



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Quantitative Bestimmung von Koffein und seinen Hauptmetaboliten in Tee

verfasst von

Jessica Beierbach, Bakk.rer.nat

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 27. November 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreut von: Mag. Dr. Elisabeth Rudolph-König

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und in der Bearbeitung und Abfassung keine anderen, als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe. Des Weiteren bestätige ich, dass ich diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Jessica Beierbach

Weingarten, den 27.11.2014

Einleitung

In einer Diplomarbeit aus dem Jahr 2010 wurde der Koffeingehalt von unterschiedlichen, auf dem lokalen Markt erhältlichen Lebensmitteln analysiert, um mit Hilfe dieser Daten die Koffeinaufnahme in der österreichischen Bevölkerung zu erheben. Dabei zeigte sich, dass die Koffeingehalte für verschiedene Tee- und Kaffeeproben einer sehr großen Spannweite unterliegen. Gründe hierfür sind offensichtlich die Vielzahl an unterschiedlichen Produkten, Herstellern und Zubereitungsmethoden. [Rudolph et al., 2012] Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit 34 verschiedene Teegetränke aus Österreichs Supermärkten und ausgewählten Coffee-Shops auf ihren Gehalt an Koffein, sowie zusätzlich an Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin untersucht. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Abbau-Produkte von Koffein, welche wie dieses selbst zur Gruppe der Methylxanthine gehören. [Ashihara et al., 2011], [Da Silva Pinto M, 2013] Die Betrachtung letzterer ist vor allem deshalb interessant, da sie nur in wenigen Studien berücksichtigt werden. Neben unterschiedlichen Teesorten und Brühzeiten wurden bei der Analyse außerdem verschiedenste Produzenten berücksichtigt. Quantifiziert wurden die einzelnen Methylxanthine nach Aufarbeitung der Proben mittels Festphasenextraktion und Einkonzentrierung, sowie gegeben falls vorausgegangener Proteinfällung, mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und einem UV-Detektor.

Im Folgenden möchte ich dem Leser zunächst einige allgemeine Informationen über Tee, die Teepflanze *Camellia sinensis* und die Methylxanthine liefern. Ferner werde ich im ersten Kapitel auf das Prinzip der verwendeten Methoden eingehen (Kapitel 1: Literaturübersicht). Im Anschluss folgen detaillierte Angaben zu den verwendeten Materialien und der praktischen Vorgehensweise im Labor (Kapitel 2: Materialien und Methoden), sowie den ermittelten Ergebnissen (Kapitel 3: Ergebnisse und Diskussion), welche in Kapitel 4 (Schlussfolgerung) und 5 (Zusammenfassung) bewertet und schließlich nochmals zusammengefasst werden.

Introduction

As part of a diploma thesis from 2010 the caffeine content of different foods, available on the local markets, has been analyzed in order to determine the caffeine consumption of the Austrian population. It has been shown, that the concentrations of diverse tea- and coffee- samples vary to a great extent. Obviously the reason therefore is the amount of different products, manufacturers and preparation methods. [Rudolph et al., 2012] Based on these findings the contents of caffeine and additionally of theobromine, theophylline and paraxanthine have been investigated in 34 different tea drinks from Austrian supermarkets and selected coffee shops. Those compounds are degradation products of caffeine, which, like caffeine itself, belong to the chemical group of methylxanthines. [Ashihara et al., 2011], [Da Silva Pinto M, 2013] The observation of the latter is interesting since they are only considered in a few studies. Beside of different tea varieties and brewing times also various manufacturers have been considered during the analysis. The quantification of the methylxanthines using a High Pressure Liquid Chromatograph and an UV-detector, took place after sample preparation by solid-phase extraction and concentrating, as well as preceding protein precipitation if necessary.

In the following I will provide some general information about tea, the tea plant *Camellia sinensis* and the methylxanthines. Furthermore the first chapter (Chapter 1: Literature Review) concentrates on the principle of the used methods. Afterwards there will be detailed information about the materials and the practical approaches (Chapter 2: Materials and Methods) and about the obtained results (Chapter 3: Results and Discussion), that are evaluated and summarized in chapter 4 (Conclusion) and 5 (Summary).

Inhaltsverzeichnis

1. Literaturübersicht	1
1.1 Die Welt des Tees.....	1
1.1.1 Tee – Definition im Allgemeinen und im Besonderen	1
1.1.2 Die Teepflanze <i>Camellia sinensis (L.) Kuntze</i>	3
1.1.3 Der Teemarkt - ein wachsender Wirtschaftssektor	4
1.1.4 Tee: Ein Getränk, das was kann	6
1.2 Die Stoffgruppe der Methylxanthine	7
1.2.1. Koffein-Synthese	9
1.2.2 Koffein-Abbau	12
1.2.3 Die Funktion von Koffein in der Pflanze.....	12
1.3 Prinzip der verwendeten Methoden.....	14
1.3.1 Festphasenextraktion	14
1.3.2.1 Hochdruck- / Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	16
1.3.2.2 Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC)	19
1.3.2.3 Gradienten-Elution	20
2. Materialien und Methoden	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Geräte	22
2.1.3 Software	23
2.1.4 Proben.....	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Herstellung des internen Standards	24
2.2.2 Herstellung der Verdünnungsreihen und Standardgeraden	25
2.2.4 Wiederfindung	35
2.2.5 Probenzubereitung	37
2.2.5.1 Schwarz-, Grün- und Weißteeproben.....	37
2.2.5.2 Zitronentee-Getränk.....	37
2.2.5.3 Eisteeproben.....	38

2.2.5.4 Bubble Tea.....	38
2.2.5.5 Milchmischgetränke.....	38
2.2.6 Probenlagerung.....	39
2.2.7 Lagerversuch.....	39
2.2.8 Probenaufarbeitung.....	40
2.2.8.1 Proteinfällung.....	40
2.2.8.2 Festphasenextraktion.....	40
2.2.8.3 Einkonzentrierung.....	41
2.2.9 HPLC-Bedingungen der Analyse.....	42
3. Ergebnisse und Diskussion.....	43
3.1 Chromatogramme.....	43
3.2 Detektionsgrenze.....	44
3.3 Lagerversuch.....	44
3.4 Teeproben.....	47
4. Schlussfolgerung.....	58
5. Zusammenfassung.....	60
5. Summary.....	61
6. Abkürzungsverzeichnis.....	I
7. Literaturverzeichnis.....	III
8. Abbildungsverzeichnis.....	VII
9. Tabellenverzeichnis.....	IX
Danksagung.....	X
Lebenslauf.....	XI

1. Literaturübersicht

1.1 Die Welt des Tees

1.1.1 Tee – Definition im Allgemeinen und im Besonderen

Gemäß dem Codex Alimentarius, dem österreichischen Lebensmittelbuch, sind ausschließlich jene Aufgüsse, die aus den Blättern, Blattknospen und zarten Stielen der Teepflanze *Camellia sinensis* (L.) Kuntze hergestellt werden, als Tee zu bezeichnen. [Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, 2009] Aus dieser einen Pflanze können durch unterschiedliche Verarbeitungsprozesse verschiedene Teesorten erzeugt werden. In Abbildung 1 sind die einzelnen Produktionsschritte von schwarzem, grünem und Oolong Tee dargestellt, wobei ersichtlich wird, dass sich die Teesorten in ihrer Herstellung hauptsächlich im Grad der Fermentation unterscheiden. Der Fermentationsprozess hat wesentlichen Einfluss auf die Inhaltsstoffe des Tees. So wird beispielsweise die enzymatische Oxidation der Catechine induziert, was die Bildung von Theaflavinen und Thearubiginen zur Folge hat. Diese beiden Pigmente sind verantwortlich für die orange-rote Farbe des Schwarztees. [Horz'ic' et al., 2009] Neben den genannten Tees gibt es weitere Sorten, welche nicht fermentiert werden, wie weißer Tee, Sorten bei welchen die Fermentation nach Ablauf der Hälfte der üblichen Zeit abgebrochen wird, wie gelber Tee oder Pu-Erh Tee, dessen vollständige Fermentation mit Hilfe von Mikroorganismen erfolgt. Im Gegensatz hierzu wird die Fermentation von Schwarztee durch das Enzym Polyphenoloxidase katalysiert. [Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, 2009], [Mahmood et al., 2010]

Unterschiede in Aussehen, Geschmack und Aroma ergeben sich nicht nur aus der Verarbeitung nach der Ernte, sondern auch aus den regionalen Klimaeinflüssen, der Höhenlage und anderen Begebenheiten des Anbaugebiets, nach dem die Teesorte im Übrigen benannt wird, sowie aus dem Zeitpunkt der Ernte. Der indische Darjeeling-

Tee, beispielsweise, wächst an den südlichen Ausläufern des Himalaya Gebirges in Höhen von bis zu 2500 Metern. Er zeichnet sich durch sein intensives, liebliches Aroma aus. Klimabedingt gibt es für den Darjeeling drei Haupterntezeiten: den „first flush“ im Frühling, den „second flush“ im Sommer und eine Herbsternte, die als „autumnals“ bezeichnet wird. Je nach Erntezeit unterscheiden sich die Tees in Geschmack und Farbe. Der first flush ist besonders zart und grünlich im Aufguss. Der second flush dagegen ist kräftiger und die Herbst-Tees sind vollmundig, leicht im Geschmack und von gelb-rötlicher Farbe. Ein anderes Beispiel ist der Assam-Tee. Das Anbaugebiet Assam liegt im Nordosten Indiens an der Grenze zu Myanmar, dem ehemaligen Birma. Assam-Tee ist kräftig und ausgewogen im Geschmack und hat eine rotbraune Tassenfarbe. Häufig wird der Assam-Tee mit Milch getrunken. [Kaffee- und Teeverband] Eine Vielzahl von Teegetränken, die auf dem österreichischen Markt erhältlich sind, wird aus Tee-Extrakt hergestellt. Dabei handelt es sich um einen wässrigen Auszug aus Tee, dem Wasser entzogen wurde. Aufgüsse aus Pflanzenteilen, die nicht von *Camellia sinensis (L.) Kuntze* stammen, tragen hingegen die Bezeichnung „teeähnliche Erzeugnisse“. [Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, 2009]

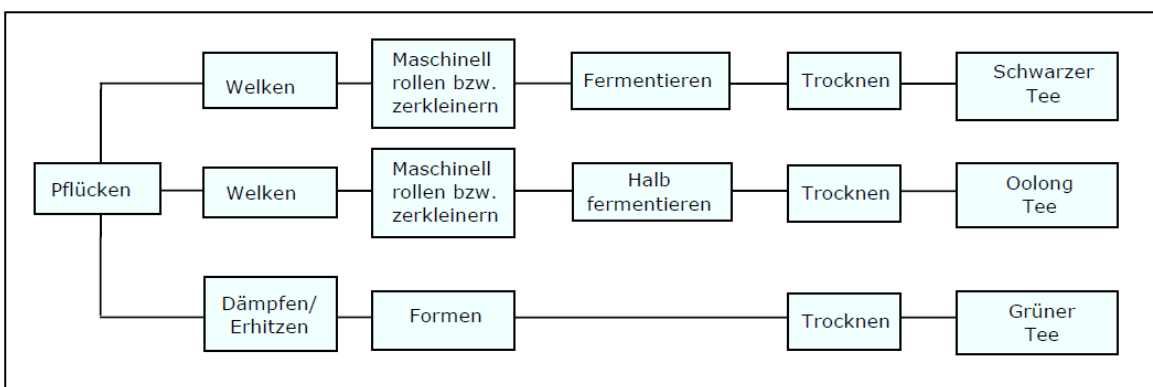


Abb.1: Herstellungsübersicht für Tee [Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend, 2009]

1.1.2 Die Teepflanze *Camellia sinensis* (L.) Kuntze

Classification	
Genus	C. L- camellia
Family	Theaceae- Tea family
Order	Theales
Subclass	Dilleniidae
Class	Magnoliopsida- Dicotyledons
Division	Magnoliophyta- Flowering plants
Superdivision	Spermatophyta- Seed plants

Abb.2: Klassifikation von *Camellia sinensis* (L.) Kuntze [Mahmood et al., 2010]

Die Teepflanze ist seit rund 60 Millionen Jahren in Südostasien beheimatet. In seiner Urform ist *Camellia sinensis* (L.) Kuntze ein Baumgewächs und kann eine Größe von 10 bis 15 Meter Höhe erreichen. In der heutigen Zeit wird die immergrüne Pflanze in den Plantagen jedoch in Strauchform gehalten. In den Achseln der lanzettenförmigen, leicht gezahnten Blätter wachsen weiß bis schwach rosarot gefärbte Blüten. Aus diesen bilden sich grünlichbraune, holzige Kapsel Früchte mit runden, braunen, stark ölhaltigen Samen. [Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee, 2014]

Bis zum Ende des 16. Jahrhunderts beschränkte sich der Anbau und Konsum von *Camellia sinensis* ausschließlich auf Asien. Zwar wurde der Tee in Europa bereits um 900 n.Chr. durch Erzählungen bekannt, gelang aber erst im Jahr 1610 über den Seeweg aus Japan nach Amsterdam. Durch die lange Reise und die feuchten Lagerbedingungen an Bord litt die Qualität des von Asien nach Europa transportierten Tees jedoch erheblich. Über den Landweg wurde Tee erst Mitte des 17. Jahrhunderts mit Karawanen von Peking durch die Wüste Gobi, quer durch Sibirien bis an den Baikalsee und weiter zur Wolga transportiert. Die Teeindustrie in ihrer modernen Form entwickelte sich etwa ab 1818 in Nordostindien, genauer gesagt in Assam. Dort wurde Tee erstmals aus Samen kultiviert. Grund waren die geschlossenen Grenzen zu Japan und Schwierigkeiten mit dem China-Handel. Zunächst stammten die Samen aus China, später wurden sie durch Samen aus Züchtungen ersetzt. Anschließend entwickelte sich

der Teeanbau in größerem Maß auch in anderen Ländern, wie Sri Lanka, Sumatra und Kenia. [Kaffee- und Teeverband] Gegenwärtig wird die Teepflanze in circa 30 Ländern auf verschiedenen Kontinenten der Welt angebaut. Zu diesen gehören unter anderem China, Sri Lanka und Indien in Asien, Kenia, Malawi und Uganda in Afrika, Argentinien in Südamerika, sowie Georgien und die Türkei in Europa. [Kaffee- und Teeverband] Allen Anbaugebieten gemeinsam sind die gemäßigten Temperaturen, sauren Böden und sehr feuchten Umgebungsbedingungen. [Mahmood et al., 2010]

1.1.3 Der Teemarkt - ein wachsender Wirtschaftssektor

Tee wird aufgrund seines Aromas und speziellen Geschmacks rund um den Globus konsumiert. Abbildung 3 zeigt die 23 Länder mit dem höchsten Pro-Kopf-Verbrauch an Tee. Angeführt wird die Liste von Ostfriesland mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von durchschnittlich 300 Litern Tee innerhalb von drei Jahren von 2009 bis 2011. Das Schlusslicht bildet Italien mit nur einem Liter. In einigen dieser Länder, wie China und Indien, ist das Teetrinken eine Art Ritual und eine Frage des Lebensstils. In vielen europäischen Ländern hingegen wird Tee nur unregelmäßig verzehrt. Hier werden zumeist Früchte- und Kräuteraufgüsse bevorzugt. Neben der Teesorte unterscheidet sich der Teekonsum global auch hinsichtlich seiner Zubereitung, die beispielsweise bei unterschiedlichen Wassertemperaturen erfolgen kann. In einigen Teilen der Welt ist es außerdem typisch mehrere Aufgüsse herzustellen.

Seitdem Wissenschaftler die potentiell gesundheitsfördernde Wirkung von Tee publik machten gewann er zusätzlich an Popularität. [Horz'ic' et al., 2009] Die Weltproduktion an Schwarz- und Grüntee stieg von 4,2 Millionen Tonnen im Jahr 2011 um fast 12% auf 4,7 Millionen Tonnen im Jahr 2012 an – Tendenz steigend. Mehr als ein Drittel der gesamten Weltproduktion entfällt allein auf China. Durch die wachsende Bevölkerung und eine breitere, besser verdienende Mittelschicht in den Anbauländern stieg der Eigenverbrauch 2012 um 20% und auch in Österreich wächst das Teegeschäft. Der Umsatz stieg hier von Mitte 2012 bis Mitte 2013 um ganze 6% von 58,8 Millionen

Euro auf 62,4 Millionen Euro. Der österreichische Markt teilt sich in 75% Kräuter- und Früchtetee, 18% Schwarztee und 7% Grüntee. Vor allem der grüne Tee gewann in den letzten Jahren beim Verbraucher an Beliebtheit. Außerdem konnten die österreichischen Teehersteller eine starke Tendenz zum Kauf von qualitativ hochwertigen Tees erkennen. [Kaffee- und Teeverband] Durch diesen Trend gewinnt auch die Qualitätskontrolle von Tee immer mehr an Bedeutung. Neben Aminosäuren, Catechinen und weiteren chemischen Verbindungen in den Blättern der Teepflanze, beeinflusst auch Koffein den Geschmack und das Aroma des Teeaufgusses. In der Teeindustrie wird die Qualität eines Aufgusses derzeit allerdings nur anhand von sensorischen Kriterien beurteilt. [Chen et al., 2008]

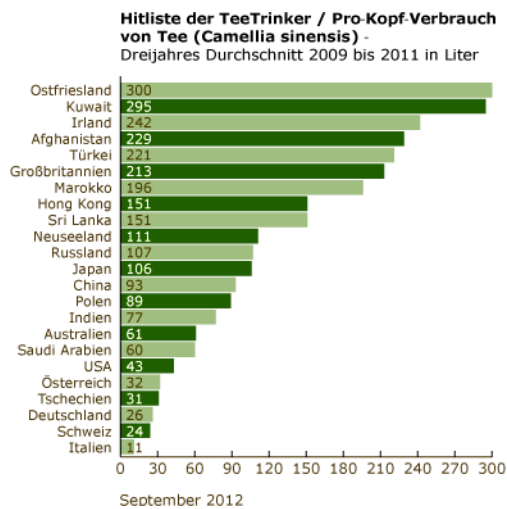


Abb.3: Pro-Kopf-Verbrauch von Tee
[Kaffee- und Teeverband]

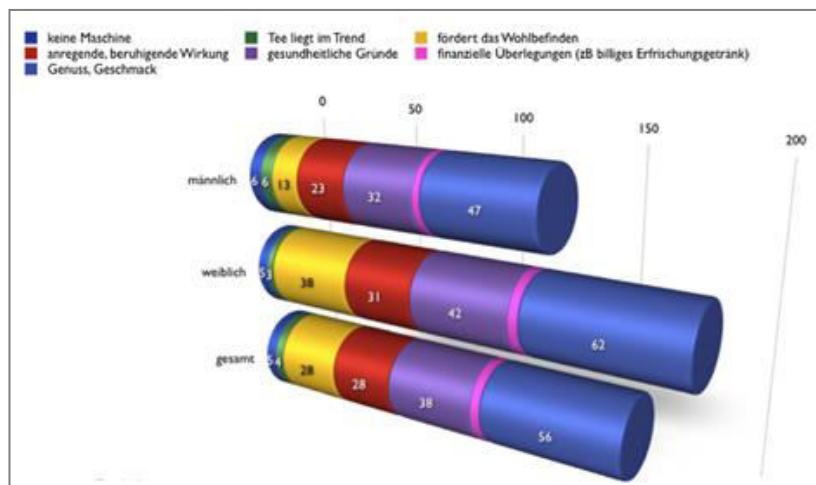


Abb.4: Motive für den Teekonsum
[Institut für Angewandte Tiefenpsychologie]

