



universität  
wien

# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

## Quantitative Bestimmung von Koffein und seinen Hauptmetaboliten in Kaffee

verfasst von

Bianca Schmelzer, Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Univ.- Ass. Dr. Elisabeth Rudolph-König



## **Danksagung**

Mein Dankeschön gilt zunächst der gesamten AG König des Departments für Ernährungswissenschaften für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Speziell danke ich Univ.-Ass. Dr. Elisabeth Rudolph-König für die Betreuung und stete Unterstützung, und es mir ermöglicht hat, diese Masterarbeit zu verfassen.

Weiters möchte ich mich bei der Assistentin Sandra Auernigg-Haselmaier bedanken, die vor allem bei technischen und analytischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem danke ich meiner Studienkollegin Jessica Beierbach, die mit mir gemeinsam den praktischen Teil absolviert hat.

Besonderer Dank geht an meine Familie, an alle Bekannten und Freunde, die mich während meiner Studienzeit begleitet haben.



## **I. INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I-IV</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI-VII</b>

<b>1. EINLEITUNG und FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1-2</b>
--	------------

<b>2. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
-----------------------------------	----------

<b>2.1 Methylxanthine .....</b>	<b>3</b>
---------------------------------	----------

2.1.1 Koffein.....	4
--------------------	---

2.1.1.1 Synthese .....	4-5
------------------------	-----

2.1.1.2 Abbau .....	6
---------------------	---

2.1.2 Theobromin .....	7
------------------------	---

2.1.3 Theophyllin .....	7
-------------------------	---

2.1.4 Paraxanthin.....	7
------------------------	---

<b>2.2 Kaffee – Eine Bohne geht um die Welt.....</b>	<b>8</b>
--	----------

2.2.1 Die Kaffeefrucht.....	8
-----------------------------	---

2.2.2 Geschichte .....	8
------------------------	---

2.2.3 Der Kaffeemarkt – Arabica, Robusta und Co.....	9-12
--	------

2.2.4 Ernte und Verarbeitung.....	12-13
-----------------------------------	-------

2.2.4.1 Die Veredelung – Der Röstprozess.....	13-14
---	-------

2.2.5 Inhaltsstoffe.....	14-15
--------------------------	-------

2.2.6 Zubereitungsmethoden .....	15
----------------------------------	----

2.2.7 Eine Vielfalt von Kaffeearten .....	16
---	----

<b>2.3 Analysemethode .....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Festphasenextraktion .....	17-19
2.3.2 Hochleistungschromatographie (HPLC).....	20-21
2.3.2.1 Peaks eines Chromatogramms.....	21
2.3.2.2 Kennzahlen eines Chromatogramms .....	22-23
2.3.2.3 Reversed-phase HPLC.....	24

### **3. MATERIALIEN und METHODEN..... 25**

<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	25
3.1.2 Geräte und Materialien .....	26
3.1.3 Software.....	27
3.1.4 Kaffeeproben .....	27

<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Herstellung eines internen Standards .....	28
3.2.2 Herstellung des Mischstandards .....	28-32
3.2.2.1 Erneute Messung der Mischstandardlösungen .....	33
3.2.3 Wiederfindung.....	33-34
3.2.4 Validierung der Methode .....	34-35
3.2.5 LOD (Limit of Detection) .....	35
3.2.6 Probensammlung und -lagerung .....	36
3.2.6.1 Lagerversuch – Wie stabil sind die Methylxanthine? .....	36
3.2.7 Probenzubereitung.....	37
3.2.7.1 Espresso.....	37
3.2.7.2 Filterkaffee .....	37
3.2.7.3 Kapsel und Pads .....	37
3.2.7.4 Kaffee von Coffeeshops .....	37

3.2.7.5 Kaffeefertiggetränke .....	38
3.2.8 Probenaufbereitung .....	38
3.2.8.1 Zentrifugieren.....	38
3.2.8.2 Proteinfällung.....	38-39
3.2.8.3 Festphasenextraktion.....	40
3.2.8.4 Konzentrierung.....	40
3.2.9 Analyse der Kaffeeproben .....	41
3.2.9.1 HPLC-Bedingungen.....	41
3.2.9.2 Statistische Auswertung.....	41
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Espresso .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Filterkaffee.....</b>	<b>44-45</b>
<b>4.3 Kapsel &amp; Pads.....</b>	<b>46-47</b>
<b>4.4 Coffeeshops.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Kaffeefertiggetränke.....</b>	<b>49</b>
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Allgemein.....</b>	<b>50-51</b>
<b>5.2 Kaffeekategorien: Methylxanthinkonzentrationen .....</b>	<b>51</b>
5.2.1 Espresso .....	51-52

5.2.2 Filterkaffee.....	52-53
5.2.3 Kapsel & Pads .....	54
5.2.4 Coffeeshops .....	55
5.2.5 Kaffeefertiggetränke.....	55-58
<b>5.3 Koffeingehalt: Kaffeeproben im Vergleich .....</b>	<b>59</b>
5.3.1 Espresso .....	59-60
5.3.2 Latte Macchiato/Latte Macchiato Caramel bzw. Vanilla .....	60
5.3.3 Cappuccino .....	61
5.3.4 Caffè Latte/Vanilla Latte .....	61
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
7.1 Summary.....	64
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65-72</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>73-78</b>
<b>10. LEBENS LAUF .....</b>	<b>79</b>



## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Xanthin.....	3
Abbildung 2: Methylxanthine .....	3
Abbildung 3: Koffeinsynthese .....	5
Abbildung 4: Koffeinabbau.....	6
Abbildung 5: Kaffeexporterlöse (1988-2013) .....	10
Abbildung 6: Weltweite Rohkaffeexporte – Arabica und Robusta.....	11
Abbildung 7: Moderne SPE .....	17
Abbildung 8: Ablauf der Festphasenextraktion .....	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer HPLC.....	20
Abbildung 10: Normalverteilung.....	21
Abbildung 11: Chromatogramm .....	23
Abbildung 12: Chromatogramm des Mischstandards 1 .....	30
Abbildung 13: Standardgerade Koffein.....	31
Abbildung 14: Standardgerade Theobromin .....	31
Abbildung 15: Standardgerade Theophyllin .....	32
Abbildung 16: Standardgerade Paraxanthin .....	32
Abbildung 17: Chromatogramm_Kaffee Spar Natur Pur (1).....	45
Abbildung 18: Chromatogramm_Kaffee Spar Natur Pur (2).....	45
Abbildung 19: Chromatogramm_Nespresso Lungo Fortissio .....	46

### III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Weltweite Rohkaffeeexporte nach Ursprungsländer .....	9
Tabelle 2: Export von Kaffee aus ökologischem Anbau .....	10
Tabelle 3: Pro Kopf Verbrauch in ausgewählten Ländern .....	12
Tabelle 4: Trennmechanismen der Festphasenextraktion .....	18
Tabelle 5: Einwaage der Standards .....	29
Tabelle 6: Pipettierschema: Verdünnungsreihe aus Mischstocklösung .....	29
Tabelle 7: Retentionszeiten und Standardgeraden (erneute Messung) .....	33
Tabelle 8: Wiederfindung.....	34
Tabelle 9: Validierung der Methode .....	35
Tabelle 10: LOD der Methylxanthine .....	35
Tabelle 11: Lagerversuch .....	36
Tabelle 12: Proteinfällung .....	39
Tabelle 13: Konditionierung der SPE.....	40
Tabelle 14: Standardgeraden von der ersten und zweiten Messung.....	42
Tabelle 15: Espresso.....	43
Tabelle 16: Crema .....	44
Tabelle 17: Bio-Kaffee .....	44
Tabelle 18: Nespresso .....	46
Tabelle 19: Senseo .....	47
Tabelle 20: Tassimo.....	47
Tabelle 21: Caffissimo .....	47
Tabelle 22: Coffeeshop Company .....	48
Tabelle 23: Mc Cafe.....	48
Tabelle 24: Starbuck's .....	48
Tabelle 25: Kaffeefertiggetränke .....	49
Tabelle 26: Anzahl der Kaffee je Kategorie .....	50
Tabelle 27: Methylxanthinkonzentrationen im Filterkaffee.....	53
Tabelle 28: Methylxanthinkonzentrationen im löslichen Kaffee.....	57

Tabelle 29: Kaffeefertiggetränke: analysierter Koffein im Vergleich mit Herstellerangabe .....	58
Tabelle 30: Kaffeevariationen: Konzentrationsbereich von Koffein .....	59







## 1. EINLEITUNG und FRAGESTELLUNG

Koffein ist eine bekannte Substanz und wird von vielen als „Aufputzmittel“ bezeichnet. Es gehört zur Gruppe der Methylxanthine und kommt in diversen Pflanzenarten vor. Neben Kaffee enthalten andere alltägliche Lebensmittel wie Tee, Colagetränke, Energydrinks sowie auch Schokolade Koffein.

Neben positiven Effekten wie stimulierende Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System und Nervensystem [Clarke und Macrae, 1988] und pharmakologische Wirkung [Eichler, 1976] besitzt Koffein auch negative Eigenschaften. Diesbezüglich ist vor allem zu erwähnen, dass das *US Center for Disease Control* unter anderem vor den Konsum von koffeinhaltigen alkoholischen Getränken warnt. Koffein kann nämlich in Kombination mit der enthemmenden Wirkung von Alkohol zu Alkoholexzessen führen [Revelle et al., 2012].

In einer Diplomarbeit aus dem Jahr 2010 wurde der Koffeingehalt von verschiedenen Getränken und einigen Lebensmitteln, die am österreichischen Markt erhältlich sind, analysiert. Die Werte stellten die Basis für die Expositionsabschätzung von Koffein innerhalb der österreichischen Bevölkerung dar, da kaum umfassende Daten zu den Koffeingehalten in Getränken und Lebensmitteln existieren. Dabei stellte sich heraus, dass die Koffeinkonzentrationen in verschiedenen Kaffee- und Teeproben im Vergleich zueinander große Schwankungen aufwiesen. Für die große Spannweite werden folgende Gründe angenommen: das große Angebot an unterschiedlichen Produkten, die Vielzahl von Herstellern sowie auch die Vielfalt der Zubereitungsmethoden [Rudolph et al., 2012].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden im Rahmen dieser Masterarbeit diverse Kaffeeprodukte aus dem österreichischen Markt und aus drei ausgewählten Coffeeshops gekauft und der Koffeingehalt bestimmt. Neben Koffein wurde auch der Gehalt seiner Hauptmetaboliten Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin analysiert,

da es bis dato wenige Studien über die Konzentrationen der Abbauprodukte von Koffein in Lebensmitteln, v.a. in Kaffee, gibt.

Die einzelnen Methylxanthine wurden mittels Doppelbestimmungen der Kaffeeproben in mehreren Arbeitsschritten aufgearbeitet und anschließend quantifiziert. Zu diesen Aufarbeitungsschritten zählen das Zentrifugieren, die Festphasenextraktion, die Aufkonzentrierung, sowie bei Bedarf die Proteinfällung. Abschließend erfolgt die Analyse mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und einem UV-Detektor.

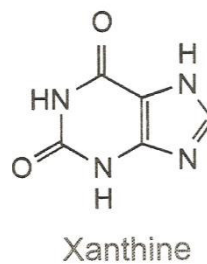


## 2. LITERATURÜBERSICHT

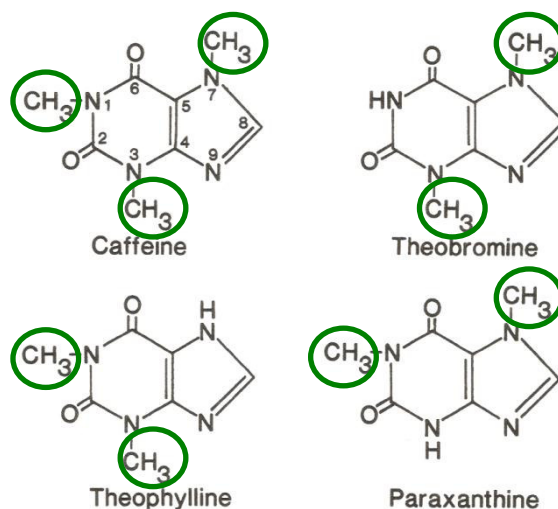
### 2.1 Methylxanthine

Die Methylxanthine gehören zur Gruppe der Purinalkaloide. Die Grundstruktur des Xanthins kommt in zahlreichen pflanzlichen Spezies vor; zu diesen zählen Rübensaft, Gerstenkeimlinge, Erdnusskerne, Kaffeebohnen und Teeblätter.

Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin sind N-Methylderivate des Xanthins. Diese vier Methylxanthine unterscheiden sich, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, durch die Anzahl und die Stellung der Methylgruppen(CH<sub>3</sub>) [Hänsel und Sticher, 2010].



**Abb.1: Xanthin** [modifiziert nach Ashihara und Crozier, 2001]



**Abb.2: Methylxanthine: Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin**

[Lelo et al., 1986]

### 2.1.1 Koffein

Koffein wurde erstmals aus der Kaffeebohne als reine Komponente im Jahr 1819 von Friedlieb Ferdinand Runge isoliert [Walduogel, 2003]. Der Biosynthese- und Abbauweg von Koffein war hingegen bis zum Jahr 2000 noch nicht vollständig erforscht [Ashihara et al., 2008].

Koffein ist aufgrund seiner pharmakologischen Wirkung der am längsten bekannte Inhaltsstoff von Kaffee. Koffein ist ein farb- und geruchloses, leicht bitter schmeckendes Pulver. Seine chemische Bezeichnung lautet 1,3,7 - Trimethylxanthin; Koffein wird der Gruppe der Purine zugeordnet, aus der das Koffein über den Biosyntheseweg in der Kaffeepflanze gebildet wird. Der Koffeingehalt weist Schwankungen zwischen 0,8% und 2,5% in den einzelnen Kaffeeprovenienzen auf. Provenienzen steht für die Herkunft des Rohkaffees, d.h. die Bezeichnung des Kaffees erfolgt nach dem jeweiligen Erzeugerland oder nach dem nächstgelegenen Verschiffungshafen. Zu den weiteren koffeinhaltigen Lebensmitteln zählen Tee, Guarana, Mate und Kolanüsse [Eichler 1976].

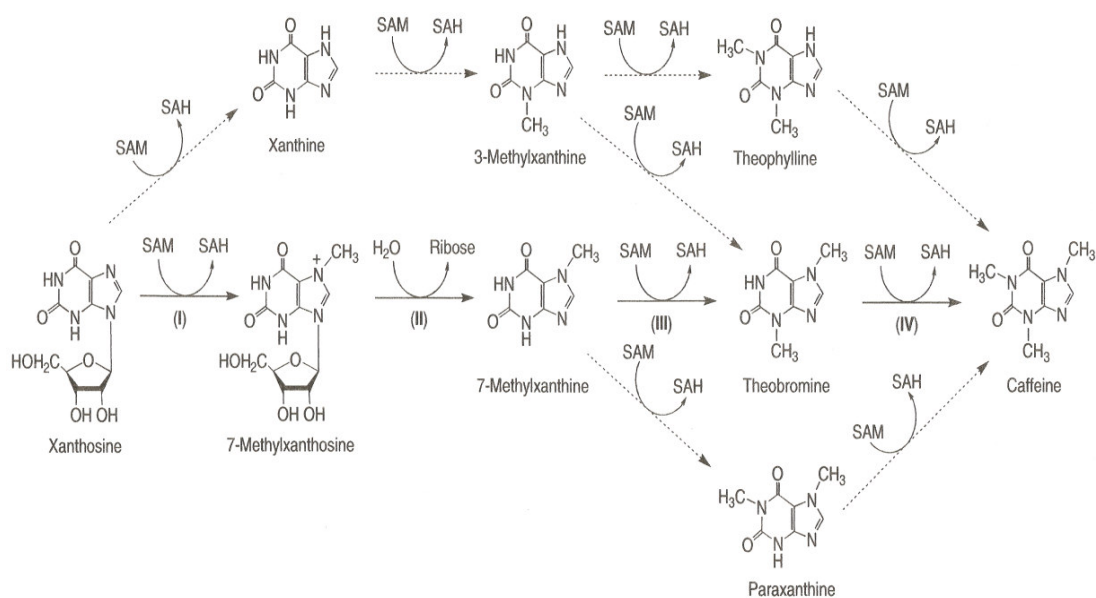
#### 2.1.1.1 Synthese

Die Biosynthese von Koffein wurde intensiv analysiert. Man fand heraus, dass Koffein von Adeninnukleotiden, die durch mehrere Schritte von mehreren Enzymen katalysiert wurden, synthetisiert wird. Die letzten Reaktionsschritte beinhalten die Methylierung von Xanthosin durch N-Methyltransferase, bei der das 7-Methylxanthosin, dessen Riboserest, durch 7-Methylxanthosin-Nukleosidase entfernt wird. Das daraus resultierende 7-Methylxanthin wird an der 3-N-Stellung durch N-N-Methyltransferase methyliert. Daraus entsteht 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin), das wiederum an der 1-N-Stellung methyliert wird und somit das Endprodukt 1,3,7- Trimethylxanthin (Koffein) gebildet wird [Abb. 3]. Bei allen Reaktionsabfolgen wird S-adenosyl-L-Methionin (AdoMet) als Methyl-Donor benötigt [Ogawa et al. 2001].

Zusammenfassend ergibt sich folgender Hauptreaktionsablauf, der über Theobromin erfolgt und bei Tee- und Kaffeepflanzen vorkommt [Ashihara et al., 2011]:

**Xanthosine -> 7-methylxanthosin -> 7-Methylxanthin -> Theobromin -> Koffein**

Neben dem Hauptkoffeinbiosyntheseweg gibt es auch weitere Reaktionsabläufe, die vor allem von den breiten Spezifitäten der N-Methyltransferasen abhängig sind, insbesondere die Koffein-Synthese. So wird beispielsweise 3-Methylxanthin durch Xanthin und Paraxanthin durch 7-Methylxanthin synthetisiert. 3-Methylxanthin wird zu weiteren Xanthinen abgebaut. Paraxanthin wird unmittelbar in Koffein umgewandelt. Paraxanthin ist das aktivste Substrat der Koffein-Synthese, aber nur begrenzte Mengen an Paraxanthin reichern sich im Pflanzengewebe an, da die N1-Methylierung von 7-Methylxanthin sehr langsam von statten geht [Ashihara et al., 2008]. In Abbildung 3 werden die Reaktionsabläufe der Koffeinsynthese dargestellt.



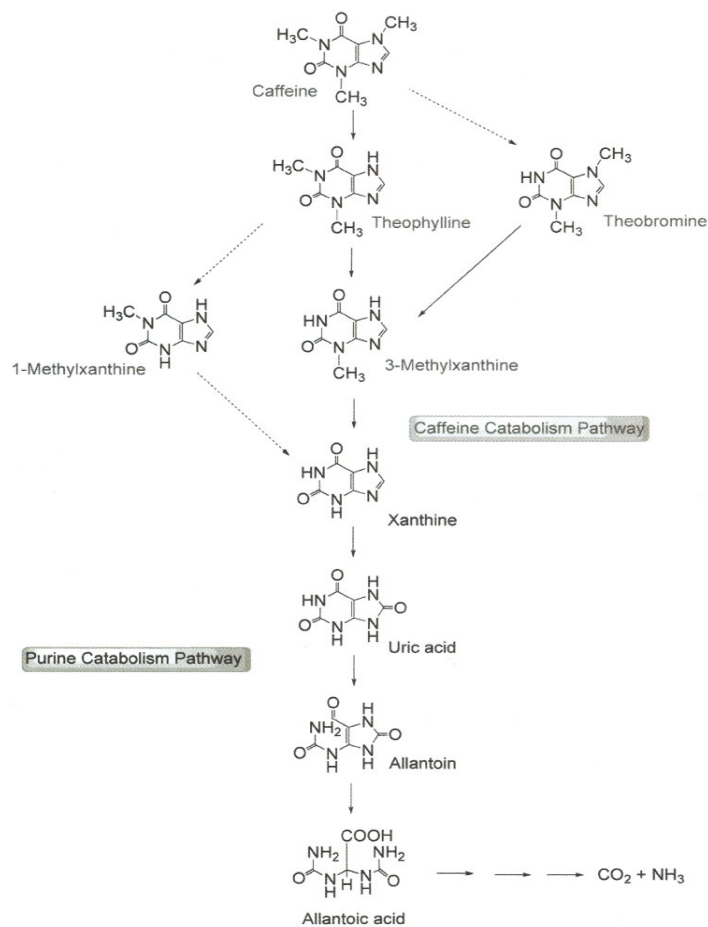
**Abb. 3: Koffeinsynthese** [Ashihara et al., 2008]

### 2.1.1.2 Abbau

Der Abbau von Koffein in Kaffeepflanzen und -blättern wurde erstmals 1965 von Kalberer analysiert. Seitdem folgten einige Experimente mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Purinalkaloiden, wobei sich zeigte, dass der Hauptabbauweg von Koffein folgenden Ablauf hat [Ashihara et al., 1996; Vitoria und Mazzafera, 1998]:

**Koffein -> Theophyllin -> 3-Methylxanthin -> Xanthin** [Ashihara et al. 2008]

Koffein wird hauptsächlich zu Xanthin über Theophyllin und 3-Methylxanthin katabolisiert. Xanthin wird durch den herkömmlichen oxidativen Purinabbauweg zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  abgebaut [Abb. 4] [Ashihara, et. al 2008].



