HASLER et al. 1999, SACHSE et al. 1999]

2.8. Speichelkonzentrationen

Die Konzentrationen von Coffein im Körper variieren, so erscheint Coffein schon nach wenigen Minuten im Plasma. Nach etwa einer Stunde hat die Plasmakonzentration ihren Höhepunkt erreicht. Coffein verteilt sich in den Geweben des Körpers sehr gleichmässig. [EICHLER, 1976,]

Zur Bestimmung der Coffeinkonzentrationen kann aber auch der Speichel herangezogen werden. Die Speichelkonzentrationen sind den Plasmakonzentrationen gleich zu setzen. [HORNING et al, 1977]

2.9. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (solid phase extraction SPE) ist eine Methode zur Probenvorbereitung. Die Hauptaufgaben sind Probenreinigung und Probenkonzentrierung. Verunreinigungen, die im selben UV-Bereich absorbieren werden oder die Geräte beschädigen können, müssen entfernt werden. Es handelt sich um kleine Einwegextraktionssäulen, die mit Adsorbentien gefüllt sind. [KICINSKI, 1996]

Die Auswahl des Adsorbens ist bestimmt durch die Polarität der zu extrahierenden Stoffe und durch die Art der Matrix. Es gibt 4 verschiedene Methoden:

- Normalphasen SPE mit polaren Adsorbentien
- Normalphasen SPE mit polaren modifizieren Kieselgelen
- Umkehrphasen-SPE mit unpolaren modifizierten Kieselgelen
- Ionenaustausch-SPE mit ionisch modifizierten Kieselgelen

Im Falle von Umkehrphasen-SPE mit unpolar modifizierten Kieselgelen ist das Adsorbens weniger polar als die mobile Phase. Es werden unpolare oder leicht polare Analyten, die im Lösemittel gelöst sind, adsorbiert. [KICINSKI, 1996]

Durch Wechselwirkungen zwischen Sorbens und Isolat durch die oben angeführten Mechanismen (ionisch oder Polarität) können einzelne Substanzen aus Lösungen aufgefangen, gereinigt oder konzentriert werden. [POOLE, 2003]

Trennmechanismus	Probenart
Normalphase (Kieselgel)	Leicht bis Mittelpolar
Normalphase (Polar gebundene Phase)	Mittel bis Starkpolar
Umkehrphase (Unpolar gebundene Phase)	Unpolar
Ionenaustausch (Anion SAX, Kation SCX)	Ionische Säure Ionische Base

Tabelle 1 Trennmechanismen [KICINCSKI; 1996]

Der generelle Ablauf einer Festphasenextraktion kann aus Abbildung 7 entnommen werden.

Die einzelnen Schritte sind:

Probenvorbereitung

Je nach Beschaffenheit der Probe sollte sie vorher entgast, gefiltert, zentrifugiert oder verdünnt werden damit die Säule nicht verstopft.

Konditionierung

Je nach Säule wird sie unterschiedlich geladen; im Falle einer reversed phase Säule werden organische Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril verwendet. Durch diesen Schritt werden die funktionellen Gruppen benetzt.

Equilibrierung

Durch das Waschen mit Wasser soll eine maximale Adsorption des Analyten an der festen Phase gewährleistet werden

Probenauftrag

Die Probe wird auf die Säule aufgetragen. Der Analyt wird an der festen Phase zurück gehalten und das Lösemittel passiert ohne zu interagieren.

Waschen

Das Spülen mit Wasser dient dem Entfernen von störenden Bestandteilen ohne dabei die analysierende Substanz von der Säule zu spülen.

Elution

Durch ein Lösemittel werden die zurückgehaltenen Analyten von der Säule eluiert. Die Wechselwirkung zwischen Lösemittel und des Analyten ist höher als zwischen Säule und Analyt. Die Analyt-Sorbens-Wechselwirkungen werden gebrochen. Im Anschluss kann das Eluat weiter analysiert werden.

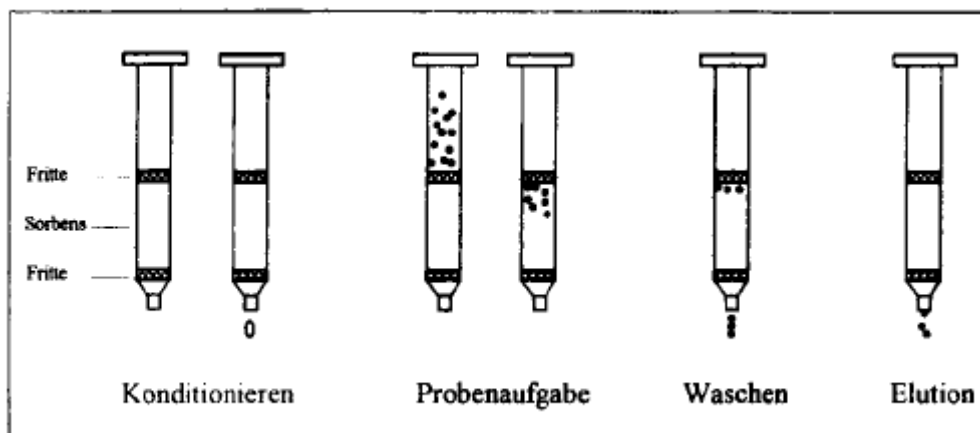


Abbildung 7 Arbeitsablauf bei Anwendung einer Festphasenextraktion [KICINSKI, 1996]

2.10. Analyse von Coffein

Zur Analyse von Coffein können verschiedene Methoden angewendet werden. Die meisten verwendeten Methoden basieren auf Umkehrphasen-Chromatographie

gekoppelt mit UV-Detektion., oder mit Massenspektrometrie. [BISPO et al., 2002, BRUNETTO et al., 2007]

Ebenso können diese Komponenten auch mit Ionenaustauschchromatographie gekoppelt mit UV-Detektion analysiert werden. Diese Methoden erfordern meist langwierige Vorbereitungsarbeiten und Vorbehandlungen vor der chromatographischen Untersuchung.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist die im Moment beste Möglichkeit zur Analyse von Coffein und anderen Methylxanthinen (Theobromin und Theophyllin) mit einer C18-Umkehrphasen Säule und einem UV-Detektor. [BRUNETTO et al., 2007]

2.11. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass sie Gemische auftrennen kann und sehr präzise, schnell, rentabel und vielseitig einsetzbar ist. [SPILLER, 1998]

In vielen Studien ist die HPLC das Mittel der Wahl zu Analyse von Coffein und hat sich als die geeignetste Methode herausgestellt. [MUNIN et al. 2006, RODRIGUES et al. 2006, DOBROCKY et al. 1994, BISPO et al. 2002, BROWN THOMAS et al. 2004, NAIK and NAGALAKSHMI, 1997]

Bei dieser Analysenmethode wird die aufbereitete Probensubstanz mit einem Laufmittel (mobile Phase) durch die Säule (stationäre Phase) geleitet. Es kann eine Vorsäule vorgeschaltet werden, um mögliche Verunreinigungen von der eigentlichen Säule fernzuhalten. Die Säule geht mit der Substanz Wechselwirkungen ein, die nach unterschiedlichen Zeiten wieder gelöst werden. Es erscheinen die verschiedenen Substanzen nach unterschiedlichen Zeiten am Ende der Trennsäule. Mit Hilfe eines Detektors und entsprechender Software werden diese Substanzen in einem Chromatogramm bildlich dargestellt.

Zur Analyse von Coffein werden HPLC Anlagen mit UV-Detektoren und einer Umkehrphasen (reversed phase RP) Chromatographie verwendet. [RODRIGUES et al. 2007, THOMAS BROWN et al. 2004, NAIK PURA and NAGALAKSHMI, 1997, BRUNETTO et al. 2007]

Die Laufmittel variieren in den einzelnen Studien, es besteht aus Gemischen von Acetonitril, Methanol und einer Flussrate von 0,5 ml/Minute [MUMIN et al. 2006], Triethylamin Phosphat Puffer mit 15% Acetonitril und einer Flussrate von 1 ml/Minute [RODRIGUES et al. 2007] beziehungsweise mit einem Gradienten von 2 Minuten 2% Acetonitril, von der zweiten bis elften Minute 4% Acetonitril und anschließend bis zur 25 Minute 8% Acetonitril [DOBROCKY et al. 1994]

2.12. Coffein Assesment Tool (CAT)

Das Coffein Assesment Tool ist ein Fragebogen zur Erhebung der Coffein Aufnahme im Stil eines food frequency questionnaire. Dieser Fragebogen enthält verschiedene coffeinhältige Produkte unterschiedlicher Marken. Dabei werden die verzehrten Mengen über einen bestimmten Zeitraum abgefragt. Durch diesen Fragebogen kann die aufgenommene Menge von Coffein pro Tag ermittelt werden.

[BOYLAN et al. 2008, KONJE and CADE, 2008]

2.13. Salivette®

Die Salivette® ist ein Hilfsmittel zur Speichelgewinnung. Sie bestehen aus einer Watterolle, einem Einhängegefäß und einem Zentrifugenröhrchen. Die Watterolle soll für ca. 1 bis 2 Minute in den Mund genommen werden bis sich genug Speichel in der Watte gesammelt hat. Diese Watterolle kommt dann zurück in ein Einhängegefäß und kann wieder verschlossen werden. Zur Stimulierung des Speichelflusses gibt es auch Watteröllchen mit Zitronensäure, deren Wirkung diesen anregen soll.

Durch das Zentrifugenröhrchen ist die Speichelgewinnung sehr einfach. Im Einhängegefäß befindet sich ein kleines Loch und somit kann sich der Speichel im Zentrifugenröhrchen sammeln. Nach dem Zentrifugieren wird das Einhängegefäß mit dem Watteröllchen und dem Verschluss einfach abgenommen und der Speichel kann weiterverarbeitet werden.



Abbildung 8 Salivette® [Salivette, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland]

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Geräte

Die folgenden aufgelisteten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien haben während der Durchführung der Versuche Anwendung gefunden.

Chemikalien und Reagentien

- Wasser Rotisolv® HPLC Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) Rotisolv® Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol Rotisolv® HOCHLEISTUNGSFLÜßIGKEITSCROMATOGRAPH Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Coffein wasserfrei von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- 7-(β -)Hydroxy(ethyl)theophyllin von Sigma-Aldrich Handels GmbH (Wien, Österreich)
- Natrium-Hydrogencarbonat von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe Deutschland)
- meta-Phosphorsäure von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe Deutschland)
- 1,7-Dimethylxanthin von Sigma-Aldrich Handels GmbH (Wien, Österreich)

Allgemein verwendete Geräte

Zentrifuge: Jouan BR4i multifunction Centrifuge von Thermo Electron Corporation
Key Write-DTM (Frankreich)

Heizplatte: IKA® RCT basic safety control

Waage: Sartorius ISO 9001 Modell KB BA 100 von Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)

Pipetten: Eppendorf Reference® variable (5-200µl, 100-1000µl) von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Materialien

- Spritzen 10 ml von Braun (Melsungen, Deutschland)
- Spritzenfilter Rotilabo® steril, 0,45µl Zellulosemischester von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Oasis® HLB Extraction Cartridge 30µm
- Oasis® HLB cartridge 1cc/30mg 30µm
- Gewindefläschchen ND 10 (1,5ml Kapazität), Klarglas von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Schraubkappe mit Septum PP ND 10 (1,3mm) von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Salivette® von Sarstedt
- Plastikeprouvetten

Getränkeproben

Die verschiedenen Getränkeproben wurden in unterschiedlichen Wiener Lebensmittelgeschäften erfasst, besorgt und auf ihren Coffeingehalt untersucht.

Biologische Proben

Die Speichelproben wurden von 50 freiwilligen Probanden an zwei verschiedenen Tagen abgegeben. Sie setzen sich zusammen aus 25 männlichen und 26 weiblichen

Probanden. Mit Hilfe der Salivette® wurde der Speichel gesammelt und anschließend abzentrifugiert und konnte direkt mit SPE weiter verarbeitet werden.

HPLC-UV-Chromatograph

Die HOCHLEISTUNGSFLÜßIGKEITSCHROMATOGRAPH-Anlage besteht aus einer UltiMate 3000 Series Chromatograph (Dionex Austria GmbH, Wien, Österreich), ausgestattet mit einer Hochleistungsgradientenpumpe ohne Mischkammer (HPG-3200M), einem Autosampler (WPS-3000 TSL, Micro) mit Temperaturregelung, einem Säulenthmostat (TCC-3000) und einem variablen Wellenlängendetektor (VWD-3400). Die schematische Darstellung eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen kann der untenstehenden Abbildung entnommen werden.

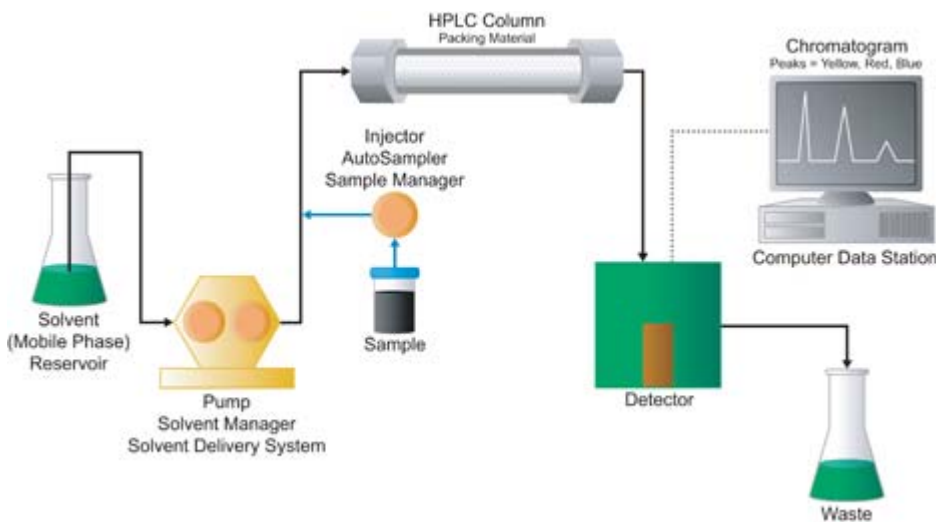


Abbildung 9 Abbildung Schema einer HPLC-Anlage [WATERS, 2007]

Software

Die verwendete Software für diese Analyse war:

Hystar Version 3.2 von Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland) sowie zur Auswertung der Chromatogramme:

Hystar PostProcessing von Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Deutschland)

3.2. Etablierung der Methode zur Analyse von Coffein

In vielen Versuchen wurde die beste Einstellung zur Analyse von Coffein gesucht. Es wurde mit einem Gemisch aus 10 molarer Ammonium-Hydrogencarbonat (NH_4HCO_3) gearbeitet. Zu dem wurde mit Acetonitril (ACN) ein Gradient zugeführt.

Zunächst wurde mit den Einstellungen, die die Herstellerfirma der Säule (Waters) vorgab, einige Versuche gefahren. Am Anfang wurde in zwei Wellenlängenbereichen gemessen (270 nm und 280 nm), um herauszufinden in welchen Wellenlängenbereich eine bessere Absorption gegeben ist.

Es wurden auch Versuche mit Veränderung des Gradienten durchgeführt um die bestmögliche Trennung der Stoffe herauszufinden.

Nach vielen Versuchen hat sich erwiesen, dass mit folgenden Einstellungen das beste Ergebnis zu erzielen ist.

Das Laufmittel besteht aus 10 molarer Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3), bis zur neunten Minute wird das Acetonitril auf 24 Prozent gesteigert und ab Minute 10 fällt es ab auf 1 Prozent.