1.1.4 Tee: Ein Getränk, das was kann

Das Institut für Angewandte Tiefenpsychologie in Wien führte an 1264 Probanden eine Studie zum Thema Teekonsum durch. Eines der Ergebnisse zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen Bildung und Teekonsum, wobei Menschen mit höherem Bildungsgrad häufiger Tee konsumieren. Neben dem Geschmack sind es deshalb vor allem gesundheitliche Aspekte, die zum Konsum von Tee motivieren. Insbesondere das weibliche Geschlecht gibt mit zunehmendem Alter an, dass Tee ihr Wohlbefinden fördere (Abbildung 4). [Institut für Angewandte Tiefenpsychologie]

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 „Der Teemarkt - Ein wachsender Wirtschaftssektor“ angerissen wurde gibt es tatsächlich wissenschaftliche Belege für gesundheitsförderliche Effekte von Tee. Verantwortlich für den positiven Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko, den Cholesterinspiegel, Diabetes, Arthritis und Zahnkaries sollen die antioxidativen Eigenschaften der Teepolyphenole sein. Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang besonders die Catechinderivate. Neben Polyphenolen enthalten Teeblätter außerdem nennenswerte Mengen an Aminosäuren, Mineralstoffen, Spurenelementen und Methylxanthinen. Letztgenannte, vor allem das Hauptmethylxanthin Koffein, sind für ihre physiologischen und pharmakologischen Wirkungen auf das zentrale Nervensystem, das kardiovaskuläre, gastrointestinale, respiratorische, sowie renale System bekannt [Horzǎic' et al., 2009] und sind deshalb auch Bestandteil von diversen Arzneimitteln, beispielsweise zur Behandlung von Asthma oder Kopfschmerzen, [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015] werden in Energy-Drinks oder in Produkten zur Gewichtsreduktion eingesetzt. [Marchei et al., 2005] Zu hohen Koffeindosen wird jedoch nachgesagt gesundheitliche Probleme zu verursachen. So kann die einmalige Aufnahme von 4-6 mg Koffein pro kg Körpergewicht zu Herzrasen und erhöhtem Blutdruck führen. Außerdem können Kopfschmerzen, sowie Nervosität und Muskelzuckungen auftreten. [Ministry for Primary Industries, 2012] Bei exzessivem Konsum von Koffein kann sogar der DNA-Reparaturmechanismus gehemmt werden, was mitunter zunächst zu Mutationen führen kann. [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015]

1.2 Die Stoffgruppe der Methylxanthine

Die Methylxanthine lassen sich der Gruppe der Alkaloide zuordnen. Diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind in rund 100 verschiedenen Pflanzenspezies vorzufinden. Nennenswerte Mengen der sich von den Purin-Nukleotiden ableitenden Verbindungen kommen jedoch nur in einigen wenigen Pflanzen wie dem Kaffeestrauch *Coffea arabica*, dem Kakaobaum *Theobroma cacao* oder dem Teestrauch *Camellia sinensis* vor. [Ashihara et al., 2011] Zu den Vertretern der Xanthinderivate gehören neben Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) außerdem seine Hauptmetabolite Theobromin (3,7-Dimethylxanthin), Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) und Paraxanthin (1,7-Dimethylxanthin). Ihre chemische Struktur wird in Abbildung 5 gezeigt.

Das mengenmäßig bedeutendste Methylxanthin in Tee stellt Koffein dar. [Da Silva Pinto M, 2013] In Tee wurde es erstmals 1827 entdeckt und zunächst als Tein (Thein) bezeichnet. [Kaffee- und Teeverband] Abbildung 6 zeigt unter anderem den Gehalt an Koffein und Theobromin in den Blättern ausgewählter *Camellia* Spezies. Demnach beträgt der Koffeingehalt in den jungen Blättern der ersten Ernte von *Camellia sinensis*, *Camellia assamica* und *Camellia taliensis* 2-3% ihres Trockengewichts. In *Camellia kissi* kommt Koffein dagegen in sehr geringen Mengen unter 0,02% vor. [Ashihara et al., 2011] Das Koffein in Tee und Kaffee ist chemisch ident, liegt es in Tee jedoch nicht in freier, sondern in gebundener Form vor. Dies führt zu Unterschieden in der Aufnahme und Wirkungsweise von Koffein im menschlichen Körper. Während die Koffeinwirkung nach dem Konsum von Kaffee sehr rasch eintritt und genau so schnell wieder nachlässt, bewirkt Koffein aus Tee eine sanftere und deutlich länger anhaltende anregende Wirkung. [Kaffee- und Teeverband] Zwischen 30 und 120 min dauert es, bis nach dem Konsum von Tee die maximale Koffeinkonzentration im Plasma erreicht ist und etwa ebenso lange dauert es bis eine Wirkung von Koffein festgestellt werden kann. [Bryan J, 2008]

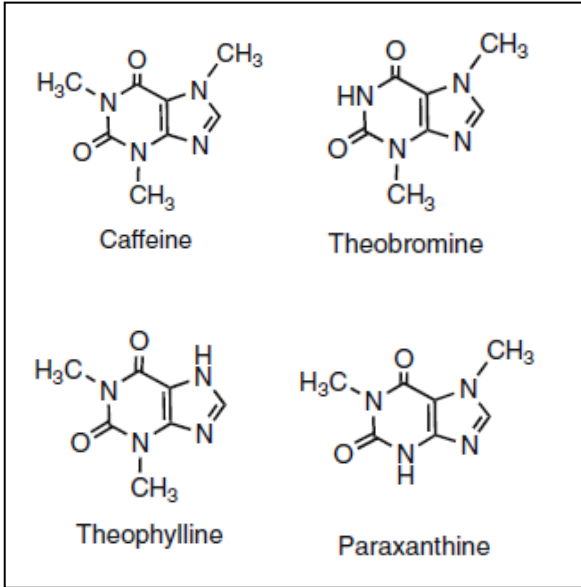


Abb.5: Die chemische Struktur der Methylxanthine [Ashihara et al., 2011]

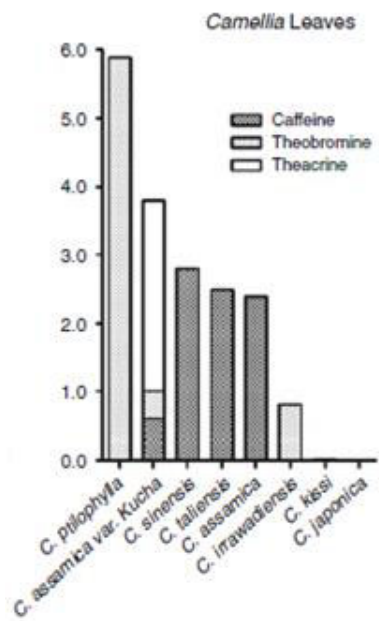


Abb.6: Koffein, Theobromin und Theacrin in den Blättern ausgewählter *Camellia* Spezies [Ashihara et al., 2011]

1.2.1. Koffein-Synthese

Der Hauptweg der pflanzlichen Koffeinsynthese besteht aus vier Reaktionsschritten, in welchen aus dem Ausgangssubstrat Xanthosin durch drei Methylierungen und eine Nucleosidase-Reaktion letztlich das Trimethylxanthin Koffein entsteht.

Im ersten Schritt der Koffeinsynthese wird aus Xanthosin das 7-Methylxanthosin gebildet. Katalysiert wird diese Reaktion durch die 7-Methylxanthosin-Synthase (Xanthosin-7N-Methyltransferase). Anschließend leitet die N-Methylnucleosidase die Hydrolyse von 7-Methylxanthosin zu 7-Methylxanthin ein. Einige Studien vermuten dagegen, dass die Übertragung der Methylgruppe und die hydrolytische Spaltung gekoppelt miteinander ablaufen und durch ein einzelnes Enzym katalysiert werden. Die Theobromin-Synthase und die Koffein-Synthase, zwei S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) -abhängige N-Methyltransferasen, ermöglichen die Umwandlung von 7-Methylxanthin über Theobromin zu Koffein. Hierbei werden zunächst das N3 des 7-Methylxanthins und anschließend das N1 methyliert. Die rekombinante Koffein-Synthase ist in der Lage neben 7-Methylxanthin auch Theobromin oder Paraxanthin als Substrat für die Koffeinsynthese zu verwenden. Da die Umwandlung von Theobromin zu Koffein (die N1-Methylierung) einige Zeit benötigt, kommt es in den koffeinbildenden Geweben der Pflanze zu einer kurzzeitigen Akkumulation von Theobromin. Exprimiert werden die an der Koffein-Synthese beteiligten Enzyme vor allem in den jungen Teeblättern. In etwas geringeren Mengen entstehen die Enzyme in den älteren Blättern, Stielen und Wurzeln der Pflanze. Gegenwärtig sind drei unterschiedliche Koffein-Synthasen bekannt. Die Expression der Gene dieser Enzyme ist variabel und somit können je nach Syntheseort und Wachstumsstadium der Pflanze unterschiedliche Enzyme an der Koffeinsynthese beteiligt sein.

Für die Entstehung von Xanthosin, dem Ausgangssubstrat für die Koffein-Synthese gibt es vier Möglichkeiten: die *de novo* Purin-Biosynthese (wie auch wir Menschen synthetisieren Pflanzen Purin-Nucleotide), der Abbau von Adenin-Nucleotiden, die Bildung im SAM-Zyklus, sowie aus Guanin-Nucleotiden.

Xanthosin → 7-Methylxanthosin → 7-Methylxanthin → Theobromin → Koffein

Neben dem beschriebenen Hauptsyntheseweg von Koffein existieren außerdem weitere kleine Nebensynthesewege, welche hauptsächlich von der breiten Substratspezifität der N-Methyltransferasen abhängig sind. So kann beispielsweise auch das Methylxanthin Paraxanthin entstehen und in der Pflanze in geringen Mengen akkumulieren. [Ashihara et al., 2011] Abbildung 7 fasst die Schritte der Koffeinsynthese nochmals graphisch zusammen.

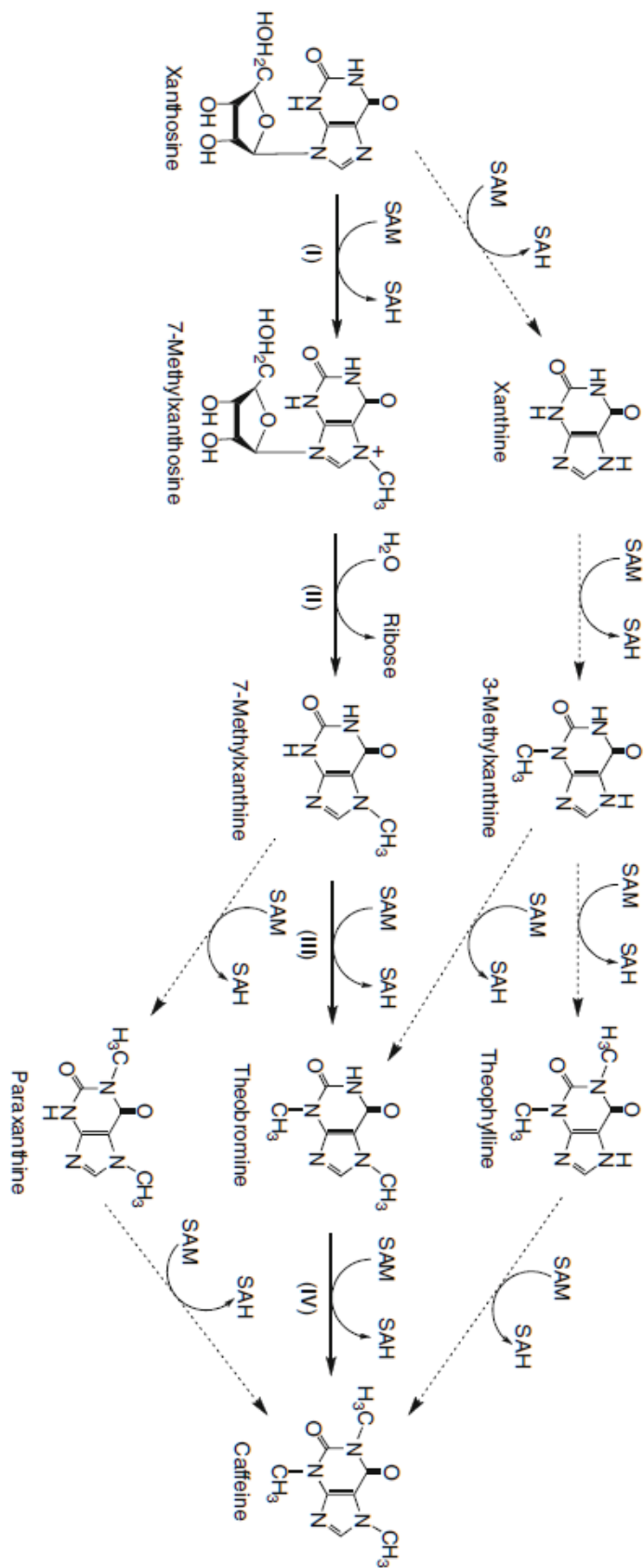


Abb. 7: Koffein Synthese [Ashihara et al., 2011]

1.2.2 Koffein-Abbau

Koffein → Theophyllin → 3-Methylxanthin → Theobromin → Koffein, CO₂

Eine Möglichkeit den Koffeinabbau in der Pflanze zu untersuchen ist die Verwendung von C14-markiertem Koffein. Der sehr langsame Abbau erfolgt im Allgemeinen durch die Entfernung der drei Methylgruppen. In der Regel entsteht aus Koffein unter Beteiligung der N7-Demethylase zunächst Theophyllin. Trotz, dass es noch keine handfesten Beweise gibt, wird vermutet, dass die p450-abhängige Monooxygenase ebenfalls eine Rolle bei der Theophyllin-Entstehung spielt. Wie dem auch sei, wird Theophyllin in *Camellia sinensis* über das 3-Methylxanthin rasch zu Theobromin und weiter zu Koffein umgewandelt. Theobromin gilt im Gegensatz zu Theophyllin jedoch vielmehr als Vorläufer von Koffein, denn als Abbauprodukt. [Ashihara et al., 2011]

1.2.3 Die Funktion von Koffein in der Pflanze

Es existieren zwei Hypothesen, um die Frage welche ökologische Rolle Koffein in einer Pflanze spielt zu beantworten. Eine dieser Theorien besagt, dass die hohen Koffeinkonzentrationen in den jungen Blättern, Früchten und Blütenknospen von *Camellia sinensis* die Aufgabe haben diese vor Fraßfeinden und Pathogenen zu schützen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Behandlung von Kohlgewächsen und Orchideen mit Koffein Schnecken durch seine neurotoxische Wirkung abstößt oder gar abtötet. Die zweite Hypothese beschäftigt sich mit der autotoxischen Funktion von Koffein. Dieses soll durch die herabfallenden Blätter und Samenschalen in den Boden gelangen und die Samenkeimung um die Elternpflanze

herum unterdrücken. Nur exogen ist Koffein in der Lage Stoffwechselfvorgänge der Pflanze zu hemmen. In der Pflanzenzelle ist Koffein in Vakuolen lokalisiert, sodass es keinen Einfluss auf den Zellmetabolismus nehmen kann. Einige experimentelle Studien, die im Labor durchgeführt wurden, untermauern diese These. Inwieweit Koffein im natürlichen Ökosystem eine derartige Wirkung hat ist jedoch unklar, insbesondere aufgrund der Tatsache, dass einige Bodenbakterien, wie *Pseudomonas putida*, Methylxanthine abbauen. [Ashihara et al., 2011]

1.3 Prinzip der verwendeten Methoden

1.3.1 Festphasenextraktion

Da die zu untersuchende Probe aus einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle besteht, erhält man als Output der analytischen Trennung sehr komplexe Chromatogramme. Aus diesen erweist sich die Identifikation einer bestimmten Verbindung als sehr schwierig, vor allem, wenn die Substanz nur in geringen Konzentrationen in der Probe enthalten ist. [Mitra, 2003] Aus diesem Grund ist es sinnvoll die zu analysierende Komponente aus der Probe zu isolieren. Eine Möglichkeit hierfür ist die Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE). Seitdem sie in den 1980er Jahren die aufwendige und kostenintensive flüssig-flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction, LLE) ablöste, ist die Festphasenextraktion die am häufigsten genutzte Methode zur Probenaufarbeitung und hat grundsätzlich das Ziel den Analyten aufzukonzentrieren, die Probe zu reinigen und damit die Probenmatrix zu vereinfachen. [Poole, 2003] Grundsätzlich arbeiten die LLE und die SPE nach demselben Prinzip, wobei die Auftrennung der Probe auf der Wechselwirkung zwischen den Probenkomponenten und einem Sorbens, das sich in der Regel in einer kurzen Säule befindet, basiert. Die Auswahl des geeigneten Säulenmaterials hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Analyten ab. Letztlich hat aber auch die Probenmatrix großen Einfluss auf das Ergebnis. [Lucci et al., 2012] Zum Einsatz kommt die SPE vor allem im Bereich der Chemie, pharmazeutischen- und Lebensmittelindustrie. Anwendungsbeispiele sind die Isolierung von polaren Pestiziden aus Fetten und Ölen, die Isolierung von Mykotoxinen aus Futtermitteln oder die Fraktionierung von Lipiden. [Poole, 2003]

Die Festphasenextraktion besteht aus vier einfachen Arbeitsschritten, die in Abbildung 8 demonstriert werden. Zu Beginn der Methode erfolgt die Konditionierung, bei welcher nach Auswahl eines geeigneten Sorbens seine funktionellen Gruppen mittels eines entsprechenden Lösungsmittels solvatisiert werden. [Lucci et al., 2012] Dieser Schritt ermöglicht die Interaktion zwischen dem Säulenmaterial und den Probenkomponenten. In einem nächsten Schritt wird die Probe auf die Säule

aufgetragen und sickert durch das Sorbensbett hindurch, wobei einige Matrixkomponenten, sowie die Analyten, am Säulenmaterial haften bleiben. Durch einen anschließenden Waschvorgang werden die Verunreinigungen von der Säule gespült. Die verwendete Waschlösung muss entsprechend stark sein um störende Substanzen vom Sorbens zu entfernen und gleichzeitig noch so schwach, dass die Analyten nicht auch von der Säule gespült werden. Im vierten und letzten Schritt wird schließlich der Analyt eluiert. [Lucci et al., 2012]