**Abb.4: Koffeinabbau** [Ashihara, et. al 2008]

### **2.1.2 Theobromin**

Theobromin, das 3,7-Dimethylxanthin, gehört zu dem primär metabolischen Produkt von Koffein [Lelo et al., 1986]. Es ist das dominierende Purinalkaloid in den Samen der Kakaopflanze [Ashihara et al., 2008].

Spuren von Theobromin in Rohkaffee konnten erstmals von Franzke et. al (1976,1968) sowie Lehmann und Martinod (1965) nachgewiesen werden [Eichler, 1976].

### **2.1.3 Theophyllin**

Theophyllin, das 1,3 Dimethylxanthin, weist einige Gemeinsamkeiten mit Theobromin auf. Es gehört wie Theobromin zu den primär metabolischen Produkten von Koffein [Lelo et al., 1986] und wurde auch in Rohkaffee erstmals von Franzke et. al (1976,1968) sowie Lehmann und Martinod (1965) nachgewiesen [Eichler, 1976].

### **2.1.4 Paraxanthin**

Paraxanthin, das 1,7 Dimethylxanthin, ist ein isomerisches Dimethylxanthin [Lelo et al., 1986]. Dieses Methylxanthin ist der aktivste Hauptmetabolit von Koffein und ist in keinem Lebensmittel als Inhaltsstoff zu finden [Aresta et. al, 2005].

## **2.2 Kaffee – Eine Bohne geht um die Welt**

Kaffee zählt neben Tee, Kakao und Alkohol zu den Genussmitteln. Man spricht von Kaffee, wenn die von der Fruchtschale vollständig und von der Samenschale nach Möglichkeit befreiten, rohen oder gerösteten Kaffeebohnen, ganzen oder zerkleinerten Samen von Pflanzen der Gattung Coffea abstammen, wie auch das daraus zubereitete Getränk [Belitz et al., 2001].

### **2.2.1 Die Kaffeefrucht**

Die Kaffeefrucht, auch als Beere oder Kirsche bezeichnet, besteht aus einer glatten, harten Oberhaut. Unreife Früchte sind meist grün; reife hingegen sind rot bis violett. Unter der Oberhaut befindet sich das süße Fruchtfleisch, das zwei aneinander liegende Steinkerne enthält. Diese sind von einem gelblichen und durchscheinenden Silberhäutchen (Samenhaut) umhüllt, das von einer Pergamenthaut bedeckt ist [Belitz, 2001].

### **2.2.2 Geschichte des Kaffees**

Die Heimat des Kaffees liegt im Hochland Äthiopiens. Von dort breitete sich der Kaffee über Arabien und Konstantinopel nach Venedig aus. Seit Mitte des 17. Jahrhunderts ist er in Europa angesiedelt [Belitz, 2001].

### 2.2.3 Der Kaffeemarkt: Arabica, Robusta und Co

Die Anbauflächen von Kaffee verteilen sich auf ungefähr 60 tropische und subtropische Länder. Für einige ist der Kaffee das Hauptexportprodukt [Lashermes et al., 2008; Viera, 2008]. In Tabelle 1 sind die weltweiten Kaffeexporte der Ursprungsländer dargestellt. Brasilien und Vietnam nehmen zusammen die Hälfte aller Kaffeexporte ein. Andere Länder exportieren weitaus weniger im Vergleich zu den zwei Hauptexporteuren [Deutscher Kaffeeverband].

**Tab.1: Weltweite Rohkaffeexporte nach Ursprungsländern**

Kaffeejahr*	2010/11	2011/12	2012/13
Export Gesamt	95,1	96,1	100,7
Brasilien	31,1	25,5	27,8
Vietnam	16,8	21,6	19,9
Indonesien	4,4	5,3	9,2
Kolumbien	7,4	6,7	8,2
Honduras	3,9	5,5	4,3
Peru	4,2	4,7	3,9
Guatemala	3,7	3,7	3,7
Uganda	3,1	2,7	3,6
Indien	4,2	3,8	3,5
Äthiopien	3,0	2,8	3,2
Andere Länder	13,3	13,8	12,7

\*Oktober bis September; [in Millionen Sack Rohkaffee à 60 kg]

[Quelle: ICO (International Coffee Organization)]

Des Weiteren gewinnt der ökologische Kaffeeanbau immer mehr an Bedeutung. Von 2011 bis 2013 waren die stärksten Biokaffeexportländer Mexiko, Honduras und Äthiopien. Im Jahr 2013 stieg der Export bei Mexiko stark an verglichen mit 2011 und 2012. Bei den anderen zwei Hauptexportländern gab es einen Rückgang [Deutscher Kaffeeverband].

**Tab. 2: Export von Kaffee\* aus ökologischem Anbau [in Sack à 60 kg]**

Jahr	2011	2012	2013
Mexiko	132925	108319	264780
Honduras	276505	303206	256043
Indonesien	620	144568	133459
Äthiopien	139450	158252	129528
Kolumbien	78723	85659	88833
Brasilien	20693	27093	78218
Andere Länder	178213	205410	177152
Gesamt	827129	1032507	1128013

\* Kaffee in allen Verarbeitungsformen umgerechnet in Rohkaffeeäquivalente  
[Quelle: ICO]

Der wirtschaftliche bedeutendste Faktor der Kaffeeproduktion ist das aus den gerösteten und gemahlten Kaffeebohnen hergestellte Getränk [Esquivel und Jimenez, 2012]. Die Kaffeeproduktion erbringt jedes Jahr einen Wert von über 90 000 Millionen US-Dollar [Ramalho et al., 2013]. In der Abbildung 5 ist der Exporterlös von 1988-2013 ersichtlich, wobei jedoch der Erlös von Jahr zu Jahr schwankt. In den Kaffeejahren 1988/89 bis 1993/94 und von 1998/99 bis 2004/05 lag der Erlös bei <10 Milliarden US-Dollar. Die Jahre 2010/11 und 2011/12 waren bis jetzt die Rekordjahre mit einem Umsatz von 23,2 bzw. 23,5 Mrd. US-Dollar [Deutscher Kaffeeverband].



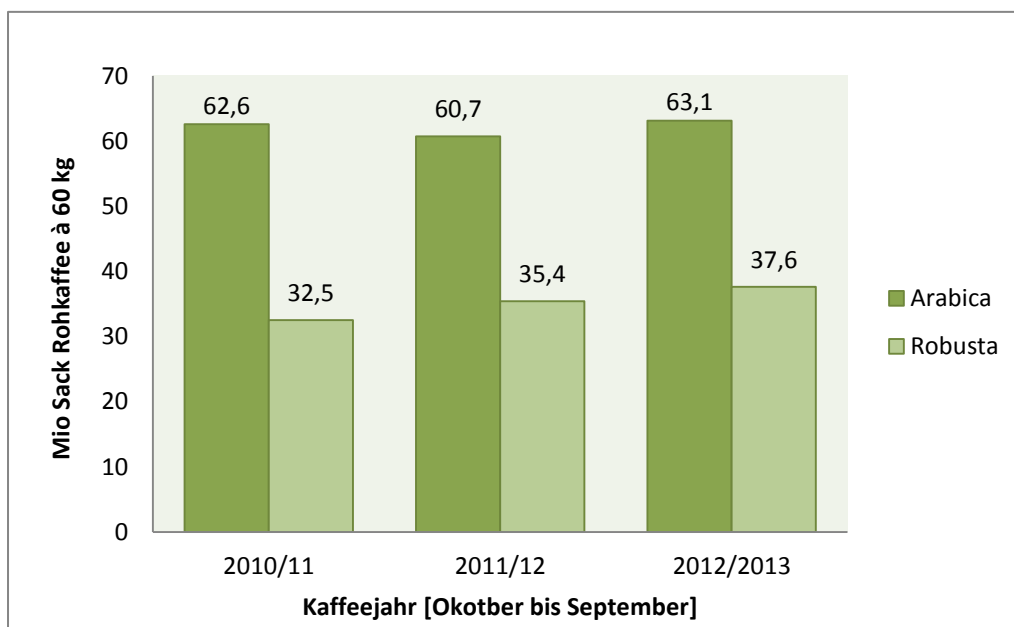
**Abb. 5: Kaffeeexporterlöse 1988-2013**

[Quelle: ICO]



Von den über 90 verschiedenen Arten der Coffea-Pflanze sind die bekanntesten Coffea Arabica, Coffea Canephora (Robusta) und Coffea Liberica [Belitz, 2011]. Der am meisten konsumierte Kaffee weltweit wird aus den Spezien Coffea arabica und Coffea canephora produziert. Der Arabica hat aufgrund seiner sensorischen Eigenschaften einen höheren Vermarktungswert und erreicht auch deshalb einen höheren internationalen Marktpreis [Esquivel und Jimenez, 2012]. Der prozentuelle Anteil des Kaffeemarktes teilt sich wie folgt auf: 75% Arabica und 25% Robusta [Belitz, 2001].

In der folgenden Abbildung ist die Exportverteilung – Arabica und Robusta – der letzten drei Kaffeejahre dargestellt [Deutscher Kaffeeverband].



**Abb.6: Weltweite Rohkaffeeexporte – Arabica und Robusta** [Quelle: ICO]

Europa zählt zum größten Kaffeimporteure, rund 66% des weltweiten Importmarktes; in Tonnen ausgedrückt waren dies 4 Millionen Tonnen im Jahr 2008. An zweiter Stelle liegt die USA mit 1,5 Millionen Tonnen und an dritter Stelle Japan mit rund 420 000 Tonnen. Robusta-Kaffee ist der dominierende in den Staaten Belgien, Luxemburg, Frankreich, Portugal und im Vereinigten Königreich [UK], während in den skandinavischen Ländern, in Österreich, Deutschland, Italien, Spanien und der Schweiz der Arabica auf dem Markt zu finden ist [Pay, 2009].

In Tabelle 3 ist der Kaffeeconsum pro Kopf von ausgewählten Ländern von den Jahren 2011 und 2012 dargestellt [Deutscher Kaffeeverband].

**Tab.3: Pro Kopf Verbrauch in ausgewählten Ländern**

Länder	2011 [in kg Rohkaffee]	2012 [in kg Rohkaffee]
EU-Durchschnitt	4,82	4,84
Österreich	7,95	9,00
Deutschland*	7,16	7,27
Finnland	12,17	12,00
Norwegen	9,54	8,70
Schweden	7,14	7,31
Dänemark	8,20	8,5
Italien	5,62	5,63
Slowakei	4,28	2,21
Niederlande	3,27	4,96
Türkei	0,52	0,55
USA	4,20	4,20

[Quelle: ICO]

\*Berechnung Deutscher Kaffeeverband, rückwirkend korrigiert

Österreich liegt über dem EU-Durchschnitt, jedoch wurde der Wert, der von ICO im Jahr 2012 ermittelt wurde, laut Statistik von den Marktteilnehmern nicht bestätigt. In Finnland ist der Kaffeeconsum pro Kopf mit Abstand am höchsten, gefolgt von den anderen skandinavischen Ländern und von Deutschland [Deutscher Kaffeeverband].

#### **2.2.4 Ernte und Verarbeitung**

Der Kaffee wird gewöhnlich einmal im Jahr geerntet. Die Haupterntezeit dauert etwa sechs bis acht Wochen. Nach der Ernte müssen die Kaffeekirschen möglichst rasch weiterverarbeitet werden, da sie nur kurz gelagert werden können. Bis der Kaffee marktfähig ist, müssen die geernteten Kaffeekirschen mehrere Produktionsschritte durchlaufen, d.h. es muss die ganze Umhüllung jeder einzelnen Kaffeebohne entfernt werden, um das gewünschte Produkt zu erzielen. Dabei kommt es zu wesentlichen

charakteristischen sensorischen Veränderungen der ursprünglich geernteten Kaffeekirschen. Zuerst werden die rohen Kaffeebohnen mittels trockenem oder nassem Verfahren aufbereitet. Bei diesen zwei Aufbereitungsverfahren werden Fruchthaut, Fruchtfleisch und -schleim, Pergamenthaut und möglichst auch Silberhäutchen und der größte Teil des Wassers in der Bohne entfernt, so dass am Schluss die saubere und trockene Kaffeebohne übrig bleibt [Belitz, 2001]. Als nächstes ist die Röstung ein wesentlicher Arbeitsschritt.

#### **2.2.4.1 Die Veredelung – Der Röstprozess**

Beim Röstprozess erhält der Kaffee erst sein unverwechselbares Aroma und seinen Geschmack. Die Kaffeebohnen durchlaufen während des Röstprozesses vier Hauptphasen: Trocknung, Entwicklung, Zersetzung und Vollröstung. Bei der Röstung kommt es zu einer Veränderung der Inhaltsstoffe; einerseits verringert sich der Gehalt von einigen, andererseits treten neue Inhaltsstoffe auf [Belitz, 2001]. Es wurde auch wissenschaftlich bewiesen, dass der natürliche Gehalt an phenolischen Antioxidantien in der rohen Kaffeebohne nach dem Rösten verloren geht [Delgado-Andrade und Morales, 2005; Steinhart et al., 2005]. Diese Verminderung ist mit dem Abbau der Chlorogensäure assoziiert, welche die antioxidative Kapazität des gerösteten Kaffees beeinflusst. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass der Gehalt an Antioxidantien und die Effizienz des Röstkaffee durch die Bildung von Verbindungen mit Antioxidationsaktivität, wie Maillard-Produkte, auch erhalten wird oder sogar verbessert wird [Nicoli et al., 1997; Del Castillo et al., 2005].

Dauer und Temperatur des Röstvorganges bringen bei jeder Kaffeesorste ihre individuelle Note hervor und beeinflussen damit den Geschmack von Kaffee erheblich [Eichler 19769]. Dabei spielt die Kombination von zahlreichen chemischen Komponenten, welche durch die chemischen und physikalischen Veränderungen beim Rösten entstanden sind, eine wichtige Rolle. Bei der Röstung bei ungefähr 180-200°C kommt es zu einer wesentlichen Veränderung der chemischen Zusammensetzung und

der biologischen Aktivitäten von Kaffee. Als Resultat entstehen Verbindungen der Maillard Reaktion [Czerny et al., 1999] und organische Verbindungen der Pyrolyse [Daglia et al., 2000].

Heller geröstete Kaffeebohnen, die in den USA und Mitteleuropa ihre Vorliebe haben, weisen einen milderen Geschmack im Vergleich zu dunkel gerösteten auf. Dunkler geröstete Bohnen, die sich vor allem für Espresso eignen und sich vorwiegend in Südeuropa vorfinden, beinhalten mehr Bitterstoffe [Belitz, 2001; Eichler, 1976].

Unter Gewichtsverlust der Rohkaffeebohnen während des Röstens, der sogenannte "Einbrand", versteht man den Wasserverlust und den chemischen Röstverlust.

Nach dem Röstprozess wird das Röstgut mit Luft gekühlt, um Nachrösten, Verbrennen und Aromaverlust zu vermeiden. Es kann aber auch Wasser zur Vorkühlung eingesetzt werden, wodurch der Röstprozess schlagartig beendet wird. Ein handelsüblicher Röstkaffee ist aus 4-8 Provenzen zusammengesetzt. [Belitz, 2001; Eichler, 1976]. Die Verpackung soll so beschaffen sein, dass der Kaffee geschmacklich, biologisch und physiologisch einwandfrei bleibt. Wichtig ist dabei die luftdichte Komponente, da die Aromaöle des Röstkaffees auf Sauerstoff reagieren und ranzig werden. Die Verpackung schützt die Bohnen zudem vor Feuchtigkeit, Gerüchen, Wärme und Licht, die neben Sauerstoff, die natürlichen Feinde des Kaffeearomas sind [Belitz, 2001].

### **2.2.5 Inhaltstoffe**

Alle Inhaltsstoffe der Kaffeebohne konnte man bis heute noch nicht erforschen, da sie äußerst komplex zusammengesetzt ist und je nach Sorte und Röstung erheblich variieren können. Der bekannteste Inhaltsstoff, der allen ein Begriff ist, ist das Koffein. Zu den weiteren wichtigsten Komponenten zählen noch Kohlenhydrate, Wasser, Eiweißstoffe, Säuren, Alkaloide, Mineral- und Aromastoffe. Den größten Anteil nehmen die Kohlenhydrate ein. Diese werden beim Rösten aber zu anderen

Verbindungen umgewandelt oder ganz abgebaut. Fette und Öle tragen wichtige Stoffe, die wesentlich für das Aroma sind [Belitz, 2001; Eichler, 1976].

### **2.2.6 Zubereitungsmethoden**

Heutzutage gibt es eine reiche Auswahl an verschiedenen Zubereitungsmethoden von Kaffee. Die Filterkaffeemaschine und die Espressokanne zählen zu den alt bewährten haushaltsüblichen Methoden, wobei der Trend jedoch in eine andere Richtung geht. Immer mehr Konsumenten haben ihre Liebe zu Pad- und Kapselsystemen entdeckt. Dabei spielt der Markt eine wesentliche Rolle; denn dieser bietet ein vielseitiges Sortiment an. Hinter diesen Systemen verstecken sich sowohl Vorteile als auch Nachteile. Vorteile sind vor allem die schnelle und einfache Handhabung, und aus der vielfältigen Auswahl an diversen Kaffeearten findet jeder Kaffeeliebhaber den passenden. Die Nachteile liegen im hohen Kaffeepreis pro Kilogramm und die Anhäufung von nicht biologisch abbaubarem Müll; zum Letzteren haben die Hersteller schon an Kampagnen für Recyclingsysteme gearbeitet. Diese Systeme sind jedoch noch nicht weit verbreitet.

Zwei weitere, bekannte Kaffeemaschinen sind die Siebträgermaschine und der Vollautomat. Der Unterschied dieser beiden Maschinen liegt in der Zubereitung. Der Vollautomat ist eine Kaffeemaschine, der ein Komplettangebot mit sich bringt, d.h. der Kaffee wird mit dem eingebauten Mahlwerk gemahlen und rinnt dann per Knopfdruck in die Tasse, wobei man noch die gewünschte Tassengröße wählen kann. Die Siebträgermaschinen benötigen ein externes Mahlwerk und einen Tamper [Wechselberger und Hierl, 2014].

Vollautomaten sind zu meist in Haushalten zu finden, während Siebträger eher in der Gastronomie ihren Einsatz haben.

## 2.2.7 Eine Vielfalt an Kaffeevariationen

Auf dem österreichischen Markt und in Coffeeshops oder Kaffeehäusern steht eine Vielzahl an Kaffeevariationen zur Auswahl. Von Espresso angefangen, über Cappuccino, Latte Macchiato, Caffè Latte, Kaffee mit diversen Flavours und Co ist für jeden was dabei.

