



Viti i VIII-të i Botimit, Nr.1,
Korrik 2017

PËRCAKTIMI I KAFEINËS NËÇAJIN E MALIT, KAFE DHE DISA PIJE JO-ALKOOLIKE ME ANË TË HPLC/DAD

Bledar Murtaj*, Aurel Nuro*, Dorina Shëngjergji, Aurora Napuçe**, Elda Marku***

*Departamenti i Kimisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës

**Departamenti i Farmacisë, Fakulteti i Shkencave Mjekësore, Albanian University

Adresë kontakti: bledar.murtaj@fshn.edu.al

Përmbledhje

Objektivat: Qëllimi i këtij studimi është të paraqesë një metodë analitike për përcaktimin e kafeinës në mostrat e çajit të malit, kafesë dhe disa pijeve jo-alkoolike me përmbajtje kafeine. Përcaktimi i kafeinës në mostrat e çajit, kafesë dhe pijeve jo-alkoolike është një analizë e rëndësishme për shkak të përdorimeve masive të këtyre produkteve (1; 2; 3).

Metodat: Përcaktimi i kafeinës në mostrat e çajit, kafesë dhe pijeve jo-alkoolike është realizuar me anën e teknikës të HPLC/DAD e rekomanduar dhe nga literatura apo normat kombëtare dhe ndërkombëtare. Pasi është vendosur vlefshmëria e metodës analitike, janë marrë mostra të bimëve të çajit, të çajit të pakeluar, të kafesë, koka-kolave dhe pijeve energjetike të ndryshme në markete nga qyteti i Tiranës. Mostrat janë marrë në janar 2015. Injektimi i tyre është bërë pas filtrimit dhe hollimit të matricave. Përcaktimi cilësor dhe sasior është realizuar duke përdorur HPLC model Agilent 1260 e pajisur me pompë kuaternare dhe detektor DAD. Kolona Zorbax S8-C18 (15 m x 4 mm x 0.5 µm) u përdor për ndarjen e tyre (4; 5; 6).

Konkluzionet: Në mostrat e çajit u detektua prania e kafeinës në nivele të ndryshme në varësi të origjinës të produktit. Prania e kafeinës tek mostrat e kafesë varet nga origjina dhe trajtimi i saj. Prania e kafeinës në disa nga pijet jo-alkoolike të analizuar ishte e krahueshme me atë të raportuar nga markat tregtare.

Fjalë çelës: *Kafeina, çaj mali, kafe, pije jo-alkoolike, HPLC/DAD.*

DETERMINATION OF CAFFEINE IN MOUNTAIN TEA, COFFEE AND SOME SOFT DRINKS USING HPLC/DAD

Abstract

Objective: The aim of this study is to present an appropriate analytical method for the determination of caffeine in mountain tea, coffee and some soft drink samples. Determination of caffeine in mountain tea, coffee and some soft drink samples is an important analyzes due to the wide uses of these products in wide population (1; 2; 3).

Method: Determination of caffeine in mountain tea, coffee and some soft drinks was

performed using the technique of HPLC/DAD recommended in literature and also in national and international norms. After the validations of the analytical method, real samples were taken in Tirana markets. Samples were taken in January 2015. Direct injection was made for caffeine analyze. Qualitative and quantitative determination is performed using Agilent model 1260 HPLC equipped with quaternary pump and DAD detector. S8 Zorbax-C18 column (15 m x 4 mm x 0.5 μ m) was used for its isolation (4; 5; 6).

Conclusion: In tea mountain samples were detected presence of caffeine at different levels depending on the origin of the product. The presence of caffeine in coffee samples depends on the origin and its treatment. The presence of caffeine in some of the non-alcoholic beverage analyzed was comparable to that reported by trademarks (4; 5; 6).

Keywords: *Caffeine, mountain tea, coffee, non-alcoholic beverages, HPLC/DAD.*

Hyrje

Kafeina (trimetil-1,3,7-Ksantina) është një alkaloid i cili gjendet në natyrë tek gjethet, farërat, dhe frytet e bimëve të çajit, kafesë, kakaos, kolës dhe më shumë se 60 bimë të tjera. Sasia e kafeinës që gjendet tek këto produkte, ndryshon dukshëm nga njëra bimë tek tjetra. Efekti qetësues i kafeinës përdoret për të siguruar rritjen e energjisë trupore ose për rritjen e gjallërisë dhe të vigjilencës. Shpesh, ajo përdoret për të qëndruar zgjuar për një kohë të gjatë. Efekti stimulues dhe i këndshëm ndodh kur kafeina përdoret në doza të ulëta. Kur nivelet e kafeinës janë më të mëdha efektet e dëshiruara, zëvendësohen nga simptomat psikologjike, të cilat ngjasojnë me ankthin dhe neurozat depresive. Për personat që kanë probleme të theksuara psikologjike, simptomat e tyre mund të jenë edhe më të theksuara nga përdorimi i tepërt i kafeinës.