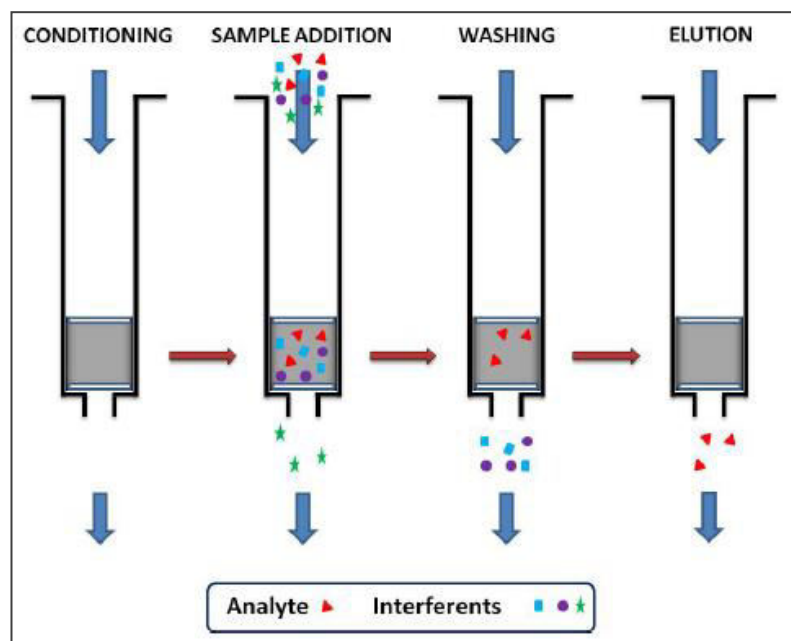


Abb.8: Das Prinzip der SPE [Lucci et al., 2012]

Extraktionsplatten und on-line Schnittstellen ermöglichen durch die Kopplung der SPE an den Hochdruckflüssigkeitschromatographen, beziehungsweise an ein anderes Trennungssystem, die rasche Aufarbeitung vieler Proben, sowie einen hohen Automatisierungsgrad. Obwohl die off-line SPE im Gegensatz zur automatisierten Variante einige Nachteile besitzt, wie zum Beispiel den hohen Zeitaufwand, den Verbrauch großer Mengen organischen Lösungsmittels, oder die schlecht zu kontrollierende Flussgeschwindigkeit der Lösungsmittel, ist in den meisten

Laboratorien dennoch die günstige, manuelle Probenaufarbeitung üblich. [Poole, 2003], [Lucci et al., 2012]

1.3.2.1 Hochdruck- / Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Chromatographische Verfahren wurden dazu entwickelt verschiedene Substanzen eines Stoffgemisches voneinander zu trennen. Prinzipiell beruht der Trennungsprozess auf der unterschiedlichen Verteilung der Einzelkomponenten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Je nachdem wie stark die Wechselwirkungen der einzelnen Moleküle mit der stationären Phase sind, verweilen sie kürzer oder länger in dieser Phase bevor sie wieder an die mobile Phase abgegeben werden. Ein Analyt, der eine hohe Affinität zum Säulenmaterial besitzt, hält sich länger in der stationären Phase auf und hat folglich eine höhere Retentionszeit, als eine Verbindung mit geringer Affinität zur stationären Phase. Auf diese Weise werden die einzelnen Substanzen des Stoffgemisches schließlich voneinander getrennt (Abb.9). Im Falle der Hochdruck-beziehungsweise Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Pressure bzw. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) handelt es sich bei der mobilen Phase um eine Flüssigkeit. Die stationäre Phase bildet in der Regel eine 5 - 25 cm lange Säule, welche mit sehr kleinen, porösen Partikeln mit einem Durchmesser von 1 - 5 µm bepackt ist. Die Auswahl eines geeigneten Säulenmaterials hängt von den chemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Analyten ab. Am häufigsten werden Siliciumoxide verwendet, unter anderem da sie sehr resistent gegenüber hohem Druck sind. Neben der mobilen und der stationären Phase gehören zu den Hauptkomponenten der HPLC eine Pumpe, ein Injektor für das Einbringen des Probenmaterials, der Detektor und eine Datenverarbeitungseinheit. In Abbildung 10 ist der Aufbau einer solchen HPLC schematisch dargestellt.

Zu Beginn der Analyse wird das Lösungsmittel, sprich die mobile Phase, zur Pumpe transportiert. Luft in der mobilen Phase kann die Sensitivität der Messung, wie auch

die Fluss-Stabilität beeinflussen. Deshalb wird die Luft in der Regel mittels eines eingebauten Degasers aus dem Lösungsmittel entfernt. Die Probe mit dem zu analysierenden Molekül wird in die mobile Phase injiziert und passiert sodann unter Druck die stationäre Phase. Die Pumpe kann einen Druck von bis zu 400 bar erzeugen. In neueren Entwicklungen, in welchen die Säule mit sehr kleinen Partikeln bepackt ist, wird ein höherer Druck benötigt. Dieser kann dann bis zu 600 oder sogar 1200 bar betragen. In so einem Fall spricht man von einer U-HPLC (Ultra-HPLC). Nach der Auftrennung der Probenkomponenten verlassen diese die Säule und werden einzeln detektiert. An die HPLC können unterschiedliche Detektoren gekoppelt werden. Das können beispielsweise ein Massenspektrometer, elektrochemische oder optische Detektoren sein. Im Rahmen dieser Arbeit fand die Detektion der Analyten mittels eines optischen UV-Detektors statt. In diesem Fall passiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches von einer Deuterium-Lampe erzeugt wird, die mobile Phase, sowie die aufgetrennten Probenkomponenten. Um die größtmögliche Sensitivität zu erreichen entspricht die eingestellte Wellenlänge hierbei dem Absorptionsmaximum der zu analysierenden Komponente. Die Intensität des austretenden Lichtstrahls, sowie ein Referenzsignal, werden gemessen und die Absorption gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Das Ergebnis der HPLC-Messung wird in einem sogenannten Chromatogramm graphisch dargestellt. Für jede Substanz, welche von der Säule eluiert wird und den Detektor erreicht, wird ein Peak gezeichnet, der idealerweise einer Gaußverteilung folgt. Die Fläche unter dem Peak korreliert mit der Konzentration des Analyten und ermöglicht daher eine quantitative Auswertung. Entwickelt wurde die moderne HPLC im Jahr 1965, also vor rund 50 Jahren, von Horvath. Die ersten Ansätze für chromatographische Verfahren entstanden jedoch bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts. In der Praxis findet die HPLC beispielsweise in der Lebensmittelindustrie Anwendung, wo sie unter anderem dafür eingesetzt wird, um zu untersuchen ob sich der Gehalt bestimmter Lebensmittelinhaltsstoffe während der Verarbeitung und Lagerung verändert, oder um ein Produkt auf bestimmte Lebensmittelzusatzstoffe zu analysieren. [Moldoveanu und David, 2013], [Nollet und Toldra, 2013]

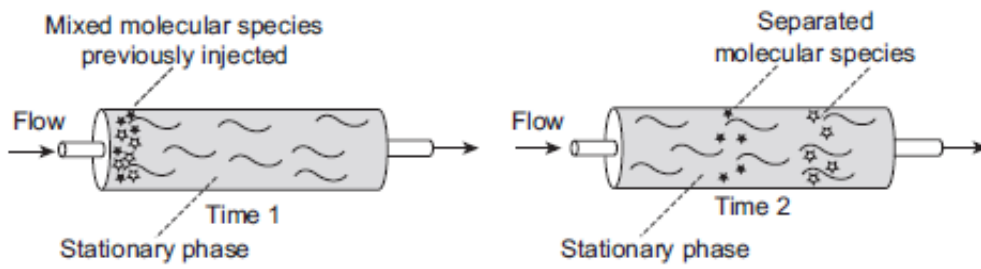


Abb.9: Vereinfachte Darstellung des Trennprozesses [Moldoveanu und David, 2013]

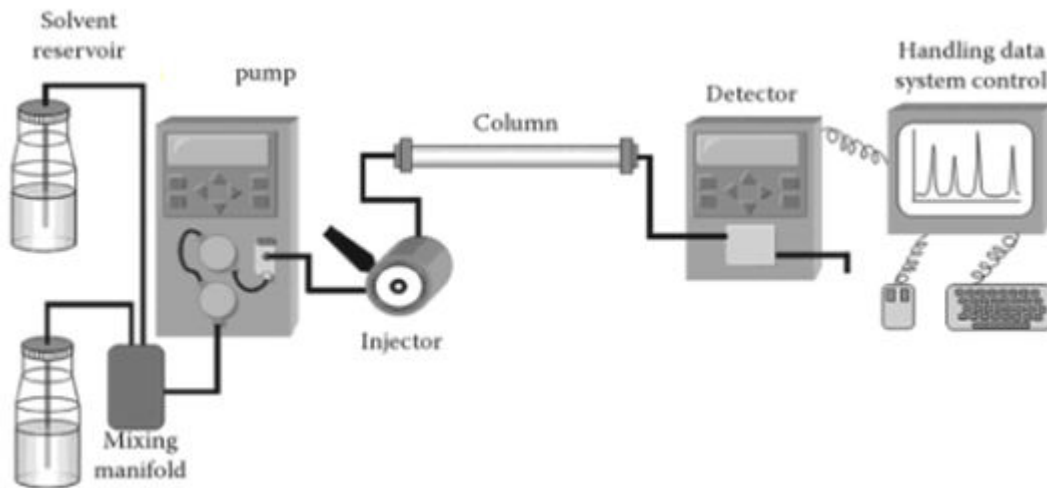


Abb.10: HPLC-Apparatur [Nollet und Toldra, 2013]

1.3.2.2 Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC)

Diese Art von Hochdruck- bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist durch die Verwendung einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase charakterisiert. Stark hydrophobe Analyten werden unter diesen Umständen länger auf der Säule gehalten und später eluiert, als jene Analyten, die weniger hydrophobe Eigenschaften besitzen. Sehr häufig besteht das Säulenmaterial aus Siliciumoxid, welches eine Kohlenwasserstoffkette mit 8-18 Kohlenstoffatomen gebunden hat. Die mobile Phase hingegen ist polar und besteht zu einem Teil aus Wasser und zum anderen aus einem organischen Lösungsmittel. Acetonitril ist ein Lösungsmittel, das neben Alkoholen, sehr häufig in der RP-HPLC zum Einsatz kommt. Dabei handelt es sich um eine schwache Säure von mittlerer Polarität. In der Praxis ist das Verfahren der RP-HPLC das am weitesten verbreitete. Dem entgegen steht die Normal-Phase HPLC (NP-HPLC) in welcher eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase für den Trennungsprozess Anwendung finden. Unpolare Substanzen werden bei diesem HPLC-Typen folglich zuerst eluiert. Das genaue Verfahren wird unter Berücksichtigung der Beschaffenheit der Probe ausgewählt. Die RP-HPLC eignet sich für die Trennung von hydrophoben Probenkomponenten. Die Polarität einer Verbindung schließt die Anwendung der RP-HPLC jedoch nicht aus. [Moldoveanu und David, 2013], [Nollet und Toldra, 2013]

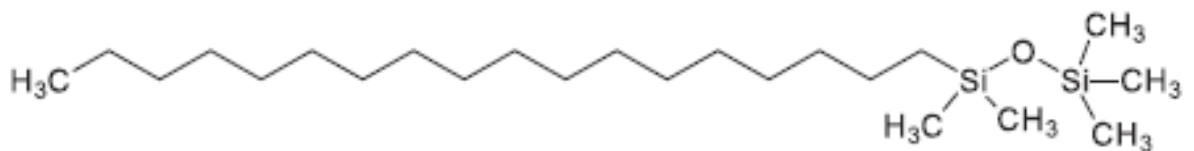


Abb.11: Struktur eines hydrophoben Moleküls mit C-18-Kette [Moldoveanu und David, 2013]

1.3.2.3 Gradienten-Elution

Häufig, unter anderem in der RP-HPLC, wird das Prinzip der Gradienten-Elution angewendet. Bei diesem Verfahren werden zwei oder mehrere Laufmittel, bevor sie die Pumpe erreichen, miteinander gemischt, um somit den prozentualen Anteil der organischen Komponente im Lösungsmittel während der Messung zu verändern. Die Zusammensetzung der mobilen Phase kann, muss aber nicht linear verändert werden. Dies wird in der nachstehenden Abbildung (Abb.12) veranschaulicht. Ferner ist aus der Grafik ersichtlich, dass die Laufmittelzusammensetzung zu Beginn der Messung für eine kurze Weile konstant gehalten wird. Dieser Sachverhalt dient der Retention der Probenkomponenten, die am schwächsten mit dem Säulenmaterial wechselwirken. Die Anwendung der Gradienten-Elution hat drei Hauptgründe. Zum einen, um den Trennungsvorgang zu beschleunigen, zum anderen zur Säuberung der Säule und letztlich auch zur Verbesserung der Trennung einzelner Komponenten durch Modifikation der Retentionszeiten, sprich um co-eluierende Komponenten voneinander zu trennen. Die Elution bei der die Laufmittelzusammensetzung unverändert bleibt wird als Isokraten-Elution bezeichnet. [Moldoveanu und David, 2013]

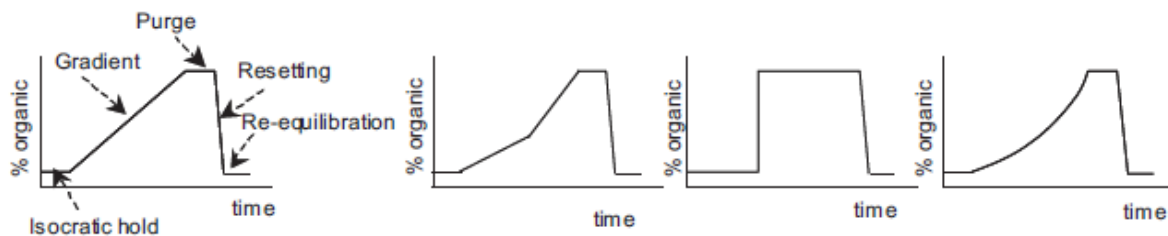


Abb.12: Veränderung des Anteils der organischen Komponente in der mobilen Phase [Moldoveanu und David, 2013]

2. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst alle Chemikalien und Materialien aufgelistet, welche für die praktische Bearbeitung der Masterarbeit Anwendung fanden. Anschließend werden die durchgeführten Versuche und verwendeten Methoden näher erläutert.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

- Wasser Rotisolv® HPLC Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol Rotisolv® HPLC Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) Rotisolv® Gradient Grade von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- Coffein wasserfrei ($\geq 98,5\%$) von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin von SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Riedstr. 2, 89555 Steinheim, Deutschland)
- Theobromin von SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Riedstr. 2, 89555 Steinheim, Deutschland)
- Theophyllin von SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Riedstr. 2, 89555 Steinheim, Deutschland)
- Meta-Phosphorsäure von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- Paraxanthin von SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Riedstr. 2, 89555 Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Geräte

- Pipetten Eppendorf Reference® variable (10-100µl, 100-1000µl) von Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen epT.I.P.S.® LoRetention Reloads 50-1000µl von Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
- Safe-Lock Tubes 1,5ml von Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
- Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen (16ml) von Carl Roth GmbH & Co KG (Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland)
- Tubes (15ml, 50ml) von Sarstedt AG & Co. (51588 Nümbrecht, Deutschland)
- Spritzen Ominifix® 10 ml von Braun
- Säulen: Oasis® HLB 1cc (39mg) Extraction Cartridges von OASIS SAMPLE EXTRACTION PRODUCTS (Ireland)
- Autosamplerfläschchen 2ml vial Amber von Agilent Technologies (PL)
- Deckel für Autosamplerfläschchen Clear PE Snap Cap w/ PTFE Septa von Agilent Technologies (USA)
- Ultraschallbad von Bandelin Sonorex Digitec (Heinrichstr. 3-4, 12207 Berlin, Deutschland)
- Zentrifuge Jouan BR4i multifunction Centrifuge von Thermo Electron Corporation Key Write-DTM (Frankreich)
- Konzentrator Concentrator plus von Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
- Feinwaage MC 410 S von Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
- HPLC UltiMate 3000 von Dionex bestehend aus:
 1. UltiMate 3000 Pump
 2. UltiMate 3000 Autosampler
 3. UltiMate 3000 Column Compartment
 4. UltiMate 3000 Variable Wavelength Detector

2.1.3 Software

- Compass Hystar Version 3.2 von Bruker Daltonics
- Compass Hystar Post Processing von Bruker Daltonics
- Chromeleon (Xpress)

2.1.4 Proben

Bei den analysierten Proben handelt es sich um schwarzen, grünen und weißen Tee in Teebeuteln, sowie in loser Blattform, Eistee, Bubble Tea und Tee-Milchmischgetränke. Alle Proben stammen aus lokalen Supermärkten, Geschäften und Coffee-Shops in Wien (Merkur, Spar, Billa, denns Biomarkt, Müller, Starbucks) und wurden nach ihrer Aufarbeitung auf den Gehalt an Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin untersucht. Zehn der 34 verschiedenen Produkte stammen aus der Kategorie „Schwarzer Tee“, von welchen sieben Produkte mit unterschiedlichen Brühzeiten (3, 5 und 10 min) zubereitet wurden. Ein Produkt, das Marco Polo Zitronen-Teegetränk, wurde sowohl mit kochendem, als auch mit kaltem Wasser hergestellt und außerdem wurde das Getränk Bubble Tea, dessen Rezeptur auf Schwarztee basiert, ebenfalls in diese Kategorie einbezogen. Acht beziehungsweise vier Produkte mit jeweils drei unterschiedlichen Brühzeiten können den Kategorien „Grüner Tee“ und „Weißer Tee“ zugeordnet werden. Ferner wurden sechs verschiedene Eistees, sowie sechs unterschiedliche Milchmischgetränke auf Teebasis, eines davon mit drei unterschiedlichen Brühzeiten, untersucht. In den Ergebnistabellen 7 – 11 sind die einzelnen Produkte jeder Kategorie mit ihren Ziehzeiten angeführt. Da für jedes Produkt und für jede Brühzeit jeweils zwei unabhängige Proben untersucht wurden, umfasst die gesamte Arbeit exakt 150 Messungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung des internen Standards

Im Allgemeinen kann ein interner Standard in der Analytik zur Qualitätskontrolle eingesetzt werden. Das Prinzip ist einfach: es wird eine bekannte Konzentration des internen Standards zu jeder Probe hinzugegeben. [Dolan J.W, 2012] Dieser Vorgang wird auch als „Spiken“ bezeichnet. [Kromidas S.] Im Chromatogramm erscheint für den internen Standard, wie auch für die Probenkomponenten, ein Peak, dessen Fläche theoretisch in allen Proben gleich ist. Andernfalls lässt sich auf Verluste des internen Standards und damit des Analyten während der Probenaufarbeitung schließen. Es gibt einige Charakteristika, welche eine Verbindung vorweisen muss, um als interner Standard eingesetzt zu werden. Zum einen muss das Molekül dem nachzuweisenden Analyten in seinen Extraktionseigenschaften ähneln und unter denselben Bedingungen detektierbar sein. Aus diesem Grund muss der interne Standard strukturelle Ähnlichkeit zum Analyten besitzen. Des Weiteren sollte die Verbindung logischer Weise nicht in der Probe vorkommen, ausreichend stabil sein, sodass sie während der Probenaufarbeitung, sowie der chromatographischen Analyse nicht degradiert und nicht mit anderen Molekülen aus der Probe coeluiert. [Dolan J.W, 2012] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, die 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin mit Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) aufweist, wurde im Rahmen der durchgeführten Analysen eine Lösung dieser Verbindung als interner Standard eingesetzt. Zur Herstellung 100 ml internen Standards mit einer Endkonzentration von 100 mg/L wurden 10 mg des pulverförmigen 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin in ein Wiegeschiffchen eingewogen, in einen 100 ml Messkolben überführt und bis zur Markierung mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Jeweils unmittelbar vor der Festphasenextraktion wurden 100 μ l interner Standard zu 900 μ l der Einzelstandards, welche zur Herstellung der Standardgeraden dienten, wie auch zu den Proben zugesetzt und durchliefen ab diesem Zeitpunkt die selben Schritte, wie auch die zu messenden Proben. Die exakte Einwaage von 7-(β -Hydroxyethyl)theophyllin betrug 10,3 mg. Die Endkonzentration des internen

Standards in den Einzelstandards beziehungsweise in den Proben betrug folglich 10,3 mg/L in einem Endvolumen von 1 ml.