Bei dieser Masterarbeit wurden folgende Kaffeevariationen ausgewählt:

- **Espresso:** sehr starker Kaffee ohne Milch und Zucker
- **Cappuccino:** je ein Drittel Espresso, heiße Milch und Milchschaum
- **Latte Macchiato:** "gefleckte Milch" - aufgeschäumte warme Milch mit einem Shot Espresso
- **Caffè Latte:** Milchkaffee, je zur Hälfte heiße Milch und Espresso
- **Vanilla Latte:** entspricht dem Caffè Latte mit einem Schuss Vanillesirup als Geschmack
- **Caramel Macchiato:** entspricht dem Latte Macchiato mit einem Karamellsirup als Geschmack

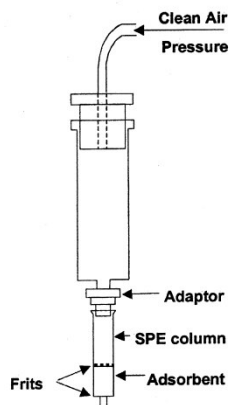
## 2.3 Analysemethoden

### 2.3.1 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion, auch SPE (engl., solid phase extraction) genannt, ist weit verbreitet und stellt eine sehr beliebte Technik für eine schnelle und selektive Probenaufbereitung dar. Die Vielseitigkeit der SPE erlaubt die Anwendung dieser Technik für viele Zwecke, wie beispielsweise Aufreinigung, Spurenanreicherung, Entsalzen, Derivatisierung und Klassenfraktionierung.

Das Prinzip der SPE ist ähnlich der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), bei der eine Aufteilung der gelösten Stoffe zwischen zwei Phasen erfolgt. Aber anstelle von zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen, wie in LLE, umfasst die SPE das Partitionieren zwischen einer flüssigen (Probenmatrix oder Lösungsmittel mit Analyten) und einer festen (Sorbens) Phase. Diese Analysetechnik ermöglicht die Konzentration und Reinigung von Analyten aus der Lösung durch Sorption, basierend auf einem festen Sorbens und Reinigung des Extrakts nach der Extraktion.

In der modernen SPE wird das Adsorbens zwischen zwei Frittenplatten in einer Polypropylen-Kassette verpackt und flüssige Phasen werden durch die Kartusche entweder durch Absaugen oder durch Überdruck (Schwerkraft, Gasdruck aus einer Spritze oder durch Zentrifugation) geleitet [Huck und Bonn, 2000].



**Abb.7: Moderne SPE** [Huck and Bonn, 2000]

Zusammengefasst wird die feste Phase der SPE-Säule aktiviert, danach werden unerwünschte Komponenten eliminiert. Abschließend werden die gewünschten Analyten in ein Proberöhrchen eluiert und gesammelt.

Festphasenextraktionsverfahren werden nicht nur benutzt, um Spuren von organischen Verbindungen aus Umweltproben zu extrahieren, sondern auch um störende Komponenten der komplexen Matrix zu entfernen [Huck and Bonn, 2000]. Man erhält dadurch einen gereinigten Analyten, der für weitere Analyseschritte bedeutend ist.

Es gibt vier allgemeine Theorien zum Mechanismus eines SPE-Vorgangs [Zwir-Ferenc und Biziuk, 2006; Kicinski, 1996]:

**Tab.4: Trennmechanismen der Festphasenextraktion**

<b>Trennmechanismen</b>	<b>Probenart</b>
1. Normalphase	Leicht bis Mittelpolar
2. Normalphase (Polar gebundene Phase)	Mittel bis Starkpolar
3. Umkehrphase (Unpolar gebundene Phase)	Unpolar
4. Ionenaustausch Anion Kation	Ionische Säure Ionische Base

Die Anwendbarkeit der SPE wird hauptsächlich durch das ausgewählte Sorbens, das die Säule beinhaltet, bestimmt. Derzeit gibt es eine Vielzahl von Sorbentien; die am häufigsten verwendeten Gruppen von Sorptionsmitteln sind:

- chemisch modifiziertes Silicagel
- polymeres Sorptionsmittel
- graphitierter oder poröser Kohlenstoff

Bei allen Sorptionsmitteln handelt es sich um dreidimensionale polymere Materialien [Zwir-Ferenc und Biziuk, 2006].



In der folgenden Abbildung sind die einzelnen Schritte einer Festphasenextraktion ersichtlich und werden folgend kurz erklärt.

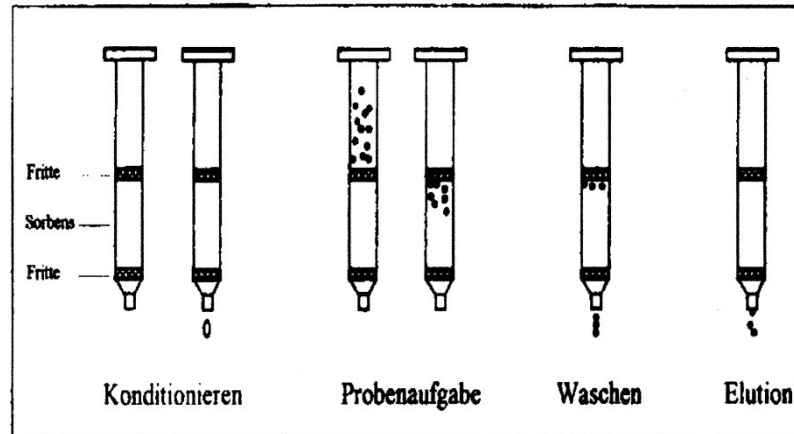


Abb.8: Ablauf der Festphasenextraktion [Kicinski, 1996]

Bevor man mit der SPE jedoch beginnen kann, muss man die Probe je nach Beschaffenheit entgasen, zentrifugieren, filtrieren bzw. verdünnen.

Das SPE-Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

- 1. Konditionierung:** Aktivierung des Sorptionsmittels durch ein geeignetes Lösungsmittel (Methanol)
- 2. Equilibrierung:** Entfernung des Aktivierungsmittels (mittels HPLC-Wasser)
- 3. Probenaufgabe:** Probe wird in die Säule überführt, dabei werden die Analyten durch das Sorbens zurückgehalten.
- 4. Waschen:** Entfernung von störenden Verbindungen (mittels HPLC-Wasser).
- 5. Elution der Analyten**

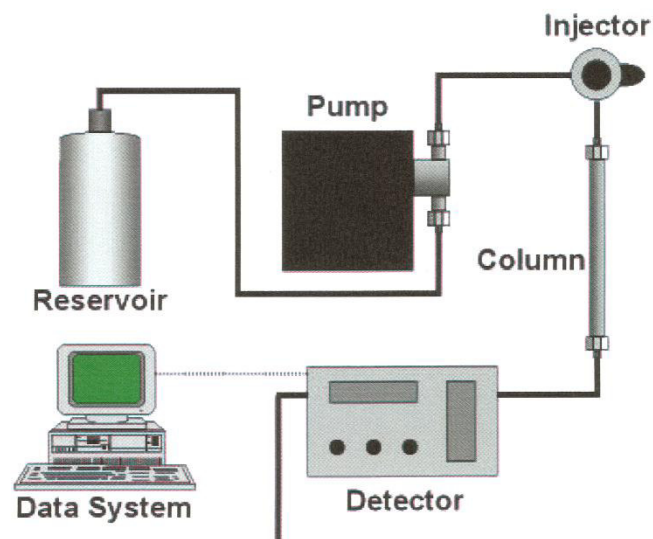
[Huck und Bonn, 2000]

### 2.3.2 Hochleistungschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gehört neben der klassischen (Niederdruck) Flüssigkeitschromatographie zur Säulenchromatographie.

Bei der Flüssigkeitschromatographie dient als mobile Phase eine Flüssigkeit und bei der stationären Phase werden Feststoffe oder Flüssigkeiten eingesetzt [Matissek et. al. 2010].

Ein HPLC-Gerät besteht allgemein aus vier Hauptteilen: Pumpe, Injektor, Trennsäule und Detektor mit Auswertesystem. In Abbildung 7 ist der schematische Aufbau einer HPLC-Anlage dargestellt und im Folgenden wird kurz erläutert, welche Aufgaben die einzelnen Bestandteile haben.



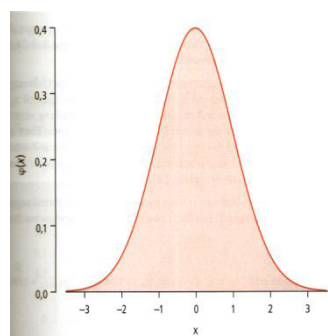
**Abb.9: Schematische Darstellung einer HPLC [Menche, 2005]**

Im sogenannten Reservoir befindet sich das Elutionsmittel. Häufig wird in der RP-HPLC das Prinzip der Gradientenelution angewendet. Der Begriff Gradientenelution beschreibt eine spezielle Methode, bei der das Volumenverhältnis der beiden Lösungsmittel während der Trennung kontinuierlich geändert wird. Durch diesen Vorgang findet eine verbesserte Trennung von Komponenten statt, deren Retentionszeiten voneinander abweichen. Durch den Einsatz der Pumpe entsteht ein

hoher Druck. Dadurch wird die Anwendung von stationären Phasen von Partikeln mit kleinerem Durchmesser möglich gemacht und eine verbesserte Trennung der Substanz erreicht wird. Der Injektor ist dazu bestimmt die Substanz auf die Säule aufzutragen. Je nach Säulenart, die verwendet wird, kann es sich um Verteilungs-, Ionenaustausch- oder Adsorptionschromatographie handeln [Menche, 2005]. Zur Detektion werden UV/VIS- Fluoreszenz-Spektrometer, RI-, amperometrische und Leitfähigkeits-Detektoren angewendet. Wenn man einen entsprechenden Detektor, der die Eigenschaften des Eluats misst, auswählt, erhält man als Messergebnis eine Reihe von Peaks. Eine derartige Darstellung, die man als Chromatogramm bezeichnet, entsteht, indem man den Detektor am Ende der Säule ankoppelt und sein Signal in Abhängigkeit von der Zeit ausdrückt [Skoog und Leary, 1996].

### 2.3.2.1 Peaks eines Chromatogramms

Die Peaks in einem Chromatogramm (Abb.9) weisen eine Ähnlichkeit mit einer Normalverteilung oder Gaußverteilung auf (Abb.8) [Skoog und Leary, 1996].



**Abb.10: Normalverteilung** [Rudolf und Kuhlisch, 2008]

### 3.2.2.2 Kennzahlen eines Chromatogramms

Bei der Analyse mittels HPLC spielt die abschließende Auswertung des Chromatogramms eine wesentliche Rolle, um ein endgültiges Messergebnis zu erhalten.

Ein Chromatogramm enthält einige wichtige Kennzahlen, die folgend kurz beschrieben werden. Die Kenngrößen werden im Chromatogramm immer dort bestimmt, wo die höchste Probenkonzentration gemessen wird, also bei der Peakspitze [Skoog und Leary, 1996].

#### **Totzeit $t_m$**

Unter Totzeit versteht man die Zeit, die eine nicht-retardierte Komponente von der Probenaufgabe bis zum Erscheinen im Detektor braucht. In dieser Zeit verweilen alle Probeteilchen in der mobilen Phase [Kromidas und Kuss, 2008].

#### **Retentionszeit**

Unter der Retentionszeit versteht man die Zeit, die ein Stoff zu Elution aus der stationären Phase benötigt [Kunze, 2009]. Man unterteilt diese in Brutto- und Nettoretentionszeit [Kromidas und Kuss, 2008].

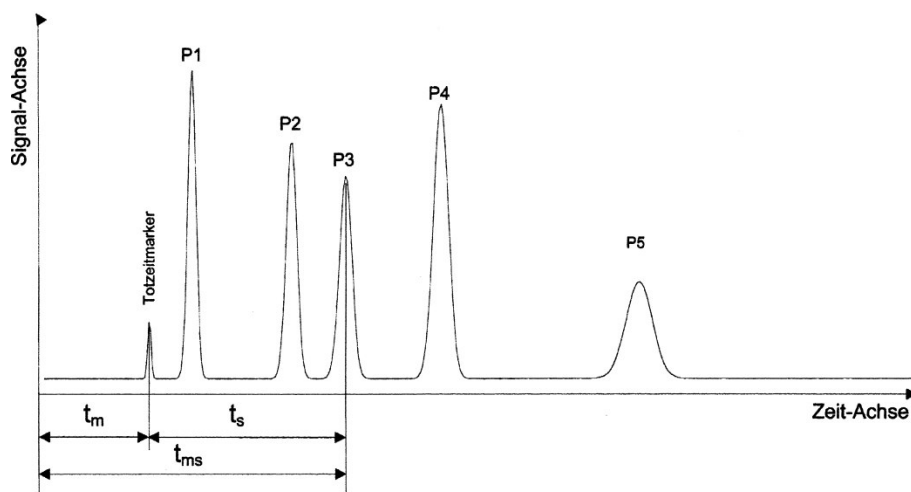
#### **Bruttoretentionszeit $t_{ms}$**

Unter Bruttoretentionszeit versteht man die Zeit, die von der Probenaufgabe bis zum Erreichen des Peakmaximums einer Komponente vergeht. Die Zusammensetzung der Bruttoretentionszeit ergibt sich aus den Zeiten, in der sich ein Probeteilchen in der

mobilen und in der stationären Phase aufgehalten hat. In Chromatogrammen findet man in der Regel die Angabe der einzelnen Peaks mit der Bruttoretentionszeit [Kromidas und Kuss, 2008].

### **Nettoretentionszeit $t_s$**

Die Nettoretentionszeit ergibt sich aus der Differenz aus Bruttoretentions- und Totzeit. Sie zeigt an, wie lange sich die Komponente in der stationären Phase aufhält [Kromidas und Kuss, 2008].



**Abb.11: Chromatogramm [Kromidas und Kuss, 2008]**

Ein Chromatogramm ist sowohl für die qualitative als auch für die quantitative Analyse von Bedeutung. Die Identifikation der Probenkomponenten wird anhand der Positionen der Peaks auf der Zeitachse ermittelt. Die Flächen unter den Peaks dienen als quantitatives Maß; sie stellen den Gehalt jeder gemessenen Substanz dar [Skoog und Leary, 1996].

### 2.3.2.2 Reversed-phase HPLC (RP-HPLC)

Die Reversed-phase HPLC ist neben der Normal-phase HPLC die zweite Methode, die in der Verteilungschromatographie angewendet wird. Diese Art von Chromatographie wird am häufigsten von den insgesamt vier chromatographischen Trennverfahren genutzt. Bei der Reversed-Phase HPLC verwendet man eine unpolare stationäre Phase (z.B. Kohlenwasserstoff) und eine polare mobile Phase (Acetonitril, Wasser, Methanol). Bei der Normalphasen HPLC hingegen ist die stationäre Phase polar und die mobile Phase unpolar. Je nach Typenwahl der HPLC wird zuerst die unpolare oder die polare Substanz eluiert.

In der Praxis wird größtenteils die Methode RP eingesetzt. Das Säulenmaterial besteht meistens aus Siloxane, in den R eine C<sub>8</sub>-(n-Octyl-) oder C<sub>18</sub>-(n-Octadecyl-) Kette ist [Skoog und Leary, 1996].

### **3. MATERIALIEN und METHODEN**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Chemikalien und Reagenzien**

- 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-( $\beta$ -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)

### 3.1.2 Geräte und Materialien

- 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)
- 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)
  
- 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



### **3.1.3 Software**

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

### **3.1.4 Kaffeeproben**

Die Kaffeeproben für diese Masterarbeit wurden im österreichischen Lebensmittelhandel und in drei bekannten Coffeeshops gekauft. Um einen Überblick zu bewahren und um Messergebnisse sinnvoll zu vergleichen, wurde vor dem Kauf eine Art Kategorienliste erstellt. Schlussendlich wurden die Kaffeeproben in 5 Kategorien, siehe folgende Auflistung, unterteilt, wobei die in Punkt 2.2.7 (siehe S.16) angeführten Kaffevariationen miteinbezogen wurden.

#### ***5 Kategorien:***

- Espresso
- Filterkaffee: Crema-Kaffee und Biokaffee (ganze Bohnen u. gemahlener)
- Kapseln & Pads
- Coffeeshops
- Kaffeefertiggetränke

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung des internen Standards

Die Verwendung des internen Standards in der quantitativen Chromatographie gewährleistet eine Qualitätssicherung bei der Messung. Es wird dabei die höchste Genauigkeit erzielt, da die Unsicherheiten, die mit der Probeninjektion verbunden sind, vermieden werden [Skoog und Leary, 1996].

Der verwendete interne Standard 7- $\beta$ -Hydroxyethyltheophyllin ist strukturverwandt mit dem Koffein. Der Unterschied liegt in einer OH-Gruppe und CH<sub>2</sub>-Gruppe.

Um eine Endkonzentration von 10 mg/l zu erhalten, wurden 100 mg eingewogen. Diese Menge wurde in einem 100ml Messkolben überführt und mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Zu jedem Mischstandard und zu jeder einzelnen Probe wurden jeweils 100  $\mu$ l interner Standard zugesetzt [Tab.6].

### 3.2.2 Herstellung des Mischstandards

Die Herstellung von Standardlösungen ist die einfachste Methode in der chromatographischen Analyse. Diese Standardlösung setzt sich aus den Substanzen zusammen, die in der unbekannt Probe analysiert werden sollen.

Der Mischstandard wurde aus wasserfreiem Coffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin hergestellt. Dabei wurde jeweils die entsprechende Menge der vier Standards abgewogen [Tab. 5]. Weiters wurden dann alle in einem 100 ml Messkolben überführt und mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Dabei stellte sich heraus, dass Theobromin schwer wasserlöslich ist. Aufgrund dessen wurde der Messkolben für 30 Minuten bei 60°C ins Ultraschallbad gestellt, damit sich das Theobromin auflöst.

Anhand dieser hergestellten Mischstandardlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit acht Standards erstellt. Diese ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tab.5 : Einwaage der Standards**

	Coffein	Theobromin	Theophyllin	Paraxanthin
Einwaage [mg]	100,3	50,9	49,9	45,1

**Tab. 6: Pipettierschema: Verdünnungsreihe aus Mischstocklösung**

Standard	Konzentration [mg/l]	Aus Stocklösung zu entnehmendes Volumen $V_1 = (c_2 \times V_2) / c_1$ [μl]	HPLC-H <sub>2</sub> O [μl]	Interner Standard [μl]
<b>1</b>	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
<b>2</b>	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
<b>3</b>	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
<b>4</b>	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
<b>5</b>	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
<b>6</b>	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
<b>7</b>	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
<b>8</b>	CF: 1,003 TB: 0,509 TP: 0,499 PX: 0,451	100 μl aus Standard 7 <sup>1</sup>	800	100

CF...Koffein, TB...Theobromin, TP...Theophyllin, PX...Paraxanthin

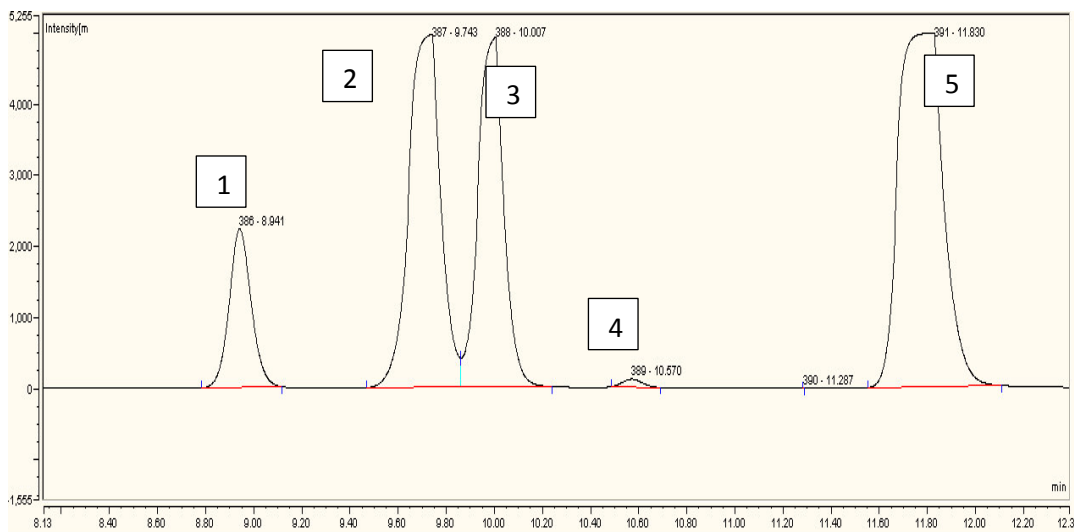
<sup>1</sup> Standard 8 wurde aus Standard 7 hergestellt: 10 μl Stocklösung + 990 μl HPLC; aus dieser Lösung wurden 100 μl (=Volumen der benötigten Stocklösung) entnommen

Die Mischstandards wurden sowohl mit als auch ohne Aufarbeitung über SPE gemessen. Dies ist bedeutend, um zu überprüfen, ob der Verlust nach der SPE sich im Rahmen hält.

