



1 Einleitung und Zielsetzung

Kaffee ist mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 149 L pro Person und Jahr das beliebteste Getränk der Deutschen und liegt damit deutlich vor Mineralwasser und Bier (135 bzw. 107 L/p.P.). Die Beliebtheit von Kaffee in Deutschland ist, obwohl leicht rückläufig (2001: 160 L/p.P.), seit gut 10 Jahren ungebrochen. Ein deutlicher Wandel ist im Konsumverhalten der Verbraucher festzustellen, der Verbrauch an traditionellem Röstkaffee ist von 2011 zu 2012 um ca. 9300 t zurückgegangen. Im gleichen Zeitraum stieg jedoch der Verbrauch an Espresso, Caffé Crema und Einzelportionen deutlich an. Dies zeigt die immer stärkere Beliebtheit der einfachen und schnellen Zubereitung von Kaffee, sowie die Veränderung der geschmacklichen Anforderung des Verbrauchers an das Kaffeegetränk von der früher beliebten „feinen Säure“ zu heute Bitterkeit betonten dunkleren Röstungen. Durch den hohen Verbrauch und die daraus resultierenden Importe (2011: 1,1 Mio./t) zeigt sich auch die große wirtschaftliche Bedeutung des Kaffees in Deutschland. Da Deutschland eines der wenigen Länder in der EU ist, das zusätzlich zur Mehrwertsteuer (7 %) eine Kaffeesteuer in Höhe von 2,19 €/kg Röst- und 4,78 €/kg löslichen Kaffee erhebt, sind auch die Einnahmen des Staates durch die Kaffeewirtschaft nicht unerheblich (Deutscher Kaffeeverband, 2012; International Coffee Organization, 2012).

Durch den hohen Konsum an Kaffee kommt diesem eine besondere ernährungsphysiologische Bedeutung in Bezug auf phenolische Verbindungen zu, da mit einer Tasse Arabica Kaffee (200 mL) 70 - 200 mg Chlorogensäuren aufgenommen werden. Darin nicht enthalten sind Chlorogensäurelactone und andere Zimtsäurederivate (z.B. Caffeoyltryptophan), die in nicht unerheblichen Mengen in Kaffee vorhanden sind (Clifford, 1999). Die durch die hohe Aufnahme möglichen positiven und negativen gesundheitlichen Effekte sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Studien. Von besonderem Interesse sind dabei die positiven Wirkungen des Kaffeegetränks und der Chlorogensäuren in Bezug auf Diabetes Mellitus Typ 2, Parkinson und Lebererkrankungen (Higdon & Frei, 2006; Ranheim & Halvorsen, 2005; Johnston et al., 2003). Weitere Untersuchungen sind zur Bioverfügbarkeit und dem antioxidativen Potential von Chlorogensäuren durchgeführt worden (Del Rio et al., 2010; Nardini et al., 2002; Iwai et al., 2004). Im Focus der Untersuchungen standen dabei fast ausschließlich die mengenmäßig am stärksten vertretenen Chlorogensäuren wie 3-, 4- und 5-CQA sowie die diCQA. Von den heute über 60 in grünem Robusta bekannten Chlorogensäuren und Aminokonjugaten wie Caffeoyl- und Cumaroyltryptophan ist der größte Teil bisher nicht isoliert bzw. auf eine mögliche Bioaktivität untersucht worden (Clifford & Knight, 2004; Jaiswal et al., 2010). Gleiches gilt für die während des Röstvorgangs entstehenden Chlorogensäurelactone, die für ihren Beitrag zur Bitterkeit des Kaffees bekannt sind (Ginz, 2001; Blumberg, 2012), bisher aber nur in



geringem Umfang auf ihre Bioaktivität untersucht wurden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen Wechselwirkungen der Chlorogensäurelactone mit dem Opioid-Rezeptor bei Mäusen, der Steigerung der Insulinausschüttung bei Ratten und eine in-vitro neuroprotektive Wirkung (de Paulis et al., 2004; Shearer et al., 2003; Chu et al., 2009).