2.2.2 Herstellung der Verdünnungsreihen und Standardgeraden

Prinzipiell werden zunächst die Stocklösungen für Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin, sowie eine Misch-Stocklösung, welche alle genannten Verbindungen enthält, hergestellt. Die Konzentrationen werden hierbei so gewählt, dass sie eine obere Grenze für den natürlichen Gehalt dieser Methylxanthine in Tee bilden. Als Basis für diese Überlegung dienen Ergebnisse aus ähnlichen Studien. Zusätzlich wird die Konzentrationsspanne etwas ausgedehnt, um über einen gewissen Sicherheitspuffer zu verfügen. Aus den Stocklösungen werden anschließend Verdünnungsreihen erstellt. Die entstehenden Standards werden entsprechend den Proben mit internem Standard versetzt und jeweils einmal unaufgearbeitet und nach Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion gemessen. Der Grund für diesen Arbeitsschritt ist die Berechnung der Wiederfindung, welche darstellt wie hoch die Verluste bei der Probenaufarbeitung sind. Die aus der Messung resultierenden Werte für die Peakflächen werden schließlich in einem Diagramm den bekannten Konzentrationen gegenübergestellt, sodass sich eine Standardgerade durch die Punkte legen lässt. Mit Hilfe von Microsoft Excel kann die dazugehörige Geradengleichung bestimmt werden. Setzt man in diese Gleichung die ermittelten Peakflächen der Proben ein, so erhält man als Ergebnis die Konzentration des jeweiligen Methylxanthins in der gemessenen Probe. Allerdings muss beachtet werden, dass die Probe zu einem Zehntel aus internem Standard besteht. Auch Verdünnungsschritte bei der Proteinfällung müssen bei der Rückrechnung unbedingt berücksichtigt werden.

Für die Koffein-Stocklösung wurde eine Konzentration von 1000 mg/L gewählt. Hierzu wurden 100 mg wasserfreies Koffein ($\geq 98,5\%$) in einem Wiegeschiffchen eingewogen und in einen 100 ml Messkolben überführt. Dieser wurde bis zur Markierung mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Die Konzentrationen der Stocklösungen für Theobromin,

Theophyllin und Paraxanthin sollten jeweils 500 mg/L betragen. Zur Herstellung wurden 50 mg der jeweiligen Substanz in einen Messkolben überführt, welcher dann mit HPLC-Wasser auf 100 ml aufgefüllt wurde. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Theobromin wurde der Messkolben, bevor er vollständig auf 100 ml aufgefüllt wurde, für 20 min bei 60°C in einem Ultraschallbad erwärmt. Die Kombination aus Ultraschallwellen und erhöhter Temperatur ist im Allgemeinen ein äußerst effizientes Hilfsmittel zur Verbesserung von Lösungsprozessen. Die Energieübertragung auf die Probenmoleküle erfolgt hierbei außerdem sehr schonend, sodass keine Zersetzung der Probe einsetzt. [Gey, 2008] Für die Misch-Stocklösung wurden 100 mg Koffein, 50 mg Theobromin, 50 mg Theophyllin und 50 mg Paraxanthin abgewogen und in ein und demselben 100 ml Messkolben bis zur Markierung mit HPLC-Wasser aufgefüllt.

Tabelle 1 (Tab.1) enthält die genauen Einwaage-Mengen, welche zur Herstellung der Stocklösungen verwendet wurden.

Verbindung	Einwaage in Einzelstocklösung [mg]	Einwaage in Mischstocklösung [mg]
Koffein	101,1	100,3
Theobromin	50,4	50,9
Theohyllin	50,1	49,9
Paraxanthin	50,1	45,1

Tab.1: Herstellung der Stocklösungen – Einwaagen

Die Tabellen 2, 3 und 4 stellen die Pipettierschemata, nach welchen die Verdünnungsreihen hergestellt wurden, dar.

Standard	Konzentration [mg/L]	Aus Stocklösung zu entnehmendes Volumen $V_1 = (c_2 \times V_2) / c_1$ [μl]	HPLC-H ₂ O [μl]	Interner Standard [μl]
1	909,9 = $(1350 \times 1011) / 1500$ bzw. $c_2 = (V_1 \times c_1) / V_2$	$V_1 = (909,9 \times 1000) / 1011 = 900$	-	100
2	707,7	$V_1 = (707,7 \times 1000) / 1011 = 700$	200	100
3	505,5	$V_1 = (505,5 \times 1000) / 1011 = 500$	400	100
4	303,3	$V_1 = (303,3 \times 1000) / 1011 = 300$	600	100
5	101,1	$V_1 = (101,1 \times 1000) / 1011 = 100$	800	100
6	50,55	$V_1 = (50,55 \times 1000) / 1011 = 50$	850	100
7	10,11	$V_1 = (10,11 \times 1000) / 1011 = 10$	890	100
8	1,011	100 μ aus Standard 7*	800	100

* aber ohne internen Standard, d.h. 10 μl Stocklösung + 990 μl HPLC-H₂O.

Tab.2: Pipettierschema: Verdünnungsreihe Koffein

Standard	Konzentration [mg/L]	Aus Stocklösung zu entnehmendes Volumen $V_1 = (c_2 \times V_2) / c_1$ [μl]	HPLC-H ₂ O [μl]	Interner Standard [μl]
1	TB: 453,6 TP: 450,9 PX: 450,9	$V_1 = (453,6 \times 1000) / 504 = 900$ $V_1 = (450,9 \times 1000) / 501 = 900$ $V_1 = (450,9 \times 1000) / 501 = 900$	-	100
2	TB: 352,8 TP: 350,7 PX: 350,7	$V_1 = (352,8 \times 1000) / 504 = 700$ $V_1 = (350,7 \times 1000) / 501 = 700$ $V_1 = (350,7 \times 1000) / 501 = 700$	200	100
3	TB: 252,0 TP: 250,5 PX: 250,5	$V_1 = (252,0 \times 1000) / 504 = 500$ $V_1 = (250,5 \times 1000) / 501 = 500$ $V_1 = (250,5 \times 1000) / 501 = 500$	400	100
4	TB: 151,2 TP: 150,3 PX: 150,3	$V_1 = (151,2 \times 1000) / 504 = 300$ $V_1 = (150,3 \times 1000) / 501 = 300$ $V_1 = (150,3 \times 1000) / 501 = 300$	600	100
5	TB: 50,4 TP: 50,1 PX: 50,1	$V_1 = (50,4 \times 1000) / 504 = 100$ $V_1 = (50,1 \times 1000) / 501 = 100$ $V_1 = (50,1 \times 1000) / 501 = 100$	800	100
6	TB: 10,08 TP: 10,02 PX: 10,02	$V_1 = (10,08 \times 1000) / 504 = 20$ $V_1 = (10,02 \times 1000) / 501 = 20$ $V_1 = (10,02 \times 1000) / 501 = 20$	880	100
7	TB: 5,04 TP: 5,01 PX: 5,01	$V_1 = (5,04 \times 1000) / 504 = 10$ $V_1 = (5,01 \times 1000) / 501 = 10$ $V_1 = (5,01 \times 1000) / 501 = 10$	890	100
8	TB: 0,504 TP: 0,501 PX: 0,501	100 μ aus Standard 7*	800	100

* aber ohne internen Standard, d.h. 10 μl Stocklösung + 990 μl HPLC-H₂O.

Tab.3: Pipettierschema: Verdünnungsreihe Theobromin (TB), Theophyllin (TP) und Paraxanthin (PX)

Standard	Konzentration [mg/L]	Aus Stocklösung zu entnehmendes Volumen $V_1 = (c_2 \times V_2) / c_1$ [µl]	HPLC-H ₂ O [µl]	Interner Standard [µl]
1	CF: 902,7 TB: 458,1 TP: 449,1 PX: 405,9	$V_1 = (902,7 \times 1000) / 1003 = 900$ $V_1 = (458,1 \times 1000) / 509 = 900$ $V_1 = (449,1 \times 1000) / 499 = 900$ $V_1 = (405,9 \times 1000) / 451 = 900$	-	100
2	CF: 702,1 TB: 356,3 TP: 349,3 PX: 315,7	$V_1 = (702,1 \times 1000) / 1003 = 700$ $V_1 = (356,3 \times 1000) / 509 = 700$ $V_1 = (349,3 \times 1000) / 499 = 700$ $V_1 = (315,7 \times 1000) / 451 = 700$	200	100
3	CF: 501,5 TB: 254,5 TP: 249,5 PX: 225,5	$V_1 = (501,5 \times 1000) / 1003 = 500$ $V_1 = (254,5 \times 1000) / 509 = 500$ $V_1 = (249,5 \times 1000) / 499 = 500$ $V_1 = (225,5 \times 1000) / 451 = 500$	400	100
4	CF: 300,9 TB: 152,7 TP: 149,7 PX: 135,3	$V_1 = (300,9 \times 1000) / 1003 = 300$ $V_1 = (152,7 \times 1000) / 509 = 300$ $V_1 = (149,7 \times 1000) / 499 = 300$ $V_1 = (135,3 \times 1000) / 451 = 300$	600	100
5	CF: 100,3 TB: 50,9 TP: 49,9 PX: 45,1	$V_1 = (100,3 \times 1000) / 1003 = 100$ $V_1 = (50,9 \times 1000) / 509 = 100$ $V_1 = (49,9 \times 1000) / 499 = 100$ $V_1 = (45,1 \times 1000) / 451 = 100$	800	100
6	CF: 20,06 TB: 10,18 TP: 9,98 PX: 9,02	$V_1 = (20,06 \times 1000) / 1003 = 20$ $V_1 = (10,18 \times 1000) / 509 = 20$ $V_1 = (9,98 \times 1000) / 499 = 20$ $V_1 = (9,02 \times 1000) / 451 = 20$	880	100
7	CF: 10,03 TB: 5,09 TP: 4,99 PX: 4,51	$V_1 = (10,03 \times 1000) / 1003 = 10$ $V_1 = (5,09 \times 1000) / 509 = 10$ $V_1 = (4,99 \times 1000) / 499 = 10$ $V_1 = (4,51 \times 1000) / 451 = 10$	890	100
8	CF: 1,003 TB: 0,509 TP: 0,499 PX: 0,451	100 µ aus Standard 7*	800	100

* aber ohne internen Standard, d.h. 10 µl Stocklösung + 990 µl HPLC-H₂O.

Tab.4: Pipettierschema: Verdünnungsreihe aus Misch-Stocklösung mit Koffein (CF), Theobromin (TB), Theophyllin (TP) und Paraxanthin (PX)

Die Standardgeraden wurden anhand der Messergebnisse der aufgearbeiteten Misch-Standards erstellt. Die Herstellung der Einzelstandards ist insofern wichtig, um die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten festzustellen. Definiert wird die Retentionszeit als Zeitdauer von der Injektion der Probe bis zur Elution der

Probenkomponente. Für gewöhnlich ist sie charakteristisch für eine spezifische Verbindung, jedoch hängt sie nicht nur von der molekularen Struktur dieser ab, sondern auch von anderen Faktoren, wie der Flussrate der mobilen Phase oder den Maßen der Säule. Ist die Retentionszeit einer Substanz bei gegebenen HPLC-Bedingungen bekannt, wie durch die Messung von Standards, so ist es einfach die zu analysierende Komponente einer Probe anhand ihrer Retentionszeit im Chromatogramm zu identifizieren. [Moldoveanu und David, 2013]

Tabelle 5 und die nachfolgenden Grafiken zeigen die Retentionszeiten und Standardgeraden, welche aus der HPLC-Messung resultierten. Wie sich bei den Probenergebnissen gezeigt hat können sich die Retentionszeiten aufgrund der unterschiedlichen Probenmatrix etwas verschieben. Außerdem sind für jede Methylxanthin-Verbindung zwei Standardgeraden dargestellt. Der Grund hierfür ist eine längere Messpause zwischen Mitte Juli und Anfang September, in welcher eine Wartung der HPLC durchgeführt wurde. Die Standards, welche zur Herstellung der Geraden herangezogen wurden, waren zu beiden Zeitpunkten, das heißt sowohl im Juni, als auch im September, exakt dieselben. Ausreißer, sowohl hinsichtlich der ermittelten Methylxanthin-Area, als auch den internen Standard betreffend, wurden bei der Erstellung der Standardgeraden ausgeschlossen.

Substanz	Retentionszeit [min]
Theobromin	8,72 – 8,94
Theophyllin	9,36 – 9,74
Paraxanthin	9,59 – 10,00
Interner Standard	10,15 – 10,57
Koffein	11,41 – 11,83