Die UV-Lampe wurde auf 270nm eingestellt, da sich bei dieser Wellenlänge die höchste Intensität der Peaks gezeigt hat.

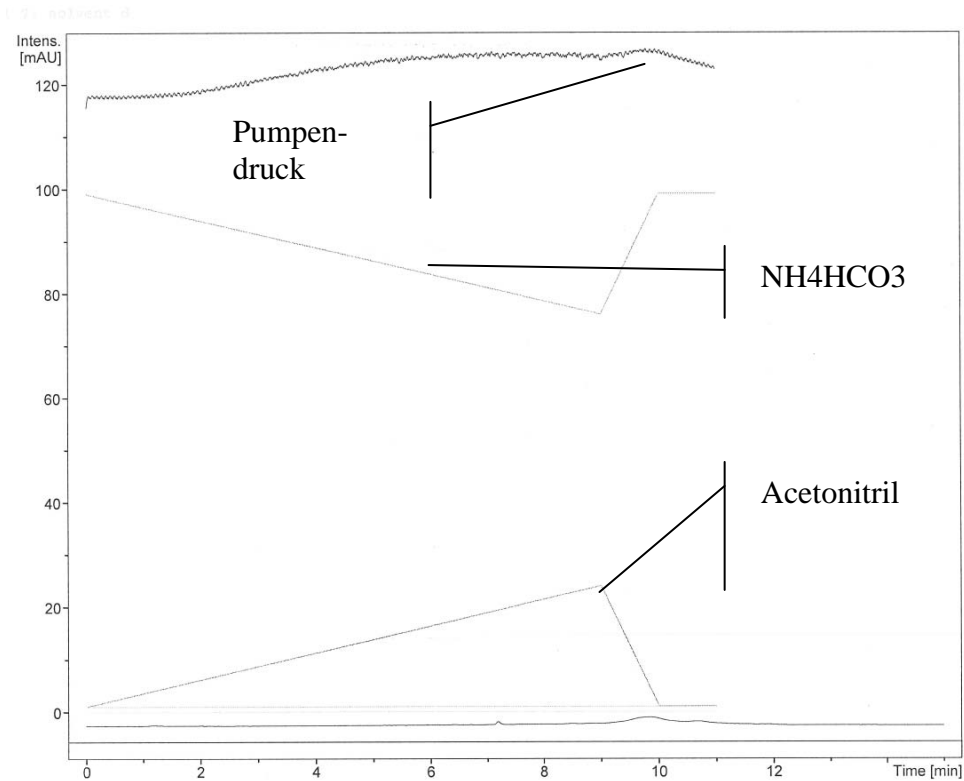


Abbildung 10 Gradient während Analyse

3.2.1. Herstellung der Standardlösungen Coffein

Die Standardlösung Coffein wurde aus wasserfreiem Coffein hergestellt. Es wurden 100 mg Coffein eingewogen und in einem 100 ml Messkolben mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung folgende Konzentrationen hergestellt:

Coffein Standard	Lösungsmittel	Konzentration [mg/l]
1000 ppm	HPLC-Wasser	1000
500 ppm	HPLC-Wasser	500
100 ppm	HPLC-Wasser	100
50 ppm	HPLC-Wasser	50
20 ppm	HPLC-Wasser	20
10 ppm	HPLC-Wasser	10
5 ppm	HPLC-Wasser	5
1ppm	HPLC-Wasser	1
0,5ppm	HPLC-Wasser	0,5

Tabelle 2 Coffeinkonzentration in Standardlösungen

Die Konzentration von 0,5ppm stellte die Nachweisgrenze dar, es wurden noch Versuche durchgeführt, die Nachweisgrenze nach unten zu verschieben. Dazu wurde versucht, die Menge Probelösung, die nach der Aufbereitung mittels SPE vorliegt, einzudampfen, um das Coffein danach in 100 µl Methanol wieder aufzunehmen und eine 10-fache Konzentrierung herzustellen.

Jedoch gelangen diese Versuche nicht, es konnte nicht das ganze Coffein wieder gelöst werden und somit wurde dieser Versuch nicht weiter geführt. Kontrolle hatte man durch den internen Standard, der auch nicht vollständig wieder gefunden wurde.

Aus diesen Lösungen wurde durch Einzelmessungen eine Kalibrationsgerade erstellt zur Bestimmung der Coffeingehalte in den Proben.

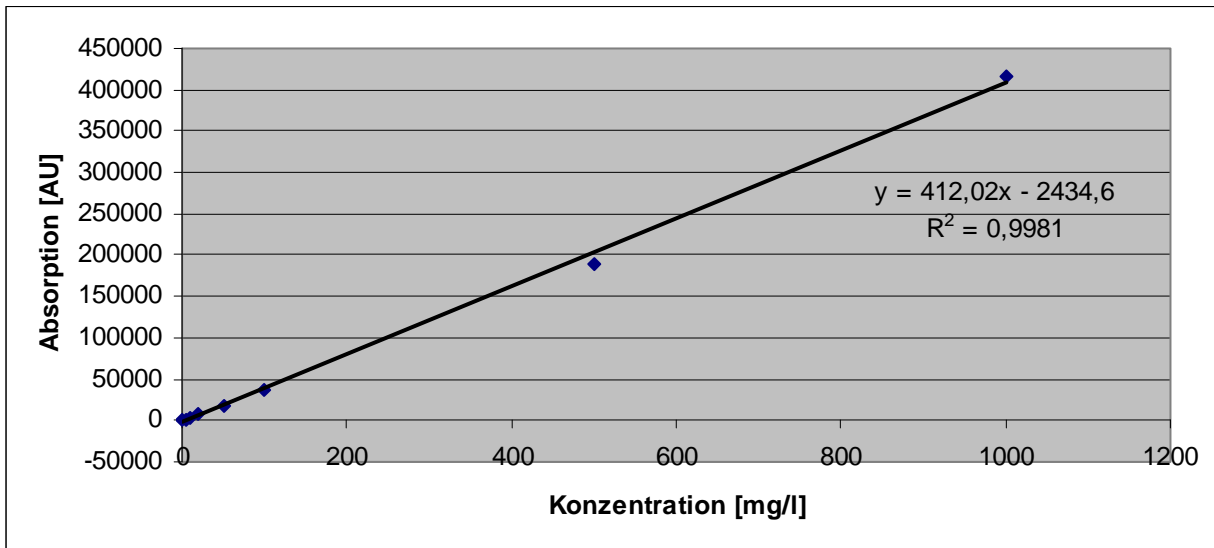


Abbildung 11 Ausgleichsgerade Coffein

3.2.2. Herstellung der Standardlösung Paraxanthin

Dieser Standard wurde hergestellt aus wasserfreiem 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin). Es wurden 100 mg in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit HPLC Wasser aufgefüllt. Aus dieser Stocklösung wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt.

Paraxanthin	Lösungsmittel	Konzentration [mg/l]
5 ppm	HPLC-Wasser	5
2,5 ppm	HPLC-Wasser	2,5
1 ppm	HPLC-Wasser	1
0,5 ppm	HPLC-Wasser	0,5
0,25 ppm	HPLC-Wasser	0,25
0,1 ppm	HPLC-Wasser	0,1

Tabelle 3 Paraxanthinkonzentration in Standardlösung

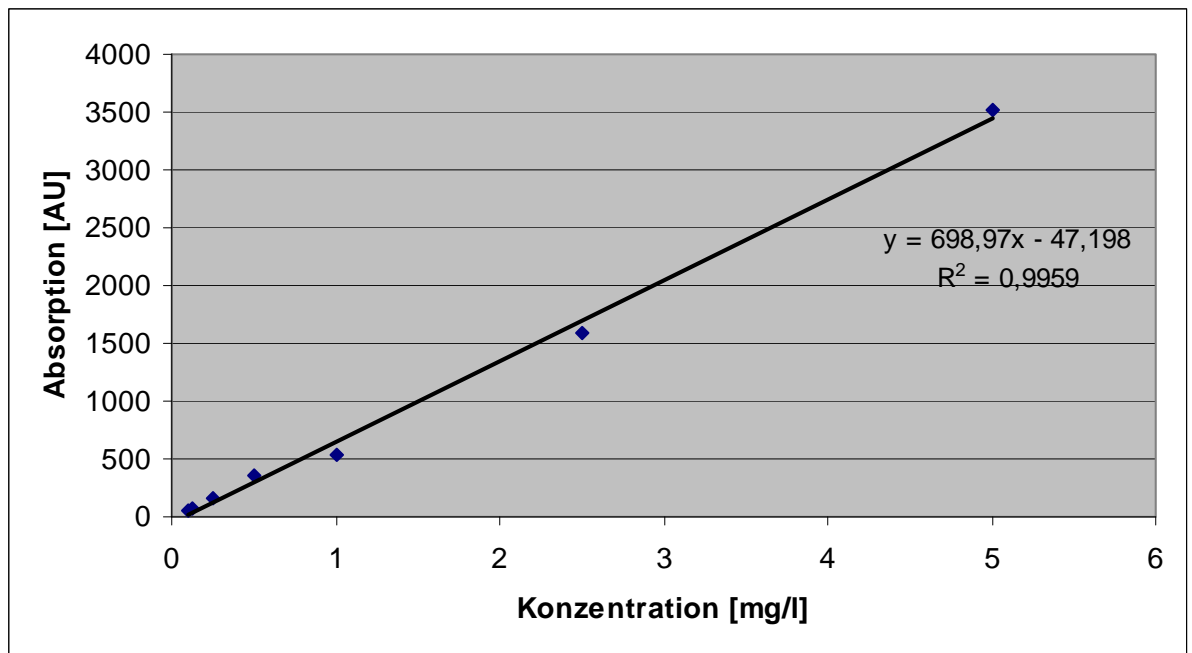


Abbildung 12 Ausgleichsgerade Paraxanthin

3.2.3. Herstellung eines internen Standard

Zur Qualitätssicherung bei der Analyse wurde ein interner Standard verwendet. Das 7- β -Hydroxyethyltheophyllin ist strukturverwandt zum Coffein, es unterscheidet sich nur durch eine OH-Gruppe und eine CH₂-Gruppe. Der interne Standard eluiert also kurz vor dem Coffein.

Durch Zugabe einer bestimmten Konzentration kann überprüft werden, ob immer die gleiche Menge gefunden wird und somit ob durch die Aufbereitung der Proben Verluste entstanden sind.

Es wurden 100 mg 7- β -Hydroxyethyltheophyllin in einem 100 ml Messkolben eingewogen, und von dieser Konzentration von 1000 ppm wurden 100 μ l den Lebensmittelproben zugesetzt. Bei den Speichelproben war die Konzentration des Coffeins viel niedriger und somit wurde dafür auch eine niedrigere Konzentration des internen Standards gewählt. Hier wurden 100 μ l des 100 ppm Standards zugesetzt.

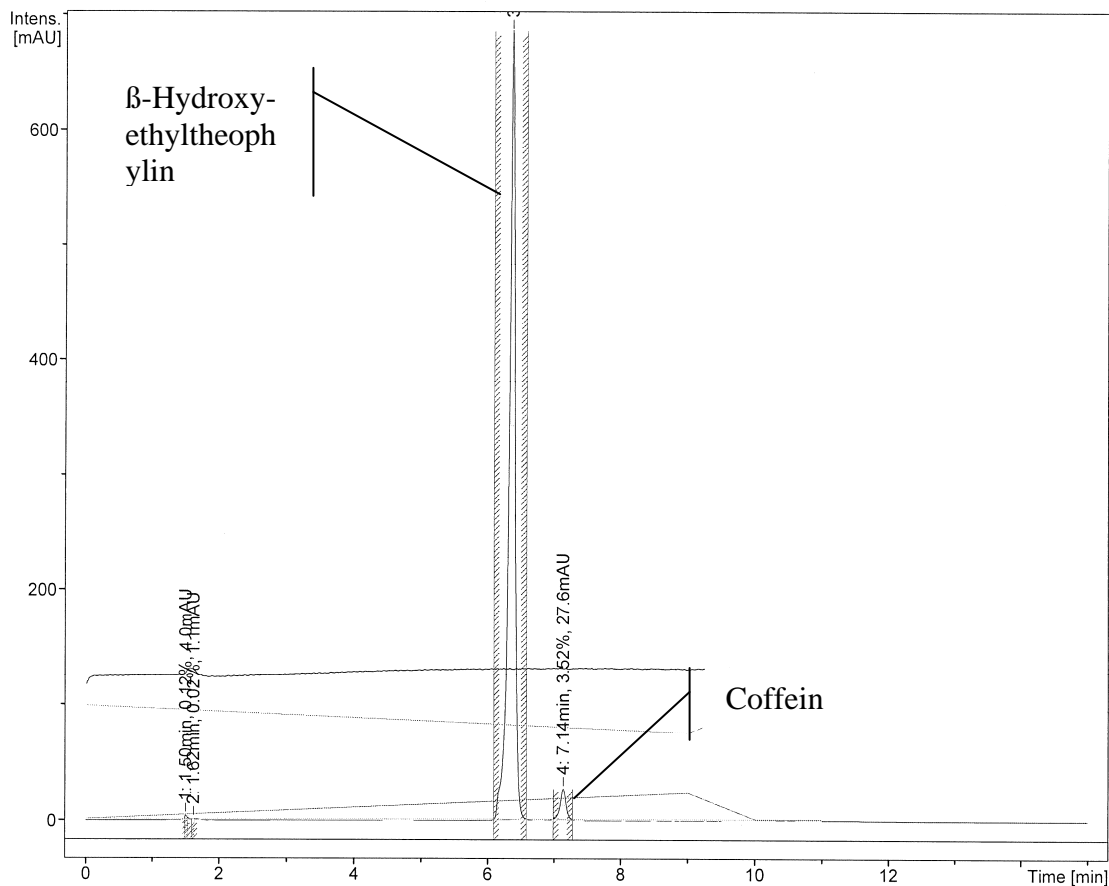


Abbildung 13 0,5ppm Coffein Standard, 100ppm interner Standard

3.2.4. Probenbereitung mittels Festphasenextraktion

Zur Aufbereitung der Proben wurde eine Festphasenextraktion (SPE) von Oasis® HLB 1 cc/30mg Extraction Cartridge verwendet, dies ist eine reversed-phase Säule.

Die SPE wurden in Plastikeprouvetten fixiert. Zwischen den jeweiligen Schritten wurden die Flüssigkeiten (Methanol, Wasser, Probe) mit Hilfe einer Zentrifuge durch die Festphasenextraktion geleitet.

Die Zentrifuge wurde mit 250 g für 30 Sekunden eingestellt und bei der Temperatur wurden 20°C gewählt. Vor dem letzten Schritt wurde die Eprouvette gewechselt um die Probe aufzufangen.

Am Anfang wurde der Umgang mit den SPE geübt und untersucht ob die Aufbereitungsmethode eine gute Wiederfindungsrate hat.

Bei den coffeinhältigen Getränken wie Cola, Energiedrinks, Eistee, Tee, Kaffee konnte die Probe direkt auf die SPE aufgetragen werden. Auch die Speichelproben waren gut geeignet, um sie mit dieser Methode aufzubereiten.

Aus der Tabelle kann das Schema der Konditionierung entnommen werden.

Konditionierung der SPE	
1ml	Methanol
1ml	Wasser
1ml	Probe
1ml	HPLC-Wasser
1ml	Methanol

Tabelle 4 Konditionierung SPE

3.3. Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate des Coffeins durch Aufbereitung mittels SPE wurde durch einen Standard ermittelt.

