

Method validation and determination of caffeine in drinks in the Iranian market by the HPLC

Hamide Sharifi Darani ¹, Parisa Ziarati ^{2,3}, Mahboubeh Taherkhani ⁴, Zahra Mousavi ⁵

¹PharmD Student, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

²Nutrition and Food Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Assistant Professor, Medicinal Chemistry Department, Pharmacy Faculty, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Chemistry, College of Sciences, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran

⁵Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

Abstract

Background: Caffeinated energy drinks are common drinks among athletes and general population that have benefits such as providing quick energy, reducing fatigue and creating alertness, but can lead to serious complications in patients, especially those who have cancer and mental, cardiovascular, or renal diseases. The aim of this study was to validate the quantitative analysis and determine caffeine in 10 caffeine-containing drink samples from Tehran markets using high efficiency liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods: In this study, first the HPLC method was validated using the sample standard. Then the amount of caffeine in 10 samples of drinks was evaluated.

Results: The calibration curve of caffeine was linear in the range of 2-200 ppm and its correlation coefficient was 0.997. The limits of detection and quantification (LOQ and LOD) were 44.65 and 13.39 µg/mL respectively. After validating the method, 10 drink samples collected from Tehran were tested for caffeine content. Comparing the results with international standards showed that the caffeine value of these beverages was lower than the standard.

Conclusion: This method has the accuracy and efficiency in measuring the caffeine of beverages. Comparing with international standards, the amount of caffeine in the beverages is lower than the standard. Due to the increased consumption of these drinks in the country, measuring caffeine at different times is essential.

Keywords: Caffeinated drinks, High efficiency liquid chromatography, Method validation, Caffeine value.

Cited as: Sharifi Darani H, Ziarati P, Taherkhani M, Mousavi Z. Method validation and determination of caffeine in drinks in the Iranian market by the HPLC. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): 425-431.

Correspondence to: Zahra Mousavi

Tel: +98 9125081304

E-mail: mosavi50@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0001-6524-491X

Received: 14 Oct 2019; **Accepted:** 13 Jun 2020

اعتبار سنجی روش و اندازه‌گیری کافئین موجود در نوشیدنی‌های بازار ایران به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

حمیده شریفی دارانی^۱، پریسا زیارتی^۲، محبوبه طاهرخانی^۴، سیده زهرا موسوی^۵

^۱ دانش آموخته دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳ استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۴ استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، تاکستان، ایران
^۵ دانشیار سم شناسی، گروه فارماکولوژی-سم شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نوشیدنی‌های انرژی‌زا و حاوی کافئین از جمله نوشیدنی‌های رایج توسط ورزشکاران و عموم مردم هستند که فوایدی نظیر فراهم کردن سریع انرژی، کاهش خستگی و ایجاد هوشیاری دارند، اما می‌توانند منجر به عوارض جدی در افراد بیمار، به ویژه مبتلایان به بیماری‌های روانی، قلبی و عروقی، سرطان و کلیوی شوند. هدف این مطالعه معتبرسازی روش آنالیز کمی و تعیین سطح کافئین نوشیدنی‌های موجود در سطح شهر تهران با استفاده از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) بود. روش بررسی: در این مطالعه، ابتدا معتبرسازی روش HPLC با استفاده از استاندارد نمونه انجام گرفت. سپس میزان کافئین موجود در ۱۰ نمونه از نوشیدنی‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: منحنی کالیبراسیون برای استاندارد کافئین در محدوده ۲۰-۲۰۰ ppm خطی و ضریب همبستگی آن ۰/۹۹۷ بود. با بررسی انجام شده حدود تعیین مقدار (LOQ) ۴۴/۶۵ µg/mL و حدود شناسایی (LOD) ۱۳/۳۹ µg/mL محاسبه شد. پس از اعتبارسنجی روش، ۱۰ نمونه نوشیدنی جمع آوری شده از سطح شهر تهران از نظر میزان کافئین مورد آزمایش قرار گرفت که میزان کافئین این نمونه‌ها کمتر از حد استاندارد بود.