Tab.5: Retentionszeiten

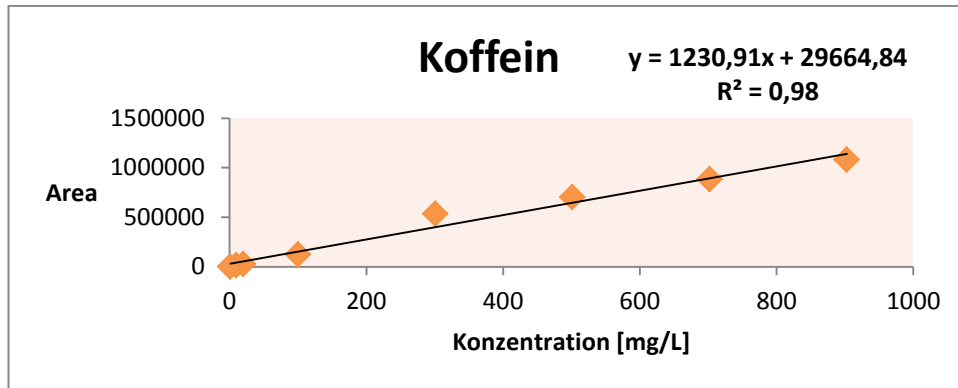


Abb.13: Standardgerade – Koffein aus dem Monat Juni

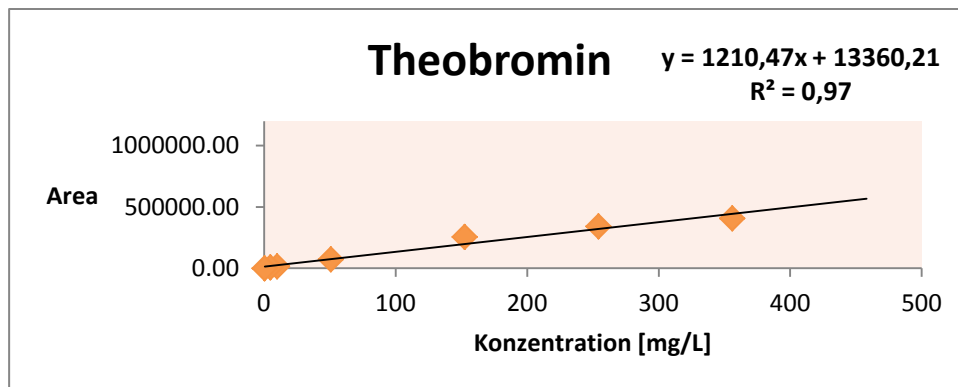


Abb.14: Standardgerade – Theobromin aus dem Monat Juni

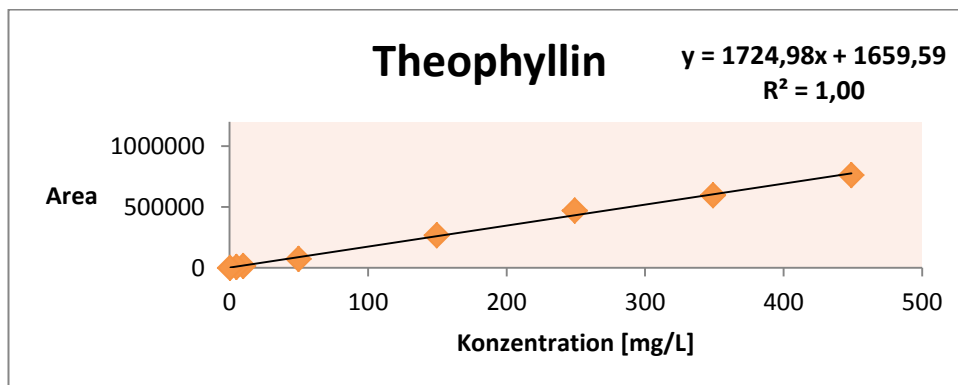


Abb.15: Standardgerade – Theophyllin aus dem Monat Juni

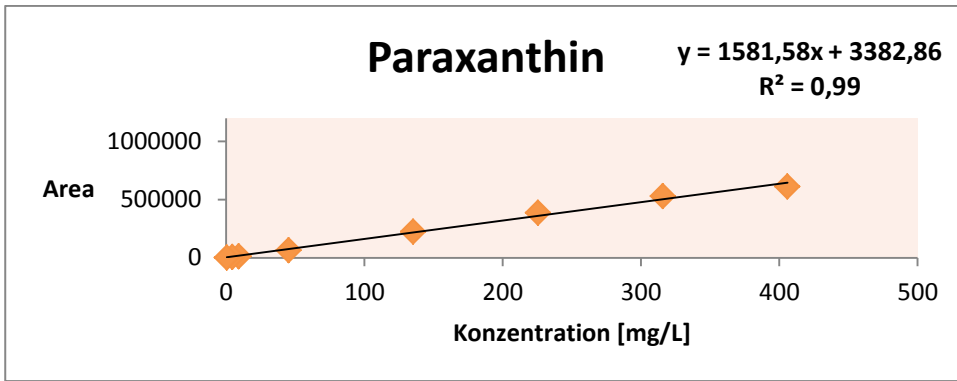


Abb.16: Standardgerade – Paraxanthin aus dem Monat Juni

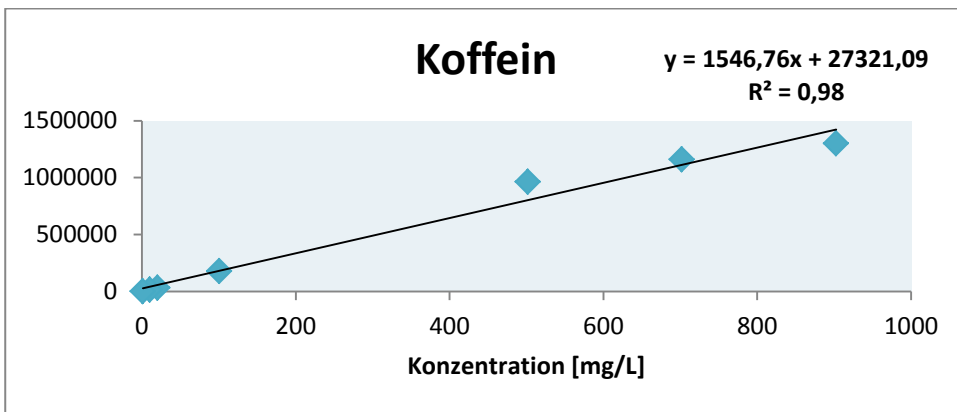


Abb.17: Standardgerade – Koffein aus dem Monat September

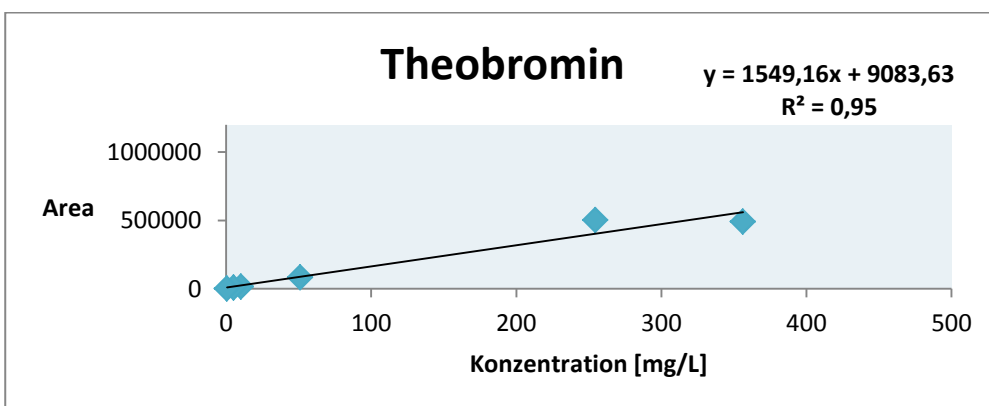


Abb.18: Standardgerade – Theobromin aus dem Monat September

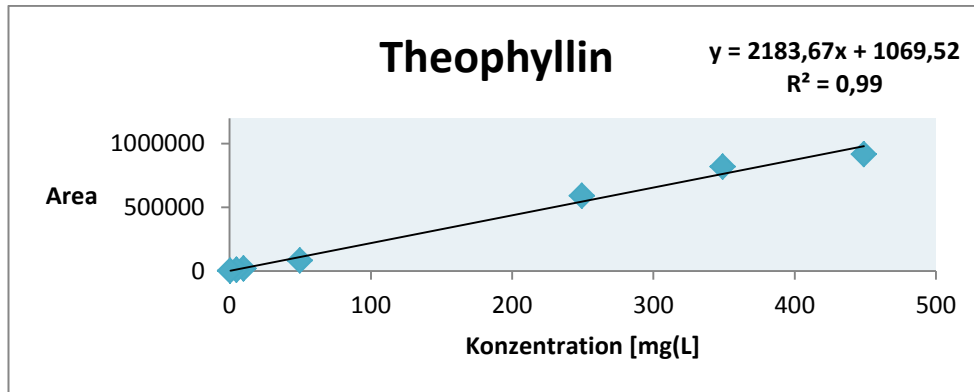


Abb.19: Standardgerade – Theophyllin aus dem Monat September

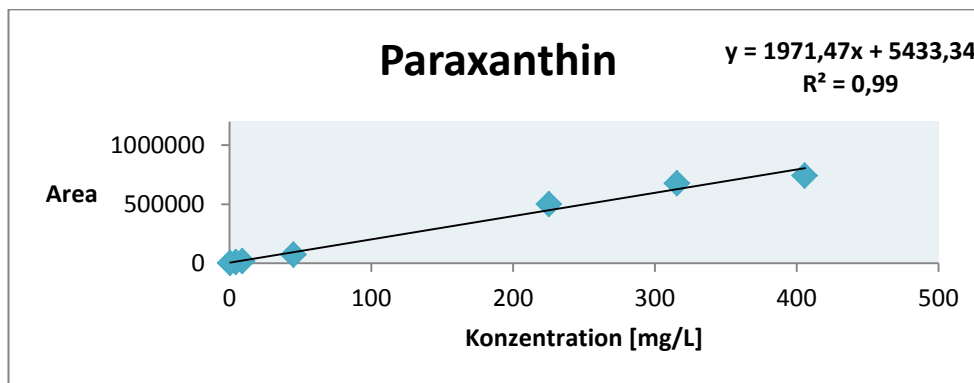


Abb.20: Standardgerade – Paraxanthin aus dem Monat September

2.2.3 Validierung der Methode zur Analyse der Methylxanthine

Die Methodvalidierung ist ein Instrument der Qualitätssicherung und bestätigt die Zuverlässigkeit einer Methode. Um die Hochdruckflüssigkeitschromatographie als Methode für die Analyse der Methylxanthine zu validieren, wurde ein zufällig ausgewählter Mischstandard zehn Mal nacheinander gemessen und die aus der Messung resultierenden Peakflächen miteinander verglichen. Geringe Schwankungen der Werte sind aufgrund von systematischen Fehlern unvermeidbar. [Kromidas S.] Derartige Fehler sind durch nicht steuerbare äußere Einflüsse, sowie durch die Unvollkommenheit des Messgerätes selbst bestimmt. So können beispielsweise Alterungseffekte an Bauteilen, welche für die Messung wichtig sind, zu systematischen Fehlern führen. [Kiencke und Eger, 2008] Als Maß für solche Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden, dient die Messpräzision. Bei der HPLC sollte der Variationskoeffizient, der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert, nicht mehr als 1% betragen. [Kromidas S.] Im Rahmen der durchgeführten Validierung wurden für die Variationskoeffizienten Werte zwischen 1,47 und 3,30% ermittelt (Koffein 1,47%, Theophyllin 1,78%, Paraxanthin 2,49% und Theobromin 3,30%). Eine mögliche Ursache für die höheren Werte ist eine ungenaue Integration der Peakflächen, da diese bei dem verwendeten Auswertungsprogramm nicht automatisch durchgeführt wurde, sondern jeder Peak manuell integriert werden musste. Zu erwähnen ist außerdem, dass für den internen Standard ein weitaus größerer Variationskoeffizient von 15,98% ermittelt wurde. Der Grund hierfür ist unbekannt, allerdings konnte dieser Sachverhalt auch bei der Messung der Teeproben festgestellt werden.

2.2.4 Wiederfindung

Wie in Abschnitt 2.2.2 „Herstellung der Verdünnungsreihen und Standardgeraden“ bereits beschrieben wurde, fand die Messung der Standards jeweils in aufgearbeiteter, sowie in unaufgearbeiteter Form statt. Betrachtet man nun die beiden Standards gleicher Konzentration genauer und vergleicht deren Peakflächen beziehungsweise berechnet man die Differenz der Peakflächen, so wird ersichtlich, dass es während der Probenaufbereitung zu einem Verlust der in der Probe enthaltenen Methylxanthine kommt. Je mehr Aufarbeitungsschritte vor der HPLC-Analyse notwendig sind, desto mehr Fehlerquellen ergeben sich natürlicher Weise. Als Beispiele können unter anderem die unzureichende Konditionierung, die Verwendung ungeeigneter Wasch- und/oder Elutionslösungen, oder die Verwendung zu großer Probenvolumina beziehungsweise zu geringer Mengen an Elutionsmittel während der Festphasenextraktion genannt werden. [Lucci et al., 2012] In der nachfolgenden Tabelle (Tab.6) sind die Peakflächen der Mischstandards ohne und mit Aufarbeitung, sowie die prozentuale Wiederfindung dargestellt.

Substanz in Standard Nr.	Area ohne Aufarbeitung [mAU/min]	Area mit Aufarbeitung [mAU/min]	Wiederfindung [%]
Theobromin 1	763611,7	-	
Theobromin 2	692804,4	406933,60	59,13
Theobromin 3	583995,3	341056,60	58,40
Theobromin 4	307852,1	255733,30	83,07
Theobromin 5	103696,0	71782,20	69,22
Theobromin 6	20347,7	14580,40	71,66
Theobromin 7	10170,1	7600,30	74,73
Theobromin 8	992,2	743,10	74,98
Theophyllin 1	763611,7	761136,90	99,68
Theophyllin 2	692804,4	596233,80	86,06
Theophyllin 3	583995,3	468843,70	80,28
Theophyllin 4	307852,1	267881,50	87,02
Theophyllin 5	103696,00	73213,40	70,60
Theophyllin 6	20347,70	15777,10	77,54
Theophyllin 7	10170,10	8042,50	79,08
Theophyllin 8	992,20	739,90	74,57
Paraxanthin 1	712969,50	610064,20	85,57
Paraxanthin 2	631921,80	528111,90	83,57
Paraxanthin 3	489859,80	386180,90	78,83
Paraxanthin 4	253563,80	224403,00	88,50
Paraxanthin 5	84865,30	63823,60	75,21
Paraxanthin 6	16923,00	12655,00	74,78
Paraxanthin 7	8450,30	6545,60	77,46
Paraxanthin 8	686,50	617,40	89,93
Koffein 1	1036166,5	1079309,20	104,16
Koffein 2	931858,10	881726,00	94,62
Koffein 3	818065,90	701551,10	85,75
Koffein 4	603562,90	534461,20	88,55
Koffein 5	175301,70	124383,60	70,95
Koffein 6	34559,90	25951,30	75,09
Koffein 7	17379,40	13322,40	76,66
Koffein 8	1751,60	1389,80	79,34
Interner Standard 1	11572,70	10529,20	90,98
Interner Standard 2	13470,60	10195,20	75,68
Interner Standard 3	12622,60	10120,60	80,18
Interner Standard 4	12111,60	11474,10	94,74
Interner Standard 5	14842,20	9900,50	66,71
Interner Standard 6	14607,90	11457,90	78,44
Interner Standard 7	9818,20	11287,60	114,97
Interner Standard 8	14722,50	11477,00	77,96

Tab.6: Wiederfindung

2.2.5 Probenzubereitung

Die Zubereitung sämtlicher Teeproben orientierte sich an den haushaltsüblichen Vorgehensweisen.

2.2.5.1 Schwarz-, Grün- und Weißteeeproben

Die Teezubereitung erfolgte in Anlehnung an die Studie von Komes et al. [Komes et al., 2010] unter Vornahme geringfügiger Modifikationen. Hierzu wurden jeweils 2 g der losen Teeblätter auf der Feinwaage eingewogen und in einen geeigneten Messbecher überführt. Anschließend wurde der Tee mit 200 ml Wasser, das zuvor zum Kochen gebracht wurde, für 3 min aufgebrüht und während dieser Zeit mit einem Löffel umgerührt. Nach Ablauf der Brühdauer wurde der Aufguss durch ein herkömmliches Teesieb filtriert, um die Teeblätter zu entfernen. Der Vorgang wurde des Weiteren für jede Probe mit einer Brühdauer von 5 und 10 min durchgeführt. Bei Proben in Teebeuteln wurde ein Beutel zur Herstellung des Aufgusses verwendet. Die Twinings of London Earl Grey Probe von Tassimo in Form einer Kapsel wurde mit einer gängigen Tassimo-Kapsel-Maschine zubereitet.

2.2.5.2 Zitronentee-Getränk

Bei dem Marco-Polo Zitronentee-Getränk wurden entsprechend der Zubereitungsanleitung auf der Verpackung 20 g des Granulats abgewogen und in 200 ml heißem beziehungsweise kaltem Wasser gelöst.

2.2.5.3 Eisteeproben

Alle Eisteeproben konnten ohne weitere Zubereitung für die Probenaufbereitung verwendet werden.

2.2.5.4 Bubble Tea

Das auf Schwarzteebasis hergestellte Kultgetränk wurde bei Bubble's Tea Bar erworben und konnte ebenso wie Eistee ohne weitere Zubereitungsschritte für die Probenaufbereitung verwendet werden.

2.2.5.5 Milchmischgetränke

Fertige Milchmischgetränke, wie der Emmi Chai Latte Classic und der Tea Chai Latte von Starbucks konnten direkt für die Probenaufbereitung verwendet werden. Zur Herstellung des indischen Chai von Teekanne wurde je ein Teebeutel für 3, 5 und 10 min mit 180 ml Wasser, das zuvor zum Kochen gebracht wurde, aufgebrüht und während der gesamten Brühdauer mit einem Löffel umgerührt. Jede der Proben wurde anschließend mit 20 ml Milch verfeinert. Die Chai Latte Proben in Pulverform von den Herstellern Krüger und Nestle wurden entsprechend der Zubereitungsanleitung auf der Verpackung zubereitet. Dazu wurde der Inhalt eines Sachets in 150 ml kochendem Wasser gelöst. Für die Probe von Krüger betrug der Beutelinhalt 25 g. Das Sachet der Nestle Probe enthielt 22 g Chai Latte Pulver. Die Twinings of London Chai Latte Probe von Tassimo in Form einer Kapsel wurde mit einer gängigen Tassimo-Kapsel-Maschine zubereitet.

2.2.6 Probenlagerung

Die Proben wurden nach ihrer Zubereitung in 15 ml beziehungsweise Proben von Milchkombi-Getränken in 50 ml Tubes überführt und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -18 °C gelagert. Heiße Teeaufgüsse wurden vor dem Einfrieren zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die Lagerfähigkeit der Methylxanthine zu untersuchen wurde ein Lagerversuch angelegt, bei dem der Methylxanthingehalt direkt nach der Probenzubereitung und anschließend im Abstand von je einer Woche über einen Gesamtbeobachtungszeitraum von einem Monat gemessen wurde. Näheres hierzu wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2.2.7 Lagerversuch

Um die Lagerfähigkeit der Methylxanthine zu untersuchen wurde ein Lagerversuch angelegt. Für dessen Durchführung wurde ein beliebiges Teeprodukt verwendet. In diesem Fall fiel die Entscheidung auf das Produkt „Milford Feinster Schwarztee kräftige Auslese“. Für die Zubereitung des Teeaufgusses wurde 1 Teebeutel (laut Packungsangabe 1,5 g) mit 200 ml kochendem Wasser für 3 min in einem Becherglas aufgebrüht und während der gesamten Ziehzeit mit einem Löffel umgerührt. Außerdem wurde eine weitere Probe mit Milch hergestellt. Dazu wurde 1 Teebeutel desselben Produktes mit 180 ml kochendem Wasser für 3 min aufgebrüht und währenddessen mit einem Löffel umgerührt. Anschließend wurden 20 ml Milch hinzu gegeben. Nach dem Abkühlen wurden von der Teeprobe ohne Milch 7 Aliquoten hergestellt. Um den Methylxanthingehalt der frisch zubereiteten Probe zu bestimmen wurde ein Aliquot unmittelbar nach der Probenzubereitung aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. Vier Aliquoten wurden eingefroren, ein weiteres wurde bei 4 °C im Kühlhaus aufbewahrt und eines wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Von der Teeprobe mit Milch wurden 6 Aliquoten hergestellt. Eines davon diente erneut der

sofortigen Messung des Methylxanthingehaltes. Vier Aliquoten wurden eingefroren und das letzte Aliquot wurde bei 4 °C gekühlt. Alle weiteren Messungen erfolgten im Abstand von je einer Woche über einen Gesamtzeitraum von einem Monat.

2.2.8 Probenaufarbeitung

2.2.8.1 Proteinfällung

Von jedem Produkt, das es zu analysieren galt, wurden zwei unabhängige Proben aufgearbeitet. Für die Milchkischgetränke bestand der erste Schritt der Probenaufbereitung in einer Proteinfällung mit Meta-Phosphorsäure. In vorausgegangenen Versuchen wurde bereits das optimale Verhältnis zwischen Probe und Säure, unter Berücksichtigung des resultierenden Endvolumens an Probenlösung, getestet. Hierbei erwies sich für die Lagerversuchsproben, sowie das Produkt „Teekanne – Indischer Chai“ der Einsatz von 3 ml Probe, sowie 50 µl Meta-Phosphorsäure als geeignet. Zu allen weiteren Proben, welche weitaus mehr Milch enthielten, wurden 500 µl Säure zu 5 ml der Probe hinzupipettiert. In 15 ml Tubes wurde das Gemisch aus Probe und Säure für mindestens 5 min bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. 2,3 ml dieses Überstandes wurde in ein frisches Tube überführt und erneut zentrifugiert. Die entstehende Lösung konnte sodann für die weitere Probenaufarbeitung verwendet werden.

2.2.8.2 Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE)

Der nächste Vorgang, beziehungsweise der erste Aufarbeitungsschritt für Proben ohne Milch, war die Entfernung störender Substanzen, welche mit den Methylxanthinen wechselwirken können. Möglich war dies durch eine Festphasenextraktion. Hierfür wurde auf die SPE-Säule (Oasis® HLB Extraction Cartridges) zunächst 1 ml Methanol pipettiert, welches dazu dient das Säulenmaterial zu aktivieren. Zur Beschleunigung

der Fließgeschwindigkeit wurde eine Spritze verwendet. Um die Säule zu waschen wurde anschließend 1 ml HPLC-Wasser auf diese pipettiert. In einem Becherglas wurden zwei mal je 900 µl Probe und je 100 µl interner Standard miteinander versetzt. Von dieser Lösung wurde 1 ml auf die Säule pipettiert. Auf diesen Schritt folgte ein erneuter Waschvorgang mit 1 ml HPLC-Wasser und zuletzt wurde nochmals 1 ml Methanol auf die Säule gegeben, um die Methylxanthine von dieser zu lösen. Das Eluat des letzten Schrittes wurde in einem sauberen Gefäß gesammelt und in 1,5 ml Safe-Lock Eppendorf-Tubes überführt.

2.2.8.3 Einkonzentrierung

Im Rahmen der Vorversuche hatte sich gezeigt, dass Theophyllin und Paraxanthin während der HPLC-Messung zu etwa derselben Zeit von der Säule gelöst werden, was im Chromatogramm als Doppelpeak sichtbar wurde. Um dieses Problem zu beheben wurde das Eluat, welches bei der Festphasenextraktion gewonnen wurde, im Konzentrator von einem Ausgangsvolumen von 1 ml auf ein Volumen von 200 µl gebracht und anschließend wieder auf 1 ml mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Nach Überführung dieser Lösung in die Autosamplerfläschchen waren die Proben bereit für die Messung im Hochdruckflüssigkeitschromatographen.

2.2.9 HPLC-Bedingungen der Analyse

Wie bereits angemerkt wurde kam bei der Analyse der Methylxanthine ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph der Firma Dionex zum Einsatz. Nennenswerte Charakteristika sind die Verwendung einer RP-HPLC, sowie des Prinzips der Gradienten-Elution. Außerdem wurden basierend auf der Diplomarbeit von Andrea Färbinger und nach experimentellen Vorversuchen für eine erfolgreiche Auftrennung der Probenkomponenten schließlich die folgenden Geräteeinstellungen übernommen:

Mobile Phase A: 80,6% Wasser

Mobile Phase B: 19,4% Acetonitril

HPLC-Säule: Fortis Phenyl (150 x 2,1mm) von Technologies Ltd.

Injektionsvolumen: 10 µl

Flussrate: 0,2 ml/min

Programmdauer: 15 min

UV-Absorption: 270 nm

Pumpendruck: 200-300 bar

Temperatur: 25°C

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Chromatogramme

Um den graphischen Output einer HPLC-Messung aufzuzeigen sind nachfolgend zwei Chromatogramme, welche aus den eigenen Analysen hervorgingen, abgebildet. Auf der vertikalen Achse ist die Peak-Intensität, auf der horizontalen Achse die Retentionszeit aufgetragen. Im Chromatogramm findet man letztere an genau jener Stelle, an welcher der Peak sein Maximum hat. [Moldoveanu und David, 2013] Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm eines Mischstandards. Von links nach rechts erscheint zunächst der Peak für Theobromin, Theophyllin, Paraxanthin, den internen Standard und zuletzt, mit der höchsten Retentionszeit, für Koffein. Das Chromatogramm in Abbildung 22 gehört zu einer Teeprobe. Es handelt sich hierbei um einen grünen Tee des Herstellers Teekanne mit einer Brühdauer von 3 Minuten. Aufgrund der geringen Konzentration von Theophyllin und Paraxanthin in dieser Probe und in Teeproben im Allgemeinen, sind diese Peaks in der Abbildung nur ansatzweise erkennbar.