Aus den hergestellten Konzentrationen und den gemessenen Peakflächen mittels HPLC erhält man mit diesen Werten eine Standardgerade. Mit Hilfe dieser Geradengleichung können die einzelnen entsprechenden Konzentrationen der Probe ermittelt werden.

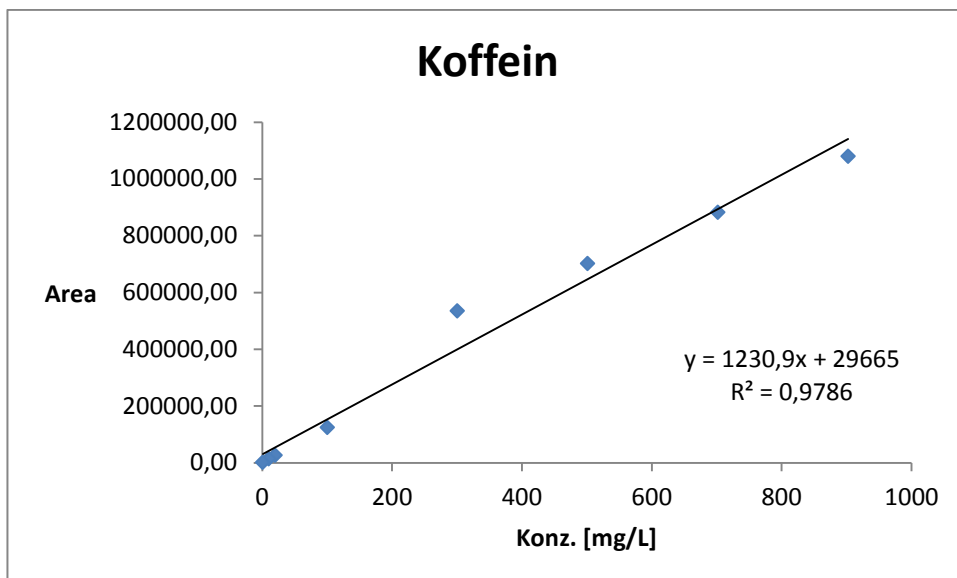
Um jedoch festzustellen zu welcher Zeit welches Methylxanthin detektiert wird, wurde vor der Messung des Mischstandards jeweils der Einzelstandard von Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin nach dem gleichen Schema hergestellt, aufbereitet und gemessen.

In der Abbildung 12 wird der Mischstandard 1 als Beispiel für ein Chromatogramm dargestellt. In den nachfolgenden Abbildungen sind die ausgewerteten Standardgeraden der einzelnen Standards zu sehen.

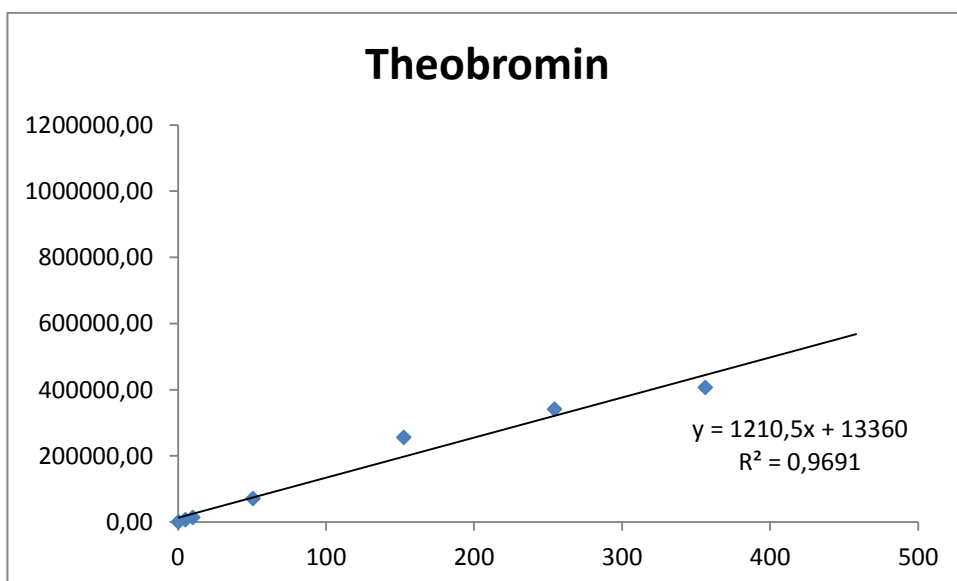


**Abb. 12: Chromatogramm des Mischstandards 1**

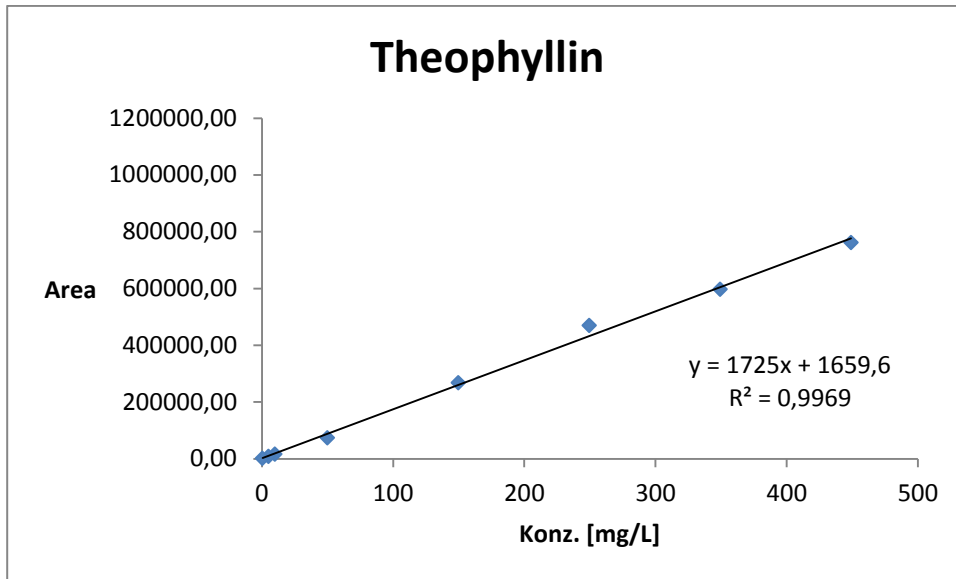
1= Theobromin, 2=Theophyllin, 3=Paraxanthin, 4=Interner Standard, 5= Koffein



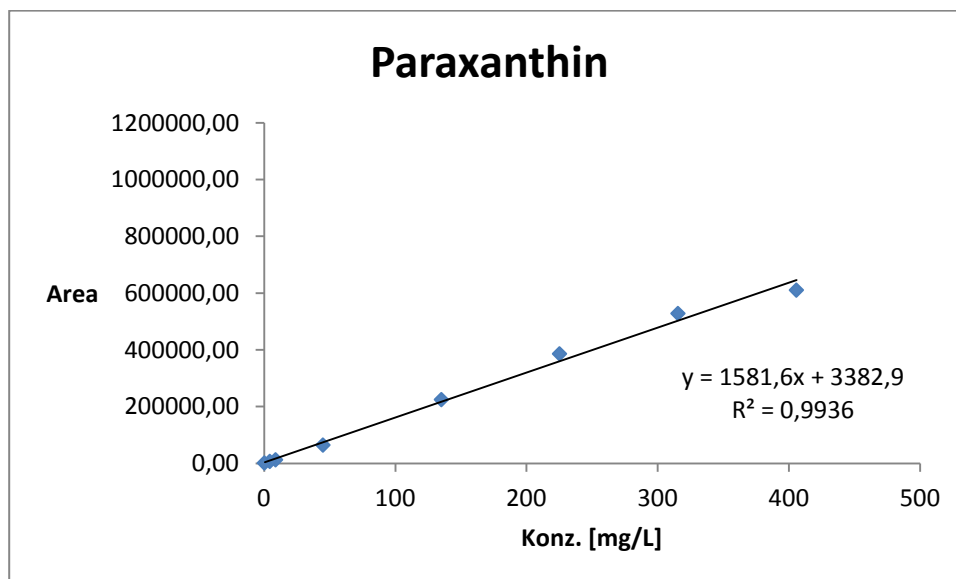
**Abb.13: Standardgerade Koffein**



**Abb.14: Standardgerade Theobromin**



**Abb.15: Standardgerade Theophyllin**



**Abb. 16: Standardgerade Paraxanthin**

### 3.2.2.1 Erneute Messung der Mischstandards

Aufgrund einer Störung beim HPLC-Gerät musste nach der Reparatur eine erneute Messung des Mischstandards erfolgen, da der Zeitraum zwischen erster Messung und wieder aufgenommenen Messung zu groß war. Entsprechend änderten sich die analysierten Werte, die Retentionszeiten und somit auch die Standardgeraden [Tab.7].

**Tab.7: Retentionszeiten und Standardgeraden (erneute Messung)**

Standard	Retentionszeiten	Standardgeraden
Theobromin	9,56-9,76	$y=1549,2x+9083$
Theophyllin	10,21-10,55	$y=2183,67x+1069,52$
Paraxanthin	10,46-10,84	$y=1971,47x+5433,36$
Interner Std.	10,99-11,37	-
Koffein	12,31-12,74	$y=1546,76x+27321,09$

### 3.2.3 Wiederfindung

Wie bereits im Punkt 3.2.2 erläutert, wurden alle acht Standards jeweils in unaufgearbeiteter, sowie in aufgearbeiteter Form gemessen. Vergleicht man nun die beiden Standards gleicher Konzentration, wie in der Tabelle angeführt, ist ersichtlich, dass bei denen ohne SPE die Peakfläche größer ist, als bei denen mit SPE. Die Ursache für diese Differenz liegt darin, dass es während der SPE zu einer Verringerung der in der Probe enthaltenen Substanzen kommt; d.h. je mehr Arbeitsschritte vor der HPLC-Analyse nötig sind, desto mehr Fehlerquellen treten auf. Zu den Fehlerquellen zählen bei dieser Analyse beispielsweise die Verwendung von falschem Elutionsmittel und/oder von zu großen oder geringen Probenvolumina oder die Nichteinhaltung der SPE-Abfolgeschritte.

Tab.8: Wiederfindung

Substanz [jeweils Standard 1-8]	Area ohne SPE	Area mit SPE	Wiederfindung [%]
Theobromin 1	763611,70	-	
Theobromin 2	692804,40	406933,60	59,13
Theobromin 3	583995,30	341056,60	58,40
Theobromin 4	307852,10	255733,30	83,07
Theobromin 5	103696,00	71782,20	69,22
Theobromin 6	20347,70	14580,40	71,66
Theobromin 7	10170,10	7600,30	74,73
Theobromin 8	992,20	743,10	74,98
Theophyllin 1	763611,70	761136,90	99,68
Theophyllin 2	692804,40	596233,80	86,06
Theophyllin 3	583995,30	468843,70	80,28
Theophyllin 4	307852,10	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



### 3.2.4 Validierung der Methode

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert. Der Variationskoeffizient ist definiert als relative Standardabweichung. Dieser beschreibt das prozentuale Verhältnis zwischen Mittelwert und Standardabweichung. Um zu überprüfen, ob die HPLC bei Messungen gleicher Komponenten ähnliche Werte misst, wurde 10mal hintereinander der Mischstandard 1 gemessen.

Tab. 9: Validierung der Methode

Standards	Mittelwert [mg/l]	Standardabweichung [ $\sigma$ ]	Variationskoeffizient [%]
Theobromin	349,44	11,92	3,41
Theophyllin	461,57	8,25	1,79
Paraxanthin	457,89	11,44	2,50
Koffein	887,27	13,39	1,51

### 3.2.5 LOD

LOD steht für Limit of Detection und wird als die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die erfasst werden kann, bezeichnet. [Shrivastava und Gupta, 2011]. In der folgenden Tabelle ist der LOD der einzelnen Methylxanthine dargestellt.

Tab. 10: LOD der Methylxanthine

Methylxanthine	LOD [mg/l]
Theobromin	0,09
Theophyllin	0,006
Paraxanthin	0,022
Koffein	7,34

### 3.2.6 Probensammlung und -lagerung

Die diversen ausgewählten Kaffees, die für die Analyse herangezogen wurden, wurden gekauft und gegebenenfalls dann selbst zubereitet. Es wurden pro Kaffeesorte zwei Proben gekauft bzw. zubereitet. Alle Kaffeeproben wurden in entsprechenden Proberöhrchen gesammelt und bei -18°C gelagert.

#### 3.2.6.1 Lagerversuch – Wie stabil sind die Methylxanthine?

Um Herauszufinden wie stabil sich Koffein und seine Hauptmetaboliten bei Lagerung verhalten, wurde ein Lagerversuch von 4 Wochen durchgeführt, wobei in jeder Woche dieselbe Kaffeeprobe mit und ohne Milch anhand verschiedener Lagertemperaturen gemessen wurde. Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über den Lagerversuch.

**Tab.11: Lagerversuch**

Kaffeeprobe	Lagerung	
	Dauer	Temperatur
ohne Milch	1 Woche	Raumtemperatur
	2 Wochen	
	3 Wochen	4°C
	4 Wochen	-18°C
mit Milch	1 Woche	4°C
	2 Wochen	
	3 Wochen	-18°C
	4 Wochen	

Beim Lagerversuch stellte sich heraus, dass die Koffein-, Theobromin-, Theophyllin- und Paraxanthinkonzentration bei der Kaffeeprobe ohne und mit Milch bezüglich Dauer und Temperatur relativ stabil war und im Vergleich mit den Temperaturen geringe Schwankungen aufwies.

### **3.2.7 Probenzubereitung**

#### **3.2.7.1 Espresso**

Der Espresso wurde mit einem handelsüblichen Vollautomaten mit der Funktion „Espresso“ zubereitet.

Zu dieser Gruppe zählen auch die gekauften Espressos von den Coffeeshops.

Die Espressos wurden vor der SPE zentrifugiert, da diese trüb waren und man somit eine Verstopfung der Säule verhindern konnte.

#### **3.2.7.2 Filterkaffee**

Die ausgewählten Kaffeearten, die als ganze Bohnen erhältlich waren, wurden als solche gekauft und die restlichen als gemahlener Kaffee. Der Bohnenkaffee wurde zuerst gemahlen, der Mahlkaffee konnte gleich so verwendet werden. Alle diese gekauften Kaffeearten wurden mit einer Filterkaffeemaschine zubereitet. Dabei wurde ein handelsüblicher Kaffeelöffel genommen, um die Menge des gemahlenden Kaffees für jede einzeln zubereitete Tasse (150ml) gleich zu halten.

#### **3.2.7.3 Kapseln und Pads**

Die ausgewählten Kapseln und Pads wurden mit der entsprechenden Kaffeemaschine zubereitet.

#### **3.2.7.4 Kaffee von Coffeeshops**

Die diversen Kaffeevariationen wurden in den drei gewählten Coffeeshops gekauft.

### **3.2.7.5 Kaffeefertiggetränke**

Die Kaffeefertiggetränke wurden in österreichischen Supermärkten und Diskonter gekauft.

### **3.2.8 Probenaufbereitung**

Die Probenaufbereitung umfasst je nach Beschaffenheit der Probe 3-5 Arbeitsschritte und spielt für die HPLC-Analyse eine wichtige Rolle. Durch diese Schritte werden die Proben entsprechend aufbereitet, um ein quantitatives und repräsentatives Resultat zu erzielen.

#### **3.2.8.1 Zentrifugieren**

Einige Proben wurden vor der SPE-Aufbereitung zentrifugiert, um eine Verstopfung des Filters in der Säule zu vermeiden.

Des Weiteren mussten auch Proben, die nach der Konzentrierung und Wiederauffüllung mit HPLC-Wasser trüb wurden, zentrifugiert werden, um eine klare Probe für den letzten Analyseschritt zu erhalten. Die Proben müssen bei der HPLC-Analyse ein klares Bild aufweisen, da trübe Proben ansonsten die Säule in der HPLC verstopfen können und es somit zu keinem sinnvollen Resultat kommt.

#### **3.2.8.2 Proteinfällung**

Bei milchhaltigen Kaffeegetränken musste man vor der SPE das störende Protein entfernen. Bei dieser Methode wurde die entsprechende Menge an 50%iger meta-

Phosphorsäure zur entsprechenden Probemenge zugesetzt, um ein Endvolumen von 1ml klarer Probe zu erhalten. Der Volumenunterschied, siehe Tabelle 8, ergibt sich daraus, dass die Kaffeefertiggetränke und Kaffees von diversen Coffeeshops einen sehr hohen Milchanteil im Vergleich zum selbstgemachten Kaffee, der für den Lagerversuch zubereitet wurde, beinhalten.

Vor dem Einsatz der 50%igen meta-Phosphorsäure wurden zum Ausfällen die organischen Lösungsmitteln, Methanol und Ethanol, herangezogen. Dabei stellte sich aber heraus, dass man für 1ml klare Probe ein zu hohes Volumen von Methanol bzw. Ethanol benötige, um ein entsprechendes Resultat zu erzielen und die Probe demnach entsprechend verdünnt wird. Um das zu vermeiden, wurde die Proteinfällung mit der meta-Phosphorsäure gemacht, da hier viel kleinere Volumina notwendig sind um die Proteine quantitativ zu fällen.

Nach der Zugabe der 50%igen Meta-Phosphorsäure zur Kaffeeprobe wurden die Proben zentrifugiert, damit sich das ausgefällte Protein im Probenröhrchen absetzt. Der flüssige Überstand wurde in ein neues Probenröhrchen überführt und nochmals zentrifugiert, um Restprotein auszufällen und damit eine klare Probe für den weiteren Analyseschritt zu erhalten.

Bei Kaffeefertiggetränke mit >3,5%igem Fett im Milchanteil musste man 2-3 Stunden zentrifugieren und anschließend die Proben über Nacht im Kühlhaus (4°C) stehen lassen, um einen klaren Überstand zu erhalten, der dann weiter verwendet werden konnte.

**Tab. 12: Proteinfällung**

	<b>Volumen des fertigen Kaffees</b>	<b>Volumen der 50%igen meta-Phosphorsäure</b>
<b>Lagerversuch</b>	3ml	0,1ml
<b>Kaffeeproben</b>	8 ml	0,8ml

### 3.2.8.3 Festphasenextraktion

Zur Aufbereitung des Mischstandards und der einzelnen Proben wurde die Säule von Oasis HLB 1cc Extraction Cartridges verwendet. Während der Aufbereitung wurde die Säule in ein Zentrifugenröhrchen gehängt, um die Substanzen (Methanol, Wasser, Probe) zu sammeln. Beim letzten Schritt wurde immer ein neues Zentrifugenröhrchen genommen, da dieses Eluat zur weiteren Analyse verwendet wurde. In der folgenden Tabelle ist die Reihenfolge der Substanzen, die bei der SPE verwendet wurden, ersichtlich.

**Tab.13: Konditionierung der SPE**

Schritt 1	1 ml	Methanol
Schritt 2	1 ml	HPLC-Wasser
Schritt 3	1ml	Probe
Schritt 4	1ml	HPLC-Wasser
Schritt 5	1ml	Methanol

### 3.2.8.4 Konzentrierung

Nach der SPE wurden die Proben in Eppendorfer-Tubes überführt und mit offenem Deckel solange in den Konzentrator gestellt, bis sich das Volumen von 1ml auf 0,4ml reduzierte. Als Hilfestellung wurde auf dem Eppendorfer-Tube eine Markierung bei 0,4ml gemacht.

Dieser Analyseschritt ist notwendig, um den alkoholischen Anteil zu verringern. Weiters erzielte man dadurch auch eine bessere Auftrennung der Methylxanthine, v.a. bei Theophyllin und Paraxanthin.