Abuzimi me kafeinën është shumë më i përhapur nga sa mund ta imagjinojmë. Kafeina shtohet tek pijet jo-alkoolike si agjent aromatizues dhe në ushqimet dietike si stimulant i sistemit nervor qendror. Kafeina përdoret si shtesë në shumë formulime farmaceutike. Efektet shëndetësore të saj janë për nivelin 200 mg për një person normal. Shoqërohet shpesh nga paracetamoli, kodeina, etj., ku efekti i saj është më i shpejtë dhe më i mprehtë. Klasifikohet si një drogë abuzive (dopping) sipas Komitetit Olimpik Ndërkombëtar (KON), kur kafeina është e pranishme në urinë me një përqendrim më të madh se 12 μ g/mL (1; 2; 3; 4). Nivelet e larta të konsumit të kafeinës shkaktojnë çrregullime në organizëm, ku përfshihen sekretimi i acidit gastrik, keqfunksionimi i veshkave, sëmundje të zemrës (arritmi kardiake) dhe shqetësime në sistemin nervor qendror, siç janë krizat nervore (përçarje, errësim i të parit dhe të dridhura të gjymtyrëve).

Përmbajtja e raportuar e kafeinës për disa formulime dietike ka një variacion të lartë: 93.0-163.5 mg për një filxhan kafe të pjekur, 46.7-67.7 mg për një filxhan kafe të shpejtë, 30.2-67.4 mg për një filxhan çaj të përgatitur me bustinë, 0.32-0.54 mg/g në një çokollatë të zezë të ëmbël, etj. Diferencat e këtyre vlerave të raportuara i dedikohet varieteteve të ndryshme të kafesë, çajit, mënyrës së përgatitjes (p.sh., përgatitja e kafesë dhe çajit), vëllimi i filxhanit dhe metoda analitike e përdorur në përcaktimin e kafeinës. Sot, 80 deri 90 % e kafeinës së shtuar në ushqime shkon për përgatitjen e pijeve jo-alkoolike. Këto produkte me kafeinë stimulojnë në mënyrë artificiale trupin dhe rritin shpejtësinë e rrahjeve të zemrës. Ky stimulant artificial për fat të mirë është i përkohshëm dhe zgjat për një kohë të shkurtër, rreth 45 minuta. Kafeina zbraz trupin nga energjia vitale, prandaj trupi kërkon të nxjerrë këtë “helm” që ka hyrë në organizëm (4; 8; 9).

Sipas Direktivës 2000/13/EC, kinina dhe kafeina të përdorura në prodhimin ose përgatitjen e

ushqimeve duhet të tregohen me anë të emërtimeve në listën e përbërësve pas termit “aromatizues”. Përveç kësaj, sipas direktivës 2002/67/EC të 18 korrikut 2002, pijet me përmbajtje kafeine më të madhe se 150 mg/L, duhet të kenë gjithashtu shënimin paralajmërues: “Përmbajtje e lartë kafeine”. Në Bashkimin Europian, vetëm pijet që kanë kafeinë në nivele të larta, për shembull pijet energjike, duhet të kenë të shënuar sasinë e kafeinës që përmbahet në këto pije. Matja e nivelit të kafeinës në produktet e kafesë është e standardizuar në rregulloren DIN ISO. Për të ulur sasinë e kafeinës tek përdoruesit, për shumë produkte ushqimore përdoren produkte të dekafeinuara. Kafeina mund të largohet nga këto produkte zakonisht me anë të avujve të ujit ose gazeve superkritikë. Ky proces nuk dëmton cilësitë e produkteve, por vetëm ul sasinë e kafeinës në to. Kafeja pa kafeinë prodhohet në një sasi të madhe duke ekstraktuar kafeinën nga kokrrat jeshile të kafesë me ujë të nxehtë, tretës organikë, ose dyoksid karboni në kushte superkritike. Kafeja pa kafeinë duhet të përmbajë më pak se 0.1 % kafeinë (2; 3; 4; 5; 6).