Bisher ist die countercurrent chromatography (CCC) nur in geringem Umfang zur Fraktionierung von Chlorogensäuren aus Kaffee eingesetzt worden (Romero-Gonzalez & Verpoorte, 2009). Scharnhop (2007) nutzte diese Technik zur Isolierung von Diterpenen und Bitterstofffraktionierung aus Röstkaffee. Auf Grund der sich in vielen Studien andeutenden Bioaktivität der Chlorogensäuren und ihrer Derivate, sowie der schlechten kommerziellen Verfügbarkeit von Standardsubstanzen, ist ein Ziel dieser Arbeit, gegenstromverteilungschromatographische Systeme zur Anreicherung und Isolierung von Chlorogensäuren und -lactonen aus Roh- und Röstkaffee zu entwickeln. Ein besonderer Schwerpunkt soll dabei auf der Anreicherung von bisher nur mittels LC-MSⁿ charakterisierten Substanzen liegen (Clifford et al., 2003; Jaiswal et al., 2010), um diese möglichst zu isolieren und eine Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente zu ermöglichen. Eingesetzt werden sollen dabei HSCCC, pH-zone-refining CCC, LSRCCC und SCCCC.

Zur Untersuchung des Rohkaffees auf seine Chlorogensäureverteilung soll ein einfaches und schnelles Extraktionsverfahren und ein RP-HPLC-System entwickelt werden, das es ermöglicht, die große Varietät der Chlorogensäuren in Rohkaffee zu trennen.

Isolierte Substanzen sollen mittels TEAC-Assay auf ihr antioxidatives Potential untersucht werden.



2 Grundlagen

2.1 Kaffee

Die Kaffeepflanze gehört zur Familie der Rubiaceae oder Rötengewächse und hat ihren Ursprung in Afrika. Zur botanischen Ordnung der Rubiaceae gehören ca. 500 Gattungen mit mehr als 6000 Arten. Die Pflanzen der Gattung *Coffea* sind überwiegend mehrjährige Sträucher und Bäume (Abb. 1).

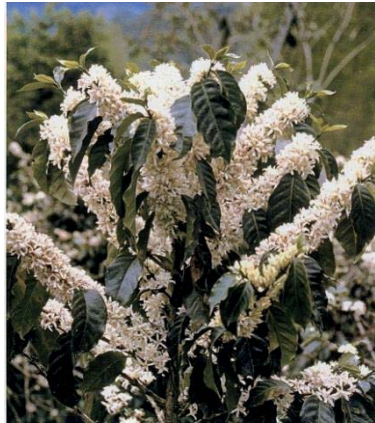


Abb. 1: Blühender Kaffeestrauch (Rotzoll & Müller, 2004)

Von den 80 bekannten *Coffea*-Arten sind jedoch nur zwei für den weltweiten Kaffeehandel von Bedeutung: *Coffea arabica* und *Coffea canephora* var. *Robusta*, diese decken 60 bzw. 40 % der Weltkaffeeerzeugung (Clifford & Willson, 1985; Rotzoll & Müller, 2004; Rothfos & Lange, 2005). Die Kaffeeproduktion findet in tropischen Regionen mit Durchschnittstemperaturen von 18 - 25 °C im Bereich des 23. Grad nördlicher und 25. Grad südlicher Breite statt, wobei *Robusta* kälteempfindlicher ist und häufig im Flachland kultiviert wird. Die Produktion des Arabica Kaffees erfolgt dagegen bis in Höhen von 1200 m. Um den hohen Wasserbedarf der Kaffeepflanze zu decken, sollte in den Anbauregionen die Jahresniederschlagsmenge zwischen 1500 und 2000 mm liegen (Rotzoll & Müller, 2004). Der immergrüne Kaffeebaum kann Höhen von 6 - 10 m erreichen, wird jedoch in den Plantagen zur Erleichterung der Ernte in Strauchform geschnitten. Der Kaffeebaum beginnt nach ca. 4 - 6 Jahren zu tragen und erreicht sein Ertragsmaximum nach 10-15 Jahren (Rothfos & Lange, 2005). Nach der Blüte benötigt die Kaffeekirsche eine sortenabhängige Reifezeit von sechs bis vierzehn Monaten, bis sich die Kaffeekirsche von grün über gelb zum erntereifen rot verfärbt (Rotzoll & Müller, 2004). Die rote Farbe der reifen Kaffeekirsche wird durch Anthocyane hervorgerufen (Scharnhop, 2007). Die Kaffeekirsche enthält zwei Kaffeebohnen, die mit ihrer flachen Seite aneinander liegen. Die Bohnen werden von der Silber- und Pergamenthaut umgeben und liegen in einem weichen, weißen bis gelblichen