Analyt	Soll	Ist	Wiederfindung [%]
Coffein	100	96,5	96,5
Theophyllin	100	99	99

Tabelle 5 Wiederfindungsrate von Coffein

3.4. Validierung der Methode

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert. Der Variationskoeffizient ist definiert als relative Standardabweichung. Er ist das prozentuelle Verhältnis zwischen Mittelwert und Standardabweichung.

Um die eigene Genauigkeit zu überprüfen wurde an zwei verschiedenen Tagen 10 mal die gleiche Probe eines Cola-Getränkes aufbereitet und anschließend analysiert.

Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

	Mittelwert [mg/l]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
CocaCola 1	86,94	1407,57	3,86
Interner Standard 1	78,32	1482,3	4,5
CocaCola 2	94,36	717,72	1,8
Interner Standard 2	82,95	357,42	1,03

Tabelle 6 10-er Bestimmung von CocaCola

Es wurde auch die Genauigkeit der HPLC-Anlage überprüft, indem zehn Mal hintereinander die Standardlösung des 1000ppm Standards und des 0,5ppm Standard eingespritzt wurde.

	Mittelwert [mg/l]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
100ppm	1018,2	6444,56	7,6
Interner Standard	81,86	155	0,23
0,5ppm	0,6	9,23	2,9
Interner Standard	78,45	1892,92	2,89

Tabelle 7 10-er Bestimmung Standard und interner Standard

3.5. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse des Fragebogens, der 3-Tages-Protokolle und der Speichelanalyse wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS/PC (Statistical Package for the Social Science, SPSS Incorp., Chicago, III., USA; Version 10.1.2) durchgeführt.

Der Nachweis der Normalverteilung der Daten wurde mittel Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt.

Anschließend wurden die Daten mit Normalverteilung mittels Pearson-Korrelation ermittelt und die Daten ohne Normalverteilung wurden mit Spearmans Rho ausgewertet.

Überprüft wurden die Übereinstimmung zwischen Fragebogen und 3-Tages-Protokolle auf den Coffeingehalt, die Speichelcoffeinkonzentration des ersten Tages und die Paraxanthinkonzentration im Speichel des ersten Tages. Für die Speichelkonzentration wurde der Mittelwert aus den ersten 7 Proben genommen.

4. Coffein in Lebensmittel

Alle Getränke und Lebensmittel die in dem Fragebogen aufgelistet sind, wurden auf ihren Coffeingehalt untersucht. Die Analyse wurde mittels HPLC durchgeführt. Die Aufbereitung der verschiedenen Lebensmittel wird in den nächsten Punkten näher beschrieben.

4.1. Analyse der coffeinhaltigen Getränke

4.1.1. Aufbereitung von Colagetränken und Eistee

Die Aufarbeitung von Colagetränken war mittels der Festphasenextraktion relativ unkompliziert. Es wurden die Getränke im Ultraschallbad entgast. Im Anschluss wurden die Proben durch einen Spritzenfilter filtriert. Dann konnte sie direkt auf die SPE aufgetragen werden.

4.1.2. Aufbereitung von Energiedrinks

Die Energiedrinks wurden ebenfalls entgast und mit einem Spritzenfilter filtriert. Sie wurden auf die SPE aufgetragen und weiterverarbeitet.

4.1.3. Aufbereitung von Kaffeegetränken

Die fertigen Kaffeegetränke wurden zentrifugiert, um vorhandene Schwebstoffe, die darin vorkommen könnten, abzutrennen. Anschließend wurden sie mit Wasser 1:1 verdünnt und direkt auf die SPE aufgetragen. Nach dieser Aufbereitung wurde die Probe noch filtriert, um die restlichen Verunreinigen zu eliminieren.

Der untersuchte Löskaffee wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Eine Tasse (250 ml) wurde mit einem Löffel (20 g) Löskaffee zubereitet, die andere Tasse wurde mit zwei Löffeln (40 g) Löskaffee zubereitet.

4.1.4. Aufbereitung von Schokolade

Die Schokolade wurde als erstes geschmolzen und dann mit Wasser versetzt und gekocht. Zu 1 Gramm Schokolade wurden 10 ml Wasser zugegeben und für circa 15 Minuten auf dem Magnetrührer auf 80°C erhitzt. Danach wurde die Schokolade durch einen Faltenfilter filtriert und im Anschluss auf die SPE aufgetragen und filtriert.

Die Kaffeeschokobohnen wurden zuerst mit einem Mixer zerkleinert und anschließend weiterverarbeitet. 1 g Probe wurde mit 10 ml Wasser aufgekocht wie es schon mit der Schokolade gemacht wurde.

4.1.5. Aufbereitung von Kaffeejoghurts

Bei den Kaffeejoghurts stellte sich der hohe Anteil an Eiweiß als Problem heraus. Dieses musste gefällt werden. Es wurde eine 50%ige meta-Phosphorsäure hergestellt und die Probe mit dieser versetzt, gevortext und anschließend für 7 Minuten bei 1700 g zentrifugiert. Das gefällte Protein setzte sich durch das Zentrifugieren ab und der wässrige Überstand wurde für die weitere Analyse verwendet.

Es wurden zu 3 g Joghurt ein Milliliter 50%ige meta-Phosphorsäure zugesetzt. Danach wurde die flüssige Phase entnommen und auf die SPE aufgetragen.

4.1.6. Aufbereitung von Tee

Der Tee wurde laut Packungsanweisung „1 Beutel für eine Tasse mit 250 ml Wasser“ aufgegossen. Es wurden bei den Teeproben eine Probe nach 3 min entnommen und eine weitere Proben nach 6 min um den unterschiedlichen Gehalt herauszufinden. Auch diese Probe wurde filtriert und anschließend über SPE aufgearbeitet.

4.2. HPLC Bedingungen der Analyse

Die Analyse des Coffeins wurde mit Hilfe eines UltiMate 3000 Series Hochdrucksflüssigkeits-Chromatographen (Dionex Austria GmbH, Wien, Österreich) durchgeführt.

Die Bedingungen waren:

Mobile Phase A: 10 molare NH_4HCO_3

Mobile Phase B: Acetonitril

Injektionsvolumen: 20 μl

Programmdauer: 15 min

HPLC-Vorsäule: X-Bridge Phenyl 3,5 μm 4,6 x 20 mm Guard Cartridge

HPLC-Säule: X-Bridge Phenyl 3,5 μm 4,6 x 100 mm Column

UV-Absorption: 270 nm

Mobile Phase: Gradienten-Elution, Eluent A: 10 molare NH_4HCO_3 , Eluent B:
Acetonitril, (Abbildung siehe Punkt 3.2)

Flussrate: 1 ml/min

Pumpendruck: bei 130 bar

5. Erhebung des Kaffeekonsums der Probanden

Der Kaffeekonsum wurde mittels eines caffeine assessment tool (CAT) ermittelt. Der CAT wurde ins deutsche übersetzt und an das österreichische Warenangebot angepasst. Dieser adaptierte Fragebogen wurde an die Probanden ausgegeben sowie 9 Salivettes® (Sarstedt Aktiengesellschaft und Co., Nürnberg, Deutschland).

Die Coffeinaufnahme der Probanden wurde über zwei verschiedene Wege abgefragt. Auf der einen Seite führten die Teilnehmer ein drei Tage Protokoll in dem sie ihre Ess- und Trinkgewohnheiten protokollierten. Aus diesem wurde im Anschluss die Coffeinaufnahme während den Proben-Tagen errechnet. Es wurden nicht nur die coffeinhaltigen Speisen protokolliert sondern alles, damit die Gewohnheiten nicht zu sehr durcheinander gebracht werden und auch alles aufgeschrieben wird.

An diesen drei Tagen wurden am zweiten und am dritten Tag auch Speichelproben abgegeben. Am zweiten Tag wurden sieben Proben im eineinhalb Stunden Takt gegeben. Die erste war eine Stunde nach der ersten Coffeinaufnahme durchzuführen.

Am dritten Tag sollten noch zwei Speichelproben erfolgen, die eine am Vormittag und die andere am Nachmittag.

Unmittelbar vor der Probennahme sollte 15 Minuten vorher kein Coffein aufgenommen werden und der Mund sollte zuvor gespült werden.

Es wurde dazu noch der Fragebogen ausgefüllt, mit dem der Verzehr coffeinhaltigen Lebensmitteln des letzten Monats abgefragt wurde.

Der Fragebogen enthielt sämtliche zuvor auf ihren Coffeingehalt untersuchte Lebensmittel. Die Probanden hatten die Auswahl den Verzehr pro Tag, Woche oder Monat anzugeben, beziehungsweise Nie. Ebenso konnte ausgewählt werden zwischen Glas, Dose oder Flasche (wobei die Flaschengröße anzugeben war).

Abgefragt wurden: Kaffee
Tee
Colagetränke
Energiedrinks

Eistee
Kaffeejoghurts
Schokolade
Medikamente

Aus dem Fragebogen und den Tagesprotokollen wurde jeweils die Coffeinaufnahme ausgerechnet. Bei den Protokollen wurde der Mittelwert dieser Tage genommen. Bei dem Fragebogen wurde zuerst die Menge für einen Monat errechnet und diese durch 30 dividiert, um die beiden Werte vergleichbar zu machen.

Die Speichelproben wurden auf den Coffeingehalt untersucht und die Ergebnisse aus diesen wurden in Zusammenhang gebracht um zu untersuchen ob der Fragebogen die Menge an aufgenommenem Coffein abschätzen kann.

5.1. Probenaufbereitung der Speichelproben

Die von den Probanden abgegebenen Speichelproben wurden mittels Salivette® gewonnen. Den Probanden wurden 9 beschriftete Röhrchen mit nach Hause gegeben wo sie die Probennahme selbstständig durchführen konnten. Das Watteröllchen blieb für ca. 2 Minuten im Mund und wurde dann wieder zurück in das Einhängengefäß gegeben. Die Probanden wurden angewiesen die Proben bei Raumtemperatur zu lagern.

Zur Aufarbeitungen wurden die Proben bei 1000 g, 20°C für 2 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der abzentrifugierte Speichel auf die SPE laut folgenden Schema aufgetragen.

Konditionierung der SPE	
1ml	Methanol
1ml	Wasser
1ml	Probe
1ml	HPLC-Wasser
1ml	Methanol

Tabelle 8 Konditionierung der SPE

Da 1 ml Speichel notwendig war um ihn auf die Säule aufzutragen, mussten die Proben von zwei Probanden neu durchgeführt werden, da zu wenig Speichel vorhanden war. Bei den anderen stand genügend Speichel zur Untersuchung zur Verfügung.

Jede Probe wurden nach diesem Schema aufgearbeitet; vor dem Abfüllen in die Vials wurde die Probe noch filtriert. Dies wurde mittels Spritzenfilter durchgeführt, damit die Säule nicht verunreinigt werden konnte.

Die Speichelproben wurden mit denselben Einstellungen detektiert wie zuvor die Analyse der Getränkeproben.

6. Ergebnisse

Bei der Analyse der Lebensmittel wurden insgesamt 10 verschiedene Kaffeearten, 27 verschiedene Colasorten, 22 Energiedrinks, 17 verschiedene Eistee-Sorten, 18 Kaffeegetränke, 7 Kaffeejoghurts, 1 Schwarzer Tee, 2 Grüne Tees sowie 7 verschiedene Schokoladen untersucht. Dazu kamen noch jeweils die 9 Speichelproben der 51 Probanden.

Die Probenaufbereitung der einzelnen Getränke ist aus Punkt 4.1 und Folgenden zu entnehmen.

6.1. Ergebnisse Lebensmittel

Die Ergebnisse der coffeinhaltigen Lebensmittel sind tabellarisch in den nachfolgenden Abbildungen aufgelistet:

KAFFEE	
Automatenkaffee	19,73 mg/100 ml
Verlängerter	65,89 mg/100 ml
Latte Mach.	24,22 mg/100 ml
Kleiner Brauner	62,09 mg/100 ml
Cappucino	12,13 mg/100 ml
Löskaffee 1 Löffel	20,09 mg/100 ml
Löskaffee 2 Löffel	48,45 mg/100 ml
Senseo	75,54 mg/100 ml
Cappu 3 in 1	19,42 mg/100 ml
Filterkaffee	44,73 mg/100 ml
Kaffee Haag (entkoffeiniert)	4,34 mg/100 ml

Tabelle 9 Coffeinkonzentration im Kaffee

COLA-GETRÄNKE	
CocaCola	9,85 mg/100 ml
CocaCola Light	9,70 mg/100 ml
CocaCola Zero	9,75 mg/100 ml
Pepsi	10,62 mg/100 ml

Pepsi Light	11,98 mg/100 ml
Red Bull Cola	13,17 mg/100 ml
Black Jack	8,39 mg/100 ml
Spar Fresh Cola	9,09 mg/100 ml
Spar Fresh Cola Light	8,94 mg/100 ml
Spar Cola Mix	4,12 mg/100 ml
Mezzo Mix	5,90 mg/100 ml
Dr. Pepper	11,32 mg/100 ml
Schartner Bombe Cola entcoffeiniert	0,10 mg/100 ml
S-Budget Cola	5,60 mg/100 ml
Top Star Cola	8,57 mg/100 ml
Top Star Cola Mix	7,31 mg/100 ml
Trendy Cola	8,84 mg/100 ml
Trendy Cola Light	9,59 mg/100 ml
Cockta	0,10 mg/100 ml
Clever Cola	6,66 mg/100 ml
Freeway Cola	8,67 mg/100 ml
Freeway Cola Light	8,34 mg/100 ml
Freeway MixMax Cola	6,49 mg/100 ml
Wake up Cola	5,91 mg/100 ml
Wake up Cola Light	6,39 mg/100 ml
Bingo Cola	6,82 mg/100 ml

Tabelle 10 Coffeinkonzentration in Colagetränken

Die Werte an Coffein bei den Colagetränken variiert zwischen 0,10 mg/100 ml bei den Colagetränken ohne Coffein, 4,13 mg/100 ml bei den niedrigsten und 13,17 mg/100 ml bei den höchsten Konzentrationen.

ENERGIEDRINKS	
Red Bull	31,79 mg/100 ml
Red Bull Sugarfree	29,25 mg/100 ml
Burn	31,91 mg/100 ml
Flying Power Sugarfree	29,94 mg/100 ml
Full Speed	30,57 mg/100 ml
Blue Bear	26,64 mg/100 ml
Blue Bear Sugarfree	26,78 mg/100 ml
S-Budget Energie	27,96 mg/100 ml
S-Budget Energie Sugarfree	30,23 mg/100 ml
Race Energie	30,38 mg/100 ml

Race Energie Sugarfree	30,08 mg/100 ml
Bomba	32,91 mg/100 ml
Booster Energiedrink	34,04 mg/100 ml
Mixxed up Energie	30,11 mg/100 ml
Mixxed up Energie Light	29,23 mg/100 ml
Race Mango Fruit Energie	29,51 mg/100 ml
Alpenjodl Energie	27,39 mg/100 ml
Pure Cafaine	66,53 mg/100 ml
Burn Energy	100,22 mg/100 ml
Red Bull Energyspot	94,85 mg/100 ml
Flying Power	29,94 mg/100 ml
Power Horse	30,26 mg/100 ml

Tabelle 11 Coffeinkonzentration in Energiedrinks

Auch bei den Energiedrinks variiert der Coffeingehalt zwischen den unterschiedlichen Herstellern. Die niedrigsten Werte liegen bei 29,25 mg/100 ml und die höchsten bei 34 mg/100 ml. Jedoch ist die Spanne relativ gering. Die beiden Energieshots liegen bei etwa 100 mg/100 ml Coffein.