نتیجه‌گیری: این روش در اندازه‌گیری کافئین نوشیدنی‌ها از دقت و کارایی لازم برخوردار است و مقایسه نتایج حاصل با استانداردهای بین‌المللی نشان می‌دهد که میزان کافئین این نوشیدنی‌ها پایین‌تر از حد استاندارد است. با توجه به افزایش مصرف این نوشیدنی‌ها در کشور، اندازه‌گیری میزان کافئین در مقاطع زمانی مختلف امری ضروری محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: نوشیدنی کافئین‌دار، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تعیین مقدار، اعتبارسنجی.

مقدمه

نوشیدنی‌هایی از جمله قهوه، چای، نوشیدنی‌های انرژی‌زا و شکلات به شمار می‌رود (۳)، آلکالوئید پورینی محلول در آب با وزن مولکولی ۱۹۴/۱۹ g/mol از خانواده متیل‌گزانتین‌هاست که خواص آن به تثویلین و تئوبرومین شبیه است. این ماده به طور عمده از گیاهی به نام کافئا عربیکا به دست می‌آید (۴)، (۵). این ماده در ترکیباتی از جمله چای، قهوه، شکلات و برخی داروها (مسکن‌ها، تقویت‌کننده‌ها) یافت می‌شود (۶). غلظت

کافئین پودر سفید کریستالی بدون بو و تلخ مزه (۱) با نام شیمیایی ۱،۳،۷-تری متیل‌گزانتین (۲) که از اجزای اصلی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه فارماکولوژی-سم شناسی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، سیده زهرا موسوی (email: mosavi50@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0001-6524-491X
تاریخ دریافت مقاله: ۹۸۷/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۰/۲۳

پلاسمایی کافئین ۱۲۰-۳۰ دقیقه بعد از مصرف خوراکی آن است و نیمه عمر آن ۳ تا ۶ ساعت است (۷، ۸).

کافئین به عنوان یک داروی طبیعی برای تحریک سیستم اعصاب مرکزی و متابولیک عمل می‌کند و از جمله اثرات آن می‌توان به تحریک سیستم عصبی، دیورز، ترشح اسید معده (۳، ۹) و اثرات مثبتی از جمله پیشگیری از بیماری‌های ریوی و اختلالات متابولیک (۱۰)، درمان خواب آلودگی و کاهش خستگی جسمانی (۱۱) و در برخی موارد ارتباط با شناخت بهتر و بهبود عملکرد ورزشی (۱۲، ۱۳) اشاره کرد. همچنین نتایج برخی تحقیقات حاکی از آن است که مصرف ترکیبات کافئینی از طریق بلوکه کردن گیرنده‌های آدنوزینی (۶) افزایش سنتز آنزیم‌های آنتی اکسایشی (۷) و کاهش تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد (۱۴) می‌تواند از بروز استرس متابولیکی و پاسخ‌های اکسایشی-التهابی بکاهد (۱۵). در کل به نظر می‌رسد که کافئین اعمال ضد التهابی و محافظت‌کنندگی خود را از طریق مهار گیرنده‌های آدنوزینی به ویژه گیرنده‌های A2a، مخالفت قوی با آنزیم‌های گروه نوکلئوتید فسفودی استراز و افزایش تولید پیام آور درون سلولی آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP: Cyclic adenosine monophosphate) که باعث فعال کردن مسیر تولید پروتئین کیناز A2 (Protein kinase A) و تحریک مسیر ضدالتهابی cAMP/PKA شده انجام می‌دهد و در ادامه منجر به کاهش کموتاکسی، حرکت، چسبندگی و فعالیت انواع سلول‌های التهابی شامل سلول‌های T کشنده، لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها می‌شود (۱۶).