Fruchtfleisch (Pulpe), das sehr zuckerhaltig ist und wiederum von der roten Kirschhaut umschlossen ist (Abb. 2) (Rotzoll & Müller, 2004).

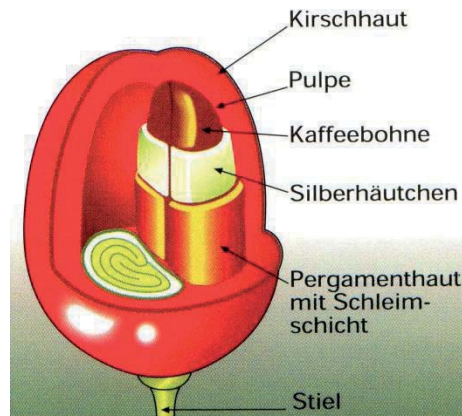


Abb. 2: Aufbau der Kaffeekirsche (Rotzoll & Müller, 2004)

2.1.1 Rohkaffee

Die Ernte der reifen Kaffeekirschen erfolgt je nach Anbaugebiet in zwei unterschiedlichen Verfahren, dem picking oder stripping. Das picking wird in Ländern mit geringen Lohnkosten oder bei hochwertigen Kaffees (gewaschene Kaffees) praktiziert. Dabei werden manuell nur vollständig reife Kaffeekirschen gepflückt und in der Regel der nassen Aufbereitung zugeführt. Das stripping bezeichnet das vollständige Abstreifen aller Kaffeekirschen, unabhängig vom Reifegrad. Hierbei wird sowohl die manuelle als auch maschinelle Ernte durchgeführt. Das maschinelle stripping ist das typische Ernteverfahren auf den Großplantagen in Brasilien. Bei diesem Ernteverfahren schließt sich auf Grund der unterschiedlich reifen Bohnen eine trockene Aufarbeitung an. Zur trockenen Aufarbeitung werden die Kaffeekirschen auf Trocknungsflächen (z.B. Betonterrassen) ausgebreitet und durch Sonneneinstrahlung getrocknet, auch maschinelle Trocknung ist möglich. An die Trocknung schließt sich das maschinelle Schälen (entfernen von Pulpe und Silberhaut) und die Sortierung an (vgl. Abb. 3). Die nasse Aufbereitung ist für Kaffeeanbauregionen entwickelt worden, in denen eine ausreichende Sonneneinstrahlung zur Trocknung nicht immer vorhanden ist. Eine Grundvoraussetzung für die nasse Aufbereitung sind vollständig reife Kaffeekirschen (Ernteverfahren: „picking“), diese werden in Wassertanks oder Schwemmkanälen nochmals vorsortiert. Danach folgt das maschinelle Abquetschen (Entpulpen) der Kaffeebohnen vom Fruchtfleisch in „Entpulpern“. Die Bohnen sind nach der Entpulperung noch von einer Schleimschicht und der Pergamenthaut umgeben und werden in Fermentationsbehältern einem 12 - 36 stündigen Gärprozess unterworfen. Dabei bewirken kaffeeeigene Enzyme die Ablösung bzw. Abwaschbarkeit des Restschleims von der

Pergamenthaut. Das Abwaschen des Restschleims erfolgt in Waschtanks bzw. -kanälen. An den Waschvorgang schließt sich die Trocknung auf Horden, Terrassen oder in Trockenöfen an. Die nasse Aufbereitung benötigt 130 - 150 L frisches Wasser für die Herstellung von 1 kg Rohkaffee (Rotzoll & Müller, 2004; Rothfos & Lange, 2005).