EISTEE-GETRÄNKE	
Rauch Eistee Zitrone	5,96 mg/100 ml
Rauch Eistee light Zitrone	5,16 mg/100 ml
Spar Eistee	6,81 mg/100 ml
Nestea Peach	3,20 mg/100 ml
Despar Eistee Zitrone	1,34 mg/100 ml
Trendy Eistee Peach	5,16 mg/100 ml
Nativia Green Tea	10,45 mg/100 ml
Pfanner Eistee Peach	4,48 mg/100 ml
Clever Eistee Zitrone	6,74 mg/100 ml
Lipton Eistee Pfirsich	5,74 mg/100 ml
Patays Eistee Pfirsich	4,24 mg/100 ml
Pfanner Der Grüne	6,60 mg/100 ml
Wake up Eistee Zitrone	6,50 mg/100 ml
S-Budget Eistee Pfirsich	5,11 mg/100 ml
Spar Der Grüne	6,26 mg/100 ml
Rauch Eistee Light Pfirsich	5,92 mg/100 ml

Tabelle 12 Coffeinkonzentration in Eistees

Die Werte von Eistees liegen zwischen 3 und 6 mg/100 ml. Einzig der Nativia Green Tea enthält deutlich mehr Coffein als die anderen mit rund 10 mg/100 ml.

KAFFEE-GETRÄNKE	
San Fabio Latte	30,96 mg/100 ml
San Fabio Choc.	2,52 mg/100 ml
Nescafe Capu	30,57 mg/100 ml
Die Leichte Muh	26,13 mg/100 ml
Maresi Eiskaffee	24,96 mg/100 ml
Caffee&Milk Latte	22,35 mg/100 ml
Emi Latte	29,06 mg/100 ml
Bellarom Capu	23,91 mg/100 ml
Rauch Cafemio Cap	24,93 mg/100 ml
Rauch Cafemio Latte	27,13 mg/100 ml
Bellarom Café and Milk x	36,83 mg/100 ml
Jacobs Icepresso	44,81 mg/100 ml
Nescafe X-Presso Choc.	42,52 mg/100 ml
Nescafe X-Presso Org.	40,34 mg/100 ml
Nescafe X-Presso Latte	23,42 mg/100 ml
Nöm Schokomilch	1,54 mg/100 ml
Landliebe Milchkaffee	20,58 mg/100 ml
Nescafe Energo	22,97 mg/100 ml

Tabelle 13 Coffeinkonzentration in Kaffeegetränke

Die Kaffeegetränke der unterschiedlichen Hersteller liegen mit ihrem Coffeingehalt in dem Bereich der Energiedrinks. Je nach Sorte enthalten sie zwischen 20 mg/100 ml und 44 mg/100 ml Coffein. Schokoladenmilch hat eine Konzentration von etwa 2 mg/100 ml Coffein.

TEE	
Teekanne Earl Grey 3 Min	12,16 mg/100 ml
Teekanne Earl Grey 6 Min	15,36 mg/100 ml
Teekanne Grüner Tee 3 Min	13,04 mg/100 ml
Teekanne Grüner Tee 6 Min	16,06 mg/100 ml
Milford my Green 3 Min	14,37 mg/100 ml
Milford my Green 6 Min	18,33 mg/100 ml

Tabelle 14 Coffeinkonzentration in Tees

Grün- und Sschwarztee haben je länger sie ziehen, höhere Coffeinwerte.

KAFFEEJOGHURT	
Nöm Fasten	3,66 mg/100 mg
Ja Natürlich	3,29 mg/100 mg
Salzburger Land Trinkjogh	3,45 mg/100 mg
Clever	4,78 mg/100 mg
Milchkanne	4,10 mg/100 mg
Milbona	4,06 mg/100 mg
Schärdinger	4,51 mg/100 mg

Tabelle 15 Coffeinkonzentration in Kaffeejoghurts

SCHOKOLADE	
Pocket Coffee	606,46 mg/100 mg
BioEspressoZartbitter	129,55 mg/100 mg
BioArt Kaffeeschoko	148,52 mg/100 mg
BioArt Kaffeebohnen	166,25 mg/100 mg
Alnatura Kaffeebohnen	211,56 mg/100 mg
Milka Vollmilch	16,55 mg/100 mg
Zartbitter Suchard	113,73 mg/100 mg

Tabelle 16 Coffeinkonzentration in Schokolade

Schokolade weißt auch eine Konzentration von Coffein auf. Je nach Sorte ist dieser Wert bei dunkler Schokolade höher als bei Vollmilchschokoladen.

Die Coffeinkonzentration eines Pocket Coffee liegt bei rund 30 mg pro Stück. Eine Zartbitterschokolade besitzt etwa 12 mg/10 g Schokolade (1 Stück) und ein Stück Vollmilchschokolade hat etwa 2 mg/10 g.

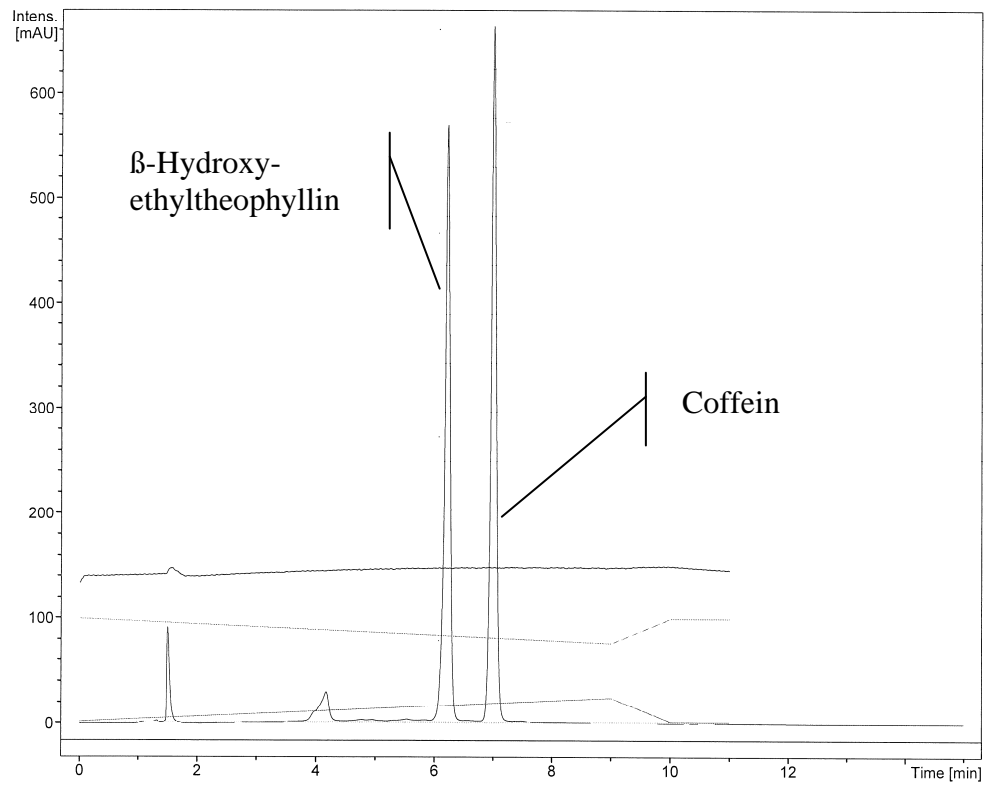


Abbildung 14 Chromatogramm Coca Cola

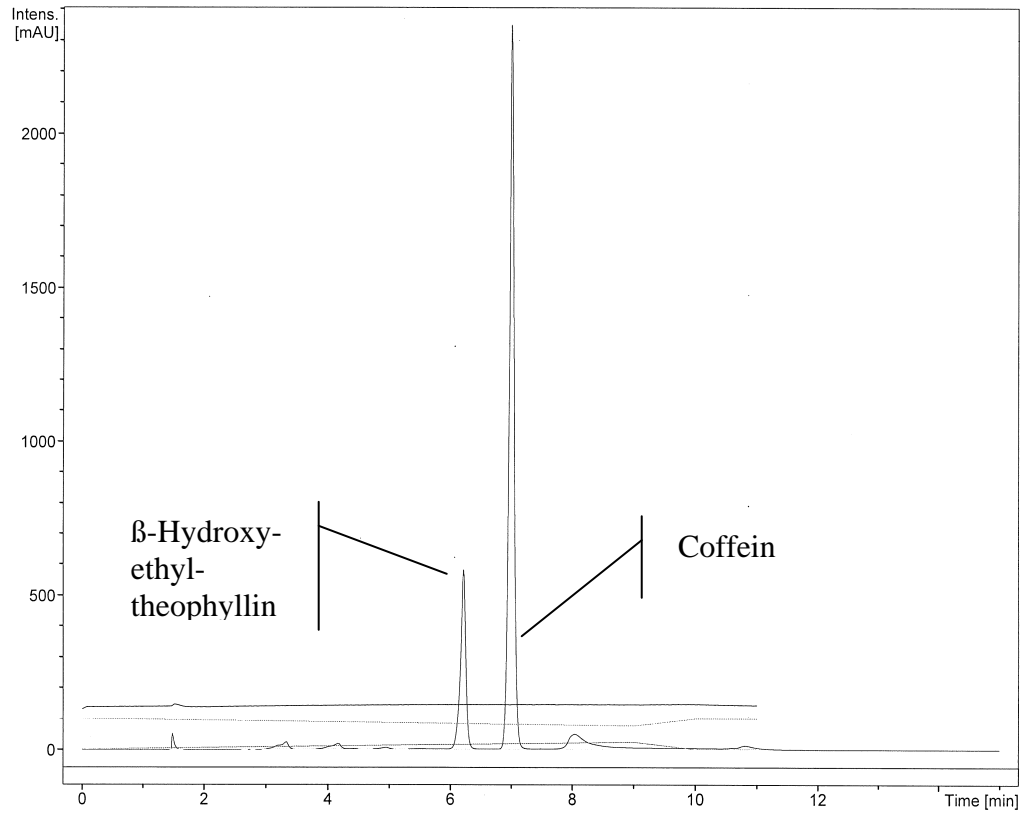


Abbildung 15 Chromatogramm Red Bull Energiedrink

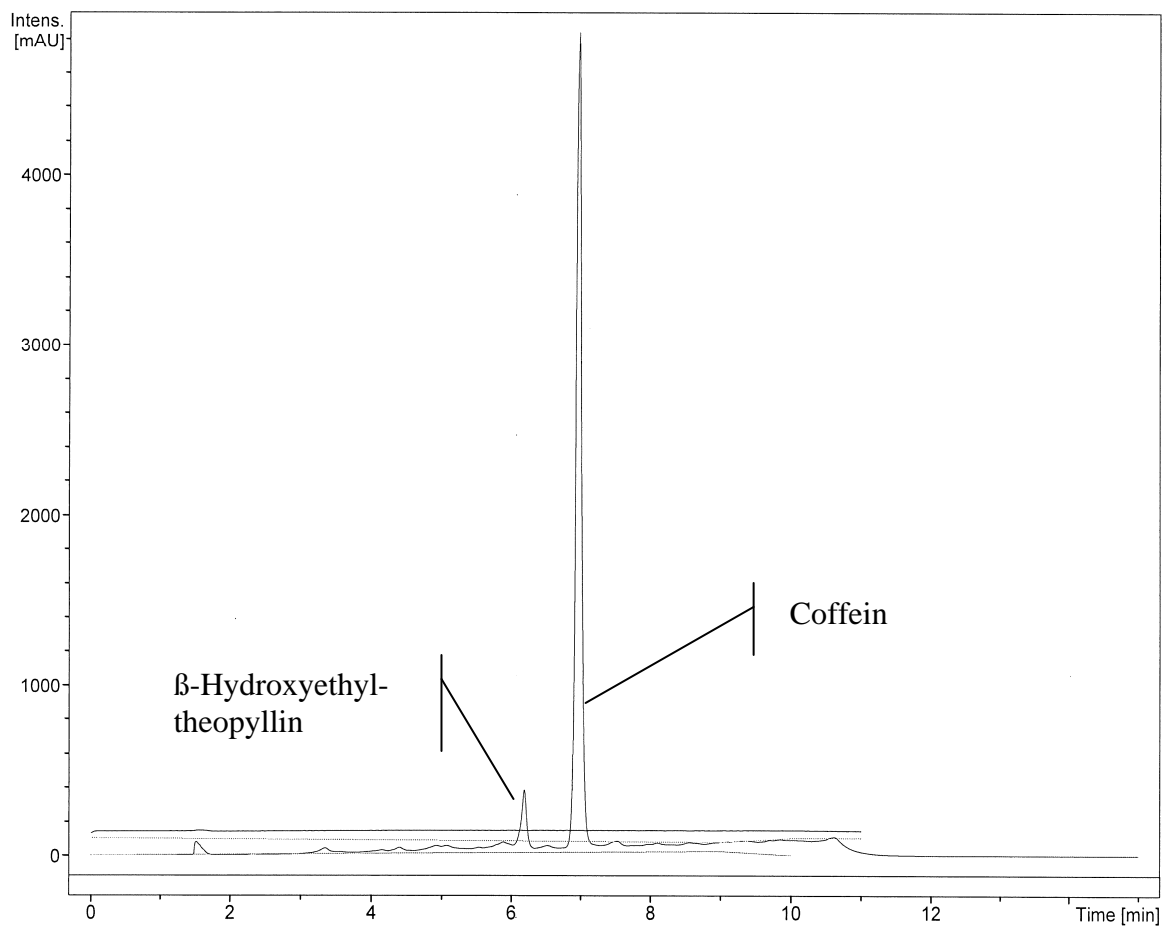


Abbildung 16 Chromatogramm Verlängerter

6.2. Ergebnisse Speichelproben

Die Analyse der Speichelproben wurde mit denselben Einstellungen durchgeführt wie zuvor die Analyse der Getränke. Es wurden alle neun Speichelproben der Probanden analysiert. Die Berechnung der durchschnittlichen Speichel Coffeinkonzentrationen und die Paraxanthinkonzentrationen wurden nur mit den ersten 7 Proben des ersten Tages errechnet.

Die Ergebnisse der Speichel Untersuchung ergab folgenden Konzentrationen von Coffein (dargestellt in mg Coffein/Liter Speichel).

FRAUEN	Coffeinkonzentration [mg/l]	MÄNNER	Coffeinkonzentration [mg/l]
Proband 1	3,44	Proband 26	3,08
Proband 2	3,22	Proband 27	1,55
Proband 3	2,72	Proband 28	3,00
Proband 4	4,49	Proband 29	0,99
Proband 5	2,54	Proband 30	2,20
Proband 6	2,00	Proband 31	2,18
Proband 7	2,39	Proband 32	2,19
Proband 8	5,86	Proband 33	12,98
Proband 9	2,95	Proband 34	2,70
Proband 10	2,24	Proband 35	4,14
Proband 11	1,64	Proband 36	2,17
Proband 12	1,35	Proband 37	3,83
Proband 13	2,05	Proband 38	1,68
Proband 14	1,93	Proband 39	1,76
Proband 15	3,47	Proband 40	2,36
Proband 16	3,01	Proband 41	2,05
Proband 17	3,89	Proband 42	1,24
Proband 18	1,85	Proband 43	1,25
Proband 19	1,04	Proband 44	3,11
Proband 20	1,94	Proband 45	1,56
Proband 21	5,65	Proband 46	1,17
Proband 22	3,54	Proband 47	1,16
Proband 23	1,19	Proband 48	1,67
Proband 24	2,88	Proband 49	1,67

Proband 25	1,87	Proband 50	1,85
Proband 51	2,87		

Tabelle 17 Coffeinkonzentrationen im Speichel

Es wurden die Paraxanthinkonzentrationen im Speichel untersucht und die ersten sieben Werte ergeben die Ergebnisse in der nächsten Tabelle ersichtlich (dargestellt in mg Paraxanthin/Liter Speichel).