از جمله اثرات منفی کافئین می‌توان به بی‌اشتهایی، افزایش فشارخون، اضطراب ناگهانی، افزایش اسید معده، اختلالات روده‌ای و بی‌خوابی اشاره کرد. دفع آب و سدیم در نوشیدنی‌های انرژی‌زا گزارش شده است که این عوارض به طور عمده مربوط به وجود کافئین در این نوشیدنی‌ها است (۱۷). این اثرات با مصرف الکل و سیگار شدت می‌یابد، چنان که حمله صرعی در خصوص مصرف نوشیدنی‌های انرژی‌زا همزمان با الکل گزارش شده است (۱۸، ۱۹). کافئین در دوزهای بالا به شدت سمی است و سبب علائم بسیاری مانند آریتمی، تاکیکاردی، استفراغ، اضطراب، رعشه، مشکلات گوارشی، تشنج، اغما و مرگ می‌شود (۲۰). در مصرف کافئین، سردرد، خستگی و درد عضلانی مشاهده شده است که این علائم می‌تواند در طول ۲۴ ساعت پس از آخرین میزان مصرف کافئین اتفاق بیافتد (۲۱). استفاده طولانی مدت از کافئین سبب به هم زدن الگوی خواب، افزایش فشار خون، وابستگی

فیزیولوژیکی و تشدید اختلالات روانی می‌شود. مقدار مصرف کافئین کمتر از ۴۰۰mg در روز پیشنهاد شده است (۲۲). مقدار کافئین در نوشیدنی‌های غیرالکلی طبق قانون سازمان غذا و دارو آمریکا (Food and Drug Administration: FDA) نباید بیشتر از ۶ mg/oz یا ۲۰۰ppm باشد (۲۳). طبق استاندارد ملی مقدار کافئین در نوشابه‌های انرژی‌زا و گازدار نباید به ترتیب بیشتر از ۳۲۰ ppm و ۱۰۰ ppm باشد.

میزان دریافت روزانه قابل قبول برای کافئین در افراد بزرگسال ۴۰۰mg/day (حدود ۵/۷ mg/kgbw/day)، در افراد باردار ۲۰۰mg/day، در مادران شیرده ۰/۳mg/kgbw/day و در کودکان ۳ mg/kgbw/day ذکر شده است (۲۴).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روشی مناسب جهت جداسازی، اندازه‌گیری، و تعیین نوع مواد است. این تکنیک با تلفیق با روش‌های دیگر و آشکارسازهای پیشرفته کاربردهای زیادی در علوم مختلف دارد. هدف ما در این پروژه استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای اندازه‌گیری کافئین نوشیدنی‌های موجود در بازار بود.

مواد و روشها

مواد و تجهیزات مورد استفاده

مواد شیمیایی: استاندارد کافئین، متانول HPLC grade مرک، آب دیونیزه، ۱۰ نمونه از نوشیدنی‌های غیرالکلی
-تجهیزات: دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت Younglin، مدل YL9100

آماده سازی استاندارد

جهت تهیه استاندارد کافئین، ابتدا ۰/۱ گرم پودر کافئین خالص با استفاده از آب بدون یون، در یک بالون ۱۰۰ میلی‌لیتر به حجم رسانده شد و غلظت ۱۰۰۰ mg/L به دست آمد. سپس غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ mg/L از کافئین توسط رقیق سازی محلول ۱۰۰۰ mg/L با آب بدون یون تهیه شد. رقت‌های تهیه شده، هرکدام ۳ مرتبه به دستگاه تزریق و با استفاده از میانگین حاصل شده، توسط نرم افزار اکسل نمودار مورد نظر رسم شد.

آماده سازی نمونه

میزان ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه، به وسیله آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد تا گازهای موجود در آن خارج شود. سپس هریک به وسیله فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد و با حجم ۵۰

دقت: نتایج تکرارپذیری در سه روز متوالی به صورت میانگین \pm انحراف معیار و درصد انحراف نسبی داده‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

غلظت کافئین در نوشیدنی‌ها

در جدول ۳ نتایج روش HPLC در نمونه‌های مختلف نوشیدنی‌ها نشان داده شده است.

میزان دریافت تخمینی روزانه

با توجه به سرانه مصرف ۴۲ لیتر نوشابه در سال و ۰/۱ کیلوگرم قهوه در سال (۳۰) در یک فرد بالغ ۶۰ کیلوگرمی، میزان متوسط دریافت روزانه کافئین از مصرف نوشابه و قهوه مطابق با فرمول ارائه شده محاسبه و مقادیر با میزان دریافت روزانه قابل قبول مقایسه شده است و شاخص خطر (HI) محاسبه شد.