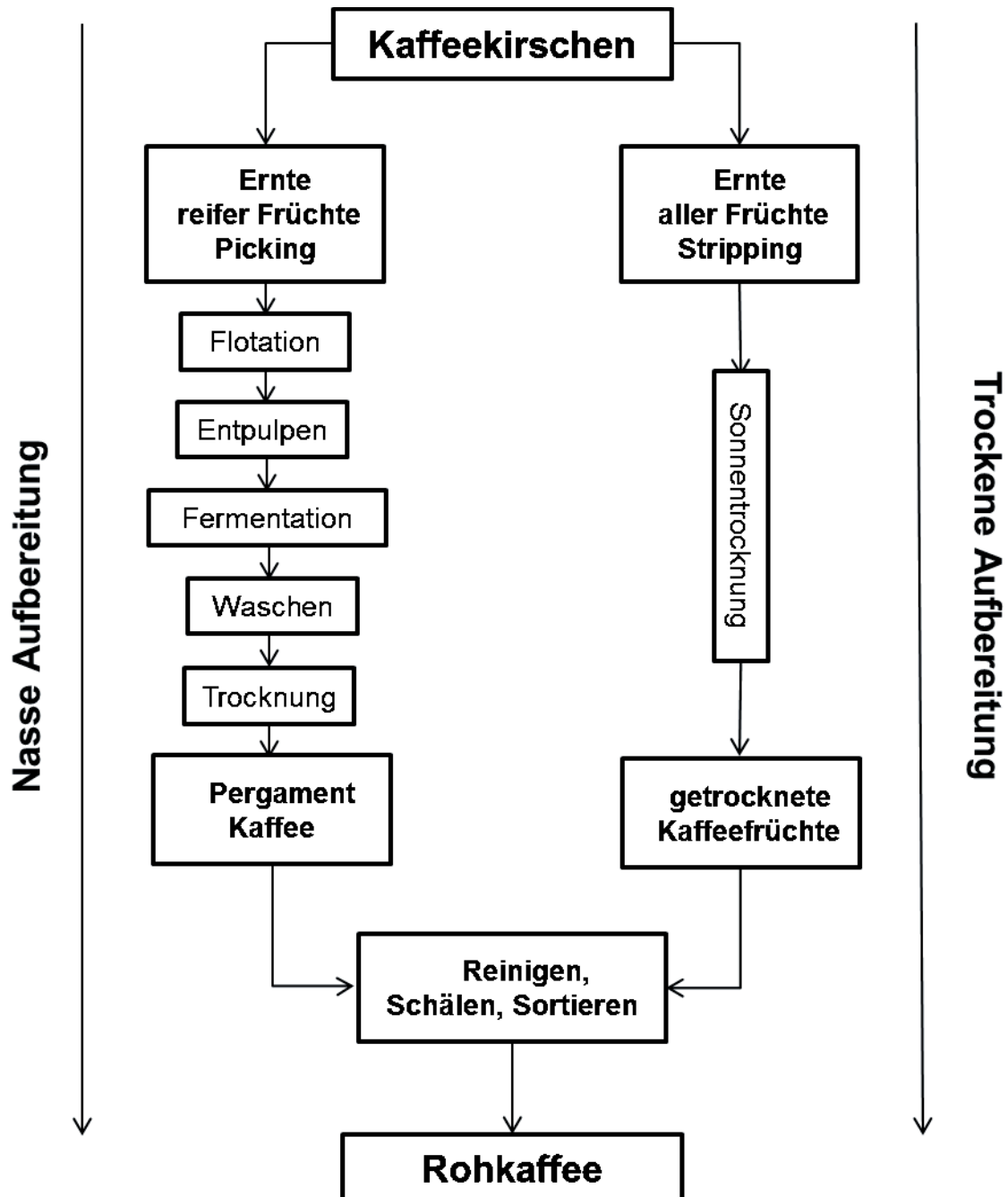


Abb. 3: Schema der nassen und trockenen Kaffeeaufbereitung (verändert nach Rothfos & Lange, 2005)

Der Einfluss der nassen und trockenen Aufarbeitungsmethode auf die chemische Zusammensetzung des Rohkaffees wurde von Balyaya und Clifford (1995) für Arabica und