FRAUEN	Paraxanthin- konzentration [mg/l]	MÄNNER	Paraxanthin- konzentration [mg/l]
Proband 1	0,07	Proband 26	0,58
Proband 2	0,40	Proband 27	0,19
Proband 3	0,07	Proband 28	0,33
Proband 4	1,30	Proband 29	0,07
Proband 5	0,11	Proband 30	0,43
Proband 6	0,07	Proband 31	0,43
Proband 7	0,27	Proband 32	0,07
Proband 8	1,10	Proband 33	3,82
Proband 9	1,71	Proband 34	0,77
Proband 10	0,22	Proband 35	0,96
Proband 11	0,07	Proband 36	0,48
Proband 12	0,07	Proband 37	1,00
Proband 13	0,23	Proband 38	0,10
Proband 14	0,07	Proband 39	0,07
Proband 15	0,75	Proband 40	0,42
Proband 16	0,57	Proband 41	0,29
Proband 17	0,47	Proband 42	0,16
Proband 18	0,09	Proband 43	0,09
Proband 19	0,07	Proband 44	0,52
Proband 20	0,96	Proband 45	0,11
Proband 21	1,18	Proband 46	0,07
Proband 22	0,75	Proband 47	0,07
Proband 23	0,15	Proband 48	0,07
Proband 24	0,83	Proband 49	0,46
Proband 25	0,13	Proband 50	0,18
Proband 51	0,37		

Tabelle 18 Paraxanthinkonzentration im Speichel

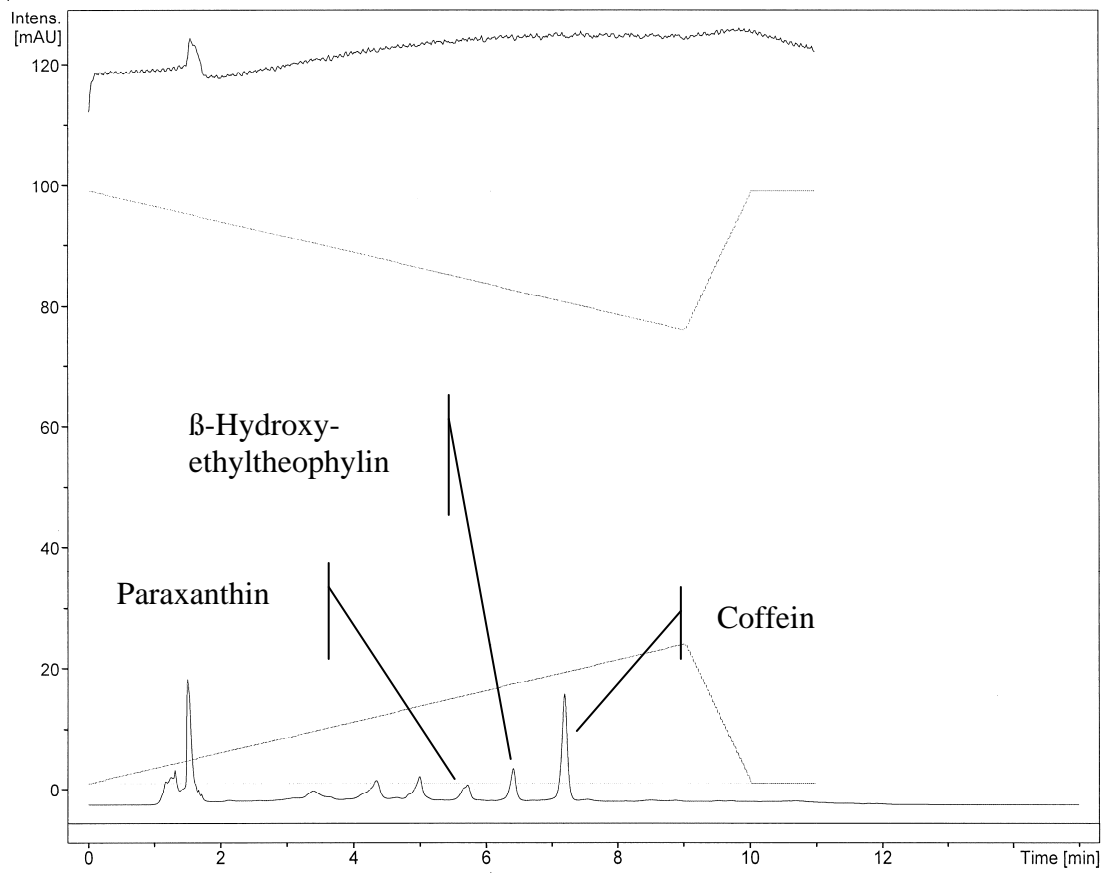


Abbildung 17 ChromatogrammSpeichelkonzentration Proband 1

6.3. Ergebnisse Fragebogen

Es wurde von den Probanden der Fragebogen ausgefüllt, bei dem sie die durchschnittliche Menge an coffeinhaltigen Getränken und Speisen angeben sollten. Daraus wurde anhand der Daten der Coffeinkonzentration der einzelnen Lebensmittel ermittelt, wie viel im Monat aufgenommen wurde. Dieser Wert wurde durch 30 dividiert um die Tages Coffein Zufuhr zu ermitteln.

FRAUEN	mg Coffein/Tag	MÄNNER	mg Coffein/Tag
Proband 1	249,65	Proband 26	287,27
Proband 2	377,33	Proband 27	104,67
Proband 3	89,87	Proband 28	242,69
Proband 4	374,73	Proband 29	16,70
Proband 5	236,27	Proband 30	328,62
Proband 6	248,85	Proband 31	340,35
Proband 7	259,04	Proband 32	219,18
Proband 8	310,48	Proband 33	495,00
Proband 9	336,96	Proband 34	372,75
Proband 10	136,53	Proband 35	109,62
Proband 11	161,48	Proband 36	245,78
Proband 12	24,40	Proband 37	666,52
Proband 13	233,62	Proband 38	251,90
Proband 14	99,63	Proband 39	125,23
Proband 15	370,85	Proband 40	236,68
Proband 16	307,95	Proband 41	217,63
Proband 17	428,87	Proband 42	197,80
Proband 18	269,45	Proband 43	96,98
Proband 19	15,87	Proband 44	263,72
Proband 20	356,30	Proband 45	320,77
Proband 21	257,53	Proband 46	131,81
Proband 22	325,97	Proband 47	193,37
Proband 23	415,66	Proband 48	341,49
Proband 24	356,45	Proband 49	482,55
Proband 25	430,17	Proband 50	234,11
Proband 51	271,55		

Tabelle 19 Coffeinaufnahme in mg/Tag des Fragebogens

6.4. Ergebnisse Tagesprotokolle

Von den Probanden wurde während der Speichelnahme auch ein Drei-Tages Ess- und Trink-Protokoll geführt. Es wurde aufgeschrieben, wann und wie viel gegessen und getrunken wurde.

Aus diesen Protokollen wurde für die drei Tage ausgerechnet, wie viel Coffein zugeführt wurde. Gerechnet wurde mit dem Mittelwert dieser 3 Tage.

FRAUEN	mg Coffein/Tag	MÄNNER	mg Coffein/Tag
Proband 1	195,29	Proband 26	195,29
Proband 2	326,24	Proband 27	161,23
Proband 3	60,55	Proband 28	273,03
Proband 4	308,00	Proband 29	22,50
Proband 5	155,71	Proband 30	233,39
Proband 6	116,78	Proband 31	293,28
Proband 7	363,03	Proband 32	157,04
Proband 8	265,35	Proband 33	485,20
Proband 9	262,15	Proband 34	313,85
Proband 10	148,39	Proband 35	233,44
Proband 11	176,93	Proband 36	273,03
Proband 12	70,00	Proband 37	622,22
Proband 13	303,98	Proband 38	142,07
Proband 14	117,10	Proband 39	116,78
Proband 15	275,37	Proband 40	129,95
Proband 16	316,18	Proband 41	272,37
Proband 17	398,68	Proband 42	209,14
Proband 18	195,33	Proband 43	117,78
Proband 19	23,50	Proband 44	321,83
Proband 20	290,70	Proband 45	252,70
Proband 21	341,85	Proband 46	117,11
Proband 22	296,58	Proband 47	163,70
Proband 23	125,88	Proband 48	214,67
Proband 24	295,57	Proband 49	483,56
Proband 25	201,63	Proband 50	160,74
Proband 51	236,78		

Tabelle 20 Coffeinaufnahme in mg/Tag des 3 Tagesprotokolls (Mittelwert)

Die Werte des 3 Tagesprotokolls und die Werte des Fragebogens stimmen sehr gut überein. In den beiden nachfolgenden Abbildungen kann die Variation zwischen Fragebogen und Tagesprotokoll entnommen werden.

In der ersten Abbildung sind die Daten der Frauen und in der zweiten Abbildung sind Männer zu entnehmen.

Die gelben Dreiecke Symbole stehen für die Menge Coffein laut Tagesprotokoll und die blauen Rechtecke stehen für die Menge Coffein laut Fragebogen

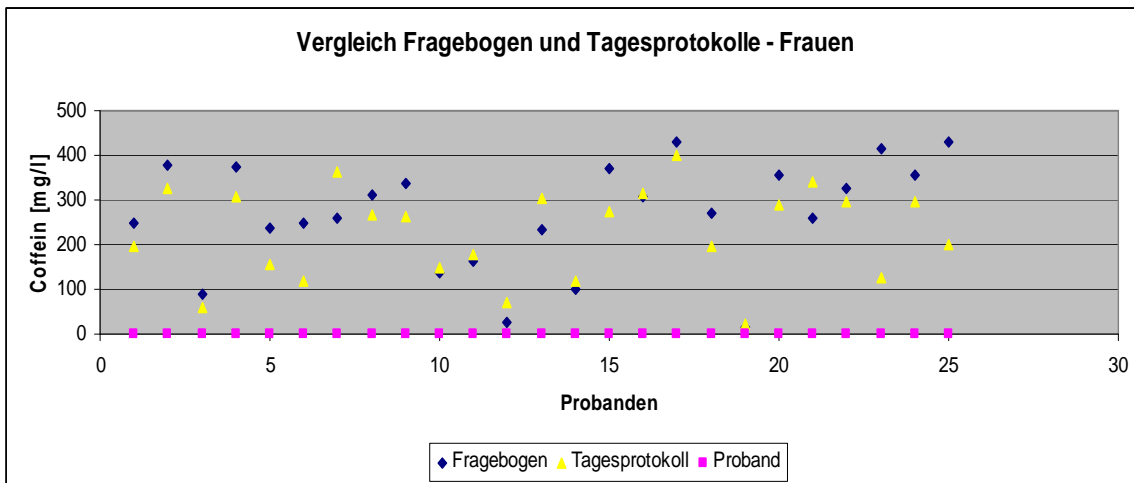


Abbildung 18 Vergleich Fragebogen und Protokolle Frauen

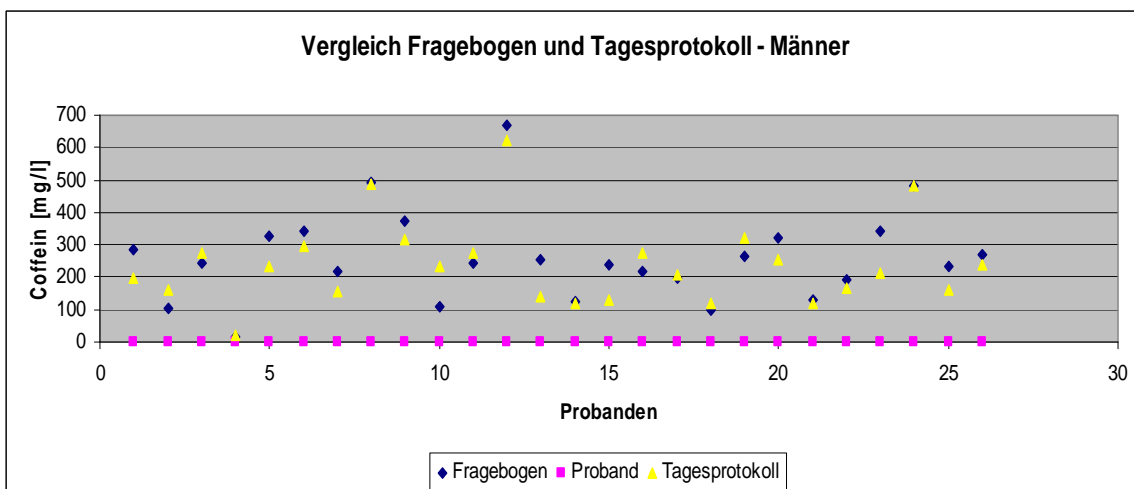


Abbildung 19 Vergleich Fragebogen und Tagesprotokolle Männer

In der folgenden Abbildung ist die Korrelation dieser beiden Werte zu sehen.

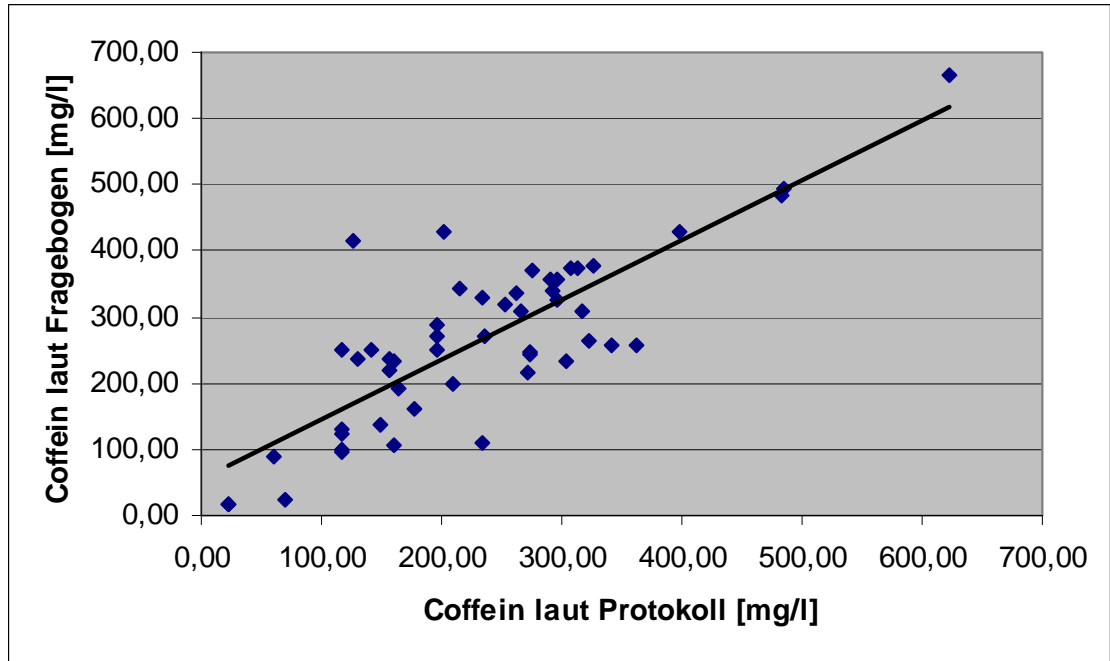


Abbildung 20 Korrelation des Fragebogen und der Tagesprotokolle

6.5. Beschreibung der Stichprobe

Insgesamt nahmen 51 Personen an dieser Studie teil. Von diesen Personen waren 26 Frauen und 25 Männer, die zu ihrer Aufnahme von Coffein befragt wurden.