(مجموع آلودگی نمونه‌های آلوده) + (تعداد نمونه‌های غیر آلوده) \times LOQ

تعداد کل نمونه‌های آنالیز شده

$$EDI = \frac{\text{میانگین آلودگی} \times \text{سرانه مصرف}}{\text{میانگین وزن یک فرد بالغ}}$$

بحث

کافئین آلکالوئیدی طبیعی است و از اجزای اصلی نوشیدنی‌هایی مانند قهوه و چای و نیز شکلات و ... به شمار می‌رود. متوسط مصرف کافئین در انسان در محدوده ۸۰ تا ۴۰۰ میلی گرم/روز به ازای هر فرد است. کافئین می‌تواند بر کیفیت و کمیت خواب اثرگذار باشد. اثرات قطع مصرف کافئین در انسان، سردرد، خستگی و خواب آلودگی است. کافئین به عنوان یک ماده اعتیادآور به خصوص در زنان گزارش شده است. کافئین اثرات متعددی بر روی ارگان‌های بدن از جمله سیستم عصبی، قلبی عروقی، گوارشی و تنفسی دارد و باعث تحریک سیستم اعصاب مرکزی، اثرات ضدالتهابی، فراهم سازی انرژی، پیشگیری از بیماری‌های ریوی و اختلالات متابولیک می‌شود. همچنین کافئین در دوزهای بالا باعث اضطراب، افزایش فشار خون، بروز مشکلات قلبی عروقی و کلیوی و حتی مرگ می‌شود. مرگ و میر معمولاً با مصرف حدوداً ۱۵۰ mg/kg از کافئین اتفاق می‌افتد.

میکرولیت به دستگاه تزریق شد. پیک کافئین به طور متوسط در زمان بازگشت ۵ دقیقه ظاهر شد.

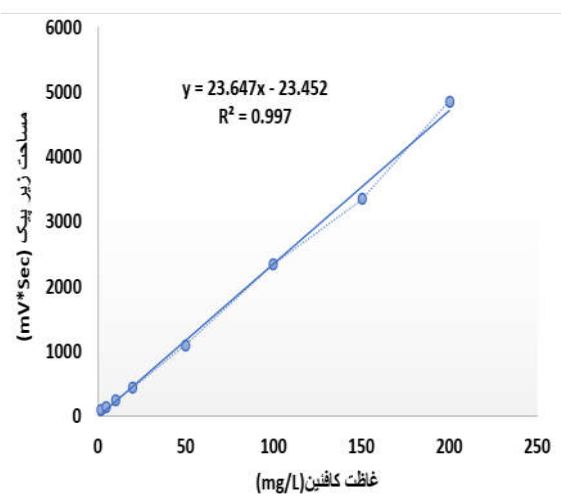
یافته‌ها

نتایج حاصل از معترسازی روش اجرایی به شرح زیر به دست آمد.

خطی بودن: ارزیابی خطی بودن و تعیین معادله خط در جدول و نمودار ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. مساحت زیر منحنی استاندارد کافئین در غلظت‌های مشخص کافئین

غلظت کافئین (mg/L)	مساحت زیر منحنی (mV*Sec)
۲	۷۳/۷۶
۵	۱۲۹/۵۸
۱۰	۲۴۰/۶۳
۲۰	۴۳۳/۴۲
۵۰	۱۰۹۳/۴۳
۱۰۰	۲۳۴۱/۷۷
۱۵۰	۳۳۳۸/۵۴
۲۰۰	۴۸۵۹/۷۳



نمودار ۱. منحنی استاندارد کافئین

حدود تعیین مقدار و حدود شناسایی: با بررسی انجام شده میزان LOQ به دست آمده $44/65 \mu\text{g/mL}$ و LOD آن $13/39 \mu\text{g/mL}$ محاسبه شد.