Nach der Aufkonzentrierung wurde abschließend auf 1ml Volumen mit HPLC-Wasser wieder aufgefüllt. Danach wurden trübe Proben nochmals zentrifugiert, um restliche Verunreinigungen zu eliminieren und eine klare Probe für die endgültige Analyse mittels HPLC zu erhalten. Für die HPLC-Analyse wurden die aufbereiteten Proben in Autosamplerfläschchen überführt.

### **3.2.9 Analyse der Kaffeeproben**

#### **3.2.9.1 HPLC-Bedingungen**

- Mobile Phase A: 80,6% Wasser
- Mobile Phase B: 19,4% Acetonitril
- HPLC-Säule: Fortis Phenyl (150 x 2,1mm) von Technologies Ltd.
- Injektionsvolumen: 10µl
- Flussrate: 0,2ml/min
- Programmdauer: 15 min
- UV-Absorption: 270 nm
- Pumpendruck: 200-300 bar
- Temperatur: 25°C

#### **3.2.9.2 Statistische Auswertung**

Bei der statistischen Auswertung der einzelnen Konzentrationen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Bei der Berechnung der Konzentrationen muss darauf geachtet werden, dass man den Verdünnungsfaktor miteinbezieht.

## 4. ERGEBNISSE

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse der einzelnen Kategorien dargestellt und im anschließenden Punkt 5 diskutiert.

Vorab eine kurze Information zu den Abkürzungen und der Auswertung:

- **Abc...**Auswertung mit den Standardgeraden, die bei der ersten Messung ermittelt wurden
- **Abc...**Auswertung mit den Standardgeraden, die bei der zweiten (erneuten) Messung ermittelt wurden
- **ND...**Nicht Detektiert
- **N...**Nachweis der Substanz, d.h die Substanz wurde zwar detektiert, aber der Gehalt konnte nicht ermittelt werden, da der Wert zur Berechnung zu klein war

**Tab.14: Standardgeraden von der ersten und zweiten Messung**

Standard	Standardgeraden	
	erste Messung	zweite Messung
Theobromin	$x=(y-13360,21)/1210,47$	$x=(y-9083,63)/1549,16$
Theophyllin	$x=(y-1659,59)/1724,98$	$x=(y-1069,52)/2183,67$
Paraxanthin	$x=(y-3382,86)/1581,58$	$x=(y-5433,34)/1971,47$
Koffein	$x=(y-29664,84)/1230,91$	$x=(y-27321,09)/1546,76$

x...ermittelte Konzentration, y...Area (Peakarea)



## 4.1 Espresso

Tab.15: Espresso

Marke	Sorte	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Illy	Normale Röstung	21,38 ± 0,07	1,48 ± 0	ND	843,35 ± 4,52
Jacobs	Auslese	7,52 ± 0,11	1,95 ± 0,04	ND	819,42 ± 1,11
Julius Meinl	Wiener Art	14,08 ± 0,62	3,51 ± 0,02	ND	773,04 ± 16,86
	Wiener Crema	8,70 ± 0,2	5,62 ± 0,53	ND	766,37 ± 0,53
Lavazza	Cremoso	15,61 ± 0,05	1,23 ± 0	ND	846,88 ± 0,08
	d'Oro	7,17 ± 2,55	1,05 ± 0,01	ND	765,94 ± 59,55
	Perfetto	11,11 ± 1,10	2,62 ± 0,02	ND	857,52 ± 2,10
Tchibo	Mailänder Art	14,75 ± 0,22	1,89 ± 0,01	ND	753,59 ± 11,57
	Sizilianer Art	9,68 ± 2,50	ND	N	916,45 ± 2,03
Segafredo	Selezione Oro	10,74 ± 0,00	0,80 ± 0,80	N	936,77 ± 0,82
EZA <sup>1</sup>		18,24 ± 1,18	1,12 ± 0,09	ND	831,63 ± 1,90
Ja!Natürlich <sup>1</sup>		5,34 ± 0,06	ND	ND	849,68 ± 37,57
Natur Aktiv <sup>1</sup>		15,86 ± 0,05	1,42 ± 0,01	ND	851,72 ± 1,02
Spar Natur Pur <sup>1</sup>		13,38 ± 1,37	3,77 ± 0,03	2,79 ± 0	920,39 ± 14,48

<sup>1</sup> Biokaffee

## 4.2 Filterkaffee

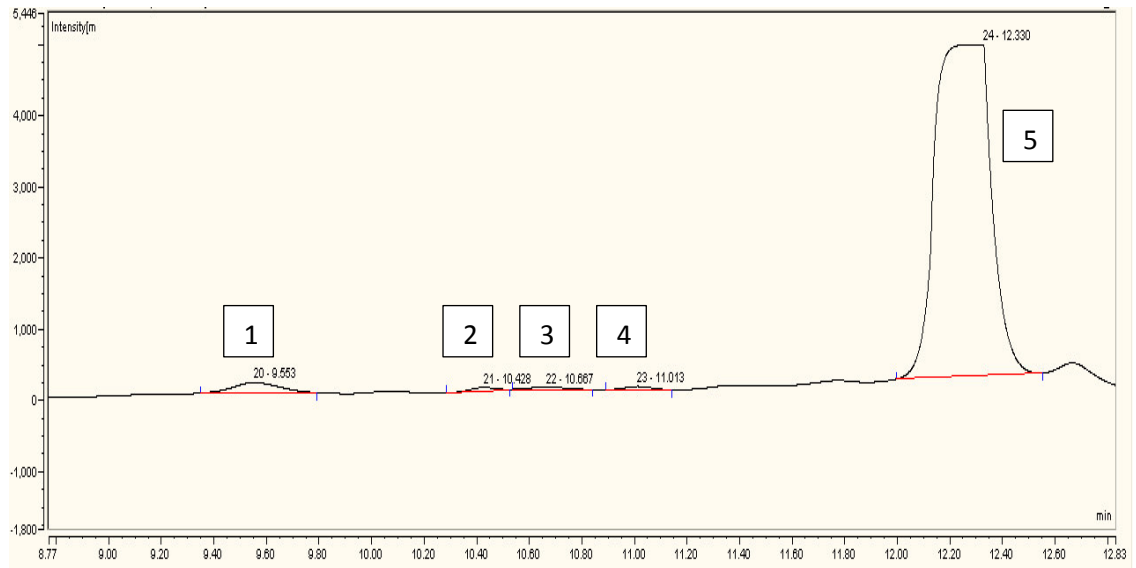
Tab.16: Crema

Marke	Sorte	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Tchibo	Vollmundig	4,02 ± 0,34	4,81 ± 0,37	2,51 ± 0,05	723,83 ± 2,20
	Mild	3,52 ± 0,14	4,16 ± 0,13	0,22 ± 0,22	756,20 ± 11,99
Jacobs	Classico	2,97 ± 0,43	1,60 ± 0,02	3,47 ± 0,12	831,04 ± 50,09
	Intenso	4,07 ± 0,36	4,10 ± 0,15	N	760,15 ± 3,57
Lavazza	Classico	2,97 ± 0,03	N	ND	703,43 ± 2,42
	Dolce	3,60 ± 0,20	0,28 ± 0,02	ND	844,76 ± 0,98
Segafredo	Selezione	2,10 ± 0,90	0,05 ± 0,05	0,50 ± 0,50	907,57 ± 7,86

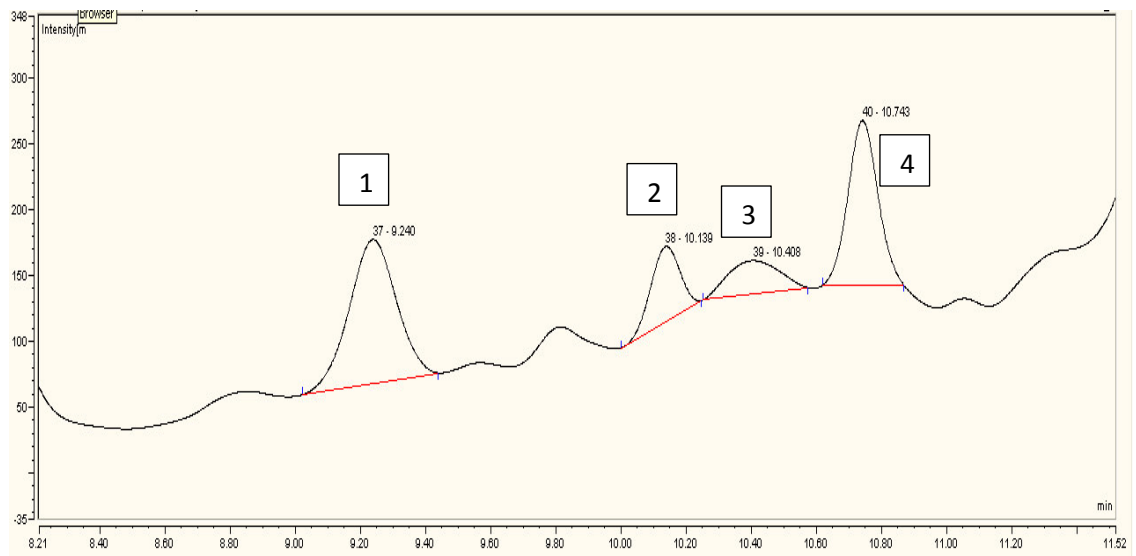
Tab.17: Biokaffee

Marke	Sorte	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Tchibo	Privat Kaffee	2,18 ± 0,43	6,54 ± 0,53	N	742,74 ± 7,28
EZA	Organico Mild	N	10,65 ± 0,88	N	812,31 ± 1,21
B.J. Darboven	Intencion Ecologico	4,71 ± 0,87	4,49 ± 0,63	1,38 ± 0,13	749,95 ± 17,95
ECHT BIO	Hochland-Kaffee	1,75 ± 0,02	0,43 ± 0,01	N	560,23 ± 15,83
Spar Natur Pur		4,91 ± 0,35	2,66 ± 0,02	0,96 ± 0,09	692,96 ± 2,15
Ja! Natürlich	Hochland-Kaffee	3,70 ± 0,06	4,34 ± 0	0,28 ± 0,28	750,61 ± 0,17

In der Abbildung 17 ist ein Chromatogramm einer Probe ersichtlich, dass Koffein im Vergleich zu Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin in viel höherer Konzentration in Kaffee vorliegt. Die anschließende Abbildung zeigt wie nah nacheinander Theophyllin und Paraxanthin detektiert wurden.



**Abb.17: Chromatogramm\_Kaffee Spar Natur Pur (1)**



**Abb.18: Chromatogramm\_Kaffee Spar Natur Pur (20)**

**1 = Theobromin, 2 = Theophyllin, 3 = Paraxanthin, 4 = interner Standard, 5 = Koffein**

### 4.3 Kapsel & Pads

Tab.18: Nespresso

Variation		Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Para-xanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
<b>Espresso</b>	Livanto	11,82 ± 0,27	1,05 ± 0,19	ND	824,11 ± 0,45
	Capricio	6,67 ± 0,13	0,94 ± 0,05	ND	825,53 ± 1,96
	Volluto	12,92 ± 0,09	0,35 ± 0,18	ND	910,72 ± 7,61
	Cosi	10,35 ± 0,06	2,64 ± 0,09	N	822,94 ± 27,74
	Kazaar	8,04 ± 0,01	ND	N	892,08 ± 8,12
<b>Ristretto</b>	Dharkan	13,12 ± 0,02	ND	ND	824,61 ± 0,28
	Ristretto	19,83 ± 1,76	1,17 ± 0	ND	793,85 ± 1,90
	Arpeggio	19,05 ± 0,02	1,73 ± 0,02	ND	782,36 ± 3,77
	Roma	21,58 ± 0,14	1,61 ± 0,82	ND	842,55 ± 4,68
<b>Lungo</b>	Fortissio	8,62 ± 0,14	1,84 ± 1,22	ND	758,69 ± 15,73
	Linizio	5,71 ± 0,06	1,33 ± 0,02	ND	749,86 ± 23,97
	Vivalto	6,04 ± 0,92	3,02 ± 0,26	ND	703,49 ± 4,7
<b>Geschmack</b>	Karamell	2,64 ± 0,47	0,98 ± 0,16	ND	513,11 ± 26,06
	Schoko	3,03 ± 0,40	2,54 ± 0,06	ND	571,60 ± 15,69

In folgendem Chromatogramm wurde nur Theobromin, Koffein und Theophyllin, das jedoch schon eine äußerst niedrige Konzentration aufweist, detektiert.

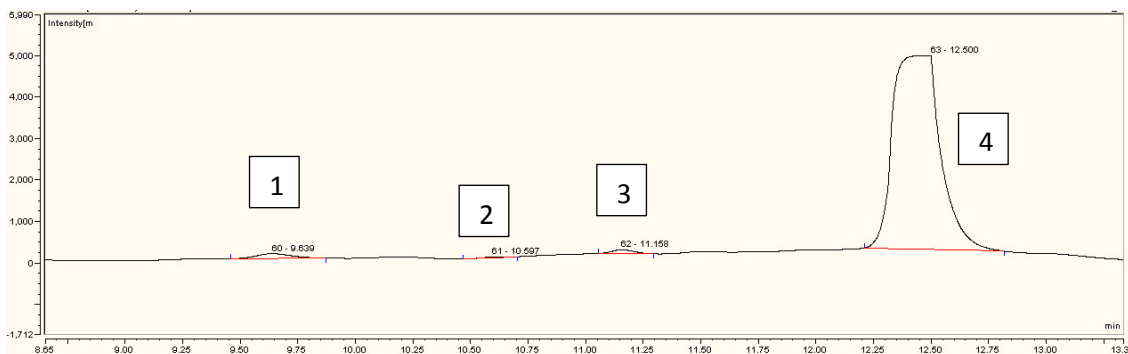


Abb.19: Chromatogramm\_Nespresso Lungo Fortissio

1 = Theobromin, 2 = Theophyllin, 3 = Interner Standard, 4 = Koffein

Tab.19: Senseo

Variation	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	3,33 ± 0,01	1,66 ± 0,03	N	599,88 ± 3,65
Cappuccino	N	N	N	238,46 ± 3,35
Latte Macchiato	N	N	N	75,19 ± 1,79

Tab.20: Tassimo

Variation	Art	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	(Classic)	5,43 ± 0,02	N	N	895,13 ± 2,47
	Ristretto	11,34 ± 0,02	N	N	881,28 ± 4,11
Crema	Classico	4,42 ± 0,05	ND	ND	734,24 ± 2,38
	Intenso	5,15 ± 0,01	1,12 ± 0,01	N	787,83 ± 2,12
Latte Macchiato	(classic)	N	1,92 ± 0,01	N	651,11 ± 5,93
	Karamell	N	3,11 ± 0,03	N	654,80 ± 25,94
Cappuccino		ND	4,51 ± 0,02	ND	731,00 ± 13,71

Tab.21: Caffissimo

Variation	Art	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	Kräftig	9,93 ± 1,36	2,13 ± 0,01	N	806,45 ± 4,88
	Elegance	7,92 ± 7,92	0,57 ± 0,57	N	678,82 ± 126,22
	Classico	1,32 ± 0,09	1,47 ± 0,37	ND	613,47 ± 8,8
Crema	Mild	6,25 ± 6,25	3,30 ± 0,62	N	525,71 ± 369,57
	Elegance	10,26 ± 6,73	2,96 ± 0,88	N	750,80 ± 92,94
	Vollmundig	N	4,31 ± 0,56	N	508,25 ± 32,36

## 4.4 Coffeeshops

Tab.22: Coffeeshop Company

Variation	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	8,60 ± 0,01	1,57 ± 0,04	N	761,85 ± 17,09
Caramel Macchiato	N	3,31 ± 0,03	3,99 ± 1,67	480,37 ± 3,47
Caffe Latte	N	ND	ND	385,17 ± 95,64
	N	ND	ND	252,61 416,90
Cappuccino	N	ND	ND	549,92 ± 7,64

Tab.23: Mc Cafe

Variation	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	9,64 ± 0,03	1,80 ± 1,80	ND	836,91 ± 2,89
Latte Macchiato	0,90 ± 0,90	1,16 ± 0,45	ND	512,40 ± 40,73
Caramel Macchiato	N	0,53 ± 0,01	ND	498,95 ± 5,43
Cappuccino	N	1,11 ± 0,03	ND	590,59 ± 2,1
Caffe Latte	N	5,1 ± 0,51	ND	414,36 ± 0,76
Vanilla Latte	54,76 ± 4,92	0,30 ± 0,18	ND	367,05 ± 179,47
	55,49 ± 3,47	0,25 ± 0,22	ND	352,51 ± 165,61

Tab.24: Starbuck's

Variation	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Paraxanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
Espresso	9,55 ± 0,53	2,11 ± 0,05	N	787,10 ± 17,39
Caramel Macchiato	N	0,65 ± 0,02	N	221,74 ± 13,49
Caffe Latte	N	0,38 ± 0,03	N	223,42 ± 11,75
Cappuccino	1,37 ± 1,37	0,52 ± 0,06	ND	575,41 ± 191,16
	1,79 ± 1,79	0,73 ± 0,11	0,73 ± 0,73	551,25 ± 173,32
Vanilla Latte	N	0,14 ± 0,14	N	215,60 ± 77,88
	N	0,09 ± 0,09	ND	208,59 ± 68,66

## 4.5 Kaffeefertiggetränke

Tab.25: Kaffeefertiggetränke

Marke	Variation	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]	Para-xanthin [mg/l]	Koffein [mg/l]
<b>Emmi</b>	Cappuccino	31,20 ± 0,97	0,79 ± 0,02	ND	527,90 ± 1,47
	Latte Macchiato	N	ND	ND	534,02 ± 8,56
	L.M Caramell	N	9,87 ± 0,38	ND	391,07 ± 16,08
	L.M. Vanille	N	0,1 ± 0,1	N	406,20 ± 32,89
<b>Iced Afro Coffee</b>	Espresso	N	1,48 ± 0	N	583,49 ± 2,19
	Cappuccino	N	1,18 ± 0,08	N	490,08 ± 13,73
	Latte Macchiato	N	0,76 ± 0	N	303,03 ± 0,50
<b>Ja!Natürlich</b>	Caffe Latte	N	0,03 ± 0,03	N	255,24 ± 1,23
	Cappuccino	N	0,82 ± 0,21	N	474,72 ± 38,14
<b>NÖM</b>	Espresso	N	2,09 ± 0,33	N	332,32 ± 0,13
	Cappuccino	7,00 ± 0,03	6,35 ± 0	ND	271,59 ± 4,94
	Latte Macchiato	ND	0,14 ± 0,14	N	284,81 ± 0,94
<b>Penny to go</b>	Espresso	N	1,58 ± 0,17	N	639,44 ± 2,89
	Cappuccino	37,76 ± 0,34	1,25 ± 0,1	ND	487,38 ± 15,11
	L. M. Vanille	N	ND	ND	411,27 ± 29,04
	L.M. Karamell	N	ND	ND	467,76 ± 4,91
<b>SBUDGET</b>	Cappuccino	33,48 ± 1,09	0,90 ± 0,13	ND	439,46 ± 4,93
	Latte Macchiato	N	ND	ND	466,77 ± 20,77
	L.M. Vanille	N	ND	ND	423,62 ± 5,63
	L.M. Karamell	N	N	ND	462,65 ± 18,01
<b>TIZIO</b>	Espresso	N	ND	N	621,36 ± 2,07
	Cappuccino	32,77 ± 0,59	ND	N	476,48 ± 0,56
	Latte Macchiato	N	ND	ND	542,03 ± 0,91
<b>Starbucks</b>	Seattle Latte (Espresso)	N	3,30 ± 0,01	N	560,32 ± 9,95
	Caramel	N	7,51 ± 0,24	N	523,80 ± 4,14

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Allgemein

Bei der Analyse wurden insgesamt 194 Kaffeeproben diverser Variationen auf ihren Theobromin-, Theophyllin-, Paraxanthin- und Koffeingehalt untersucht. Dabei ist festzuhalten, dass es sich um 97 verschiedene Einzelkaffeeprodukte handelt und je Produkt zwei Proben zubereitet bzw. gekauft wurden. Von jeder Kaffeeprobe wurde jeweils eine Einzelbestimmung durchgeführt. Die Kaffeeproben wurden vom österreichischen Lebensmittelhandel und von drei ausgewählten bekannten Coffeeshops gekauft.