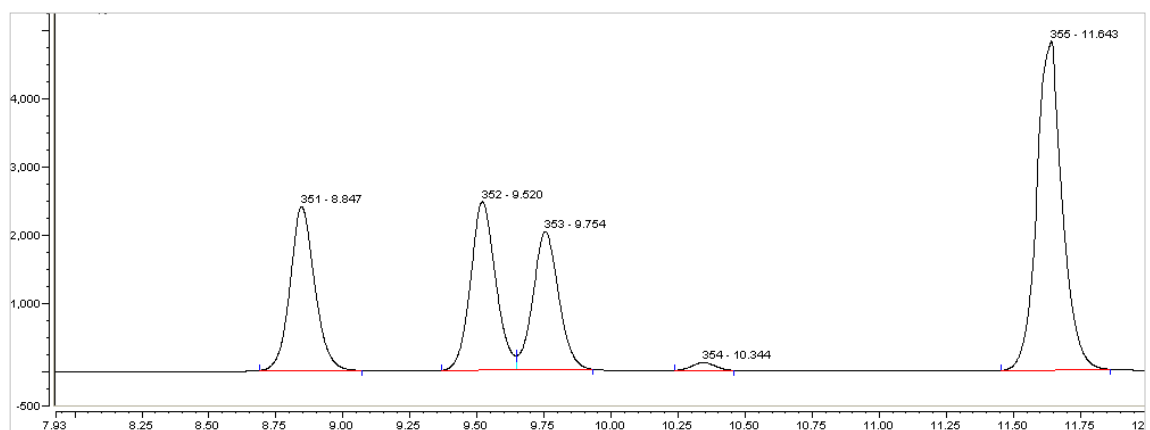


Abb.21: Chromatogramm – Mischstandard 4

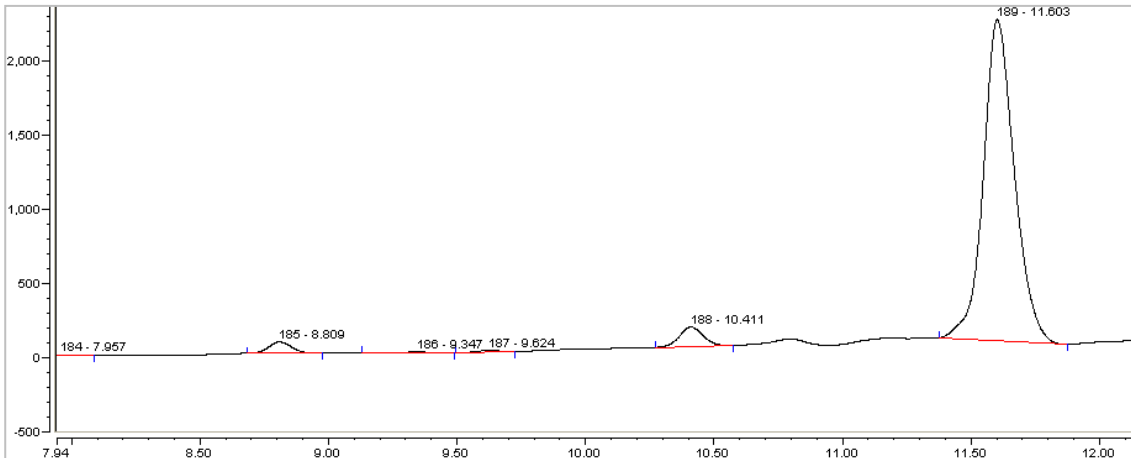


Abb.22: Chromatogramm – Probe

3.2 Detektionsgrenze

Die Detektionsgrenze (Limit Of Detection, LOD) wird nach der IUPAC-Nomenklatur als kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe bezeichnet, welche zuverlässig von Null unterschieden werden kann. [Shrivastava und Gupta, 2011] Zur Berechnung des LODs wurden die geringsten Methylxanthin-Konzentrationen, welche zur Erstellung der Standardgeraden gemessen wurden, herangezogen (Mischstandard 8) und durch den Faktor 10 dividiert. Dadurch ergab sich als Detektionsgrenze für Koffein 0,10 mg/L und für die übrigen Methylxanthine Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin 0,05 mg/L.

3.3 Lagerversuch

Die Versuchsreihe zur Untersuchung der Lagerbeständigkeit der Methylxanthine wurde bereits wenige Seiten zuvor, in Kapitel 2.2.7, beschrieben. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für Koffein fällt auf, dass der Koffein-Gehalt in der ausgewählten Teeprobe mit zunehmender Lagerdauer zunächst, entgegen aller Erwartungen, ansteigt und anschließend wieder sinkt. Dieser Sachverhalt konnte sowohl bei den mit

Milch hergestellten Proben, als auch bei den Proben ohne Milch und bei allen getesteten Lagertemperaturen beobachtet werden. Für das Methylxanthin Theobromin lässt sich aus den ermittelten Werten derselbe Zusammenhang, der soeben für Koffein beschrieben wurde, ableiten. Allerdings lagen die Theobrominkonzentrationen zu jedem Zeitpunkt der Messung über dem Wert, der für die frisch zubereitete Probe analysiert wurde. Der Gehalt an Theophyllin war in der angelegten Versuchsreihe bereits nach einer Lagerdauer von maximal zwei Wochen unter das Detektionslimit gefallen und konnte in der zu analysierenden Lagerversuchsprobe ab diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Resultate decken sich nicht mit den Ergebnissen aus anderen Studien. Komes et al. beobachteten bei der Analyse von Grüntee-Extrakten, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, nach nur 24 Stunden bereits eine Abnahme des Methylxanthingehaltes. [Komes et al., 2010] In zwei anderen Studien konnten Stocklösungen für mindestens zwei Monaten in Flaschen aus dunklem Glas bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden, ohne, dass es zu nennenswerten Veränderungen im Methylxanthin-Gehalt gekommen war. [Bispo et al., 2002], [De Argao et al., 2005] Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit diesen Studien ist nur bedingt möglich, da sich die analysierten Proben voneinander unterscheiden und die Probenmatrix möglicherweise Auswirkungen auf den Ab- bzw. Umbauprozess der Methylxanthine hat. Im Allgemeinen gibt es zudem nur wenige Studien, welche sich mit der Lagerfähigkeit der Methylxanthine beschäftigen. Auf diesem Gebiet besteht folglich Forschungsbedarf. In den Abbildungen 23 bis 25 sind die eigenen Resultate des Lagerversuchs nochmals graphisch dargestellt. Die Konzentration von Paraxanthin lag bereits bei der frisch zubereiteten Teeprobe unter dem Detektionslimit, weshalb für dieses Methylxanthin keine Grafik abgebildet ist.

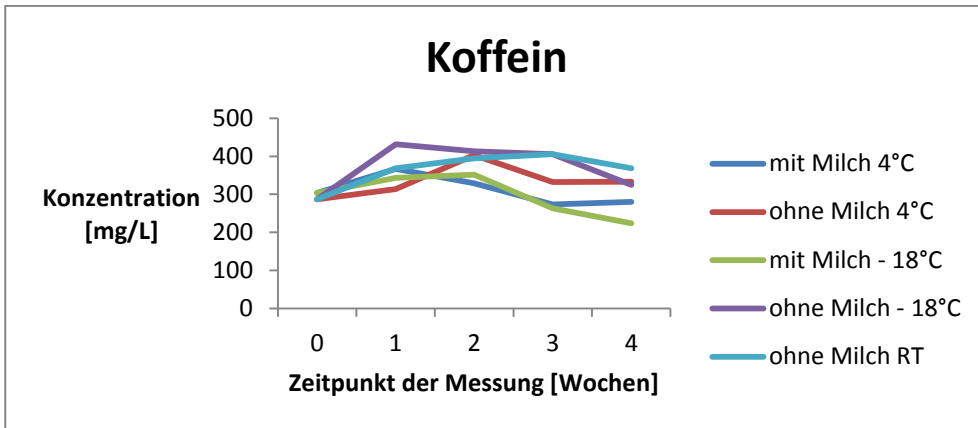


Abb.23: Ergebnis des Lagerversuchs für Koffein

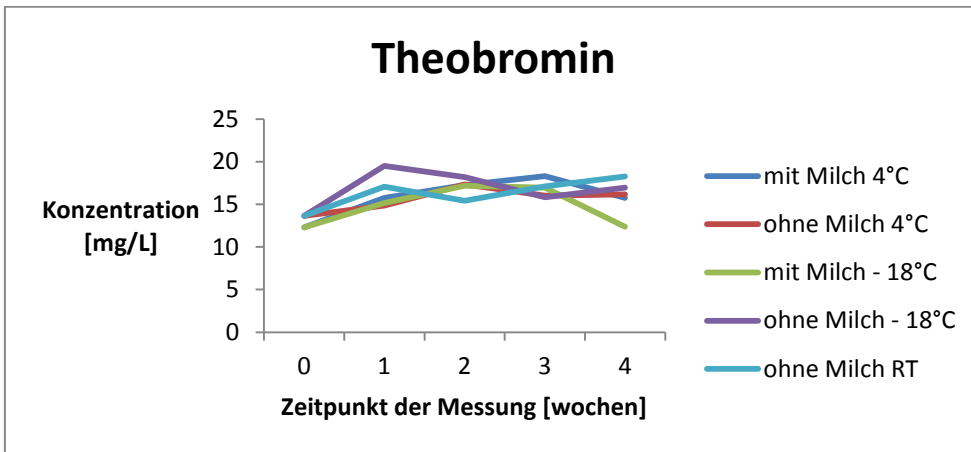


Abb.24: Ergebnis des Lagerversuchs für Theobromin

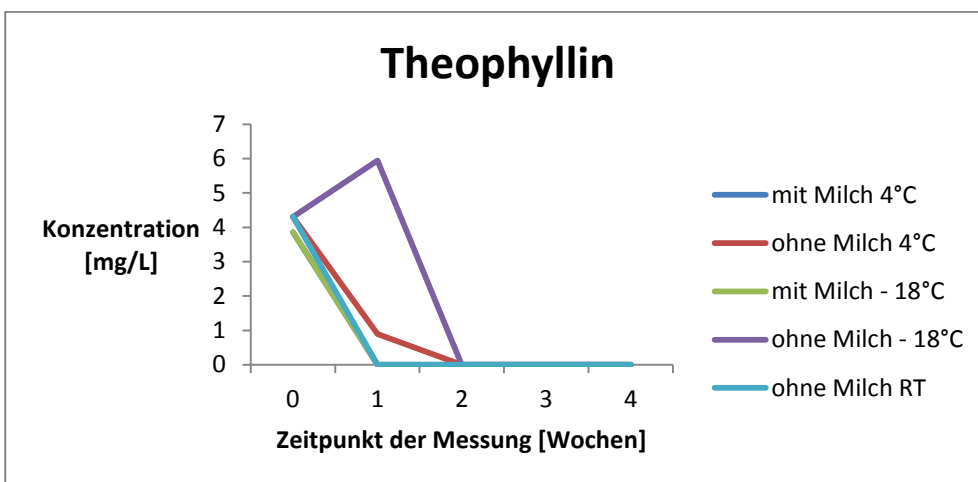


Abb.25: Ergebnis des Lagerversuchs für Theophyllin

3.4 Teeproben

Mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen und eines UV-Detektors wurden die 34 unterschiedlichen Teeprodukte aus den fünf Kategorien „Schwarzer Tee“, „Grüner Tee“, „Weißer Tee“, „Eistee“ und aus der Kategorie „Milchmischgetränke“ auf ihren Gehalt an Theobromin (TB), Theophyllin (TP), Paraxanthin (PX) und Koffein (CF) analysiert. Die jeweiligen Methylxanthin-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Geradengleichungen, welche in Kapitel 2.2.2 dargestellt sind (Abb. 13-20), berechnet und als Mittelwert zweier unabhängiger Proben \pm Standardabweichung in mg/L angegeben. Für die Berechnung wurden jene Standardgeraden herangezogen, die mit dem Zeitpunkt der Probenmessung übereinstimmten. Die Tabellen 7 bis 11 fassen die Methylxanthin-Konzentrationen aller gemessenen Proben zusammen. Neben der exakten Bezeichnung der Teeprobe und der Angabe des Herstellers enthalten die nachfolgenden Tabellen gegebenenfalls auch die Brühzeit.

	Brühzeit [min]	TB [mg/L]	TP [mg/L]	PX [mg/L]	CF [mg/L]
Schwarzer Tee					
English Breakfast (Teekanne)	3	11,62±0,02	< LOD	< LOD	208,31±0,22
	5	16,04±0,02	< LOD	< LOD	277,59±0,22
	10	15,92±0,21	< LOD	< LOD	270,18±0,15
Earl Grey (Meißner)	3	< LOD	< LOD	< LOD	205,30±0,01
	5	7,19±0,01	< LOD	< LOD	237,30±0,03
	10	6,88±0,00	< LOD	< LOD	237,02±0,27
Classics Earl Grey Tea im Teebeutel (Twinings of London)	3	< LOD	< LOD	< LOD	152,71±0,38
	5	0,04	< LOD	< LOD	185,31±0,08
	10	0,61±0,00	< LOD	< LOD	214,41±0,12
Classics Earl Grey Tea lose Blätter (Twinings of London)	3	4,47±0,14	< LOD	< LOD	277,47±0,57
	5	3,25±0,01	< LOD	< LOD	351,01±4,85
	10	4,61±0,08	< LOD	< LOD	400,78±4,85
Schwarzer Tee Assam Bop (Dallmayr)	3	24,75±0,02	< LOD	< LOD	505,87±0,18
	5	29,88±0,01	< LOD	< LOD	517,98±0,04
	10	26,53±0,02	< LOD	< LOD	468,36±0,15
Pure Darjeeling (Twinings of London)	3	8,46±0,01	< LOD	< LOD	329,55±0,33
	5	10,96±0,69	< LOD	< LOD	368,87±0,18
	10	10,37±0,02	0,34	0,56	368,70±0,02
Pure Ceylon (Twinings of London)	3	0,55±0,03	< LOD	< LOD	168,70±0,17
	5	1,34±0,01	< LOD	< LOD	191,01±0,35
	10	2,07±0,02	< LOD	< LOD	203,66±0,85
Zitronen-Teegetränk heiß (Marco Polo)		< LOD	< LOD	< LOD	39,52±1,88
Zitronen-Teegetränk kalt (Marco Polo)		< LOD	< LOD	< LOD	26,97±1,21
Earl Grey Kapseln (Tassimo)		< LOD	< LOD	23,45±3,31	264,29±0,49
Bubble Tea		< LOD	< LOD	< LOD	45,55±0,23

Tab.7: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Schwarzer Tee“

	Brühzeit [min]	TB [mg/L]	TP [mg/L]	PX [mg/L]	CF [mg/L]
Grüner Tee					
Grüner Tee (Teekanne)	3	< LOD	< LOD	< LOD	249,97±3,85
	5	< LOD	< LOD	< LOD	253,08±4,00
	10	< LOD	< LOD	< LOD	218,52±1,60
Green Tea Nature (Lipton)	3	< LOD	0,18±0,01	< LOD	161,99±5,44
	5	< LOD	0,65±0,01	< LOD	183,13±0,02
	10	3,34±0,01	< LOD	< LOD	174,04±0,46
Feinster Hochland Grüntee (Teekanne)	3	21,62±0,49	< LOD	0,06	277,49±1,74
	5	21,11±0,08	< LOD	< LOD	369,97±4,41
	10	21,26±0,31	< LOD	< LOD	372,90±6,28
Grüner Tee Zitrone (Teekanne)	3	< LOD	< LOD	< LOD	191,63±2,99
	5	< LOD	< LOD	< LOD	230,95±1,91
	10	< LOD	< LOD	< LOD	191,89±2,65
Green Tea & Lemon (Twinings of London)	3	< LOD	< LOD	< LOD	263,61±15,75
	5	< LOD	0,58	7,21±0,46	272,21±2,74
	10	< LOD	< LOD	3,31±0,06	282,06±8,83
Sencha Milder Grüntee (Teekanne)	3	< LOD	< LOD	55,38±1,57	92,81±2,87
	5	< LOD	< LOD	< LOD	106,49±3,02
	10	< LOD	< LOD	< LOD	115,16±5,32
Bio Grüner Tee Sencha im Teebeutel (Spar Natur Pur)	3	< LOD	1,36±0,00	< LOD	221,31±3,99
	5	< LOD	0,63±0,03	35,86±2,41	332,73±7,13
	10	< LOD	0,97±0,12	38,93±2,42	399,98±0,69
Bio Grüner Tee Sencha lose Blätter (Spar Natur Pur)	3	< LOD	< LOD	18,92±1,43	233,72±0,82
	5	< LOD	0,08±0,02	0,36±0,33	264,58±5,68
	10	< LOD	9,74±0,01	< LOD	304,14±0,49

Tab.8: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Grüner Tee“

	Brühzeit [min]	TB [mg/L]	TP [mg/L]	PX [mg/L]	CF [mg/L]
Weißer Tee					
Weißer Tee (Teekanne)	3	< LOD	< LOD	15,40±0,07	178,81±0,18
	5	< LOD	< LOD	2,98±0,22	193,12±2,93
	10	2,13±0,04	0,59±0,01	0,45±0,18	226,90±0,06
Bio-Weißer Tee (Spar Natur Pur)	3	< LOD	< LOD	< LOD	210,41±0,97
	5	< LOD	< LOD	< LOD	254,21±3,92
	10	< LOD	< LOD	< LOD	365,40±1,13
Weißer Tee Pai Mu Tan im Teebeutel (Sonnentor)	3	< LOD	< LOD	< LOD	104,05±0,10
	5	< LOD	< LOD	< LOD	106,23±0,98
	10	< LOD	< LOD	< LOD	116,81±0,01
Weißer Tee Pai Mu Tan lose Blätter (Sonnentor)	3	< LOD	0,22±0,15	< LOD	436,94±0,23
	5	< LOD	0,73±0,19	< LOD	439,51±0,31
	10	< LOD	0,78±0,05	< LOD	493,29±2,16

Tab.9: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Weißer Tee“

	Brühzeit [min]	TB [mg/L]	TP [mg/L]	PX [mg/L]	CF [mg/L]
Eistee					
Green Tea Citrus (Nestea)		< LOD	< LOD	< LOD	31,66±0,92
Green Tea Lemon (Rauch Nativa)		< LOD	< LOD	< LOD	64,01±0,22
Ice Tea Lemon (Nestea)		< LOD	< LOD	< LOD	20,05±0,16
Ice Tea Lemon (Lipton)		< LOD	< LOD	< LOD	64,32±0,42
Iced Tea with Lemon Flavour (Arizona)		< LOD	2,17±0,1	< LOD	18,98±0,87
Eistee Pfirsich (Rauch)		< LOD	< LOD	< LOD	40,51±1,02