Robusta eines gleichen indischen Anbaugebiets untersucht. Es zeigte sich, dass nass aufgearbeitete Arabica höhere Chlorogensäuregehalte aufweisen, als trocken aufbereitete. Bei Robustas verhielt sich der Chlorogensäuregehalt umgekehrt. Geringen Einfluss hat die Aufarbeitungsmethode auf den Koffeingehalt. Knopp et al. (2006) zeigten mit ihren Untersuchungen, dass der Gehalt an Fructose und Glucose in gewaschenem Arabica deutlich niedriger ist als in ungewaschenem und dadurch Rückschlüsse auf den Bearbeitungsprozess möglich sind. Die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen Arabica und Robusta sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung von Rohkaffee (verändert nach Belitz et al. 2008)

Bestandteil^a	Arabica	Robusta
Lösliche Kohlenhydrate	9-12,5	6-11,5
Unlösliche Polysaccharide	46-53	34-44
Nichtflüchtige Säuren	2-2,9	1,3-2,2
Chlorogensäuren	6,7-9,2	7,1-12,1
Lipide	15-18	8-12
Proteine	8,5-12	8,5-12
Koffein	0,8-1,4	1,7-4,0
Mineralstoffe	3-5	3-5

^a Werte in % der Trockenmasse

2.1.2 Röstkaffee

Die Röstung des Rohkaffees bei Temperaturen von 180 - 300 °C führt zu starken Veränderungen der chemischen Zusammensetzung der Kaffeebohnen. Besonders kennzeichnend für den Röstvorgang ist die Ausbildung des typischen Röstaromas der Kaffeebohnen. Während der Röstung unterscheidet man vier Hauptphasen: Trocknung, Entwicklung, Zersetzung und Vollröstung. Der Anfang der Röstung ist durch das Gerinnen von Eiweiß und die Verdampfung von Wasser bestimmt, ab 100 °C bräunt sich die Bohne und organische Substanzen werden thermisch zersetzt, wodurch ab 150 °C Wasserdampf, CO₂ und CO freierwerden und das Volumen der Bohne stark vergrößern. Beim weiteren Temperaturanstieg erfolgt die Zersetzung, die durch das Auftreten bläulichen Rauchs und des Kaffeearomas gekennzeichnet ist (180 - 200 °C). Abschließend wird bei der Vollröstung eine Karamellbildung erreicht und der Wassergehalt der Bohnen ist auf 1,5 - 3 % gesunken. An die Röstung schließt sich eine Kühlphase an, in der die Bohnen mit Wasserdampf oder im Luftstrom abgekühlt werden (Belitz et al., 2008). Bei der Röstung ist die Wärmeübertragung sowohl durch Kontakt als auch durch Konvektion möglich, die Konvektionsröstung gewinnt jedoch immer stärker an Bedeutung, da der Wärmeübergang auf das Röstgut gleichmäßiger



ist und die Röstzeit verkürzt wird. Die gängigen Röstverfahren in Trommel- oder Fließbettröstern können in kontinuierlichem oder Chargenbetrieb erfolgen (Rotzoll & Müller, 2004).

Chemisch erfolgen während der Röstung zahlreiche Abbau und Umwandlungsprozesse, Chlorogensäuren werden durch Wasserabspaltung und intramolekulare Veresterung zu Chlorogensäurelactonen (Chiniden) umgesetzt. Proteine bilden durch die thermische Belastung Diketopiperazine, die wie die Chlorogensäurelactone einen Beitrag zur Bitterkeit des Kaffees leisten (Ginz, 2001). Der bekannteste Bitterstoff des Kaffees, das Koffein, wird durch die Röstung nur in geringem Umfang abgebaut. Ebenfalls nur geringe Veränderungen durchläuft die Lipidfraktion des Kaffees. Ein deutlicher Abbau findet durch Maillard-Reaktion und Karamellisierung bei den Kohlenhydraten statt, durch die Melanoidine mit Molekülmassen von 3 - 100 kDa entstehen und zur braunen Farbe des Röstkaffees beitragen (Belitz et al., 2008; Rothfos & Lange, 2005). Melanoidinen wird eine positive gesundheitliche Wirkung zugesprochen, die nicht nur durch ihr antioxidatives Potential verursacht wird, sondern auch probiotische Wirkungen beinhaltet (Morales et al., 2010). Durch die Röstung wird das typische Kaffeearoma gebildet, welches von Heterocyclen (Furane, Lactone, Pyrrole uvm.) bestimmt wird und sehr komplex zusammengesetzt ist. Bis heute konnten über 800 flüchtige Aromastoffe in Kaffee identifiziert werden. Die Vorstufen für die Aromastoffe sind hauptsächlich Saccharide und Aminosäuren, Chlorogensäuren sind nur in geringem Umfang beteiligt. Das Kaffeearoma ist nicht stabil und geht durch Oxidation schnell verloren. Gemahlener Röstkaffee wird daher unter Luftabschluss oder Schutzgasatmosphäre verpackt (Belitz et al., 2008)