Die Kaffeeprodukte wurden in 5 Kategorien klassifiziert, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

**Tab. 26: Anzahl der Kaffees je Kategorie**

Kaffeekategorie		Anzahl
Espresso (inkl. 4 Bio)		14
Filterkaffee	Crema	7
	Bio	6
Kapsel & Pads	Nespresso	14
	Senseo	3
	Tassimo	7
	Caffissimo	6
Coffeeshop	Coffeeshop Company	4
	MC Cafe	6
	Starbuck's	5
Fertiggetränke		25

Die analysierten Methylxanthinkonzentrationen beider Probe vom selben Produkt weisen bis auf wenige Ausnahmen keine starken Schwankungen auf. Es ist daraus zu schließen, dass vor allem bei den vorportionierten und einzeln abgepackten Kaffeeprodukten, wie Kapsel und Pads, die Kaffeemenge sowohl qualitativ als auch quantitativ passt.



Der Paraxanthingehalt wurde am wenigsten detektiert bzw. lag der Wert zur Berechnung unterhalb des gewählten Konzentrationsbereichs.

Für Koffein wurde eine Abweichung für die jeweils zwei Proben gleicher Art von max. 15% festgelegt, da Koffein das Hauptalkaloid in Kaffee ist. Falls die Abweichung mehr als 15% war, wurden diese Proben erneut aufbereitet und gemessen, um ausschließen zu können, dass kein Arbeitsschritt vergessen wurde bzw. unachtsam gearbeitet wurde. Koffein ist nämlich das Hauptalkaloid in Kaffee. Bei dessen Synthese bzw. auch Abbau in der Kaffeepflanze spielen die Substanzen Theophyllin, Theobromin und Paraxanthin eine wichtige Rolle und können deshalb in geringerer Konzentration in Kaffee vorkommen. Theobromin ist hingegen als dominierendes Purinalkaloid in der Kakaopflanzen vertreten [Ashihara et al., 2008]. Paraxanthin kommt natürlicher Weise nicht in Lebensmitteln vor [Aresta et al., 2005]. Obwohl es der aktivste Hauptmetabolit des Koffeins ist, enthält die Kaffeepflanze nur Spuren von Paraxanthin (siehe S.5) [Ashihara et al., 2008]. Aufgrund dessen darf die Abweichung bei den drei Hauptmetaboliten einen etwas höheren Prozentsatz aufweisen, da diese verglichen mit Koffein in deutlich geringerer Konzentration im Kaffee vorliegen.

## **5.2 Kaffeekategorien: Methylxanthinkonzentrationen**

### **5.2.1 Espresso [Tab.15]**

Bei allen Espressos, die mittels Kaffeefullautomaten zubereitet wurden, wurde ein Theobromingehalt gemessen, wobei dieser aber im Vergleich zueinander starke Schwankungen aufweist. Die niedrigste Konzentration liegt bei 5,28 mg/l und die höchste bei 21,45 mg/l.

Mit Ausnahme von zwei gemessenen Proben kommt Theophyllin in allen Proben vor. Die Konzentration jedoch ist verglichen mit Theobromin um einiges niedriger.

Paraxanthin wurde in 3 Espressos nachgewiesen. Ein Gehalt konnte jedoch nur bei einem Produkt ermittelt werden, da bei den anderen zwei Espressos der für die Berechnung der Konzentration analysierte Wert zu klein war.

Der Koffeingehalt schwankt zwischen 742,02 und 937,59 mg/l.

In einer Studie von Gennaro und Abrigo (1992) wurde neben Tee und Cola auch beim Espresso der Koffein- und Theobromingehalt untersucht. Die Koffeinkonzentration ist verglichen mit den analysierten Espressoproben wesentlich höher; diese liegt nämlich bei  $1760 \pm 8$  mg/l. Bei Theobromin wurde auch ein etwas höherer Wert ermittelt, nämlich  $27 \pm 2$  mg/l.

Vergleicht man zwei oder mehrere Sorten gleicher Marke, liegen Schwankungen der einzelnen Methylxanthinkonzentrationen vor, wobei bei Theobromin die stärkste Abweichung vorzufinden ist.

Bei den Bio-Espressos sind die ausgewerteten Konzentrationen ähnlich. Der Ja!Natürlich Espresso weist jedoch um rund zwei Drittel geringeren Theobromingehalt im Vergleich zu den anderen 3 Bio-Espressos auf.

Studien, in denen nur der Koffeingehalt in Espresso bestimmt wurde, werden im Punkt 5.7.1 erläutert.

### **5.2.2 Filterkaffee [Tab. 16-17]**

Das Vorkommen der drei Hauptmetaboliten von Koffein bei den ausgewählten Filterkaffees ist ähnlich den Espressosorten; diesbezüglich ist aber zu beachten, dass der Theobromingehalt bei diesen Kaffeearten bei  $<6$  mg/l liegt und der Paraxanthingehalt bei allen Bio-Kaffees nachgewiesen werden konnte.

Die niedrigste Koffeinkonzentration weist der Echt Bio Hochlandkaffee mit 544,4 mg/l auf, ansonsten schwankt dieser zwischen 690,81 und 915,43 mg/l. Diese Werte finden sich wieder im ermittelten Konzentrationsbereich, der in den Studien von Barone und Roberts (1996) und Gilbert et al. (1976) bei gefiltertem Kaffee analysiert wurde. Bei

Barone und Roberts (1996) liegt ein Bereich von 36,6 - 148,1 mg/150ml (244 - 987,33 mg/l) und bei Gilbert et al. (1976) von 195 - 1170 mg/l vor. Beide Studien weisen aber eine wesentlich größere Spannweite im Vergleich mit diesen analysierten Kaffeeproben auf. In einer Studie von Santini et al. (2011) wurde der Koffeingehalt von verschiedenen Kaffeezubereitungsmethoden analysiert, wobei der „*American Coffee*“ vergleichbar mit dem hier untersuchten Filterkaffee ist. Der „*American Coffee*“ wies eine niedrigere Koffeinkonzentration (0,321 mg/ml) verglichen mit den analysierten Filterkaffeeproben auf. Weiters veröffentlichte die US FDA - Food and Drug Administration - in einem Report im Jahr 2012 den Koffeingehalt von Getränken und Lebensmitteln, wobei auch Filterkaffee mit einem Koffeinkonzentrationsbereich von 95-330/8 fl. oz (231,8 - 805,2 mg/l) angeführt ist. Es ist somit auch hier ersichtlich, dass der Koffeingehalt großen Schwankungen unterliegt.

Die zwei ausgewählten Sorten einer Marke zeigen im Vergleich keine starke Abweichung der einzelnen Methylxanthine; beim Bio-Kaffee hingegen schwankt der Theophyllingehalt zwischen 0,42 und 11,53 mg/l.

In einer anderen Studie, in der Gehalt von Koffein, Theobromin und Theophyllin mittels HPLC in diversen Lebensmitteln ermittelt wurde, kam man bei Filterkaffee zu folgenden Resultat [Bispo et al, 2002]:

**Tab. 27: Methylxanthinkonzentrationen im Filterkaffee** [modifiziert nach Bispo et al, 2002]

Kaffeeprobe	Koffein [mg/l]	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]
A	350	17,0	< 10 <sup>-7</sup>
B	67,0	< 10 <sup>-7</sup>	< 10 <sup>-7</sup>

Es wird auch hier gezeigt, dass starke Schwankungen bei den einzelnen Methylxanthinkonzentrationen vorliegen, jedoch weichen diese Werte von den analysierten Filterkaffeeproben ab.

### 5.2.3 Kapseln & Pads [Tab.18-21]

Bei den derzeit sehr beliebten Kapseln und Pads schwanken die Theobrominkonzentrationen stark im Vergleich zu den anderen analysierten Methylxanthinderivaten. Die höchste Konzentration liegt bei 21,72 mg/l und die niedrigste Konzentration bei 1,23 mg/l, wobei zu beachten ist, dass bei 4 Proben der Theobromingehalt zwar nachgewiesen wurde, aber nicht ausgewertet werden konnte, da diese unterhalb des festgelegten Konzentrationsbereichs lagen. Bei Paraxanthin gab es bei fast allen ausgewählten Kapseln- und Pads-Produkten auch nur einen Nachweis. Bei 3 Tassimo-Proben ist eine starke Abweichung bei der Koffeinkonzentration ersichtlich [Tab. 20]. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Probenfarbe beider Proben gleicher Art im Vergleich unterschiedlich war; eine war viel dunkler als die andere. Bei der dunklen wurde, wie erwartet, die höhere Konzentration gemessen.

Im Vergleich zu allen ausgewählten und analysierten Kaffeeproben weist der *Senseo Latte Macchiato* mit 73,4mg/l die niedrigste Koffeinkonzentration auf [Tab. 19]. Auffallend niedrig ist auch der Koffeingehalt beim *Senseo Cappuccino* verglichen mit Cappuccinos von Coffeeshops und Kaffeefertiggetränken [Tab. 19 und 22-25]. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass diese beiden Senseovariationen ein äußerst wässriges Erscheinungsbild hatten im Vergleich zu den anderen.

In einer Studie von Ribeiro et al. (2014) wurde der Koffeingehalt von Espresso anhand von unterschiedlichen Ausführungen unter anderem auch per Kapsel und one-way-Verpackungen, vergleichbar mit den hier untersuchten Pads, analysiert. Bei den Kapseln liegt der Koffeingehalt bei  $3,15 \pm 0,10$  mg/ml ( $3150 \pm 100$  mg/l) und bei den one-way Verpackungen bei  $2,96 \pm 0,14$  mg/ml ( $2960 \pm 140$  mg/l). Auch Candeias et al. (2009) untersuchte die Koffeinkonzentration in Espresso-Kapseln; die niedrigste liegt bei 1802 mg/l und die höchste bei 2432,8 mg/l. Im Vergleich zu den analysierten Espresso-Proben der ausgewählten Kapseln und Pads wurde eine wesentlich höhere Koffeinkonzentration in diesen beiden Studien ermittelt.

#### **5.2.4 Coffeeshops [Tab. 22-24]**

Alle ausgewählten Kaffeeariationen der drei Coffeeshops ergaben einen Nachweis der Koffeinhauptmetaboliten Theobromin und Theophyllin. Die ausgewählten Kaffees wurden jeweils beim gleichen Coffeshop gekauft. Bei vier Kaffeeprodukten lag nach der ersten Messung eine sehr starke Abweichung (bis zu 66%) bei der Koffeinkonzentration der zwei Proben gleicher Art vor [Tab. 22-24]. Diese Proben wurden deshalb nochmals neu aufbereitet und analysiert. Die zweite Messung ergab das gleiche Resultat wie bei der ersten Messung. Es stellte sich die Frage, warum diese starken Schwankungen vorliegen. Bei genauer Betrachtung der Proben war ersichtlich, dass die eine Probe deutlich dunkler als die zweite Probe desselben Produkts war. Deswegen ist anzunehmen, dass die Ursache für diese starke Abweichung das ungleiche Verhältnis Espresso : Milch ist. In der Studie McCruser et al. (2003) kam man zu einem ähnlichen Ergebnis. Man hat sechs espressos, die beim gleichen Coffeshop, aber an verschiedenen Tagen gekauft wurden, analysiert. Weiters zeigen zwei andere Studie auch ein solches Resultat, wobei man die espressos noch zusätzlich an unterschiedlichen Standorten gekauft hat [Desbrow et al., 2012; Hackett et al., 2008]. Man geht davon aus, dass dieser Konzentrationsbereich mit enormer Spannweite auf die Vielfalt der Kaffeearien, die als Kaffeemischungen dem Kaffeeproduzenten geliefert werden, zurückzuführen ist. Als weitere Ursache wird noch die Art und Weise wie der Barista den Kaffee zubereitet genannt; also ist die Menge des Kaffees und des Wassers sowie dessen Temperatur ausschlaggebend [Desbrow et al., 2012].

#### **5.2.5 Fertiggetränke [Tab. 25]**

Theobromin wurde bei allen bis auf eine Probe detektiert, jedoch lagen die meisten Werte sowie bei Paraxanthin unter dem festgelegten Konzentrationsbereich. Die

berechneten Konzentrationen für Theobromin- ausgenommen NÖM Cappuccino (~ 7 mg/l) - haben einen höheren Wert (> 30 mg/l) im Vergleich zu den anderen Kaffeeproben (< 22 mg/l).

Der Theophyllingehalt konnte hingegen bei mehreren Proben ermittelt werden.

Die Koffeinkonzentration bei den Fertiggetränken der unterschiedlichen Hersteller liegt zwischen 254,01 und 623,43 mg/l.

Alle drei Produkte von NÖM weisen im Vergleich zu den anderen Fertiggetränken die niedrigste Koffeinkonzentration auf; ein Grund dafür könnte sein, dass bei diesem Kaffeeprodukt Kaffeeextrakt anstatt Kaffee verwendet wurde.

In zwei verschiedenen Studien wurde löslicher Kaffee auf den Gehalt von Koffein, Theobromin und Theophyllin untersucht. Vergleicht man die Konzentrationen der analysierten Kaffeeproben, bei der Löscaffee verwendet wurde (Fertiggetränke der Marke Iced Afro Coffee), mit der Studie von Bispo et al. (2002) und von De Aragao et al. (2005) so kommt man nicht zum selben Resultat [Tab. 28]. Weiters wurde in mehreren Studien, die in der Tabelle 28 aufgelistet sind, nur der Koffeingehalt von Löscaffee, die unter anderem auf dem kenianischen [Wanyika et al. 2010], brasilianischen [Rojo Carmago et al., 1997] und algerischen [Belguidoum et al., 2014] Markt angeboten werden, bestimmt. Auch der US FDA Report 2012 veröffentlichte Resultate dazu. Von den angeführten Studien weisen vier, verglichen mit den analysierten Kaffeeproben, abweichende Koffeinkonzentrationen auf, wobei bei Belguidoum et al. (2014) im Vergleich mit allen angeführten Studien bzw. mit den analysierten Proben der niedrigste Koffeingehalt ermittelt wurde. Vor allem bei Heckmann et al. (2010), aber auch bei Wanyika et al. (2010) und Gilbert et al. (1976), liegt die stärkste Schwankungsbreite vor.

**Tab.28: Methylxanthinkonzentrationen im löslichen Kaffee**

Löskafee	Koffein ( <i>Bereich</i> ) [mg/l]	Theobromin [mg/l]	Theophyllin [mg/l]
Bispo et al. (2002)	122	12	15
De Aragao et al. (2005)	771,40	11,50	<0,06
<b>Belguidoum et al. (2014)</b>	<b>65,80-78,28</b>	-	-
US FDA Report (2012)	30-70mg/8 fl oz [127 - 295]	-	-
Rostagno et al. (2011)	70	-	-
Heckmann et al. (2010)	27-173 mg/8oz [113,94 - 730,06]	-	-
Wanyika et al. (2010)	325,40 - 708,91	-	-
Olmos et al. (2009)	210-440	-	-
Knight et al. (2004)	75mg/8 fl oz [317]	-	-
Camargo et al. (1997)	616,70 - 816,70	-	-
Gilbert et al. (1976)	102 – 559	-	-
<b><i>Iced Afro Coffee:</i></b>			
<i>Espresso</i>	583,49 ± 2,19	<LOD	1,48 ± 0
<i>Cappuccino</i>	490,08 ± 13,73	<LOD	1,18 ± 0,8
<i>Latte Macchiato</i>	303,03 ± 0,50	<LOD	0,76 ± 0

Des Weiteren wurden die gemessenen Koffeinkonzentrationen mit denen, die die Hersteller auf deren Produkte vermerken, verglichen. Dabei hat sich herausgestellt, dass bei den analysierten Proben der Koffeingehalt höher ist als angegeben. Bei zehn Proben ist dieser um den Faktor >1,5 höher [Tabelle 29]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in einer Studie von Desbrow et al. (2012), in der unter anderem bei Kaffeemilchmischgetränke der Koffeingehalt gemessen wurde. Die meisten von diesen untersuchten Fertiggetränken wiesen auch eine höhere Koffeinkonzentration im Vergleich zur Herstellerangabe auf.

Tab. 29: Kaffeefertiggetränke: analysierter Koffeingehalt im Vergleich mit Herstellerangabe

Marke	Variation	Koffein [mg/l]	Koffeingehalt laut Hersteller	% Differenz zum Hersteller
<b>Emmi</b>	Cappuccino	527,90	80 mg/230ml (348 mg/l)	52
	Latte Macchiato	534,02	80 mg/230ml	53
	L.M. Caramell	391,07	60 mg/230ml (261 mg/l)	50
	L.M. Vanille	406,20	60 mg/230ml	56
<b>Iced Afro Coffee</b>	Espresso	583,49	ca. 35 mg/100ml	67
	Cappuccino	490,08	ca. 30 mg/100ml	63
	Latte Macchiato	303,03	ca. 23 mg/100ml	32
<b>Ja!Natürlich</b>	Caffe Latte	255,24	15mg/100ml	70
	Cappuccino	474,72	30mg/100ml	58
<b>NÖM</b>	Espresso	332,32	ca.28 mg/100ml	19
	Cappuccino	271,59	ca. 17 mg/100ml	60
	Latte Macchiato	284,81	ca. 22 mg/100ml	29
<b>Penny to go</b>	Espresso	639,44	52 mg/100ml	23
	Cappuccino	487,38	35 mg/100ml	39
	L. M. Vanille	411,27	35 mg/100ml	18
	L.M. Karamell	467,76	35 mg/100ml	34
<b>SBUDGET</b>	Cappuccino	439,46	-	-
	Latte Macchiato	466,77	-	-
	L.M. Vanille	423,62	-	-
	L.M. Karamell	462,65	-	-
<b>TIZIO</b>	Espresso	621,36	52 mg/100ml	19
	Cappuccino	476,48	35 mg/100ml	36
	Latte Macchiato	542,03	35 mg/100ml	55
<b>Starbucks</b>	Seattle Latte (Espresso)	560,32	-	-
	Caramel	523,8	-	-



### 5.3 Koffeingehalt: Kaffeeproben im Vergleich

In den folgenden Punkten wird der Koffeingehalt der einzelnen Kaffeearten wie Espresso (37), Caffe Latte (3)/Vanilla Latte (2), Cappuccino (12) und Latte Macchiato (8)/ Caramel (8) bzw. Vanilla (3) miteinander verglichen. Es hat sich herausgestellt, dass der Koffeingehalt bei jeder einzelnen Probe bis zu sehr starke Schwankungen aufweist [Tab. 30].

**Tab.30: Kaffeearten: Konzentrationsbereich von Koffein**

<b>Kaffeearten</b>	<b>Konzentrationsbereich von Koffein [mg/l]</b>
Espresso	332,19 - 937,59
Latte Macchiato, Latte Macchiato Caramel bzw. Vanilla	73,40 - 680,74
Cappuccino	235,11 - 766,57
Caffe Latte, Vanilla Latte	137,72 - 546,52

#### 5.3.1 Espresso

Der Koffeingehalt hat eine Spannweite von 332,19 bis 937,59 mg/l bei allen untersuchten Espressos; wobei jedoch der Espresso mit 332,19 mg/l als Ausreißer, verglichen mit anderen Espressos, zu vermerken ist. Die anderen weisen nämlich eine Koffeinkonzentration von >550 mg/l auf. In einer Studie von McCusker et al. (2003) liegt der Koffeingehalt zwischen 58,1 und 185,0 mg/Dosis. Desbrow et al. (2012) hat hingegen aus 131 Espressos eine weitaus höhere Koffeinobergrenze ermittelt, nämlich mit einem Maximum von 7000 mg/l. Die Spannweite von allen analysierten Espressos in dieser Studie reicht von 580 bis 7000mg Koffein/l. Auch Crozier et al. (2012) und Candeias et al. (2009) kamen bei der Analyse von Espressos zu extrem hohen Koffeinkonzentrationen; bei Crozier et al. (2011) wurde ein Konzentrationsbereich von 1604,17 - 6500 mg/l und bei Candeias et al. (2009) von 2151,6 - 5651,6 mg/l ermittelt.