Përderisa konsumimi i pijeve jo-alkoolike dhe pijeve të tjera me kafeinë është një zakon shumë i përhapur nëpër botë, atëherë të tilla produkte ushqimore kanë rëndësi të madhe ekonomike dhe sociale. Sikurse për çdo rast tjetër në lidhje me ushqimet, konsumi i pijeve jo-alkoolike është i rregulluar nga legjislacionet. Kështu, përcaktimi i kafeinës në pijet jo-alkoolike dhe energjike është i detyrueshëm për kontrollin dhe sigurinë ushqimore. Për përcaktimin e kafeinës në mostra të ndryshme janë zhvilluar disa metoda analitike, ku përfshihen titrimetria, voltametria, Gazkromatografia dhe HPLC (5; 6; 8; 11).

METODIKA

Reagentët

Të gjithë reagentët kimikë (Kafeinë, MgO, CaCO₃, CH₃COOH, dhe NH₄OH) janë siguruar nga Sigma/Aldrich, në Gjermani. Metanoli me shkallë pastërtie për përdorim në HPLC është siguruar nga Merck në Gjermani. Uji i bi-distiluar, ultra i pastër është përftuar nga sistemi integral Milli-Q i pajisur me paketë pastruese për përdorim për LC.

Tretësirat standarde

Treten 200 mg kafeinë në 500 mL ujë të nxehtë të distiluar në një balonë të taruar me vëllim 1 L. Pasi tretësira ftohet në temperaturën e dhomës, tretësira çohet në vëllim final prej 1 L duke përdorur ujë të distiluar. Kjo tretësirë stok (200 ppm) u përdor për të përgatitur tretësirat e punës 200 ppm, 100 ppm 50 ppm, 20 ppm dhe 10 ppm. Këto tretësira u përdorën për të përgatitur kurbën e kalibrimit për kafeinën. Tretësira stok dhe tretësirat standarde u ruajtën në refrigerator në +4°C (2; 5; 6).

Analiza me HPLC/DAD e kafeinës

Analiza e kafeinës në mostra uji, u realizua me anë të aparatit HP 1260 Series Chromatograph (Agilent Technologies, USA) i pajisur me degazues, injektor manual Radehon me lup 20ul, pompë kuaternare, termostat për kolonën dhe me detektor me grup diodash (DAD). Ndarja kafeinës nga metabolitët e tjerë u realizua në kolonën S8 Zorbax C18 (150 mm × 4.6 mm x 0.5 um). Faza lëvizëse e përdorur për ndarjen dhe izolimin e kafeinës ishte përzierja ujë: metanol në raport 50:50 (në vëllim). Matjet u realizuan në gjatësinë e valës $\lambda = 272$ nm. Përpara se të maten parametrat e vlerësimit, është kryer identifikimi për të ndarë kafeinën nga komponimet me strukturë të përafërt

dhe që mendohet se janë të pranishëm në mostër. Procedura e diskriminimit konfirmohet nga rezultatet pozitive të përftuara nga produktet e kafesë, prova e bardhë dhe nga standardet. Sfondi i zhurmave është i neglizhueshëm dhe nuk ka sinjale komponimesh që interferojnë me sinjalin e Kafeinës (1; 5; 9).

Vlerësimi i metodës

Vlerësimi i metodës është bërë sipas Vendimit të Komisionit European 2002/657/EC. Parametrat e përcaktuar për vlerësimin e metodës janë lineariteti, specifikiteti, precizioni, saktësia, limiti i dedektimit (LOD) dhe limiti i kuantifikimit (LOK). Limiti i detektimit për kafeinën ishte 0.055 ppm, kurse limiti i kuantifikimit ishte 0.250 ppm. Këta parametra u njehsuan për pesë përqendrime: 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm 20 ppm dhe 10 ppm. Çdo standard u injektua tri herë. Lineariteti u provua duke përdorur tretësira prove nga 10-50 ppm ku pritet të jenë dhe nivelet e kafeinës në mostra. Gjithashtu, u kryen matje për provën e bardhë (ujin e bi-distiluar të pastër dhe të fortifikuar në disa përqendrime).