Tab. 2: Zusammensetzung von Röstkaffee mittlerer Röstung (verändert nach Belitz et al., 2008)

Komponente^a	Arabica	Robusta
Koffein	1,3	2,4
Lipide	17	11
Protein	10	10
Kohlenhydrate	38	41,5
Aliphatische Säuren	2,4	2,5
Chlorogensäuren	2,7	3,1
Flüchtige Verbindungen	0,1	0,1
Melanoidine	23	23

^a Werte in % der Trockenmasse



2.2 Chlorogensäuren

Chlorogensäuren sind sekundäre Pflanzenstoffe und werden der Gruppe der Polyphenole (Untergruppe: Hydroxyzimtsäurederivate, vgl. Abb. 4) zugeordnet. Der Begriff der Polyphenole wird in der Literatur uneinheitlich verwendet. Clifford (2001) definiert Verbindungen als Polyphenole, die an wenigstens zwei aromatischen Ringen mindestens eine Hydroxylgruppe tragen. Unter diese Definition würden z.B. diCQAs, jedoch nicht die einfachen Chlorogensäuren fallen. Eine weitere Einteilung der Polyphenole ist in Abb. 4 dargestellt.

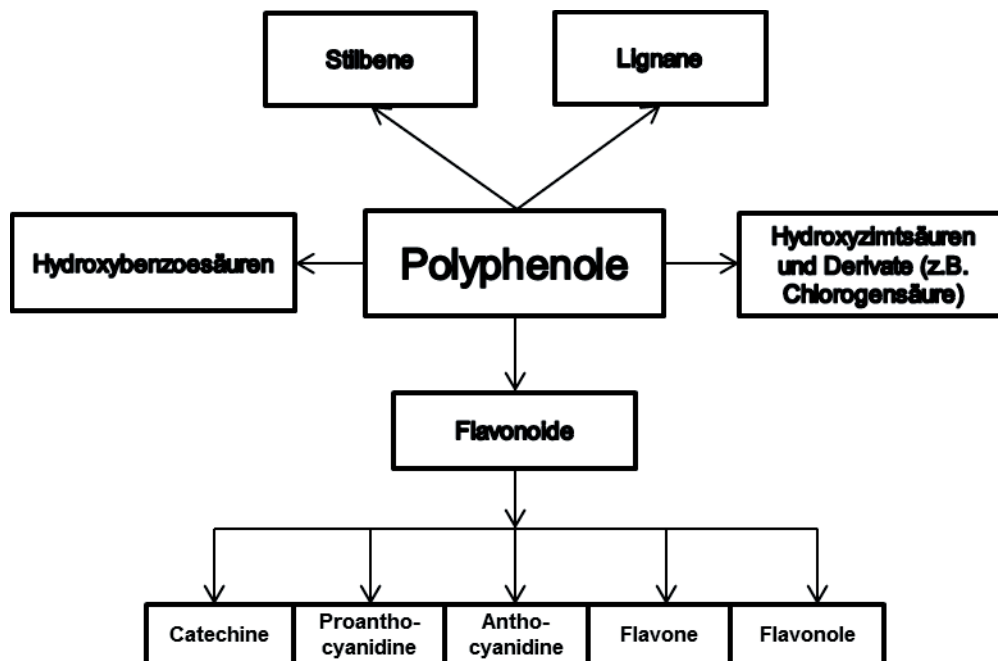


Abb. 4: Einteilung der pflanzlichen Polyphenole (nach Manach et al., 2004)