In einer anderen Studie von Desbrow et al. (2007), die in Australien durchgeführt wurde, hat sich auch herausgestellt, dass die untersuchten Espressos stark schwankende Koffeinkonzentrationen aufweisen (25 – 214 mg/Bedienung). Daten von *Food Standards Agency, 2004* (Vereinigtes Königreich), liefern ähnliche Resultate. Weiters zeigen zwei weitere Studien, in denen koffeinhaltige Getränke untersucht wurden, große Spannweiten beim Koffeingehalt. In der Studie von Heckmann et al. (2010) wird ein Koffeinkonzentrationsbereich von 240-720 mg/8oz (1012,8 - 3038,4 mg/l) angegeben und bei Olmos et al. (2009) liegt der niedrigste Koffeingehalt bei 730 mg/l und der höchste bei 2760 mg/l. Der US FDA Report 2012 veröffentlichte auch Daten zu Koffeinkonzentrationen von Espresso, die im Vergleich zu den bereits erwähnten wesentlich niedriger sind. Der Konzentrationsbereich erstreckt sich nur zwischen 122 und 366mg/l.

### **5.3.2 Latte Macchiato/Latte Macchiato Caramel bzw. Vanilla**

Die Latte Macchiato-Proben sollten im Bereich der Methylkonzentrationen der analysierten Espressoproben liegen, da diese außer Milch einen Shot Espresso (~42ml) enthalten. Bei den insgesamt 18 unterschiedlichen Latte Macchiato-Proben schwankt die Koffeinkonzentration stark. Es lagen nicht alle in dem Konzentrationsbereich, der beim Espresso ermittelt wurde. Viele weisen eine Koffeinkonzentration <550 mg/l auf. Der Koffeingehalt liegt bei diesen Proben zwischen 200 und 680 mg/l, wobei ein Ausreißer mit 73,4 mg/l die niedrigste Konzentration von allen analysierten Kaffeeproben zu vermerken ist. Als mögliche Ursache für den Konzentrationsunterschied wird der Aufbereitungsschritt „Proteinfällung“ bei den Latte Macchiato-Proben angenommen, da sich durch diesen zusätzlichen Arbeitsschritt der Koffeingehalt verringert.

### **5.3.3 Cappuccino**

Der Großteil der analysierten Cappuccino-Proben hat einen Koffeingehalt zwischen 430 und 590 mg/l. Zwei Cappuccinos weisen eine Konzentration von >590 mg/l und <700 mg/l auf, wobei bei einem die Koffeinkonzentration bei den zwei Proben gleicher Art stark schwankt; weitere zwei Cappuccino-Proben haben einen Koffeingehalt von < 280 mg/l.

### **5.3.4 Caffe Latte/Vanilla Latte**

Von den sechs unterschiedlichen Proben weist die Hälfte, eine starke Abweichung innerhalb der zwei Produkte gleicher Art auf. Der Konzentrationsbereich von Koffein liegt unter Miteinbeziehung der sehr stark schwankenden Proben zwischen 137,72 und 546,52 mg/l.

## 6. SCHLUSSFOLGERUNG

Die Analyse der Methylxanthine Koffein, Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin mittels HPLC unter den entsprechenden Bedingungen hat sich als geeignete Methode bewährt.

Bei der manuellen Integration der einzelnen Peaks war es manchmal nicht so einfach den richtigen Peak dem entsprechenden Methylxanthin zuzuordnen, da neben diesen viele andere Substanzen aufgrund der komplexen Kaffeematrix detektiert wurden. Diese Integration war jedoch notwendig, da die automatisierte Integration teilweise ungenau war.

Beim Vergleich mit Literaturwerten ergab sich die Schwierigkeit vergleichbare Studien, in denen alle vier Methylxanthinkonzentrationen in Kaffee analysiert wurden, zu finden. In den meisten wurde nur das im Kaffee vorkommende Hauptalkaloid, das Koffein, bestimmt. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass Theobromin und Theophyllin vor allem in Kakao, Schokolade und Tee dominierende Substanzen [Aresta et al. 2005] sind und dadurch dessen Analyse in diesen Produkten bedeutender ist. Der Nachweis von Paraxanthin ist besonders schwierig, da es nicht natürlich in Lebensmitteln vorkommt. Dessen Gehalt beruht auf die Art und Weise des Synthese- bzw. Abbauweges der Substanz, bei der Paraxanthin als Abbau- bzw. Zwischenprodukt eine wichtige Rolle spielt.

Sowohl die Literaturwerte als auch die Werte der hier analysierten Kaffeeproben zeigen, dass der Koffeingehalt einer großen Spannungsweite unterliegt. Diesbezüglich kann man keiner Zubereitungsmethode bzw. Kaffeeart eine Koffeinkonzentration zuteilen. Bei Espresso wurde der höchste Gehalt (~938 mg/l) ermittelt.

Im Hinblick auf die analysierten Kaffeeproben könnte man durch Einbeziehung unterschiedlicher Chargen und durch Doppelbestimmung der jeweils einzelnen Proben eine genauere Qualitäts- und Quantitätsprüfung der Methylxanthinkonzentrationen erzielen. Weiters könnte man noch die Kategorie Löscaffee miteinbeziehen, da diese Art von Kaffee in mehreren Studien analysiert wird.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Koffein ist die bekannteste Substanz in Kaffee. Kaffee ist ein beliebtes Getränk weltweit und wird in diversen Variationen angeboten. Anhand von festgelegten Kaffeekategorien und ausgewählten Kaffevariationen wurde der Gehalt von Koffein und seinen Hauptmetaboliten Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin in insgesamt 194 Kaffeeproben analysiert. Zur Quantifizierung dieser Methylxanthine wurde eine HPLC mit einem UV-Detektor verwendet, wobei eine analytische interne Standardisierung miteinbezogen wurde.

Die höchste Koffeinkonzentration mit rund 938 mg/l wurde bei einem Espresso, der mittels eines Kaffeefullautomaten zubereitet wurde, bestimmt. Weiters wiesen auch vier andere Kaffeeproben einen Koffeingehalt mit >900 mg/l auf; bei allen analysierten diversen Kaffeeprodukten wurde eine große Spannweite der Koffeinkonzentration festgestellt. Der Konzentrationsbereich für Koffein liegt zwischen 73,4 und 937,59 mg/l.

Nicht bei allen Proben konnte der Gehalt von Theobromin, Theophyllin und Paraxanthin analysiert werden, da diese verglichen mit Koffein weitaus niedrigere Konzentrationen im Kaffee aufweisen; am wenigsten wurde Paraxanthin gemessen. Der Anteil der analysierten Gehalte von Theophyllin und Theobromin ist ähnlich.

Die höchste gemessene Konzentration von Theobromin lag bei 59,68 mg/l, von Theophyllin bei 11,53 mg/l und von Paraxanthin bei 5,66 mg/l.

Im Hinblick auf alle quantifizierten Methylxanthinkonzentrationen hat man festgestellt, dass im Vergleich aller Proben alle vier Methylxanthine schwankende Konzentrationen aufweisen.

## 7.1 Summary

Caffeine is the most well-known substance in coffee. Coffee is a popular beverage worldwide and is offered in several variations. On the basis of specified categories of coffee and of selected variations of coffee the content of caffeine and its major metabolites theobromine, theophylline and paraxanthine was analyzed in a total of 194 beverage samples. To quantify these methylxanthines RP-HPLC with a UV detector was used, further an analytical internal standardization was involved. Prior to this measurement, however, several steps were required to achieve a corresponding character of the individual samples.

The highest concentration of caffeine with about 938 mg / l was quantified in an espresso, which was prepared by a fully automatic coffee machine. Furthermore, four other coffee samples had a caffeine content of >900 mg / l; in all analyzed various coffee products a large range of caffeine concentrations were determined. The concentration range of caffeine was between 73,4 and 937,59 mg/l.

On all samples, the content of theobromine, theophylline and paraxanthine could not be analyzed, because these compared with caffeine they have much lower concentrations in the coffee; paraxanthine was measured least. The content of the analyzed levels of theophylline and theobromine is similar.

The highest measured concentration of theobromine was 59,68 mg/l, of theophylline 11,53 mg/l and paraxanthine 5,66 mg/l.

In view of all quantified methylxanthine concentrations, it was found that in comparison of all samples all four methylxanthines showed a variable concentrations.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Aresta A, Palmisano F, Zambonin C. G. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. *Food Chemistry* 2005; 93: 177 - 181.

Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science* 2001; 6(9): 407-413.

Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 2008; 69: 841-856.

Ashihara H, Kato M, Crozier A. Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants. 2011 Handbook Methylxanthine

Ashihara H., Monteiro A. M, Moritz T, Gillies F. M, Corzier A. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica*. *Planta* 1996; 198: 334-339.

Barone J. J, Roberts H. R. Caffeine Consumption. *Food Chemical Toxicology* 1996; 34 (1): 119-129.

Belguidoum K., Amira-Guebailia H, Boulmokh Y, Houache. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2014; 45: 1314-1320.

Belitz H.-D. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie: mit 620 Tabellen*. Springer Verlag, Berlin 2001; 5. vollst. überarb. Aufl.

Bispo M. S, Veloso M. C. C, Heloísa Lúcia 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* 2002; 40: 45 - 48.

Candeias S. X, Gallardo E, Matos A. C. Caffeine Content of Retail Market Coffee in Portugal. *Food Anal. Methods* 2009; 2: 251-256.

Clarke R. J, Macrae R. *Coffee: physiology*. London and New York: Elsevier applied science publishers LTD: Springer 1988.

Crozier T. W. M, Stalmach A, Lean M. E. J, Crozier A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food & Function: The Royal Society of Chemistry* 2011.

Czerny M, Mayer F, Grosch. Sensory study on the character impact odorants of roasted C Arabica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47: 695-699.

Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 1449-1454.

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* 2005; 67: 1007 - 1013.

Del Castillo M. D, Gordon M.H, Ames J.M. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *European Food Research and Technology* 2005; 21: 471-477.



Delgado-Andrade C, Morales F. J. Unravelling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity in coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 1403-1407.

Desbrow B, Hughes R, Leveritt M, Scheelings P. An examination of consumer exposure to caffeine from retail coffee outlets. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45: 1588 - 1592.

Desbrow B, Henry M, Scheelings P. An examination of consumer exposure to caffeine from commercial coffee and coffee-flavoured milk. *Journal of Food Composition and Analysis* 2012; 28: 114 – 118.

Deutscher Kaffeeverband: Kaffeemarkt 2013;  
online: [http://www.kaffeeverband.de/images/dkv\\_pdf/geschuetzt/Jahresbericht/Kaffeemarkt2013.pdf](http://www.kaffeeverband.de/images/dkv_pdf/geschuetzt/Jahresbericht/Kaffeemarkt2013.pdf) (Stand: 04.09.2014)

Eichler O. *Kaffee und Coffein*. Springer Verlag, Berlin 1976; 2. völlig neubearb. Auflage.

Food Standards Agency. *Survey of Caffeine Levels in Hot Beverages*. Food Surveys, Food Standards Agency 2004; United Kingdom

Gennaro M.C, Abrigo C. Caffeine and theobromine in coffee, tea and cola-beverages Simultaneous determination by reversed-phase ion-interaction HPLC. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1992; 343: 523-525.

Gilbert R. M. PH D, Marshman J. A. PH D, Schwieder M B SC, Berg R. Dipl Tech. Caffeine content of beverages as consumed. *CMA Journal* 1976; 114: 205-208.

Hackett J, Telepchak M. J, Coyer M. J. Analysis of Total Caffeine and Other Xanthines in Specialty Coffees Using Mixed Mode Solid-Phase Extraction and Liquid

Chromatography–Diode-Array Detection After Microwave Digestion. *Journal of Analytical Toxicology* 2008; 32: 695 – 701.

Hänsel O, Sticher O. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Springer Verlag 2010, Berlin Heidelberg; 9.überarb. und aktual. Auflage; Kapitel Purinalkaloide.

Heckmann M. A, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety and Regulatory Matters. *Journal of Food Science* 2010; 75 (3): 77-87.

Huck C. W, Bonn G. K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 2000; 885: 51-72.

Kicinski H.-G Dr. *Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung und Clean up*. *Chemie in Labor und Biotechnik* 1996; 12: 542-548.

Knight C.A, Knight I, Mitchell D.C, Zepp J.E. Beverage caffeine intake in US consumers and subpopulations of interest: estimates from the Share of Intake Panel survey. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42: 1923-1930.

Kromidas S, Kuss H.-J. *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KG 2008, Weinheim

Kunze U. R. *Grundlagen der quantitativen Analyse*. Wiley-VCH 2009; 6. aktualisierte u. erg. Auflage.

Lashermes P, Andrade A. C, Etienne H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In P. H. Moore, & R. Ming (Eds.), *Genomics of tropical crop plants*, New York: Springer 2008; 203-225.

Lelo A, Birkett D.J, Robson R. A, Miners J. O Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br. J. clin. Pharmac.* 1986; 22: 177-182.

Matissek R, Steiner G, Fischer M. *Lebensmittelanalytik*. Springer Verlag Berlin-Heidelberg 2010; 4. Vollständig überarb. Auflage.

Menche Gerd. *Molecular Modelling Untersuchungen zur Enantiomerentrennung in der HPLC*. Cuvillier Verlag Göttingen 2005; 1.Auflage, Kapitel 2

McCusker R, Goldberger B, Cone E. Caffeine Content of Specialty Coffees. *Journal of Analytical Toxicology* 2003; 27: 520-522.

Nicoli M.C, Anese M, Parpinel M. T, Franceschi S, Leric C.R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters* 1997; 114: 71-74.

Ogawa M, Herai Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. Gene isolation and enzymatic properties. *J Bio Chem* 2001; 276: 8213-8218.

Olmos V, Bardoni N, Ridolfi A. S, Villaamil Lepori E. C. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Additive & Contaminants: Part A* 2009; 26 (3): 275-281.

Pay E. The market for organic and fair trade coffee. Increasing incomes and food security of small farmers in West and Central Africa through exports of organic and fair-trade tropical products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 2009; p. 1-19.

Ramalho J. C, Rodrigues A. P, Semedo J. N, Pais I. P, Martins L. D, Simoes-Costa M. C. et al. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* ssp. Under long-term enhanced [CO<sub>2</sub>]. PLoS ONE 2013; 8 (12)

Ribeiro V. S, Leitao A. E, Ramalho J. C, Lidon F. C. Chemical characterization and antioxidant properties of a new coffee blend with cocoa, coffee silverskin and green coffee minimally processed. Food Research International 2014; 61: 39-47.

Revelle W, Condon D. M, Wilt J. Caffeine. Northwestern University, Evanston, IL, USA 2012, 423-429.

Rojo Carmago M. C, Toledo M. C. F, Farah H. G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. Food Additive & Contaminants 1999; 16 (2): 79-87.

Rostagno M. A, Manchon N, D'Arrigo M, Guillamon E, Villares A, Garcia-Lafuente A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused –core column. Analytica Chimica Acta 2011; 685: 204-211.

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.

Rudolf M, Kuhlisch W. Biostatistik – Eine Einführung für Biowissenschaftler. Pearson Studium 2008; S.65.

Santini A, Ferracane R, Mikušová P, Eged S, Šrobárová A, Meca G, Mañes J, Ritieni A. Influence of different coffee drink preparations on ochratoxin A content and evaluation of the antioxidant activity and caffeine variations. *Food Control* 2011; 22: 1240-1245.

Shirvastava A, Gupta V. B. Methods for the determination of limit of the detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2011; 2 (1): 21-25.

Skoog D.A, Leary J. J. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Springer Verlag Berlin 1996.

Steinhart H, Luger R, Piost J. Antioxidative effect of coffee melanoidins. *Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee (2002)*. Paris: Association Scientifique Internationale du Café.

Vieira H. D. Coffee: The plant and its cultivation. In M. Souza (Ed.), *Plant parasitic nematodes of coffee*; Dordrecht: Springer 2008; 3-18.

Vitoria A.P, Mazzafera P. Caffeine degradation in leaves and fruits of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *Pesquisa Agropecuarua Brasil* 1998; 33: 1957-1961.

Walduogel S. R. Caffeine a drug with a surprise. *Angewandte Chemie International Edition* 2003; 42: 604-605.

Wanyika H. N, Gatebe E. G, Gitu L. M, Ngumba E. K, Maritim C. W. Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science* 2010; 4 (6): 353-358.

Wechselberger t, Hierl T. Das Kaffeebuch für Anfänger, Profis und Freaks. Braumüller GmbH Wien; 2014, 4. Auflage.

Żwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. Polish J. of Environ. St. 2006; 5: 677-690.

## 9. ANHANG

### ROHDATEN

#### ESPRESSO (Kaffeevollautotmat)

Marke	Sorte	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
ILLY	Normale Röstung	9,67	39090,5	10,21	4003,2	10,62	N	10,81	11050,1	12,58	1219548,1
		9,67	39297,6	10,21	4004,3	10,62	N	10,81	10821,4	12,58	1206833,0
JACOBS	Auslese	9,58	19825,4	10,10	4990,3	10,46	N	11,04	8657,0	12,38	1177980,1
		9,63	19513,3	10,16	4856,1	10,49	N	11,07	4478,7	12,38	1181101,5
JULIUS MEINL	Wiener Art	9,55	29769,9	10,67	5171,3	-	ND	11,01	5308,3	12,33	1138022,6
		9,55	28045,8	-	-	-	ND	10,81	9442,4	12,33	1090613,6
	Wiener Crema	9,61	21615,8	10,62	11173,1	-	ND	11,10	13606,6	12,42	1104207,6
		9,58	21057,8	10,56	14488,1	-	ND	11,25	7302,8	12,61	1105675,2
LAVAZZA	Cremoso	9,70	31131,5	10,20	3514,8	10,58	N	10,93	11162,6	12,49	1218049,3
		9,73	30993,2	10,23	3509,3	10,59	N	10,94	15385,8	12,52	1218266,9
	D'Oro	9,62	22776,7	10,14	3153,0	10,77	N	-	-	12,39	1188085,4
		9,62	15586,9	10,17	3124,4	-	-	11,02	15502,0	12,38	1020614,6
	Perfetto	9,70	23183,5	10,21	6310,2	10,63	N	10,92	6672,1	12,49	1236061,8
		9,68	26268,5	10,22	6230,4	10,59	N	10,99	8357,8	12,49	1230171,5
TCHIBO	Mailänder Art	9,59	30154,8	10,10	4833,7	-	ND	10,83	9551,7	12,35	1070704,7
		9,67	29548,5	10,19	4799,8	-	ND	11,02	8917,7	12,39	1103247,4
	Sizilianer Art	9,44	26768,1	-	ND	10,06	N	11,13	7534,2	12,53	1155237,4
		9,43	21263,2	-	ND	10,04	N	11,08	8633,1	12,46	1057441,8
SEGAFREDO	Selezione Oro	9,68	24209,7	10,24	4247,0	10,62	N	10,99	7159,6	12,55	1343398,2
		9,70	24207,4	10,41	N	10,64	N	11,01	7780,2	12,56	1345700,3
EZA (BIO)		9,60	32136,3	10,41	3563,0	-	ND	11,04	9464,0	12,37	1199365,0
		9,66	36866,4	10,58	3268,4	-	ND	11,13	5124,7	12,56	1194046,9
Ja! Natürlich (BIO)		9,66	16689,6	10,59	N	-	ND	11,53	7695,1	12,50	1274903,4
		9,71	16514,8	10,59	N	-	ND	11,52	7704,3	12,49	1169269,6
Natur Aktiv (BIO)		9,69	31343,9	10,24	3876,5	10,61	N	10,83	11175,4	12,60	1223523,8
		9,71	31472,4	10,29	3908,6	10,67	N	10,87	8082,9	12,64	1226399,4
Spar NaturPur (BIO)		9,41	26603,8	10,00	7518,3	10,37	7400,1	10,96	4545,7	12,36	1043384,2
		9,37	29624,7	10,01	7603,0	10,39	7406,1	10,96	10562,4	12,36	1075793,9