Tab.10: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Eistee“

	Brühzeit [min]	TB [mg/L]	TP [mg/L]	PX [mg/L]	CF [mg/L]
Milchmischgetränke					
Chai Latte (Tassimo)		12,95±0,01	< LOD	< LOD	173,85±0,55
Chai Tea Latte (Starbucks)		5,81±0,12	< LOD	< LOD	140,80±6,94
Chai Latte Classic (Emmi)		< LOD	< LOD	< LOD	73,59±0,06
Chai Latte Vanilla (Emmi)		0,17±0,03	< LOD	< LOD	75,75±1,11
Chai Latte (Pulver, Nestle)		1,38±0,01	< LOD	< LOD	201,51±0,43
Indischer Chai (Teekanne)	3	< LOD	< LOD	< LOD	53,69±0,15
	5	< LOD	< LOD	< LOD	63,60±0,25
	10	< LOD	< LOD	< LOD	69,45±0,01

Tab.11: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Milchmischgetränke“

Aus den Ergebnistabellen wird schnell ersichtlich, dass sich die Konzentrationen der einzelnen Methylxanthine, sowie ihre Zusammensetzung zwischen verschiedenen Teeprodukten, auch innerhalb einer Kategorie und je nach Brühdauer des Tees, stark unterscheiden können. In den traditionell angebauten Teepflanzen *Camellia sinensis* und *Camellia assamica* bildet Koffein das mengenmäßig am stärksten vertretene Methylxanthin. Dies kann auch in allen analysierten Teeprodukten beobachtet werden. Zwei jüngere *Camellia* Spezies hingegen, *Camellia ptilophylla* und *Camellia assamica* var. *Kucha*, enthalten vor allem Theobromin. Diese wurden für Untersuchungen eigens von der Sun-Yat-sen-Universität in China kultiviert. [Peng et al., 2008]

Unter den eigenen, getesteten Proben fallen zwei Teesorten auf, die einen besonders hohen Gehalt an Koffein aufweisen. Das sind zum einen der weiße Tee Pai Mu Tan von Sonnentor, dessen Aufguss aus losen Teeblättern zubereitet wurde ($493,29 \pm 2,16$ mg/L, Ziehzeit 10 min) und der Schwarztee Assam Bop von der Firma Dallmayr ($517,98 \pm 0,04$ mg/L, 5 min Ziehzeit). Auch andere Studien konnten besonders hohe Koffeinmengen in Tees aus dem Anbaugebiet Assam beobachten und ihre Daten weisen darauf hin, dass Assam-Tees einen höheren Koffeingehalt aufweisen, als beispielsweise Tees aus China. [Sabhapondit et al., 2012] Weitaus geringere Mengen an Koffein sind in dem Zitronen-Teegetränk von Marco Polo ($26,97 \pm 1,21$ bzw. $39,52 \pm 1,88$ mg/L), dem Kultgetränk Bubble Tea ($45,55 \pm 0,23$ mg/L), in Eistees (zwischen $18,98 \pm 0,87$ und $64,32 \pm 0,42$ mg/L) und in Milchmischgetränken (zwischen $53,69 \pm 0,15$ und $173,85 \pm 0,55$ mg/L) enthalten. Theobromin, aber vor allem Theophyllin und Paraxanthin kommen in einer Vielzahl der Proben nicht vor, beziehungsweise sind sie in so geringen Konzentrationen enthalten, dass sie mit der verwendeten Methode nicht detektiert werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Theobromin speziell in schwarzem Tee vorliegt (in etwa 64% der analysierten Proben). Diese Erkenntnis wird durch die publizierten Daten von Horzic und seiner Arbeitsgruppe bekräftigt. Begründet wird dieser Umstand dadurch, dass Theobromin vor allem in den jungen Blättern der Teepflanze vorkommt, welche aufgrund ihres hohen Gehaltes an Polyphenolen die erste Wahl bei der Produktion von Schwarztee sind. [Horzic et al., 2009] Von den analysierten Proben enthält besonders Dallmayr's Assam Bop hohe Konzentrationen an Theobromin ($29,88 \pm 0,01$ mg/L, 5 min Ziehzeit) und auch ein Großteil der getesteten Milchmischgetränke (50%), welche allesamt auf Basis von Schwarztee hergestellt werden, enthalten das 3,7-Dimethylxanthin. Aber auch in Tees aus anderen Kategorien, wie im feinsten Hochland Grüntee von Teekanne, ist Theobromin vorzufinden ($21,62 \pm 0,49$ mg/L, 3 min Ziehzeit). Beachtliche Mengen an Theophyllin sind im Teeaufguss aus den losen Teeblättern des grünen Sencha Tees von Spar Natur Pur enthalten ($9,74 \pm 0,01$ mg/L, 10 min Ziehzeit). Im Hinblick auf Paraxanthin ist der milde Sencha Grüntee von Teekanne zu nennen ($55,38 \pm 1,57$ mg/L, 3 min Ziehzeit). Wie bereits an dieser Stelle klar wird, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit keine Aussage

darüber zu, welche der Teekategorien den höchsten Gehalt an einem bestimmten Methylxanthin besitzt. Auch, wenn dies nicht mit der Aussage von Horzic und seiner Arbeitsgruppe, weißer Tee enthalte mehr Koffein als Grüntee und dieser wiederum mehr als schwarzer Tee, übereinstimmt. [Horzic et al., 2009] Im Großen und Ganzen passen die ermittelten Werte zu den Daten aus der Fachliteratur. In Tabelle 12 werden die eigens ermittelten Konzentrationen mit den Werten aus ähnlichen Studien verglichen. Allerdings gibt es den eigenen Recherchen zufolge keine Arbeiten, welche den Gehalt an Paraxanthin berücksichtigen und kaum Daten zum Gehalt der Methylxanthine in Milchkombi-Getränken. Ausschließlich über die Internetseite des Coffee-Shops Starbucks erhält man Informationen zum Koffeingehalt bezüglich der Chai Tea Latte Getränke. Im Gegensatz zu den angegebenen 197,74 mg/L (70 mg/354 ml) [<http://starbucks.at>] wurde lediglich ein Gehalt von $140,80 \pm 6,94$ mg/L analysiert. Der Chai Tea Latte von Starbucks wird aus Milch und einem Sirup, der Schwarztee-Extrakt enthält, hergestellt. Unterschiede im Koffeingehalt, sowie die relativ große Standardabweichung sind möglicherweise auf unterschiedliche Sirupmengen bei der Zubereitung zurückzuführen, welche vom zubereitenden Personal im Übrigen nicht exakt abgemessen wurden. Auf den Produktverpackungen und Internetseiten weiterer Hersteller von Teegetränken, wurden keine Angaben zur Koffeinkonzentration gefunden. Allerdings geht der Getränkeproduzent Rauch in Bezug auf die Nativia Eistees auf die anregende Wirkung von Koffein ein: „Volles Glas, wacher Geist: Wo viel getrunken wird fließen Gedanken klarer. Wache Köpfe greifen regelmäßig zum Glas, das mildert Müdigkeit und steigert Konzentration und Leistungsfähigkeit.“ [<http://www.rauch.cc/de>] Entsprechende Erfrischungsgetränke gelten insbesondere für Kinder und Jugendliche als nennenswerte Aufnahmequelle von Koffein. Eine hohe Koffeinaufnahme wird mit wenig Schlaf und folglich geringer Lernleistung und möglichen gesundheitlichen Problemen assoziiert. Ferner ist der Einfluss hoher Koffeinemengen auf die Gehirnentwicklung bei Kindern nicht bekannt, sodass vom Konsum von Koffein abgeraten wird. [De Mejia und Ramirez-Mares, 2014] Auch in der Schwangerschaft sollte die Koffeinaufnahme gering gehalten werden. Aufgrund eines erhöhten Risikos für Fehl- und Frühgeburten, sowie einer möglichen fetalen

Wachstumsstörung empfiehlt die FDA (Food and Drug Administration) eine maximale tägliche Zufuhr von 300 mg Koffein nicht zu überschreiten. Die FSA (Food Standards Agency) dagegen [Jarosz et al., 2012] und das American College of Obstetricians and Gynecologists setzen die Grenze bei 200 mg Koffein pro Tag und halten diese Menge in der Schwangerschaft für unbedenklich. [ACOG, 2010] Wie sich im Rahmen der Analysen gezeigt hat ist die tägliche Zufuhr von mehr als 200 mg beziehungsweise 300 mg Koffein durchaus realistisch. Je nach Teesorte und Zubereitungsart kann bereits ein Liter Tee diese Menge enthalten.

Teekategorie	Ermittelte Konzentrationen [mg/L]	Ergebnisse anderer Studien [mg/L]	Literaturangaben
Schwarzer Tee			
CF	26,97 – 505,87	293,07±3,03 181,2±2,9 169,07-312,78 (40-74 mg/8 oz) 110 (22 mg/200 ml)	[Horzic et al., 2009] [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015] [De Mejia und Ramirez-Mares, 2014] [Jarosz et al., 2012]
TB	0,00 – 24,75	45,93±0,29	[Horzic et al., 2009]
TP	0,00 – 0,34	9,27±0,09	[Horzic et al., 2009]
PX	0,00 – 23,45	-	
Grüner Tee			
CF	92,81 – 277,49	99,21 – 300,00 117,8±5,3 105,67-211,34 (25-50 mg/8 oz) 110 (22 mg/ 200 ml)	[Komes et al., 2010] [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015] [De Mejia und Ramirez-Mares, 2014] [Jarosz et al., 2012]
TB	0,00 – 21,62	7,55 – 86,18	[Komes et al., 2010]
TP	0,00 – 1,36	2,58 – 29,08	[Komes et al., 2010]
PX	0,00 – 55,38	-	
Weißer Tee			
CF	104,05 – 436,94	335,05±1,78 135,0±5,3 63,40 (15 mg/8 oz)	[Horzic et al., 2009] [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015] [De Mejia und Ramirez-Mares, 2014]
TB	< LOD	38,61±0,11	[Horzic et al., 2009]
TP	0,00 – 0,22	4,38±0,08	[Horzic et al., 2009]
PX	0,00 – 15,40	-	
Eistee			
CF	18,98 – 64,32	18,32 – 32,41 (6,5 – 11,5 mg/12 oz) 67,84±0,41 (67,84±0,41µg/ml) 76,08-118,35 (27-42 mg/12 oz)	[McCusker et al., 2006] [Tobolkina et al., 2014] [De Mejia und Ramirez-Mares, 2014]
TB	< LOD	-	
TP	0,00 – 2,17	-	
PX	< LOD	-	
Milchmischgetränke			
CF	53,69 – 201,51	197,74 (70 mg/354 ml)	[http://starbucks.at]
TB	0,00 – 12,95	-	
TP	< LOD	-	
PX	< LOD	-	

Tab.12: Vergleich der Methylxanthin-Konzentrationen der einzelnen Teekategorien mit Werten aus der Literatur

Ein Aspekt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Brühdauer eines Tees und dem Methylxanthin-Gehalt. Unter diesem Gesichtspunkt wurden Teeaufgüsse mit unterschiedlichen Ziehzeiten von 3, 5 und 10 min hergestellt. Hierbei zeigt sich für Koffein in allen Fällen ein Anstieg der Konzentration bei Erhöhung der Extraktionszeit von 3 auf 5 min. Eine entsprechende Regelmäßigkeit kann nicht beobachtet werden, wenn die Brühdauer von 5 auf 10 min erhöht wird. Außerdem lässt sich kein Muster erkennen, um wie viel der Gehalt zunimmt. Mit Ausnahme von einem Produkt (Schwarzer Tee Assam Bop von Dallmayr) enthalten die Teeaufgüsse mit einer Ziehzeit von 10 min jedenfalls mehr Koffein, als jene, die nur 3 min aufgebrüht wurden. Für Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin kann kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt der jeweiligen Verbindung und der Ziehdauer des Tees festgestellt werden. Eine Studie aus den USA, welche den Gehalt an Koffein und Theobromin in 77 verschiedenen Tees bestimmte, untersuchte ebenfalls den Einfluss der Extraktionszeit (3, 5, 10, 15 und 20 min) auf die Endkonzentration der jeweiligen Verbindung im fertigen Aufgussgetränk. Sie konnten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Brühdauer und dem Gehalt an Koffein, sowie Theobromin beobachten. [Friedman et al., 2005] Neuste Untersuchungen dagegen zeigten für eine Brühdauer von bis zu 5 min einen Anstieg des Koffeingehaltes, sowie des Gehaltes der gesamten phenolischen Verbindungen in Schwarztee, was die eigenen Beobachtungen zum Einfluss der Ziehzeit auf den Koffeingehalt bestätigt. Ferner konnten Ramalho und seine Arbeitsgruppe feststellen, dass die Koffeinkonzentrationen bei einer weiteren Erhöhung der Extraktionszeit, je nach Herkunft des Tees, sinken und auch wieder ansteigen konnten (Abb. 26). Erklärt wird dieses Verhalten dadurch, dass die Löslichkeit der phenolischen Verbindungen zu Beginn der Brühdauer, wenn das Wasser noch eine Temperatur von 100°C besitzt, höher ist als bei geringeren Temperaturen und die restlichen, ungelösten Komponenten bei einer längeren Ziehzeit des Tees schließlich doch noch extrahiert werden. [Ramalho et al., 2013] Eine dritte Studie erhielt wiederum ein anderes Ergebnis. El-Shahawi et al. konnten mit zunehmender Ziehzeit einen signifikanten Anstieg der Koffeinkonzentration in Proben, die aus losen Grünteelblättern zubereitet

wurden, beobachten. [El-Shahawi et al., 2012] Eine Arbeitsgruppe aus Thailand untersuchte ebenfalls den Einfluss unterschiedlicher Zubereitungsbedingungen auf den Koffeingehalt in Tee. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der Koffeingehalt in Aufgüssen aus ganzen Teeblättern bei einer Ziehzeit von bis zu 15 min umso höher ist, je länger die Infusionszeit und je höher die Wassertemperatur ist. Danach löst sich immer weniger Koffein aus den Teeblättern, bis der Gehalt im fertigen Aufguss schließlich konstant ist. Für Aufgüsse aus gemahlene Teeblättern konnte kein Zusammenhang zwischen der Infusionszeit und dem Koffeingehalt beobachtet werden. Das rührt daher, dass die zerkleinerten Pflanzenteile eine größere Oberfläche besitzen, was eine schnelle Freisetzung von Koffein in das Wasser ermöglicht. [Suteerapataranon et al., 2009] Die Frage, ob die Extraktionszeit bei der Teezubereitung Einfluss auf den Koffein- beziehungsweise Methylxanthingehalt nimmt, kann an dieser Stelle folglich nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

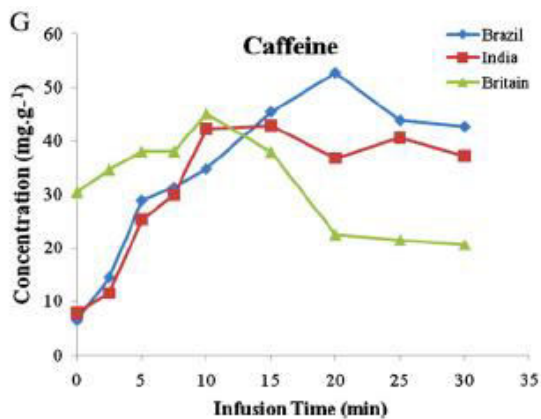


Abb.26: Einfluss der Brühdauer auf den Koffeingehalt in verschiedenen Schwarzteesorten [Ramalho et al., 2013]

Eine weitere interessante Frage, welche im Rahmen der Untersuchungen geklärt werden sollte, ist jene, ob sich Aufgüsse ein und der selben Teesorte in ihrem Methylxanthin-Gehalt unterscheiden, wenn sie ein mal mit Hilfe eines Teebeutels und ein anderes mal mit losen Teeblättern hergestellt werden. Hierzu wurden aus den

Kategorien Schwarz-, Grün- und Weißtee jeweils eine Teesorte desselben Herstellers, aber in unterschiedlicher Form, miteinander verglichen. Für den Schwarztee Classics Earl Grey von Twinings of London und für den weißen Tee Pai Mu Tan von Sonnentor kann festgehalten werden, dass der Koffeingehalt höher ist, wenn der Aufguss aus losen Teeblättern hergestellt wurde. Gleiches kann nicht für den Koffeingehalt in grünem Tee Sencha von Spar Natur Pur festgestellt werden. Für die anderen Methylxanthine können abermals keine Gesetzmäßigkeiten beobachtet werden. In der Literatur findet man widersprüchliche Ergebnisse zu dieser Fragestellung. Komes et al. untersuchten verschiedene Grüntees und stießen auf höhere Methylxanthinkonzentrationen, sofern der Teeaufguss mit Hilfe eines Teebeutels hergestellt wurde. [Komes et al., 2010] Entsprechendes konnte in der Studie von El-Shahawi festgestellt werden. [El-Shahawi et al., 2012] In einer Publikation aus dem „Food Research International“ kann man allerdings gegenteiliges lesen. Hier wurden höhere Konzentrationen an Methylxanthinen gemessen, wenn der Aufguss aus losen Teeblättern statt mit einem Teebeutel zubereitet wurde. [Hicks et al., 1996] Ferner stellten Jaganyi und Ndlovu fest, dass der Übergang von Koffein aus dem Teebeutel in das Wasser um 29% langsamer erfolgte, als bei der Herstellung des Aufgusses aus losen Teeblättern. [Jaganyi und Ndlovu, 2001] Die abweichenden Ergebnisse sind möglicherweise auf die unterschiedliche Qualität der Teebeutel zurückzuführen. Je nachdem welches Papier vom Produzenten für die Herstellung der Teebeutel verwendet wird, kann der Übergang von gelöstem Koffein durch das Papier in das Teewasser variieren. [Yao et al., 2006] Außerdem findet man in der Literatur Hinweise darauf, dass die Koffeinfreisetzung aus dem Teebeutel umso höher ist, je größer dieser ist. Die Form des Teebeutels hat hierbei keinen Einfluss. Entscheidend ist lediglich, dass die Teeblätter genug Platz haben um sich frei bewegen zu können. [Jaganyi und Ndlovu, 2001]

4. Schlussfolgerung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen liefern zuverlässige Ergebnisse bezüglich des Methylxanthin-Gehalts in ausgewählten Tees aus den Kategorien Schwarz-, Grün-, Weißtee, Eistee und Milchkischgetränke. Die ermittelten Konzentrationen stimmen in etwa mit den publizierten Daten ähnlicher Untersuchungen überein. Grundsätzlich kann keine Aussage darüber gemacht werden in welcher Teekategorie der höchste Gehalt eines bestimmten Methylxanthins vorliegt. Allerdings konnte für zwei von drei Produkten ein höherer Koffein-Gehalt festgestellt werden, wenn die Probe mit losen Teeblättern statt mit einem Teebeutel zubereitet wurde. Um eine verlässliche Aussage über den Zusammenhang zwischen der Teeform und dem Methylxanthin-Gehalt im fertigen Getränk treffen zu können ist die Anzahl der untersuchten Proben zu gering. An dieser Stelle wäre es notwendig weitere Analysen durchzuführen. Interessant wäre es zudem den Einfluss der Wassertemperatur, oder den Einfluss multipler Extraktionen auf den Methylxanthin-Gehalt zu untersuchen. Eine Berücksichtigung all dieser Aspekte in nur einer Arbeit hätte jedoch den zeitlichen Rahmen gesprengt. Vor allem das aufwendige Einkonzentrieren bei der Probenaufarbeitung und die umständliche, manuelle Auswertung der Chromatogramme mit dem Programm Chromeleon nehmen viel Zeit in Anspruch. Eine Möglichkeit die Qualität der Daten zu verbessern wäre neben einer besseren Auswertungssoftware die sofortige Aufarbeitung und Messung der frisch zubereiteten Proben, denn der Lagerversuch deutet darauf hin, dass Koffein und Theobromin während der Lagerung Ab- und Umbauprozessen unterliegen und ihr Gehalt schwanken kann. Insbesondere für Theophyllin wurde ein Abbau beobachtet. Prinzipiell eignet sich die Vorgehensweise der Analyse gut für eine geringe Anzahl von Proben, jedoch nicht für große Versuchsreihen. Jafari et al. empfehlen für die Routineanalyse die kosten- und zeitsparende ESI-IMS (Elektronenspray Ionisation – Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie), welche komplett auf ein Trennungverfahren, wie die HPLC, verzichtet und welcher lediglich eine SPE vorausgeht. Die ermittelten Werte liegen bei beiden Methoden im selben Konzentrationsbereich, nur, dass das Ergebnis einer Messung bei der IMS bereits nach weniger als 1 min vorliegt, während die HPLC-

Messung pro Probe 15 min in Anspruch nimmt. Allerdings wurden in dieser Studie lediglich Koffein und Theophyllin analysiert. [Jafari et al., 2011] Ob die Methode auch dazu geeignet ist zusätzlich den Gehalt an Theobromin und Paraxanthin in einer Messung zu erheben, muss erst geprüft werden. Eine weitere Alternative, die bereits erfolgreich eingesetzt wurde ist die voltammetrische Bestimmung von Koffein. Sie zeichnet sich durch die minimale Probenaufarbeitung, den geringen Zeit- und Kostenaufwand, sowie ein geringes Risiko der Probenkontamination aus. [Tyszczyk-Rotko und Beczkowska, 2015] Generell stößt man in jüngerer Literatur auf viele neue und optimierte Analyse-Methoden zur quantitativen Bestimmung von phenolischen Verbindungen.