Die wahrscheinlich früheste Erwähnung von Chlorogensäuren wird Robiquet und Boutron im Jahr 1837 zugeschrieben. Die Bezeichnung Chlorogensäure wird erst 1846 durch Payen eingeführt. Die Namensgebung ist dabei wahrscheinlich auf die Reaktion der Chlorogensäuren mit Eisenchlorid zurückzuführen, die ein grünes Pigment ergibt und in dem Artikel erwähnt wird. Die Strukturelemente Kaffeesäure und Chinasäure (Abb. 5) werden erst im Jahr 1932 durch Fischer und Dangschat für die Chlorogensäure beschrieben (Kuhnert et al., 2012; Clifford, 1999). Mittlerweile steht die Bezeichnung „Chlorogensäuren“ für eine Strukturklasse, die aus Estern (Depsiden) von verschiedenen Zimtsäurederivaten (z.B. Kaffee-, *p*-Cumar- und Ferulasäure) mit Chinasäure besteht und sich nicht ausschließlich auf die Mono-Ester der Kaffeesäure bezieht, sondern auch Di-, Tri- und Mischester wie Feruloylcaffeoylchinasäuren einschließt.

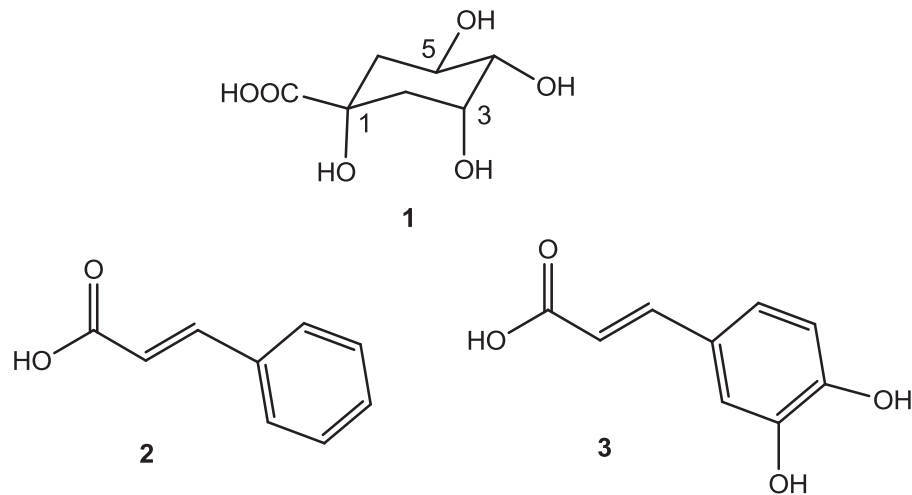


Abb. 5 : Struktur von China- (1), Zimt- (2) und Kaffeesäure (3)

In einigen Veröffentlichungen werden auch andere Konjugate von Zimtsäurederivaten mit Aminosäuren (z.B. Caffeoyltryptophan), Zuckern (z.B. Caffeoylglucose) und organischen Säuren (z.B. Caffeoylmalat) zu den Chlorogensäuren gezählt (Rothfos & Lange, 2005). Clifford (2000) teilt die Gruppe der Zimtsäurederivate in Chlorogensäuren (Ester der Chinasäure mit Zimtsäuren) und andere (z.B. Ester mit Aminosäuren oder Zuckern).

In hohen Mengen sind sie in Kaffee, Kirschen, Blaubeeren und Kartoffeln vorhanden (vgl.Tab. 3).