## FILTERKAFFEE

### a) CREMA

Marke	Sorte	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Tchibo	Vollmundig	9,29	17408,7	10,24	8624,2	10,50	6916,6	10,85	15242,5	12,14	842094,6
		9,29	18160,0	10,20	9762,3	10,56	7061,3	10,86	13715,9	12,14	837184,4
	Mild	9,28	17372,9	10,26	7979,2	10,46	N	10,82	15349,3	12,17	862445,3
		9,27	17084,3	10,24	8365,2	10,46	4003,2	10,82	15104,4	12,15	889262,2
Jacobs	Classico	9,31	17088,2	10,28	4194,9	10,54	8196,9	10,85	13363,3	12,19	903554,9
		9,31	16155,7	10,28	4142,1	10,60	8536,0	10,84	9212,6	12,18	1015658,5
	Intenso	9,30	17447,5	10,23	8308,4	10,45	N	10,80	9439,6	12,15	876283,9
		9,33	18231,2	10,24	7848,8	10,46	N	10,80	10089,2	12,16	884272,6
Lavazza	Classico	9,65	13230,6	10,52	N	-	ND	11,16	15896,0	12,43	1013038,8
		9,62	13298,8	10,53	N	-	ND	11,10	16617,3	12,40	1019855,6
	Dolce	9,36	17538,4	9,96	2122,7	-	ND	10,91	11616,2	12,29	976055,9
		9,39	17098,3	9,99	2113,7	-	ND	10,94	9,600,4	12,31	973857,2
Segafredo	Selezione	9,36	16660,3	9,99	N	10,33	N	10,93	7173,6	12,31	1054044,5
		9,36	14685,1	10,06	1799,0	10,34	4808,0	10,95	9736,3	12,31	1036453,8

### b) BIO

Marke	Sorte	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Tchibo	Privat Kaffee	9,29	15280,9	10,18	11089,7	10,48	3219,5	10,79	11999,9	12,15	852655,8
		9,26	16225,6	10,20	12731,2	10,50	1516,8	10,80	12240,8	12,15	869056,5
EZA	Organico Mild	9,27	11737,9	10,19	16980,1	10,38	875,9	10,79	16894,6	12,14	939993,6
		9,27	10453,4	10,18	19737,9	10,40	1992,3	10,78	13561,7	12,14	937291,6
J.J. Darboven	Intencion Egologico	9,28	17584,4	10,19	7712,0	10,47	5537,3	10,79	11917,4	12,14	848775,1
		9,26	19489,8	10,19	9673,3	10,48	5180,6	10,79	10569,0	12,14	888938,8
Echt Bio	Hochland-Kaffee	9,58	11579,9	10,11	1908,0	10,47	4643,4	10,98	17126,5	12,34	792820,1
		9,62	11515,1	10,16	1945,9	10,51	4642,4	11,03	14399,8	12,36	837345,1
Spar Natur Pur	Bio-Kaffee	9,24	18375,8	10,14	5858,3	10,41	4631,4	10,75	13351,8	12,10	807489,5
		9,26	19139,0	10,17	5797,3	10,45	4872,2	10,78	12666,1	12,13	802694,2
Ja! Natürlich	Hochland-Kaffee	9,23	17362,3	10,14	8460,5	10,38	4184,6	10,80	10109,5	12,10	869790,1
		9,24	17500,8	10,15	8464,5	10,39	3340,3	10,75	11668,2	12,10	869409,2



**KAPSELN & PADS**

**a) NESPRESSO**

	Sorte	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Espresso	Livanto	9,62	25349,0	10,54	3509,7	-	ND	-	ND	12,48	1186770,7
		9,62	26106,1	10,52	2780,1	-	ND	11,05	7015,9	12,47	1185503,4
	Capriccio	9,62	18298,9	10,54	2832,5	-	ND	11,13	6308,0	12,46	1190874,9
		9,63	18650,1	10,55	3037,0	-	ND	11,14	6080,7	12,47	1185386,2
	Volluto	9,70	27153,5	10,66	1410,7	-	ND	11,19	5750,4	12,48	1318622,4
		9,71	27392,8	10,65	2097,7	-	ND	11,15	7831,1	12,48	1297224,0
	Cosi	9,70	23739,6	10,60	6140,9	-	ND	11,12	17761,6	12,51	1145491,5
		9,63	23581,5	10,59	6463,2	-	ND	11,12	5764,2	12,52	1223493,5
Ristretto	Kazaar	9,65	20427,0	-	ND	-	ND	-	ND	12,52	1293132,6
		9,63	20392,0	-	ND	-	ND	-	ND	12,50	1270296,0
	Dharkan	9,64	27566,5	-	ND	-	ND	10,91	14411,5	12,49	1186444,3
		9,62	27523,8	-	ND	-	ND	-	ND	12,49	1187232,4
	Ristretto	9,91	39483,2	10,36	3394,1	-	ND	11,03	16324,1	12,57	1140917,4
		9,64	34527,3	10,16	3387,7	-	ND	10,97	13765,8	12,48	1146247,4
	Arpeggio	9,69	35880,1	10,20	4521,8	-	ND	-	ND	12,51	1122125,1
		9,67	35927,3	10,18	4459,9	-	ND	-	ND	12,53	1132737,0
	Roma	9,67	39674,1	10,57	5894,7	-	ND	11,15	2136,0	12,48	1205484,2
		9,67	39272,5	10,59	2638,3	-	ND	-	ND	12,50	1218638,0
Lungo	Fortissio	9,64	21402,0	10,62	2309,7	-	ND	11,16	10505,9	12,50	1116261,2
		9,63	21029,5	10,52	7126,3	-	ND	11,16	8872,0	12,48	1072024,4
	Linizio	9,70	17190,6	10,62	3757,0	-	ND	11,15	8682,2	12,52	1048023,9
		9,67	17047,7	10,64	3663,6	-	ND	11,16	10417,7	12,52	1115438,8
	Vivalto	9,65	18876,2	10,56	6539,4	-	ND	11,09	7503,3	12,49	1023141,2
		9,67	16290,4	10,58	7584,2	-	ND	11,12	9923,8	12,49	1009914,7
Geschmack	Caramell	9,52	13456,8	10,53	2687,9	-	ND	11,07	15372,1	12,32	785458,6
		9,58	12138,6	10,49	3319,5	-	ND	11,07	13663,4	12,32	712178,3
	Schoko	9,60	12783,6	10,50	6211,2	-	ND	11,05	12440,1	12,34	809018,1
		9,59	13900,3	10,50	6001,0	-	ND	11,02	13942,6	12,35	853141,7

**b) SENSEO**

Variation	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Espresso Classico	9,66	13757,5	10,20	4405,2	10,57	N	11,09	9417,4	12,49	875960,6
	9,66	13777,1	10,20	4300,8	10,59	N	11,13	13412,9	12,48	865701,9
Cappuccino	9,57	N	9,82	N	10,10	N	10,98	17073,2	12,30	333883,1
	9,56	N	9,83	N	10,12	N	10,99	16535,4	12,32	325407,9
Latte Macchiato	9,26	N	9,73	N	10,02	N	10,68	3354,2	12,55	124923,6
	9,28	N	9,75	N	10,03	N	11,23	16589,9	12,54	120381,2

c) TASSIMO

Variation	Art	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
ESPRESSO		9,38	19363,8	9,75	N	9,96	N	10,54	15546,5	12,34	1028563,9
		9,39	19322,5	9,76	N	9,97	N	10,56	15710,4	12,35	1034078,3
	Ristretto	9,40	25879,9	9,75	N	9,96	N	10,96	9126,5	12,35	1011226,0
		9,40	25830,3	9,74	N	9,96	N	11,24	12873,0	12,35	1020418,2
Crema	Classico	9,66	15377,5	-	ND	-	ND	11,12	7727,4	12,47	1063107,2
		9,70	15238,6	-	ND	-	ND	11,13	12282,2	12,48	1056420,4
	Intenso	9,65	16327,3	10,20	3271,1	10,60	N	11,18	8030,7	12,50	1138101,8
		9,66	16344,4	10,21	3291,0	10,58	N	11,17	7533,3	12,48	1132144,5
Latte Macchiato		9,18	N	9,55	4498,0	9,79	N	11,06	14557,6	12,36	845308,7
		9,18	N	9,56	4484,6	9,79	N	11,08	13650,8	12,37	860335,6
	Caramel	9,09	N	9,73	6583,2	9,89	N	11,10	12363,8	12,45	890373,6
		9,22	N	9,59	6679,3	9,89	N	11,08	17152,1	12,36	824618,4
Cappuccino		-	ND	9,79	9171,5	-	ND	11,34	11684,0	12,67	971482,5
		-	ND	9,81	9110,0	-	ND	11,38	14297,8	12,67	936722,5

d) CAFFISSIMO

Variation	Art	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
ESPRESSO	Kräftig	9,63	24980,8	10,14	5275,4	-	ND	-	ND	12,41	1154438,2
		9,56	21150,5	10,11	5326,3	-	ND	-	ND	12,39	1168150,8
	Elegance	9,55	N	10,50	3311,9	-	ND	11,02	16400,4	12,36	804356,2
		9,60	31373,7	10,56	N	-	ND	11,08	16168,6	12,42	902317,9
	Classico	9,59	10814,0	10,49	3244,8	-	ND	11,00	15562,5	12,35	877577,1
		9,65	11072,0	10,56	4697,5	-	ND	-	ND	12,37	1159306,7
CREMA	Mild	9,59	26730,0	10,54	8826,1	10,81	N	-	ND	12,38	1286203,9
		9,62	N	10,54	6389,8	10,80	N	11,08	17363,3	12,33	246876,4
	Elegance	9,60	33008,9	10,46	5207,0	10,73	N	-	ND	12,36	1213728,0
		9,58	14060,4	10,45	8679,5	10,75	N	-	ND	12,32	952366,5
	Vollmundig	9,58	N	10,46	10712,9	10,74	N	11,06	11570,8	12,36	787478,3
		9,63	N	10,50	8512,7	10,76	N	11,06	10901,1	12,35	696494,2

## COFFEESHOPS

### a) COFFEESHOP COMPANY

Variation	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Internert Standard		Koffein	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Espresso	9,70	21185,0	10,25	4102,2	10,62	N	11,22	8864,1	12,53	1074558,1
	9,65	21214,3	10,20	4264,3	10,57	N	10,93	14129,9	12,55	1122620,5
Caramel Macchiato	9,68	N	10,20	7023,3	10,57	14586,9	11,13	19497,9	12,49	640736,7
	9,68	N	10,21	6943,1	10,60	9184,7	-	ND	12,53	631951,1
Caffe Latte	9,65	N	-	ND	-	ND	11,18	13682,5	12,47	394401,1
	9,56	N	-	ND	-	ND	-	ND	12,27	382528,5
	9,71	N	-	ND	-	ND	11,24	13625,7	12,52	636900,7
	9,55	N	-	ND	-	ND	10,94	14710,9	12,28	613548,6
Cappuccino	9,75	N	-	ND	-	ND	11,21	12707,0	12,50	734197,3
	9,68	N	-	ND	-	ND	11,17	6471,4	12,52	714838,7

### b) MC CAFE

Variation	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Internert Standard		Koffein	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Espresso	9,68	22684,6	10,23	N	-	ND	10,98	16995,1	12,56	1200080,0
	9,67	22615,1	10,19	8208,8	-	ND	10,98	21002,7	12,52	1208189,2
Latte Macchiato	9,59	11373,0	10,15	3946,3	-	ND	10,51	17930,4	12,35	728581,7
	9,61	9023,1	10,15	2347,5	-	ND	10,50	15009,7	12,34	625326,9
Caramel Macchiato	9,68	7196,6	10,29	2011,1	-	ND	11,20	14407,0	12,56	653029,2
	9,70	7268,0	10,28	2001,7	-	ND	11,19	13626,9	12,53	666781,9
Cappuccino	9,68	6677,6	10,22	3089,0	-	ND	11,13	12138,9	12,51	773429,3
	9,77	6644,6	10,30	3009,2	-	ND	11,17	11833,6	12,54	778759,9
Caffe Latte	9,68	5878,6	10,21	11095,7	-	ND	11,13	9010,5	12,50	553626,7
	9,67	5853,6	10,20	11111,0	-	ND	11,17	15581,6	12,50	551698,5
Vanilla Latte	9,67	84871,2	10,20	1910,3	-	ND	11,20	14058,9	12,47	720200,4
	9,60	83954,6	10,13	1899,1	-	ND	11,07	15214,3	12,42	684207,4
	9,76	72369,4	10,29	1279,7	-	ND	11,23	15529,3	12,51	265136,4
	9,60	75136,9	10,14	1122,9	-	ND	11,06	17479,1	12,31	264274,5

### c) STARBUCK'S

Variation	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Internert Standard		Koffein	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
Espresso	9,61	23267,8	10,14	5353,9	10,46	N	-	ND	12,42	1158549,9
	9,60	21784,6	10,15	5165,5	10,49	N	-	ND	12,47	1109644,3
Caramel Macchiato	9,57	N	10,11	2245,4	10,49	N	11,02	17360,7	12,28	325539,3
	9,66	N	10,18	2205,0	10,64	N	11,21	13902,8	12,51	291346,1
Caffe Latte	9,62	N	10,21	1787,3	10,59	N	11,14	14806,7	12,49	325483,2
	9,66	N	10,18	1701,9	10,63	N	11,16	12316,8	12,44	295686,8
Cappuccino	9,68	6577,8	10,28	1895,8	10,64	N	-	ND	12,55	514482,7
	9,56	7873,0	10,13	2184,3	10,48	4327,3	11,00	16687,0	12,31	506479,1
	9,63	12559,5	10,21	2107,8	10,59	N	-	ND	12,49	999211,6
	9,54	13627,0	10,07	2570,4	10,48	8318,4	11,01	11672,4	12,33	945958,6
Vanilla Latte	9,65	N	10,28	1569,2	10,64	N	11,20	14615,1	12,53	399404,9
	9,54	N	10,09	1385,3	-	ND	-	ND	12,27	378818,0
	9,76	N	10,32	N	10,69	N	11,29	14049,4	12,54	201926,7
	9,61	N	-	ND	-	ND	-	ND	12,30	204727,1

**FERTIGGETRÄNKE**

Marke	Variation	Theobromin		Theophyllin		Paraxanthin		Interner Standard		Koffein	
		RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
EMMI	Cappuccino	9,81	49927,2	10,36	2500,0	-	ND	11,36	13697,7	12,65	694753,0
		9,84	47470,6	10,38	2451,3	-	ND	11,30	8701,0	12,67	698465,4
	Latte Macchiato	9,58	N	-	ND	-	ND	11,03	14989,7	12,36	715220,7
		9,83	N	-	ND	-	ND	11,10	16410,1	12,36	693516,6
	L.M. Caramel	9,80	N	10,35	19414,5	-	ND	11,32	14696,5	12,62	543509,1
		9,86	N	10,35	18053,6	-	ND	11,33	13511,0	12,65	502748,7
L.M. Vanilla	9,82	N	10,39	1430,3	10,51	N	11,35	14476,8	12,59	500616,0	
	9,82	N	10,37	928,3	10,48	N	11,36	15163,6	12,61	583999,4	
ICED AFRO COFFEE	Espresso	9,12	N	9,94	3714,7	10,22	N	11,16	11642,7	12,54	764311,6
		9,12	N	9,94	3722,9	10,21	N	11,19	12905,0	12,58	769852,1
	Cappuccino	9,68	N	9,93	3035,6	10,21	N	11,23	12409,5	12,53	631259,9
		9,66	N	9,94	3305,5	10,21	N	11,23	14514,6	12,50	666068,9
	Latte Macchiato	9,22	N	9,71	2426,8	9,98	N	11,26	7813,3	12,53	410877,0
9,21		N	9,69	2435,6	9,96	N	11,16	15381,2	12,52	412137,3	
Ja!Natürlich	Caffe Latte	9,30	N	9,74	1153,5	9,95	N	11,29	15308,7	12,59	352471,2
		9,30	N	9,75	983,4	10,00	1626,8	11,27	13335,9	12,58	349362,7
	Cappuccino	9,29	N	9,80	2918,5	10,06	1666,6	11,26	11940,3	12,59	580829,4
		9,34	N	9,80	2166,4	10,07	2379,4	11,24	14491,0	12,58	677544,3
NÖM	Espresso	9,81	N	10,37	4216,0	10,55	N	11,35	12813,6	12,69	448808,7
		9,84	N	10,38	5407,8	10,54	N	11,39	11382,7	12,67	448483,0
	Cappuccino	9,82	17991,5	10,36	12443,4	-	ND	11,39	14189,0	12,62	377904,9
		9,80	17935,0	10,33	12437,7	-	ND	11,37	13920,9	12,62	365387,5
	Latte Macchiato	9,61	N	9,97	1017,9	10,23	N	11,04	14357,7	12,32	387218,1
		9,62	N	9,84	1573,7	10,21	N	11,03	12890,8	12,31	389596,0
PENNY TO GO	Espresso	9,24	N	9,68	3600,9	9,93	N	-	-	12,57	841673,9
		9,18	N	9,70	4209,1	9,97	N	11,26	13099,1	12,53	834361,9
	Cappuccino	9,75	56602,9	10,29	3493,2	-	ND	10,72	11299,4	12,54	626088,2
		9,56	57445,7	10,09	3128,6	-	ND	11,02	13413,9	12,34	664388,2
	Latte Macchiato Vanille	9,61	N	-	ND	9,77	ND	11,07	13000,9	12,36	585564,0
		9,63	N	-	ND	9,88	ND	11,06	14197,4	12,36	511931,1
	L.M. Caramel	9,60	N	-	ND	-	ND	11,05	16755,2	12,34	614142,4
		9,62	N	-	ND	-	ND	11,07	11985,2	12,40	626588,9
SBUDGET	Cappuccino	9,77	50214,1	10,33	2449,8	-	ND	10,72	11890,0	12,62	578228,5
		9,73	52969,4	10,36	2895,1	-	ND	10,74	12924,5	12,62	590723,6
	Latte Macchiato	9,62	N	-	ND	-	ND	11,02	10635,7	12,37	592776,0
		9,61	N	-	ND	-	ND	11,03	17981,8	12,35	645424,4
	Latte Macchiato Vanille	9,62	N	-	ND	-	ND	11,04	16513,4	12,35	557265,2
		9,62	N	-	ND	-	ND	11,07	15940,7	12,37	571543,8
	L.M. Caramel	9,62	N	10,15	N	-	ND	11,03	15217,2	12,37	636700,8
		9,66	N	10,16	N	-	ND	11,04	17815,2	12,35	591056,5
TIZIO	Espresso	9,80	N	-	ND	10,06	N	11,32	12116,0	12,65	817724,2
		9,78	N	-	ND	10,06	N	11,31	12768,9	12,58	812477,3
	Cappuccino	9,79	51435,8	-	ND	10,32	N	11,33	12965,9	12,58	632111,4
		9,78	49951,2	-	ND	10,32	N	11,34	11447,8	12,60	630714,7
	Latte Macchiato	9,78	N	-	ND	-	ND	11,24	10336,8	12,59	713377,4
		9,78	N	-	ND	-	ND	11,26	15332,1	12,56	715679,6
STARBUCKS	Seattle Latte	9,39	N	9,85	6960,3	10,16	N	10,81	12762,0	12,68	725101,2
		9,39	N	9,84	6979,5	10,11	N	10,81	13273,9	12,68	750322,4
	Caramel	9,34	N	9,85	14946,9	10,13	N	10,39	15639,1	12,67	686170,1
		9,39	N	9,86	14089,4	10,13	N	10,41	15872,1	12,67	696666,6

## 10. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten:

Name: Bianca Schmelzer  
Staatsbürgerschaft: Österreich

### Schulbildung:

10/2012 - laufend **Masterstudium der Ernährungswissenschaften** mit dem Schwerpunkt Lebensmittelqualität und -sicherheit, Universität Wien  
10/2008-05/2012 **Bakkalaureatsstudium der Ernährungswissenschaften**, Universität Wien  
10/2007 **AHS-Matura**  
09/2003 - 05/2007 Wirtschaftsgymnasium, Bruck/Leitha  
09/1998 - 06/2003 Bundesgymnasium, Neusiedl/See  
09/1994 - 06/1998 Volksschule, Parndorf

### Praktikum:

06/2013 Praktikantin, Staud's, 1160 Wien

### Erwerbstätigkeiten:

06/2009 - laufend Facility Manager, Oberwarter Siedlungsgenossenschaften, 7111 Parndorf  
08/2007 - 01/2009 Verkäuferin (Aushilfskraft), Hallhuber, 7111 Parndorf  
07/2007 Verkäuferin (Aushilfskraft), Reebok, 7111 Parndorf  
08/2004 Ferialpraktikantin, René Lezard, 7111 Parndorf