Es wurde von allen der Fragebogen ausgefüllt, ein 3-Tagesprotokoll und 9 Speichelproben abgegeben.

Die Altersspanne liegt zwischen 24 und 65, das durchschnittliche Alter liegt insgesamt bei 32,8 (sd 11,04) Jahren. Das durchschnittliche Alter der Männer liegt bei 34,7 (sd 12,11) Jahren und bei den Frauen liegt es bei 31 (sd 9,8) Jahren.

Aufgeteilt nach Rauchern waren insgesamt 21 Raucher und 30 Nicht Raucher bei der Studie beteiligt. Von 26 Frauen waren 9 Raucher und 17 Nichtraucher und bei den Männern waren 13 Nichtraucher und 12 Raucher.

6.6. Ergebnisse Coffeinaufnahme laut Fragebogen

Die durchschnittliche Coffeinaufnahme liegt laut Fragebogen bei 264,09 mg/Tag (sd 129,29) und laut der Tagesprotokolle bei 232,02 mg/Tag (sd 116,95), mit einer Differenz von 32,07 mg/Tag.

Getrennt nach Geschlechtern liegt die Aufnahme an Coffein bei den Frauen laut Fragebogen bei 267,13 mg/Tag (sd 133,38) und bei den Tagesprotokollen bei 225 mg/Tag (sd 100,95). Dies ist ein Unterschied von 41,45 mg.

Bei den Männern liegt die durchschnittliche Aufnahme laut dem Fragebogen bei 260 mg/Tag (sd 142,25) und die Aufnahme nach den Tagesprotokollen liegt bei 238,63 mg/Tag (sd 118,25), dies ist eine Differenz von 22,3 mg Coffein.

Die Speichelkonzentrationen an Coffein liegt im Mittel bei 2,65 mg/l (sd 1,83). Bei den Frauen ist der Mittelwert bei 2,77 mg/l (sd 1,22) und bei den Männern bei 2,54 mg/l (sd 2,32).

Diese beiden Daten in Zusammenhang gestellt ergeben folgendes Bild:

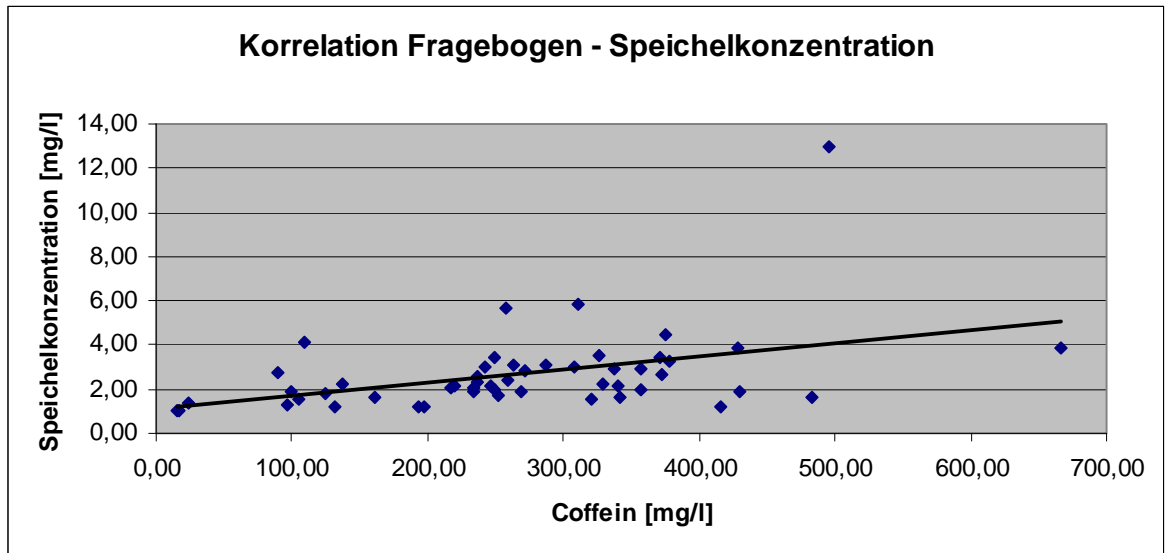


Abbildung 21 Korrelation zwischen Fragebogen und Speichelkonzentration

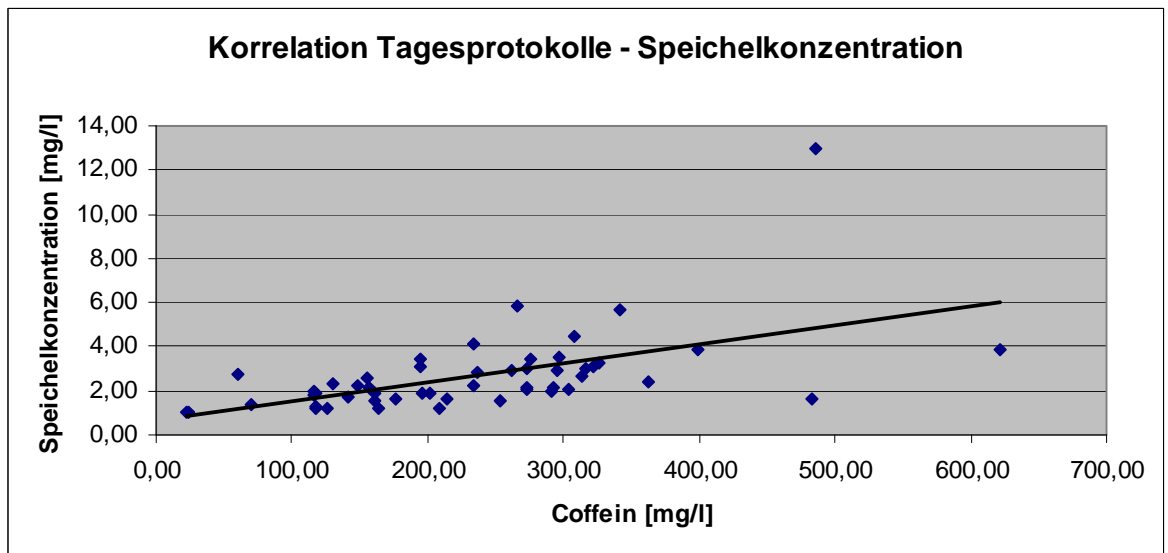


Abbildung 22 Korrelation zwischen Tagesprotokolle und Speichelkonzentration

Die Auswertung mittels SPSS ergab eine Korrelation zwischen den Daten.

Die Daten sind auf dem 0.05-Niveau signifikant.

Die Übereinstimmung des Fragebogens und der Tagesprotokolle liegt nach der Auswertung bei 0,817, die Tagesprotokolle und die Coffeinkonzentration des Speichel liegt bei 0,546, der Fragebogen und die Speichelcoffeinkonzentration liegt bei 0,427.

		3-Tage Schätzprotokoll	Caffeine Assessment Tool
3-Tage Schätzprotokoll	Korrelation nach Pearson	1	,817
	N	51	51
Caffeine Assessment Tool	Korrelation nach Pearson	,817	1
	N	51	51
Coffeinkonzentration im Speichel (mg/l)	Korrelation nach Pearson	,546	,427
	N	51	51

Tabelle 21 Statistische Auswertung nach Pearson

		Koffeinkonzentration im Speichel (mg/l)
3-Tage Schätzprotokoll	Korrelation nach Pearson	,546
	N	51
Caffeine Assessment Tool	Korrelation nach Pearson	,427
	N	51
Coffeinkonzentration im Speichel (mg/l)	Korrelation nach Pearson	1
	N	51

Tabelle 22 Statistische Auswertung nach Pearson

Die Konzentration des Paraxanthin im Speichel wurde mit einem anderen Test analysiert, da bei diesen Daten keine Normalverteilung vorliegt.

			3-Tage Schätzprotokoll	Caffeine Assessment Tool
Spearman-Rho	Paraxanthinkonzentration im Speichel (mg/l)	Korrelationskoeffizient	,785	,667
		N	51	51

Tabelle 23 Statistische Auswertung nach Spearman-Rho

			Koffein- konzentration im Speichel (mg/l)
Spearman-Rho	Paraxanthinkonzentration im Speichel (mg/l)	Korrelationskoeffizient	,753
		N	51

Tabelle 24 Statistische Auswertung nach Spearman-Rho

6.7. Verlauf der Coffeinkonzentration einzelner Probanden

In den folgenden Abbildungen ist die Coffein und Paraxanthinkonzentration im Tagesverlauf zu sehen. Es sind einige Probanden herausgenommen.

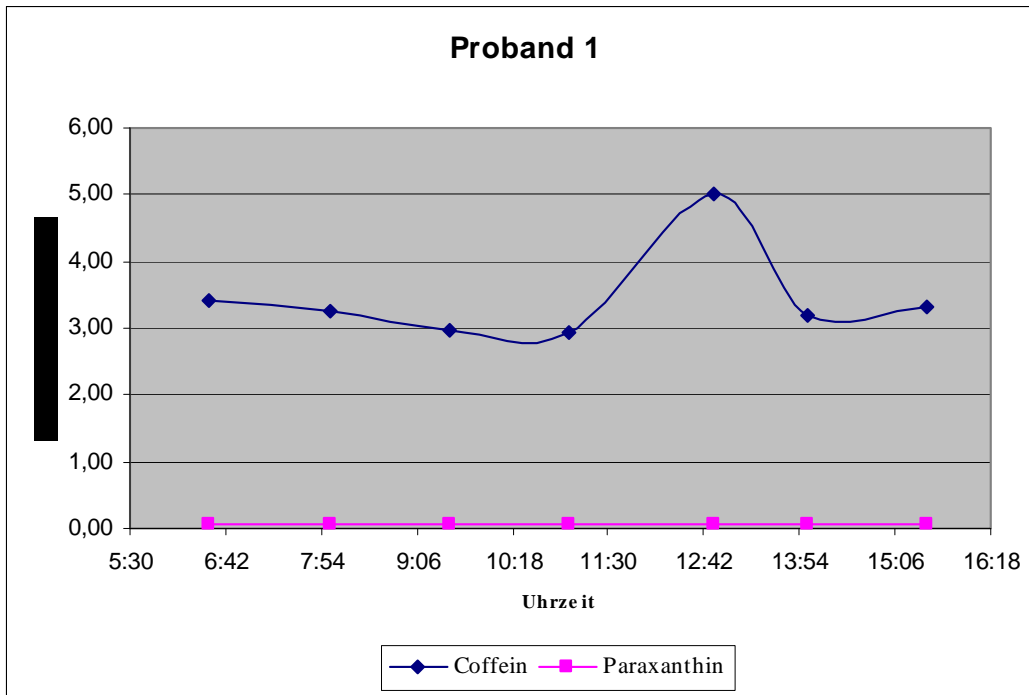


Abbildung 23 Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 1

Bei dieser Abbildung kann man sehen, dass die Coffeinkonzentration mittags nach dem aufgenommenen Kaffee am höchsten ist. Die Paraxanthinkonzentration verändert sich bei diesem Probanden nicht merklich. Entweder wird das Coffein anders abgebaut oder der Abbau ist so schnell dass es in der Paraxanthinkonzentration nicht merkbar ist.

Die Coffeinaufnahme war um 5:30 Uhr und um 12:30 Uhr jeweils eine Tasse Kaffee.

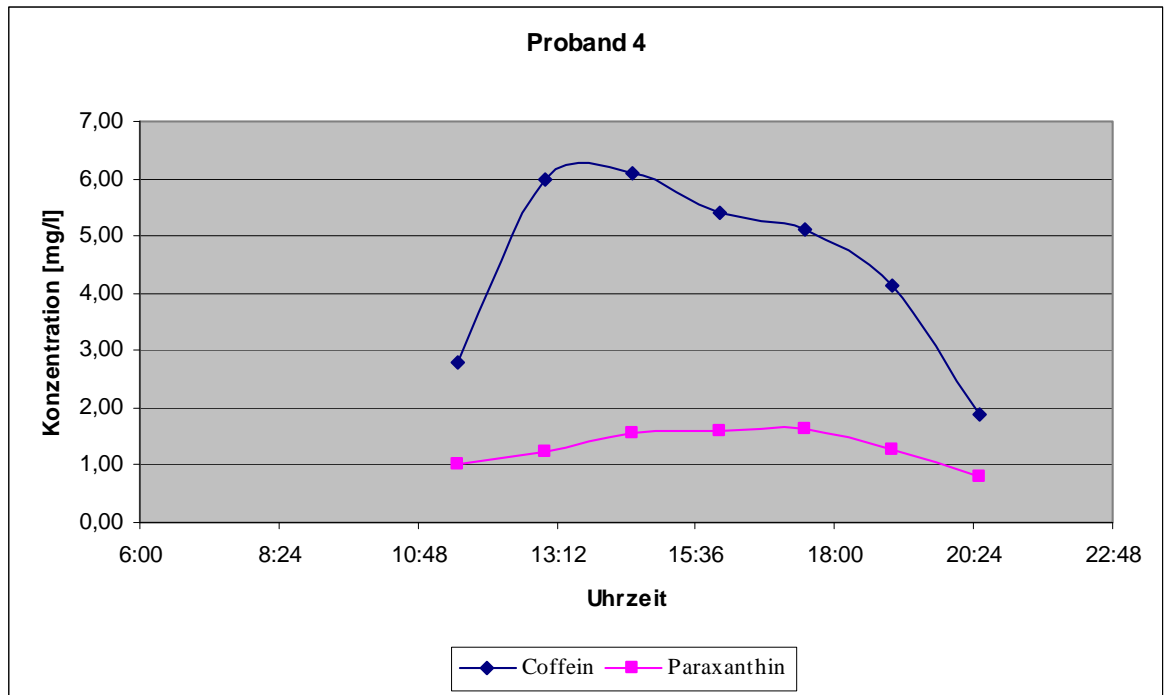


Abbildung 24 Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 4

Dieser Proband hatte um 10:30 und 15 Uhr jeweils eine Tasse Kaffee. Die Coffeinkonzentration steigt auf ein Maximum an, und hält sich konstant an, steigt nachdem zweiten Kaffee nicht weiter. Ein Anstieg der Paraxanthinkonzentration ist bemerkbar und entspricht der Coffeinkurve.