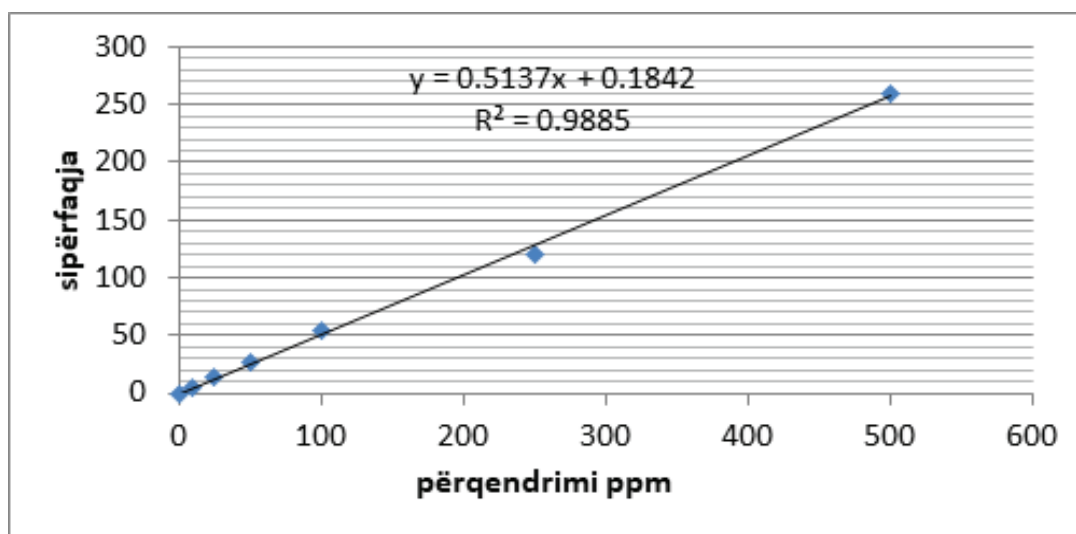


Figura 1. Kurba e kalibrimit për kafeinën

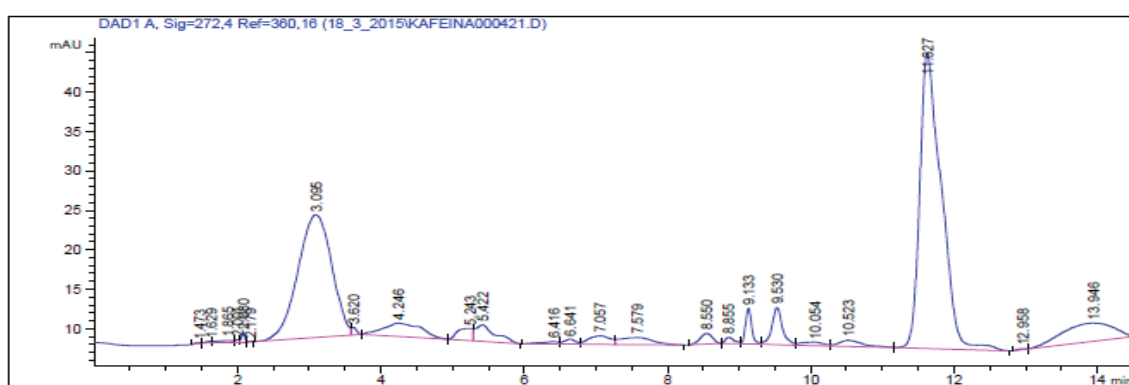
Marrja e mostrave të kafesë dhe çajit

Një total prej 24 mostrash janë mbledhur në marketet e qytetit të Tiranës, ndër të cilat 11 mostra të çaj mali nga zona të ndryshme të vendit tonë, 5 mostra kafe e pjekur dhe e bluar (turke) dhe 8 mostra të pijeve jo-alkoolike me përmbajtje kafeine janë marrë në analizë. Gjatë kryerjes së analizave eksperimentale mostrat mbahen në temperaturën e dhomës. Të gjitha enët u pastruan mirë dhe shpëlarë me ujë të një shkalle pastërtie për përdorim në HPLC.