جدول ۲. نتایج حاصل از بررسی دقت روش در سه روز کاری

غلظت استاندارد (mg/l)	۱۰	۲۰	۵۰
روز اول	۲۴۶/۲۹ ± ۳/۸۸	۴۲۷/۹۵ ± ۵/۱۹	۱۰۹۳/۴۳ ± ۳/۹۱
RSD%	۱/۵۷	۱/۳۱	۰/۳۵
روز دوم	۲۳۹/۲۴ ± ۲/۳۲	۴۳۰/۲۱ ± ۴/۴۰	۱۰۸۷/۱۷ ± ۲/۸۲
RSD%	۰/۹۶	۱/۰۲	۰/۲۵
روز سوم	۲۴۱/۴۱ ± ۱/۹۷	۴۳۲/۵۲ ± ۳/۴۵	۱۰۹۰/۲۱ ± ۱/۵۳
RSD%	۰/۸۱	۰/۷۹	۰/۱۴

در مورد تمامی داده‌های نتایج به صورت (\pm SD) میانگین داده‌ها حاصل از ۳ بار تکرار گزارش شد.

جدول ۳. میانگین زمان بازگشت و میانگین غلظت کافئین در نمونه‌ها

نمونه	میانگین غلظت کافئین (mg/L)	میانگین زمان بازگشت (دقیقه)
۱	۱۵/۴۷ ± ۱/۹۲	۵/۱۴
۲	۳/۰۵ ± ۰/۱۷	۵/۲۰
۳	۲۰/۳ ± ۳/۳۸	۵/۲۰
۴	۵۲/۳ ± ۱۳/۹۱	۵/۲۰
۵	۷۴/۷ ± ۴۵/۵۷	۵/۲۲
۶	۷۲/۷ ± ۱۲/۰۳	۵/۲۲
۷	۷۲/۵ ± ۲۱/۱۰	۵/۲۱
۸	۳/۰ ± ۹۵/۴۶	۵/۲۰
۹	۱۱/۲ ± ۴۴/۳۸	۵/۲۲
۱۰	۶۵/۵ ± ۰۳/۳۷	۵/۲۳

جدول ۴. میزان دریافت روزانه قابل قبول ADI (mg/kg/day) و میزان دریافت روزانه تخمینی EDI (mg/kg/day) کافئین در نمونه‌های نوشابه و قهوه در بالغین و مقایسه آن با ADI و محاسبه HI

نمونه	ADI	EDI	HI %
کافئین نوشابه	۵/۷	۰/۰۱۷۹	۰/۳۱
کافئین قهوه	۵/۷	۰/۰۰۰۱۲	۰/۰۰۰۲۱

است تا از بروز عواقب احتمالی ناشی از سمیت با دوزهای بالا این ماده جلوگیری شود.

مطالعات بسیاری جهت اندازه‌گیری کافئین در نوشیدنی‌ها انجام گرفته است. مطالعه‌ای توسط مذمل و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در بنگلادش بر روی ۵ نمونه از نوشیدنی‌های انرژی‌زای موجود در بازار انجام گرفت و محتوای کافئین این نوشیدنی‌ها بوسیله UV مورد آزمایش قرار گرفت و متوسط محتوای کافئین موجود در این نوشیدنی‌ها $89/21 \text{ mg/serving}$ گزارش شد و اعلام شد که کمترین مقدار کافئین در برند شماره ۴ و بیشترین مقدار کافئین در برند شماره ۵ است (۲۵).

شرستا و همکارانش در سال ۲۰۱۶ میزان متوسط کافئین اندازه‌گیری شده در ۱۲ نمونه از نوشیدنی‌ها به وسیله HPLC را $2/5-3/53$ ٪ گزارش کردند (۲۶، ۳۲).

اخیراً مصرف نوشیدنی‌های انرژی‌زا و حاوی کافئین توسط جوانان و ورزشکاران به طور فزاینده‌ای رایج شده است. ورزشکاران اعتقاد دارند که استفاده از نوشیدنی‌های انرژی‌زا طی تمرین و مسابقه، به علت ترکیبات نیروزایی همچون کربوهیدرات، کافئین، سیترات سدیم، تورین و غیره عملکرد را افزایش می‌دهد. اگرچه این محصولات ممکن است فوایدی نظیر فراهم کردن سریع انرژی، کاهش خستگی و ایجاد هوشیاری داشته باشند، اما آنها می‌توانند منجر به عوارض جدی شوند. این عوارض در افراد بیمار، به ویژه اشخاص با بیماری‌های روانی، قلبی و عروقی، سرطان و کلیوی خیلی خطرناک‌تر هستند.