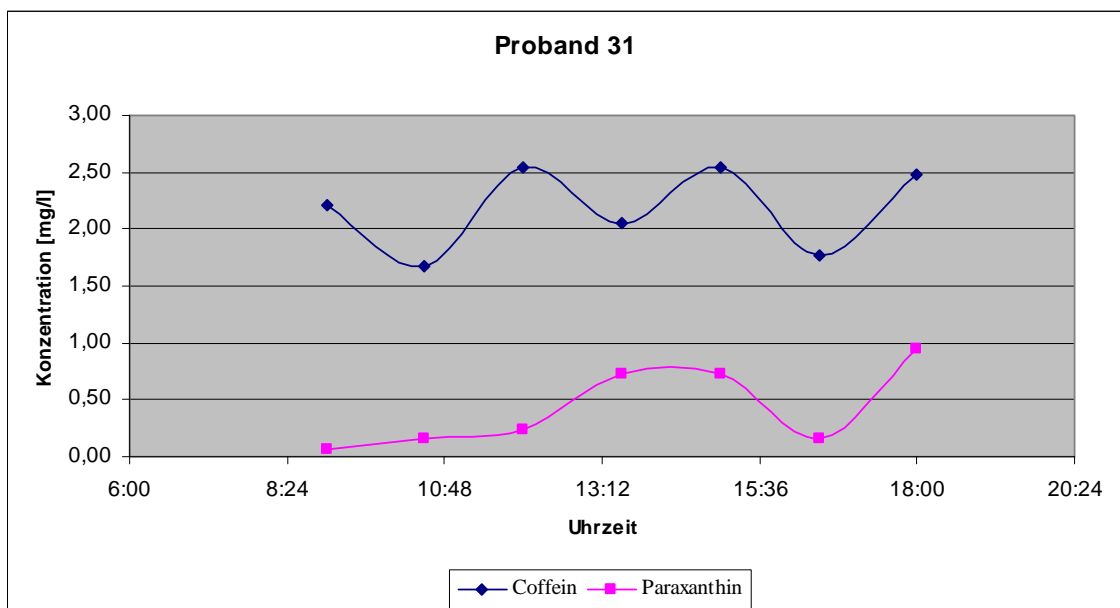


Abbildung 25 Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 31

Bei diesem Probanden war die Coffeinaufnahme um 8 Uhr, 11 Uhr, 14:30 Uhr. Bei dieser Kurve kann man sehen dass das Coffein sofort wieder abgebaut wird und der nächste Kaffee die Coffeinkonzentration im Speichel wieder erhöht. Beim Paraxanthin sieht man dass es nach einer Zeit zum Anstieg kommt, es wird stetig das Coffein abgebaut.

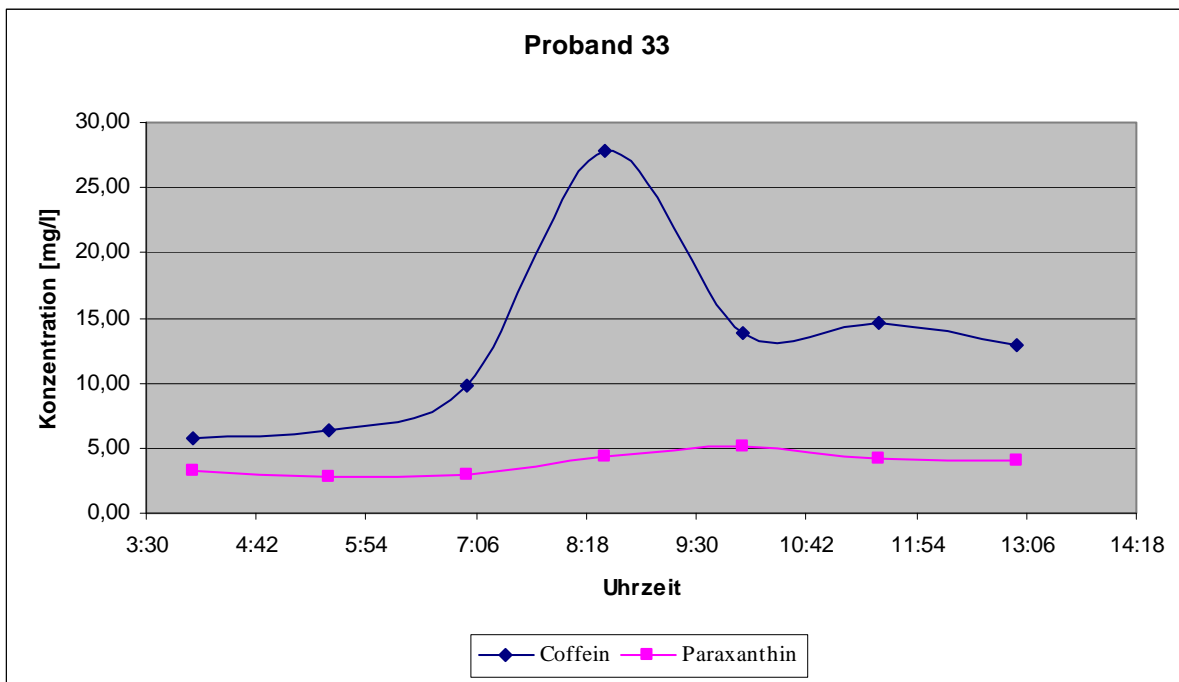


Abbildung 26 Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 33

Dieser Proband hat eine sehr hohe Coffeinzufuhr, um 3:00, 4:00, 5:30, 7:30, 8:15, 9:30, und 11:00 Uhr wurde jeweils eine Tasse Kaffee getrunken. Es ist der Abbildung zu entnehmen dass bis etwa 8:30 ein Maximum erreicht wurde und die Kurve fällt langsam ab. Die Konzentration liegt deutlich über dem Durchschnitt mit rund 27 mg/l. Für diesen hohen Anstieg ist das Paraxanthin sehr konstant aber liegt auch höher als bei anderen Probanden.

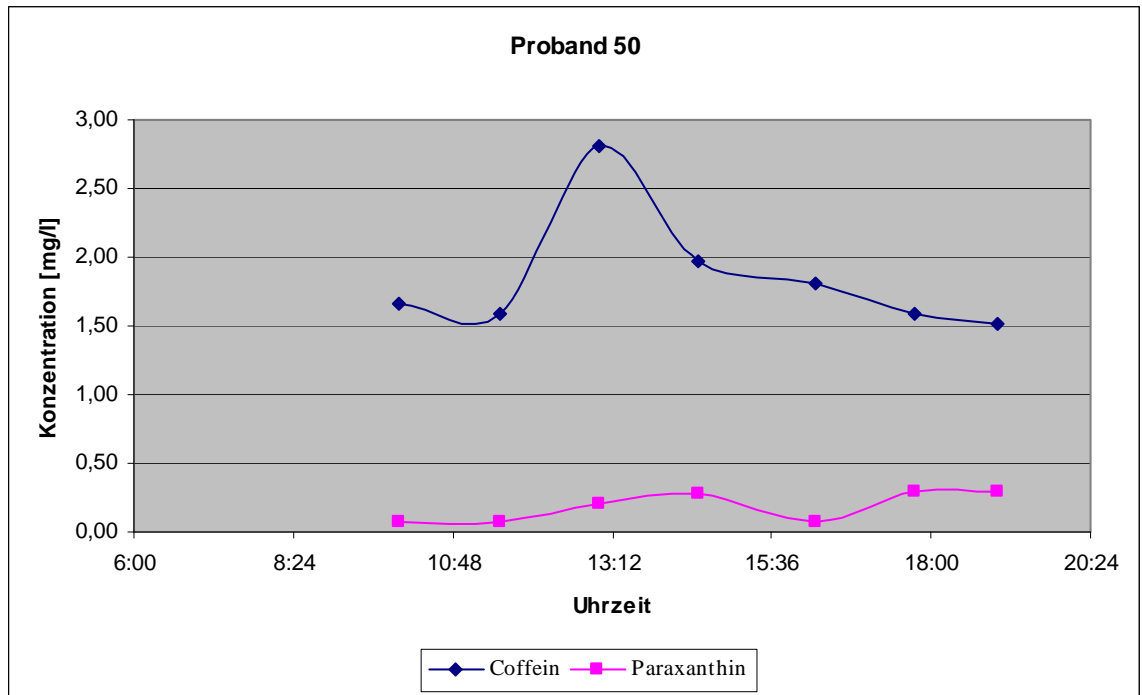


Abbildung 27 Coffein- und Paraxanthinkonzentration Proband 50

Dieser Proband hatte um 9:00 und 12:30 eine Tasse Kaffee. Auch hier ist erkennbar, dass nach Coffeinaufnahme die Konzentration steigt und ungefähr 2 Stunden nach letzter Coffeinaufnahme ist der Hauptteil des Coffein wieder abgebaut.

7. Diskussion und Schlussfolgerung

Die hier vorliegende Arbeit ist ähnlich der Studie von BOYLAN et al., jedoch ist hier das Hauptaugenmerk auf die gesamte Bevölkerung und auf keine spezielle Gruppe gerichtet.

Zunächst galt es, Daten über den Coffeingehalt der Lebensmittel zu analysieren, um damit die Coffeinaufnahme abschätzen zu können, da darüber noch kaum Daten existieren, vor allem nicht über die einzelnen Anbieter verschiedener Getränke. Die Lebensmittel wurden aus verschiedenen österreichischen Geschäften (Billa, Merkur, Hofer, Lidl, Zielpunkt, Penny) gekauft. Es wurden insgesamt 111 Lebensmittel auf ihren Coffeingehalt analysiert. Somit bekam man ein weites Spektrum an Werte und konnte sehen dass die Werte von verschiedenen Anbietern schwanken. Colagetränk ist somit nicht gleich Colagetränk mit den selben Werten. Auch kam heraus, dass der Coffeingehalt im Eistee auch nicht zu unterschätzen ist, vor allem da auch oft Kinder zu diesen Getränken greifen.

Der Fragebogen wurde adaptiert an die österreichische Produktpalette.

Zur Erprobung dieses Fragebogens wurden 51 Probanden herangezogen, die auf der einen Seite den Fragebogen ausfüllten aber zusätzlich noch ein Protokoll führten und Speichelproben abgaben. Mit diesen Hilfsmitteln wurde die Validität des Fragebogens getestet. Die Speichelkonzentration von Coffein steht im Zusammenhang mit der Coffeinaufnahme.

Die Schwierigkeiten bei der Findung der Probanden waren die Speichelproben, viele waren abgeschreckt von dem Gedanken 9 Speichelproben abzugeben, anderen war das Führen des Drei-Tages-Protokolls zu aufwendig und sagten im vorhinein ab. Zwei andere brachen nach der ersten Probennahme ab, da sie den Geschmack der Watte im Mund nicht ertragen konnten. Zwei weitere Proben mussten wiederholt werden, da zu wenig Speichel zur Analyse vorhanden war.

Die 51 Probanden, die an der Studie schließlich teilnahmen, erledigten die an sie gestellte Aufgabe.

Der Speichel wurde auf den Gehalt an Coffein und Paraxanthin analysiert, da Paraxanthin der Hauptabbauweg von Coffein.

Es stellte sich heraus, dass das Paraxanthin als Marker für die Coffeinaufnahme nicht so gut geeignet ist wie das Coffein selbst. Der Coffeinabbau kann variieren, da es bei dem Enzym (Cytochrom P450), das für den Coffeinabbau verantwortlich ist, Variationen geben kann. Es wäre eine genauere Untersuchung über das Enzym nötig, um mit diesen Werten eine genaue Aussage zu treffen.

In diesem Fall wurden die Werte der Coffeinkonzentration herangezogen.

Bei den Coffeinkonzentrationen des Speichels wurde ein Mittelwert aus den ersten sieben Proben genommen und mit den Werten des Fragebogens in Beziehung gestellt.

Es wurde auch die Paraxanthinkonzentration des Speichels ermittelt, da in der Literatur oft das Paraxanthin als besserer Marker für die Coffeinaufnahme beschrieben wird. [LELO et al. 1989, BENOWITZ et al. 1995]

Jedoch konnte dies bei dieser Untersuchung nicht festgestellt werden. Die Werte für die Paraxanthinkonzentration waren sehr gering und bei vielen Probanden nicht nachweisbar. Dies könnte auf der einen Seite damit zusammenhängen, dass die Methode zu unsensitiv ist für diese Analyse oder dass es Variationen im Stoffwechsel von Coffein geben kann. Das müsste aber mit einem genetischen Nachweis überprüft werden und die Aktivität des Cytochrom P450 gemessen werden.

Die Daten wurden mittels SPSS- ausgewertet. Von den 51 Probanden waren 26 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 31 Jahren mit einer Standardabweichung von 9,8, bei den Männer lag das Alter bei 34,7 Jahren (sd 12,11) und das Alter der gesamten Studienteilnehmer lag bei 32,8 Jahren (sd 11,04).

Aus den Tagesprotokollen und dem Fragebogen wurden die Mengen an Coffein ausgerechnet, die aufgenommen wurden. Der Wert für die Protokolle liegt im Durchschnitt bei 232,02 mg/Tag (116,95 sd) und bei dem Fragebogen bei 264,09

mg/Tag (129,29 sd). Die Differenz von 32,07 mg/Tag ist bei dieser Abschätzung sehr gut.

Diese ausgerechneten Werte wurden mit den Coffeinkonzentrationen und den Paraxanthinkonzentrationen verglichen und auf ihre Übereinstimmung überprüft.

Alle Werte, die miteinander verglichen wurden, haben eine signifikante Korrelation; die Tagesprotokolle mit dem Fragebogen haben eine Übereinstimmung von 0,817.

Das Tagesprotokoll mit den Speichelkonzentrationen hatten eine Korrelation von 0,546 und der Fragebogen mit den Speichelkonzentrationen 0,427.

Es wurde zur Überprüfung der Richtigkeit der Daten die Coffeinkonzentration herangezogen.

Die Gültigkeit des Fragebogens ist somit gegeben.

Als Ansatz für weitere Forschung sollte die Paraxanthinkonzentration und der Polymorphismus des Cytochrom P450 untersucht werden, um mehr Daten darüber zu erhalten.

8. Zusammenfassung

Coffein ist unserer Gesellschaft eines der Hauptalkaloide, das von den meisten Menschen aufgenommen wird. Es kommt in den unterschiedlichsten Lebensmitteln vor. Coffein wird meist wegen seiner anregenden Wirkung verzehrt und geschätzt. Aufgrund dieser anregenden Wirkung wird es auch immer mehr Lebensmitteln zugesetzt. Ebenso kommt es auch in pharmazeutischen Präparaten vor, vor allem in Schmerzmitteln. Im Zuge der Untersuchung wurden 111 Lebensmittel auf ihren Coffeingehalt analysiert.

Im Anschluss an diese Untersuchung wurden von 51 freiwilligen Probanden (26 Frauen und 25 Männer) mit einem Altersdurchschnitt von 32,8 Jahren ein Fragebogen ausgefüllt, ein Drei-Tage-Ess- und- Trinkprotokoll geführt sowie 9 Speichelproben gegeben. Diese Speichelproben wurden auf ihren Coffeingehalt und auf ihren Paraxanthingehalt untersucht.

Es wurde die durchschnittlich aufgenommene Menge Coffein laut Fragebogen und laut Protokolle ausgerechnet. Verglichen wurden diese Daten mit den aus dem Speichel analysierten Coffein- und Paraxanthinkonzentrationen.

Es zeigte sich bei der Untersuchung dass die Hauptcoffeinaufnahme der Probanden auf Kaffee zurück zu führen ist. Die anderen Lebensmittel sind eher zweitrangig.

Es stellte sich heraus, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Coffeinaufnahme laut Fragebogen und der Speichelcoffeinkonzentration gegeben ist. Mit Hilfe dieses Fragebogens kann die durchschnittliche Coffeinaufnahme der Bevölkerung abgefragt werden.

Die Validität dieses Fragebogens ist gegeben.

9. Summary

Caffeine is one of the most consumed alkaloids in the world. There are a lot of foods which include caffeine.

Due to the stimulating effects of caffeine it is very popular and there are more and more foods which contain caffeine. Moreover caffeine is also processed in pharmaceutical products particularly in analgetics.

During the study 111 foods are under examination on their caffeine concentration. Following this analysis, 51 volunteers (average age 32,8 years) were recruited. The test persons were given the questionnaire, nine Salivettes® and they were asked to provide a 3d food and drink diary. The salvia samples were tested for caffeine concentration and paraxanthine concentration.

The average caffeine intake was calculated from the questionnaire and the food and drink diary. The data of these both are compared to the caffeine concentration in salvia.