5. Zusammenfassung

Mit dem Ziel diverse Teeprodukte unterschiedlicher Hersteller unter verschiedensten Zubereitungsbedingungen auf den Gehalt des Hauptmethylxanthins Koffein, sowie seiner Abbauprodukte Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin zu untersuchen, wurden Proben aus den Kategorien Schwarz-, Grün-, Weißtee, Eistee und Milchlischgetränke nach vorausgegangener Probenaufarbeitung mit Hilfe einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie und einem UV-Detektor analysiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Theobromin speziell in schwarzem Tee enthalten ist, jedoch kann keine Aussage dazu gemacht werden in welcher der Teekategorien ein bestimmtes Methylxanthin am meisten vertreten ist. Ihre Zusammensetzung, sowie die Konzentrationen der einzelnen Methylxanthine variieren auch innerhalb einer Kategorie stark. Die Unterschiede sind möglicherweise auf Wachstumsfaktoren, wie das Klima, oder auf das Alter der Teeblätter bei der Ernte zurückzuführen. [Cheng et al., 2015] Aber auch die Art der Teezubereitung nimmt Einfluss auf den Gehalt der Methylxanthine - zumindest auf den von Koffein. Wurde bei der Herstellung eines Teeaufgusses die Brühdauer von 3 auf 5 min erhöht, so erzielte man in dieser Arbeit einen höheren Gehalt an Koffein im Endprodukt. Diese Gesetzmäßigkeit konnte jedoch nicht bei einer Erhöhung der Ziehzeit von 5 auf 10 min und auch nicht für die Verbindungen Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin festgestellt werden. Neben verschiedenen Ziehzeiten kann die Zubereitungsart außerdem dahingehend variieren, dass Aufgüsse mit Teebeuteln, oder aus losen Teeblättern hergestellt werden können. In zwei von drei Fällen war der Koffeingehalt höher, wenn der Aufguss aus losen Teeblättern hergestellt wurde. Abermals konnte kein Einfluss auf den Gehalt der anderen Methylxanthine beobachtet werden. Derzeit gibt es noch nicht sehr viele Studien, die sich mit der Gruppe der Methylxanthine in Tee auseinandersetzen. Vor allem Paraxanthin wird in Zusammenhang mit Tee kaum erwähnt. Allerdings gewann Tee in den letzten Jahren sowohl bei Wissenschaftlern, als auch in der allgemeinen Bevölkerung immer mehr an Popularität, sodass in Zukunft mit mehr Studien auf diesem Gebiet zu rechnen ist.

5. Summary

The aim of this study was to determine the content of the main methylxanthine caffeine, as well as of its metabolites theobromine, theophylline and paraxanthine in diverse tea products from different manufacturers under certain brewing conditions. Therefore samples out of the categories Black-, Green-, White-Tea, Ice Tea and Chai Latte have been analysed by High Pressure Liquid Chromatography and UV-Detection after preceding sample preparation. The obtained results suggest, that especially black teas contain theobromine, but no conclusion can be drawn about which methylxanthine is most common in which category of tea. These differences are possibly due to growth factors, like climate, or the age of the tea leaves during harvest. [Cheng et al., 2015] But also the kind of tea preparation influences the content of methylxanthines – at least the one of caffeine. Increasing the brewing time from 3 to 5 min in this work resulted in higher caffeine concentrations in the endproduct. This rule was neither valid for the raise of brewing time from 5 to 10 min, nor for theobromine, theophylline and paraxanthine. Beside different brewing times, tea preparation can also vary due to the use of loose tea leaves instead of tea bags. In two of three cases the caffeine content was higher, if the infusion was made by loose tea leaves. Once again, no influence on the other methylxanthines could be observed. Currently there are only few studies dealing with the topic of methylxanthines in tea. Particularly paraxanthine is not mentioned in the context of tea. However, in the last years tea gained in popularity in the general population and also in the scientific panel. Therefore in the future more studies in this field of research can be expected.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists (engl.)
bzw.	Beziehungsweise
c	Concentration (engl.), Konzentration
CF	Caffeine (engl.), Koffein
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ESI	Electrospray Ionisation (engl.), Elektrospray Ionisation
FDA	Food and Drug Administration (engl.)
FSA	Food Standards Agency (engl.)
g	Gramm
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography (engl.) Hochdruck-/Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₂ O	Wasser
IMS	Ion Mobility Spectrometry (engl.) Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (engl.) Internationale Union für reine und angewandte Chemie
kg	Kilogramm
LLE	liquid-liquid extraction (engl.), flüssig-flüssig-Extraktion
LOD	Limit Of Detection (engl.), Detektionsgrenze
mAU/min	Milliabsorbance Units per minute (engl.) Milli-Extinktionseinheiten pro Minute
mg/L	Milligramm pro Liter
min	Minute
ml	Milliliter
n.Chr.	nach Christus

nm	Nanometer
NP-HPLC	Normal-Phase HPLC
Oz	Ounce (engl.), Unze
PX	Paraxanthin
RP-HPLC	Reversed-Phase HPLC (engl.), Umkehrphasen-HPLC
SPE	solid-phase extraction (engl.), Festphasenextraktion
Tab.	Tabelle
TB	Theobromin
TP	Theophyllin
V	Volumen
< LOD	< Limit of Detection (engl.), < Detektionsgrenze
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

7. Literaturverzeichnis

American of Obstetricians and Gynecologists: Moderate Caffeine Consumption during Pregnancy. Internet: <http://www.acog.org/-/media/Committee-Opinions/Committee-on-Obstetric-Practice/co462.pdf?dmc=1&ts=20141126T0400420318> (Stand 2013).

Ashihara H, Kato M, Crozier A. Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2011; 11-31.

Bispo M.S, Veloso M.C.C, Pinheiro H.L.C, De Oliveira R.F.S, Reis J.O.N, De Andrade J.B. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science 40 (2002) 45-48.

Bryan J. Psychological effects of dietary components of tea: caffeine and L-theanine. Nutrition reviews 66 (2008) 82-90.

Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend: Österreichisches Lebensmittelbuch, IV. Auflage, Codexkapitel B31 Tee und teeähnliche Erzeugnisse, 2009.

Chen Q, Guo Z, Zhao J. Identification of green tea's (*Camellia sinensis* (L.)) quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 (2008) 1321–1325.

Cheng H, Wie K, Wang L. Chapter 72 - The Impact of Variety, Environment and Agricultural Practices on Catechins and Caffeine in Plucked Tea Leaves. Processing and Impact on Active Components in Food (2015) 597-603.

Da Silva Pinto M. Tea: A new perspective on health benefits. Food Research International 2013; 558–567.

De Aragao N.M, Veloso M.C.C, Bispo M. S, Ferreira S.L.C, de Andrade J.B. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Talanta 67 (2005) 1007-1013.

De Mejia E.G, Ramirez-Mares M.V. Impact of caffeine and coffee on our health. Trends in Endocrinology & Metabolism 25 (2014) 489-492.

Dolan J.W. When Should an Internal Standard be Used? LCGC North America 2012; 30(6); 474-581.

El-Shahawi M.S, Hamza A, Bahaffi S.O, Al-Sibaai A.A, Abduljabbar T.N. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. Food Chemistry 134 (2012) 2268-2275.

Friedman M, Kom S, Lee S, Han G, Han J, Lee K, Kozukue N. Distribution of Catechins, Theaflavins, Caffeine, and Theobromine in 77 Teas consumed in the United States. Journal of Food Science 2005; 80(9): 550-559.

Gey M.H. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.

Hicks M.B, Hsieh Y.H.P, Bell L.N. Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. Food Research International 1996; (29): 325-330.

Horzic D, Komes D, Belscak A, Kovacevic Ganic K, Ivekovic D, Karlovic D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. Food Chemistry 115 (2009) 441–448.

Institut für Angewandte Tiefenpsychologie, Dr. Walter Hoffmann: ifat „Teestudie“. Internet: <http://ifat.at/>

Jafari M.T, Rezaei B, Javaheri M. A new method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous determination of caffeine and theophylline. Food Chemistry 126 (2011) 1964-1970.

Jaganyi D, Ndlovu T. Kinetics of tea infusion. Part 3: the effect of tea bag size and shape on the rate of caffeine extraction from Ceylon orange pekoe tea. Food Chemistry 75 (2001) 63–66.

Jarosz M, Wierzejska R, Siuba M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 160 (2012) 156–160.

Kaffee- und Teeverband. Internet: <http://www.kaffeeteeverband.at>

Kiencke U, Eger R. Messtechnik: Systemtheorie für Elektrotechniker. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008.

Komes D, Horzic D, Belscak A, Kovacevic Ganic K, Vulic I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International* 43 (2010) 167–176.

Kromidas S. Methodvalidierung in der Analytik. Internet:
<http://www.kromidas.de/publikationen/artikel-diverses/dokumente>

Lucci P, Pacetti D, Nunez O, Frage N.G. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* 2012.

Mahmood T, Akhtar N. Khan B.A. The morphology, characteristics and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(19): 2028-2033.

Marchei E, Pellegrini M, Pacifici R, Palmi I, Pichini S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine in dietary supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 499–507.

McCusker R.R, Goldberger B.A, Cone E.J. Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages. *Journal of Analytical Toxicology* 2006; (30): 112-114.

Ministry of Primary Industries: Caffeine. Internet:
<http://foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/caffeine-info-sheet.pdf> (Stand: 11/2012)

Mitra S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Verlag, New Jersey, 2003.

Moldoveanu S.C, David V. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier Verlag, 2013; 1-519.

Nollet L.M.L, Toldra F. *Food Analysis by HPLC Third Edition*. CRC Press, Taylor & Francis Group, US, 2013.

Peng L, Song X, Shi X, Li J, Ye C. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008) 559– 563.

Poole C.F. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22 (6): 362-373.

Ramalho S.A, Nigam N, Oliveira G.B, de Oliveira P.A, Silva T.O.M, dos Santos A.G.P, Narain N. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Food Research International* 51 (2013) 155–161.

Rauch Fruchtsäfte GmbH. Internet: <http://www.rauch.cc/de/produkte/nativa/>

Rudolph E, Färbinger A, König J. Determination of the caffeine contents of various food items within the Austrian market and validation of a caffeine assessment tool (CAT). *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012; 29(12):1849-1860.

Sabhaponit S, Karak T, Bhuyan L.P, Goswami B.C, Hazarika M. Diversity of Catechin in Northeast Indian Tea Cultivars. *The ScientificWorld Journal* (2012) 1-8.

Shrivastava A, Gupta V.B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* (2011) 21-25.

Starbucks. Internet: <http://globalassets.starbucks.com/assets/6197b24167e94c20ad42d7580850a825.pdf>

Suteerapataranon S, Butsoongnern J, Punturat P, Jorpalit W, Thanomsilp C. Caffeine in Chiang Rai tea infusions: Effects of tea variety, type, leaf form, and infusion conditions. *Food Chemistry* 114 (2009) 1335–1338.

Tobolkina E, Qiao L, Roussel C, Girault H.H. Standard addition strip for quantitative electrostatic spray ionization mass spectrometry analysis: Determination of caffeine in drinks. *Talanta* 130(2014)377–381.

Tyszczyk-Rotko K, Beczkowska I. Nafion covered lead film electrode for the voltametric determination of caffeine in beverage samples and pharmaceutical formulations. *Food Chemistry* 172 (2015) 24-29.

Yao L, Liu X, Jiang Y, Caffin N, D'Arcy B, Singanusong R, Datta N, Xu Y. Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. *Food Chemistry* 94 (2006) 115–122.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Herstellungsübersicht für Tee	Abb.2: Klassifikation von <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	2
Abb.2: Klassifikation von <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze		3
Abb.3: Pro-Kopf-Verbrauch von Tee		5
Abb.4: Motive für den Teekonsum		5
Abb.5: Die chemische Struktur der Methylxanthine		8
Abb.6: Koffein, Theobromin und Theacrin in den Blättern ausgewählter <i>Camellia</i> Spezies		8
Abb.7: Koffein Synthese		11
Abb.8: Das Prinzip der SPE		15
Abb.9: Vereinfachte Darstellung des Trennungsprozesses		18
Abb.10: HPLC-Apparatur		18
Abb.11: Struktur eines hydrophoben Moleküls mit C-18-Kette		19
Abb.12: Veränderung des Anteils der organischen Komponente in der mobilen Phase		20
Abb.13: Standardgerade – Koffein aus dem Monat Juni		31
Abb.14: Standardgerade – Theobromin aus dem Monat Juni		31
Abb.15: Standardgerade – Theophyllin aus dem Monat Juni		31
Abb.16: Standardgerade – Paraxanthin aus dem Monat Juni		32
Abb.17: Standardgerade – Koffein aus dem Monat September		32
Abb.18: Standardgerade – Theobromin aus dem Monat September		32
Abb.19: Standardgerade – Theophyllin aus dem Monat September		33
Abb.20: Standardgerade – Paraxanthin aus dem Monat September		33
Abb.21: Chromatogramm – Mischstandard 4		43
Abb.22: Chromatogramm – Probe		44
Abb.23: Ergebnis des Lagerversuchs für Koffein		46
Abb.24: Ergebnis des Lagerversuchs für Theobromin		46
Abb.25: Ergebnis des Lagerversuchs für Theophyllin		46

Abb.26: Einfluss der Brühdauer auf den Koffeingehalt in verschiedenen
Schwarzteesorten 56

9. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Herstellung der Stocklösungen – Einwaagen	26
Tab.2: Pipettierschema: Verdünnungsreihe Koffein	27
Tab.3: Pipettierschema: Verdünnungsreihe Theobromin (TB), Theophyllin (TP) und Paraxanthin (PX)	28
Tab.4: Pipettierschema: Verdünnungsreihe aus Misch-Stocklösung mit Koffein (CF), Theobromin (TB), Theophyllin (TP) und Paraxanthin (PX)	29
Tab.5: Retentionszeiten.	30
Tab.6: Wiederfindung.	36
Tab.7: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Schwarzer Tee“	48
Tab.8: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Grüner Tee“	49
Tab.9: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Weißer Tee“	49
Tab.10: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Eistee“	50
Tab.11: Methylxanthin-Konzentrationen in der Kategorie „Milchmischgetränke“	50
Tab.12: Vergleich der Methylxanthin-Konzentrationen der einzelnen Teekategorien mit Werten aus der Literatur	54

Danksagung

Es ist noch kein „Master“ vom Himmel gefallen - und so waren für mich in den letzten Jahren nicht nur Fleiß, Durchhaltevermögen und Selbstdisziplin, sondern auch der Beistand einiger wichtiger Menschen unabdingbar. Daher möchte ich diese Arbeit zum Anlass nehmen, um mich zu bedanken,

bei der gesamten AG König des Departments für Ernährungswissenschaften für die angenehme Arbeitsatmosphäre,

bei Univ.-Ass. Dr. Elisabeth Rudolph, die mich während der Anfertigung meiner Masterarbeit begleitet und mich mit zahlreichen Tipps und Anregungen unterstützt hat,

bei Sandra Auernigg-Haselmaier, die bei der praktischen Arbeit eine wertvolle Hilfe und stets bemüht war analytische und technische Probleme, von denen es einige gab, aus dem Weg zu räumen

und bei meiner Studienkollegin Bianca Schmelzer mit der ich die Analysen gemeinsam durchgeführt habe und die mir eine gute Freundin geworden ist.

Außerdem danke ich meinen Mädels, die über Ländergrenzen hinweg immer hinter mir standen und mir eine moralische Stütze waren.

Besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie: meiner Schwester und meinen Eltern, durch die mein Studium überhaupt erst möglich wurde und die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Und nicht zu vergessen, die sich in Punkto Ernährung von mir stets eines Besseren belehren lassen mussten.

Danke!

Lebenslauf



Persönliche Daten

Vorname, Familienname, Titel	Jessica Beierbach, Bakk.
Geburtsdatum, Geburtsort	16. November 1988, Weingarten, Deutschland
Familienstand	ledig
Anschrift	Keltenstraße 9, 88250 Weingarten, Deutschland
Telefonnummer	(+49)0751-49102 (+49)0151-20157271
E-Mail-Adresse	jessica.beierbach@gmx.de

Ausbildung

Seit 10/2012	Universität Wien Fachrichtung: Ernährungswissenschaften Studienzweig: Molekulare Ernährung Angestrebter Abschluss: Master of Science
10/2008 - 06/2012	Universität Wien Fachrichtung: Ernährungswissenschaften Abschluss: Bakkalaurea of Science
09/1999 - 07/2008	Gymnasium Weingarten Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/1995 - 07/1999	Grundschule Promenadenschule, Weingarten

Berufserfahrung

07/2012 - 10/2012

Praktikum bei Griesson - de Beukelaer in Ravensburg im Qualitätsmanagement/Labor

Sprachkenntnisse

Englisch (konversationssicher)

Latein (Latinum)

Besondere Qualifikationen

Projektmanagement

Selbstständige Erarbeitung zweier Projekte im Rahmen des Praktikums bei Griesson - de Beukelaer

Präsentationstechniken

Seminar Medienkunde

Computerkenntnisse

MS Word, MS Powerpoint, MS Excel

Weingarten, den 27.11.2014