به همین دلیل یکی از اقدامات مهم تعیین و اندازه‌گیری کافئین موجود در این نوشیدنی‌ها در بازه‌های زمانی مختلف

قرار بگیرند. در این پژوهش از HPLC به عنوان روشی سریع، حساس و کارآمد به همراه دکتور UV استفاده شده است. در پژوهش حاضر سعی شد یک روش آنالیز دقیق و حساس جهت اندازه‌گیری کافئین ۱۰ نمونه از نوشیدنی‌ها اعتبارسنجی شود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که این روش کاملا علمی و عملی است. به طوری که منحنی کالیبراسیون برای استاندارد کافئین در محدوده ۲۰۰-۲۰ ppm خطی و ضریب همبستگی آن ۰/۹۹۷ بود.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کافئین نمونه‌های مورد استفاده در پژوهش نشان می‌دهد که کمترین مقدار کافئین مربوط به نوشابه فانتا با متوسط کافئین $0/17 \pm 3/05$ و شکلات سرد با متوسط کافئین $0/46 \pm 3/95$ و بیشترین مقدار کافئین مربوط به نوشابه ردبول با متوسط کافئین $7/57 \pm 74/45$ و نوشابه crown با متوسط کافئین $5/10 \pm 72/21$ میلی گرم بر لیتر است.

میزان دریافت روزانه تخمینی (EDI) کافئین با استفاده از اطلاعات به دست آمده در نوشابه و قهوه به ترتیب $0/000122$ و $0/0179$ mg/kg/day است و مقایسه آن با میزان جذب روزانه قابل قبول (ADI) نشان دهنده عدم وجود خطر برای مصرف کنندگان این محصولات است.

آسکی و همکارانش در ترکیه در سال ۲۰۱۶ از HPLC برای اندازه‌گیری کافئین نوشیدنی‌های غیرالکلی استفاده کردند و پس از معتبرسازی روش LOD به دست آمده را $0/19 \mu\text{g/ml}$ و LOQ را $0/63 \mu\text{g/ml}$ و میزان کافئین نوشیدنی‌ها را پایین‌تر از حد مجاز اعلام شده گزارش کردند (۲۷).

موسی علی عمر و همکارانش در سال ۲۰۱۲ کافئین ۱۵ نمونه نوشیدنی موجود در بازار سودان را به وسیله HPLC مورد سنجش قرار دادند و متوسط کافئین موجود در نوشابه‌های انرژی‌زا را $255/6$ ppm و در نمونه‌های چای را $458/6$ ppm گزارش کردند که بالاتر از حد مجاز است (۲۸).

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای توسط عبدال مومن و همکارانش برای اندازه‌گیری کافئین در چای و قهوه و نوشیدنی‌ها به روش SPE-HPLC انجام گرفت و محتوای کافئین ۶ نمونه از نوشیدنی‌ها در محدوده $10/5-162$ ppm و محتوای کافئین قهوه و چای به ترتیب $9/93$ ppm و $9/80$ ppm گزارش شد (۲۹).

در حال حاضر محققان برای تعیین محتوای کافئین این نوشیدنی‌ها روش‌های متعددی، از جمله استفاده از دستگاه‌هایی از قبیل HPLC، GC، FT-IR و... به کار می‌برند که هر کدام همراه دکتورهای مختلف می‌توانند مورد مطالعه