The examination shows that coffee is the main source of caffeine intake. All the other foods are marginal sources.

The caffeine intake (questionnaire) and the caffeine concentration in salvia sample has a significant coherence.

The average caffeine consumption of the population can be determined with this questionnaire.

10. Literaturverzeichnis

ABUIRJEIE M.A, EL-DIN M. S, MAHMOUD I, Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in various food products using derivative UV-spectrophotometric techniques and High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Liquid Chromatography, 1992; 15: 101-125

AKTORIES K, FÖRSTERMANN U, HOFMANN F, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2009, S 174ff

BENOWITZ NL, JACOB P, MAYAN H, DENARO C, Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans, 1995; 58: 684-691

BERTHOU F, GUILLOIS B, RICHE C, DREANO Y, JACQZ-AIGRAIN E, BEAUNE, Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes, Xenobiotica, 1992; 22: 671-680

BLASCHEK W, EBEL S., HACKENTHAL E, HOLZGRABE U, KELLER K, REICHLING J, SCHULZ V, Coffein In: Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2007. S.33ff

BELITZ HD, GROSCH W, SCHIEBERLE P, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin, 2001, S 323 ff

BREDERECK H, GOMPPER R, SCHUH HG, THEILIG G, Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie II, 16. Synthesen mit Säure-amiden, insbesondere mit Formamid; Angewandte Chemie; 71, 24: 753-776

BRUNETTO M. R, GUTIERREZ L, DELGADO Y, GALLIGNANI M, ZAMBRANO A, GOMEZ A, RAMOS G, ROMERO C, Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system, *Food Chemistry*, 2007; 100: 459 – 467

BROWN THOMAS J, YEN J.H, SCHANTZ M.M, PORTER B.J, SHARPLESS K.E, Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Standard Reference Material 2384, Baking Chocolate, Using Reversed-Phase Liquid Chromatography, 2004; 52: 3259 – 3263

BISPO M.S, VELOSO M.C.C, PINHEIRO H.L, OLIVEIRO R.FS, REIS J.O, ANDRADE J.B, Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography Science*, 2002; 40: 45- 48

BOYLAN S.M, CADE J.E, KIRK S.F.L, GREENWOOD D.C, WHITE K.L.M, SHIRES S, SIMPSON N.A.B, WILD C.P, HAY A.W.M, Assessing caffeine exposure in pregnant women, *British Journal of Nutrition*, 2008; 100: 875 – 882

CZOK G, Untersuchungen über die Wirkung von Kaffee, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 1966.

DOBROCKY P, BENNETT P.N, NOTARIANNI L.J, Rapid Method for the routine determination of caffeine and its metabolites by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1994; 652: 104 – 108

DOBROCKY P, BENNETT P.N, NOTARIANNI L.J, Rapid Method for the routine determination of caffeine and its metabolites by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1994; 652: 104 – 108

DUDLITZKY M, TEJA E, LEWIS H.F, Determination of Caffeine in tea by High-Performance Liquid Chromatography and a modified digestion procedure, Journal of Chromatography, 1984; 317: 403 - 405

EICHLER O, Kaffee und Coffein, Springer Verlag, Berlin

EL-YAZIGI A, SHABIB S, AL-RAWITHI S, YUSUF A, LEGAYADA E. S, AL-HUMIDAN A, Salvary Clearance and Urinary Metabolic Pattern of Caffeine in Healthy Children and in Pediatric Patients with Hepatocellular Disease, Journal of Clinical Pharmacol, 1999; 39: 366 – 372

ESTLER CJ, Pharmakologie und Toxikologie, Schattauer, Stuttgart, 2000

HEISS R, Lebensmitteltechnologie : biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung / Rudolf 3., überarb. u. erw. Aufl. . - Berlin [u.a.] : Springer , 1990 . - XXII, 422 S. . - 0-387-51737-5 New York

HASLER J, ESTABROOK R, MURRAY M, PIKULEVA I, WATERMAN M, CAPDEVILA J, HOLLA V, HEVIG C, FALCK J, FARRELL G, KAMINSKY L, SPIVACK S, BOITIER E, BEAUNE P, Human cytochromes P450 In: Molecular Aspects of Medicine, 1999; 20: 1-137

HÄNSEL R, HÖLZL J, Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie, Springer-Verlag, Berlin, 1996

HÄNSEL R, STICHER O, Pharmakognosie – Phytopharmazie, Springer Verlag Heidelberg, 2010

HORNING M, BROWN L, NOWLLN J, LERTRATANANGKOON K, KELLAWAY P, ZION T, Use of Salvia in Therapeutic Drug Monitoring, Clinical Chemistry, 1977; 23: 157-164

HURST W, MARTIN R, TARKA S, Analytical Methods for Quantitation of Methylxanthines, In Caffeine, 1998 CRC Press, New York

HENNION MC, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1996; 856: 3 – 54

JULIEN R, Drogen und Psychopharmaka, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997. S 169ff

KALOW W, TANG B, Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities In: Clinical Pharmacology & Therapy, 1991; 50: 508-519.

KICINSKI HG, Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung und Clean up, Chemie in Labor und Biotechnik, 1996; 47: 542-548

KOT M, DANIEL W, Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: The pathway and concentration dependence, Biochemical Pharmacology, 2008; 75: 1538 – 1549

KOT M, DANIEL W, Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat, Pharmacological Reports, 2008; 60: 789 – 797

KICINSKI H. G, Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung und Clean up, Chemie in Labor und Biotechnik, 1996; 47: 542 – 548

KONJE J.C, CADE J.E, Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study, 2008; 337: 1334 - 1338

KLEBANOFF M.A, LEVINE R. J, DERSIMONIAN R, CLEMENS J, WILKINS D. G, Serum Caffeine and Paraxanthin as Markers for Reported Caffeine Intake in Pregnancy, AEP, 1998; 2: 107 – 111

LELO A, MINERS JO, ROBSON R, BIRKETT DJ, Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines; *Clinical Pharmacol Ther*, 1986; 39: 54-59

MAIER H.G, Kaffee, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1981.

MATISSEK, STEINER, FISCHER, *Lebensmittelanalytik*

MUMIN A, AKHTER K.F, ABEDIN Z, HOSSAIN Z, Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE-HPLC), *Malaysian Journal of Chemistry*, 2006; 8: 045 – 051

POOLE C, New trends in solid phase extraction, *Trends in Analytical Chemistry*, 2003; 22: 362-373

PURA NAIK J, NAGALASKSHMI S, Determination of Caffeine in Tea Products by an Improved High-Performance Liquid Chromatography Method, 1997; 45: 3973 – 3975

PARRA P, LIMON A, FERRE S, GUIX T, JANE F, High-performance liquid chromatographic separation of caffeine, theophylline, theobromine and paraxanthine in rat brain and serum, *Journal of Chromatography*, 1991; 570: 185 -190

RODRIGUES C, MARTA L, MAIA R, MIRANDA M, RIBEIRINHO M, MAGUAS C, Application of solid phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC, *Journal of Food Consumption and Analysis*, 2007; 20:440-448

SCHAUDER P, OLLENSCHLÄGER G, *Ernährungsmedizin*, Urban & Fischer, München, 2006, S 458 ff

SACHSE C, BROCKMÖLLER J, BAUER S, ROOTS I, Functional significance of a C
– A polymorphism in intron I of the cytochrome P450IA2 gene tested with caffeine,
British Clinical Pharmacology, 1999; 47: 445 – 449

WEISS C, Koffein, Ernährungsumschau, 2007; 4: 210 – 215

11. Anhang

ANLEITUNG

3-Tages-Protokoll

Am **ersten** Tag bitte die Uhrzeit und die Speisen, Getränke aufschreiben
(Bsp.: 7.30 – Müsli mit Milch, 1 Tasse Kaffee)

Am **zweiten** Tag bitte die Uhrzeit und die Speisen, Getränke aufschreiben sowie die Uhrzeit der Probennahme.

Die erste Speichelprobe wird eine Stunde nach dem ersten Kaffee genommen und danach im 90 Minuten Rhythmus. Insgesamt werden an diesem Tag werden 7 Proben genommen.

15 Minuten vor der Probennahme soll kein Kaffee getrunken werden, der Mund soll vorher einmal mit Wasser gespült werden.

Am **dritten** Tag wird wieder die Uhrzeit und die Speisen, Getränke aufgeschrieben. Die letzten 2 Speichelproben werden eine am Vormittag und eine am Nachmittag genommen.

Bitte tragen Sie die Marke und die verzehrte Menge in die dafür vorgesehenen Felder ein!

Getränk	Marke	Entkoff- einert	Tassen/ Tag	Tassen/W oche	Tassen/ Monat	Nie
Kaffee						
Filterkaffee stark						
Filterkaffee mittel						
Filterkaffee leicht						
Löskaffee						
Cafe Latte						
Verlängerter						
Kleiner Brauner						
Cappucino						
IcePresso						
Cafesmio						
Eiskaffee						
Jacobs Ice Presso Latte						
Leichte Muh Latte Cappucino						
Nescafe Express						

Bitte tragen Sie die Marke und die verzehrte Menge in die dafür vorgesehenen Felder ein!

Getränk	Marke	Entkoff- einert	Tassen/ Tag	Tassen/W oche	Tassen/ Monat	Nie
Kaffee						
Emi Café Latte						
Nöm Caffé Latte/Cappucino/Espresso						
Maresi Eiskaffee						
Bellarom Espresso Macchiato/Latte Macchiato						
Bellarom XtraPresso						
San Fabio Caffé Latte Macchiato/Espresso						
Nescafe energo						

Bitte tragen Sie Marke und Sorte sowie die Menge ein!

Getränk	Marke	Teesorte	Tassen/ Tag	Tassen/ Woche	Tassen/ Monat	Nie
Tee						
Teekanne Earl Grey						
Teekanne Grüner Tee						
Milford my Green						

Bitte tragen Sie die getrunkene Sorte, Flaschengröße und Menge ein!

Getränk	Sorte	Flaschen- größe	Flaschen/ Tag	Flaschen /Woche	Flaschen/ Monat	Nie
Eistee-Getränke						
Rauch Eistee Zitrone/Pfirsich						
Rauch Eistee light Lemon/Peach						
Spar Eistee						
Nestea Pech/Lemon						
Despar Eistee						
Trendy Ice Tea Peach/Lemon						
Nativia Green/ White Tea						
Pfanner Ice Tea Pfirsich/Lemon/Wald beere/Wildkirsche						
Clever Eistee Pfirsich/Zitrone						
Lipton Eistee Peach/Lemon						

Bitte tragen Sie die getrunkene Sorte, Flaschengröße und Menge ein!

Getränk	Sorte	Flaschen- größe	Flaschen/ Tag	Flaschen/ Woche	Flaschen/ Monat	Nie
Eistee-Getränke						
Pataya Eistee Zitrone/Pfirsich						
Pfanner Der Gelbe/Grüne/Rote						
Wake up Eistee Pfirsich/Zitrone/ Mango-Zitrone						

Bitte tragen Sie die Flaschengröße und Menge ein

Getränk		Flaschen- größe	Getränke /Tag	Getränke /Woche	Getränke /Monat	Nie
Cola						
CocaCola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Coca Cola light	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Coca Cola zero	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Pepsi	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Pepsi light	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Red Bull Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Black Jack	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Spar Fresh Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Spar Fresh Cola light	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Spar Cola Mix	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Mezzo Mix	Flasche					
	Dose					
	Glas					

Bitte tragen Sie die Flaschengröße und Menge ein

Getränk		Flaschen- größe	Getränke /Tag	Getränke /Woche	Getränke /Monat	Nie
Cola						
Dr. Pepper	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Schartner Bombe Cola entcoff.	Flasche					
	Dose					
	Glas					
S-Budget Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Top Star Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Top Star Cola Mix	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Trendy Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Trendy Cola light	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Cockta	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Clever Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Freeway Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Freeway Cola light	Flasche					
	Dose					
	Glas					

Bitte tragen Sie die Flaschengröße und Menge ein

Getränk		Flaschen- größe	Getränke /Tag	Getränke /Woche	Getränke /Monat	Nie
Cola						
Freeway MixxMax Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Wake up Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Wake up Cola light	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Bingo Cola	Flasche					
	Dose					
	Glas					

Bitte tragen Sie die Flaschengröße und Menge ein!

Getränk		Flaschen- größe	Getränke/ Tag	Getränke/ Woche	Getränke /Monat	Nie
Energiedrinks						
Red Bull	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Red Bull sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Burn	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Full Speed	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Blue Bear	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Blue Bear sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					
S-Budget Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
S-Budget Energiedrink Sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Race Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Race Energiedrink Sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					

Bitte tragen Sie die Flaschengröße und Menge ein!

Getränk		Flaschen- größe	Getränke/ Tag	Getränke/ Woche	Getränke /Monat	Nie
Energiedrinks						
Bomba	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Flying Horse	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Booster Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Mixxed up Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Mixxed up light Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Race Mango Fruit Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Alpen Jod'l Bio Energiedrink	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Power Horse	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Power Horse Sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Pure Cafaine	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Burn Energieshoot	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Red Bull Energieshoot	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Flying Power	Flasche					
	Dose					
	Glas					
Flying Power Sugarfree	Flasche					
	Dose					
	Glas					

Marke		Menge/ Tag	Menge/ Woche	Menge/ Monat	Nie
Kaffeejoghurts					
Ja Natürlich! Kaffeejoghurt					
Salzburger Land Trinkjoghurt Cafe Latte					
Milbona Kaffeejoghurt					
Nöm Fasten Kaffeejoghurt					
Clever Kaffeejoghurt					
Schäringer Kaffeetraum					
Milchkanne Kaffeejoghurt					

Marke		Menge/ Tag	Menge/ Woche	Menge/ Monat	Nie
Sonstiges					
Kaugummi mit Guarana					
Octain Brain Bar					

Marke		Menge/ Tag	Menge/ Woche	Menge/ Monat	Nie
Medikamente					
Aspirin					
Eudorlin					
Doppelspalt					
Thomapyrin					
Saridon					
Gripostad					

Schokolade	Marke	Verzehr/ Tag	Verzehr/ Woche	Verzehr/ Monat	Nie
Schokolade					
Schokoladenmilch					
Pocket Coffee					
Alnatura Espresso Schokolade					
Bio Espresso Zartbitterschokolade					
Bioart Kaffeebohnen					
Fairtrade Coffee Schoko Bean					
Milka Vollmilch					
Suchard Zartbitter 70%					

Lebenslauf

Andrea Färbinger

* 23.09.1982 in Salzburg

AUSBILDUNG

- 10/2004 – 10/2010 Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
- 09/2002 – 06/2003 Ausbildung zur Masseurin, Wifi Salzburg
- 09/1997 – 06/2002 Höhere Bundeslehranstalt für Wirtschaftliche Berufe, Annahof,
Salzburg, Matura

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

- 08/2008 Ferialpraxis bei Edith Kubiena, Diätassistentin, Neufeld
- 07/2008 Ferialpraxis bei eatconsult, Wien
- 09/2007 Ferialpraxis bei der Lebensmittelversuchsanstalt, Wien
- 08/2007 Ferialpraxis bei Wiberg, Labor, Freilassing
- 07/2005 – 08/2005 Buffetverkauf bei den Salzburger Festspielen, Goldener Hirsch
07/2006 – 08/2006 Salzburg
- 06/2004 – 09/2004 Masseurin im Hotel Mohrenwirt, Fuschl am See
06/2005 – 09/2005
06/2006 – 09/2006
- 12/2003 – 05/2004 Masseurin im Kurzentrum Bad Bleiberg, Kärnten