Tab. 3: Gehalte an Chlorogensäuren in ausgewählten Pflanzen (verändert nach Kuhnert, 2012)

Pflanze/ Frucht	Menge g/kg
Kaffee	50-100
Apfel	0,06-0,38
Blaubeere	0,5-2
Kirschen	0,15-0,6
Kartoffeln	0,5-1,2
Aubergine	0,6
Reis	12

Für die Pflanzen haben Chlorogensäuren mehrere Funktionen, so wird ihre Bildung durch biotischen (Schadorganismen) und abiotischen Stress (UV-Licht, Temperatur, Nährstoffe usw.) gefördert, dies deutet auf Schutzfunktionen gegen Fraßfeinde, mikrobielle Infektionen und schädliche UV-Strahlung hin (Phytoalexine). Außerdem sind Chlorogensäuren durch ihre phenolische Struktur in der Lage, Radikale und oxidierende Substanzen abzufangen

(Rothfos & Lange, 2005). In der Kaffeepflanze scheinen die CQAs durch Komplexbildung eine entscheidende Rolle für die Bildung und Bindung von Purinalkaloiden in der Zelle zu spielen (Mösli Waldhauser & Baumann, 1996). Chlorogensäuren stellen außerdem eine Vorstufe in der Ligninsynthese verschiedener Pflanzen dar (Lallemand et al., 2012; Lepelley et al., 2007).

2.2.1 Chlorogensäuren des Kaffees

Rohkaffee ist mit einem Chlorogensäuregehalt von bis zu 12 % der Trockenmasse (Robusta) die reichste Quelle an Chlorogensäuren. Auch nach Abbau während der Röstung ist das Kaffeetränk mit 20 - 675 mg/200 mL CQA bei Kaffeetrinkern die bedeutendste Quelle für diese Substanzgruppe (Kuhnert et al., 2012; Belitz et al., 2008). Die Untersuchung und Charakterisierung der Chlorogensäuren des Kaffees hat in den letzten Jahrzehnten durch die Einführung moderner LC-MSⁿ Kopplungstechniken große Fortschritte gemacht. Im Jahr 1979 beschreibt Clifford für Rohkaffee 13 Chlorogensäureisomere in fünf Untergruppen, im Jahr 2010 werden 45 CQA in Arabica und über 60 in Robusta Rohkaffee (16 Untergruppen) identifiziert. Bei den meisten Verbindungen handelt es sich jedoch um Minor Komponenten, die bisher nur mittels LC-MSⁿ charakterisiert sind (Jaiswal et al., 2010). Die mengenmäßig am stärksten in Kaffee vertretenen Chlorogensäuren sind die Mono-Ester der Kaffeesäure mit Chinasäure (vgl. Abb. 6), wobei in Kaffee nur die Positionen 3-, 4- und 5- der Chinasäure verestert sind. Weitere Major-Chlorogensäuren sind die Feruloylchinasäuren und Dicaffeoylchinasäuren (vgl. Abb. 7). Eine Veresterung der Position 1 kommt in Kaffee nicht vor (Kuhnert et al., 2012; Clifford et al., 2003).

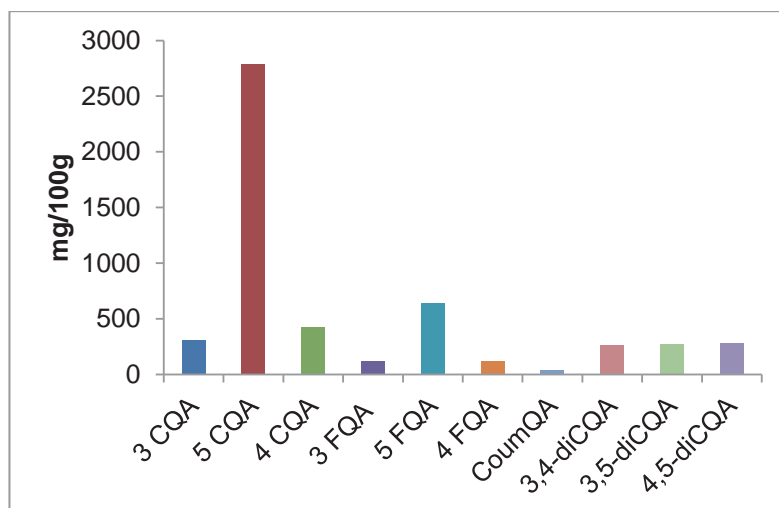


Abb. 6: Gehalte an Chlorogensäuren in Tanzania Robusta Rohkaffee