REFERENCES

- McClaran SR, Wetter TJ. Low doses of caffeine reduce heart rate during submaximal cycle ergometry. *J Int Soc Sports Nutr* 2007; 4:11.
- Jun X, Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *J Food Engin* 2009; 94:105-109.
- Svorc LU, Tomcik P, Svitkova J, Rievaj M, Bustin D. Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. *Food Chem* 2012; 135:1198-1204.
- Damirchi A, Rahmani-nia FA, Mirzaei BA, Hasan-Nia S, Ebrahimi MO. Effect of caffeine on blood pressure during exercise and at rest in overweight men. *Iran J Endocrin Metabol* 2009; 10:623-663.
- Saadaatian A, Editor. Natural and treating features of fruits and vegetables. Tehran: AyandeSazan Shahr Ab Publication, 2007; 72.
- Ribeiro J, Sebastiao AM, Caffeine and adenosine. *J Alzheimer's Dis* 2010; 20: 3-15.
- Demirtas C, Ofuoglu E, Hussein A, Pasaoglu H. Effects of caffeine on oxidant-antioxidant mechanism in the rat liver. *Gazi Med J* 2012; 23:13-8.
- Mort JR, Kruse HR. Timing of blood pressure measurement related to caffeine consumption. *Ann Pharmacother* 2008; 42:105-110.
- Rostagno MA, Manchon N, Darrigo M, Guillamon E, Villares A, Garcia-Lafuente A, et al. 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.
- Tobolkina E, Qiao L, Roussel C, Girault HH. Standard addition strip for quantitative electrostatic spray ionization mass spectrometry analysis: Determination of caffeine in drinks. *Talanta* 2014; 130:377-381.
- Ker K, Edwards PJ, Felix LM, Blackhall K, Roberts I. Caffeine for the prevention of injuries and errors in shift workers. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 12:5.
- Einother SJ, Giesbrecht T. Caffeine as an attention enhancer: reviewing existing assumptions. *Psychopharmacology* 2013; 225: 251-274.

13. Bloms LP, Fitzgerald JS, Short MW, Whitehead JR. The effects of caffeine on vertical jump height and execution in collegiate athletes. *J Strength Cond Res* 2016; 30: 1855-1861.
14. Davicino R, Alonso R, and Anesini C, Comparison between normal coffee and decaffeinated coffee effects on lymphocytes and macrophages: role of the antioxidant activity of caffeine. *J Food Biochem* 2011; 35: 877-897.
15. Hasko G and Cronstein B. Methylxanthines and inflammatory cells. In: Fredholm BB, Editor. *Methylxanthines*. Berlin: Springer; 2011. P.457-68.
16. Collomp K, Ahmaidi S, Chatard JC, Audran M, Prefaut C. Benefits of caffeine ingestion on sprint performance in trained and untrained swimmers. *Eur J Appl Physiol* 1992; 64:377-380
17. Babu KM, Church RJ, Lewander W. Energy drinks: the new eye-opener for adolescents. *Clin Pediatr Emer Med* 200; 9:35-42.
18. Paydas S, Sonay Y, Avci A, Duman BB, Tumkaya E. Energy drinks and chemotherapy: can these products cause detrimental effects in cancer patients receiving chemotherapy? *Eur J Intern Med* 2013; 24:3-4.
19. Dikici S, Saritas A, Besir FH, Tasci AH, Kandis H. Do energy drinks cause epileptic seizure and ischemic stroke? *Am J Emerg Med* 2013; 31:274.
20. Shrivastava K, Wu HF. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr* 2007; 1170:9-14.
21. Sinija V, Mishra H. FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. *LWT-Food Sci and Tech* 2009; 42:998-1002.
22. Brown J, Kreiger N, Darlington GA, Sloan M, Misclassification of exposure: coffee as a surrogate for caffeine intake. *Am J Epidemiol* 2001; 153:815-820.
23. Zou J, Li N. Simple and environmental friendly procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of caffeine in beverages. *J chromatogr A* 2006; 1136:106-110.
24. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal* 2015; 13:4102.
25. Hossain MM, Jahan I, Shawan MM, Parvin A, Hasan MM, Uddin KR, et al. Determination of pH, caffeine and reducing sugar in energy drinks available in Bangladesh. *NY Sci J* 2015; 8:92-96.
26. Pokhrel P, Shrestha S, Rijal SK, Rai KP. A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee. *J Food Sci and Tech Nepal* 2016; 9:74-78.
27. Aşçı B, Dinç Zor S, Aksu Donmez O. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of five food additives and caffeine in soft drinks. *Int J analytical chem* 2016; 2016: 2879406.
28. Ali MM, Eisa M, Taha MI, Zakaria BA, Elbashir AA. Determination of caffeine in some Sudanese beverages by High Performance Liquid Chromatography. *Pakistan J Nut* 2012; 11:336-342.
29. Mumin A, Akhter KF, Abedin Z, Hossain Z. Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE-HPLC). *Malaysian J Chem* 2006; 8:045-051.