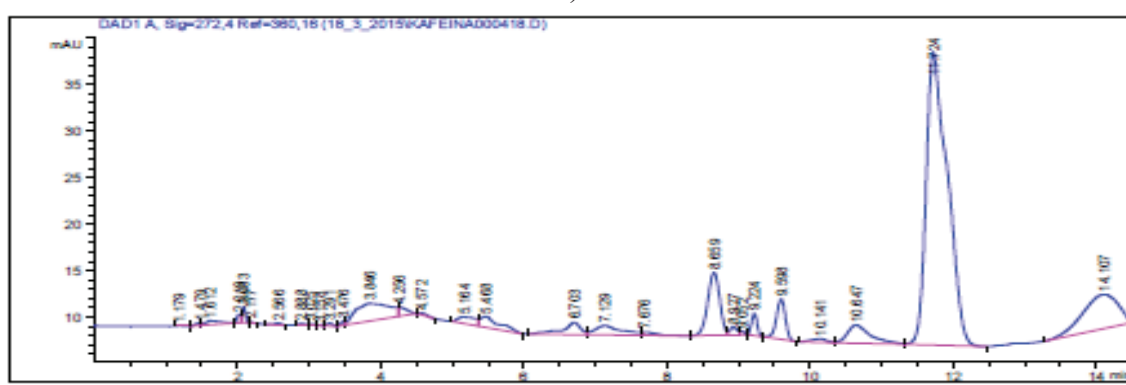
Analiza e mostrave për përmbajtjen e kafeinës

Kafeina ekstrahet në tretësirë ujore. Mostrat e bimëve të çajit copëtohen fillimisht deri në madhësinë e 1-2 cm. Peshohet 2-3 g nga mostra dhe kalohet në një enë konike me vëllim 250 ml. Më pas në të shtohet 200 ml ujë i distiluar dhe vendoset të vlijë. Temperatura e ekstraktimit ishte

100 °C. Ekstraktimi u krye për gjysmë ore. Më pas tretësira u ftoh dhe vëllimi u çua në 250 ml. Pijet jo-alkoolike të cilat përmbajnë kafeinë, fillimisht u degazuan në banjë me ultratinguj për 30 min. Të gjitha mostrat dhe ekstraktet e tyre (çaji, kafe, pije jo-alkoolike fillimisht u filtruan në letra filtri Whatman numër 1. U pipetua 1 ml filtrat në një ballonë të taruar me vëllim 10 ml dhe çohet deri në shenjë me ujë të gradës HPLC. Këto mostra të përgatitura kalohen në viale 2 ml për HPLC për të kryer analizat (4; 10; 11).



a)



b)

Figura 2. Kromatograma të marra me HPLC/DAD për kafeinën në mostrat: a) kafe, dhe b) çaj, Përmet

Rezultate

Në figurën 3 paraqiten rezultatet e gjetura për nivelin e kafeinës në 1 gram mostër çaji dhe të llogaritura për sasinë e kafeinës në një filxhan çaj. Nivelet e kafeinës në mostrat e çajit të malit variojnë nga 8.6 deri në 12.7 mg/g bimë çaj ose nga 21.5 deri në 31.8 mg/një filxhan çaj me vëllim 200 ml. Vlera mesatare e kafeinës në bimët e çajit ishte 9.3 mg/g ose 26.29 mg/ një filxhan çaj. Minimumi i kafeinës u gjet për mostrën e çajit të marrë në Prespë. Vlerën më të lartë të kafeinës e ka mostra e marrë në malin e Tomorit, Berat. Nivelet e kafeinës në mostrat e ndryshme të çajit vijnë si pasojë e pozicionit gjeografik, periudha e vjeljes, etj. Sasia e kafeinës në çajin e malit ishte në nivele shumë më të ulëta se norma e lejuar e saj prej 300 mg.

Në figurën 3 paraqiten rezultatet e gjetura për nivelin e kafeinës në 1 gram mostër çaji dhe të

llogaritura për sasinë e kafeinës në një filxhan çaj. Nivelet e kafeinës në mostrat e çajit të malit variojnë nga 8.6 deri në 12.7 mg/g bimë çaj ose nga 21.5 deri në 31.8 mg/një filxhan çaj me vëllim 200 ml. Vlera mesatare e kafeinës në bimët e çajit ishte 9.3 mg/g ose 26.29 mg/ një filxhan çaj. Minimumi i kafeinës u gjet për mostrën e çajit të marrë në Prespë. Vlerën më të lartë të kafeinës e ka mostra e marrë në malin e Tomorit, Berat. Nivelet e kafeinës në mostrat e ndryshme të çajit vijnë si pasojë e pozicionit gjeografik, periudha e vjeljes, etj. Sasia e kafeinës në çajin e malit ishte në nivele shumë më të ulëta se norma e lejuar e saj prej 300 mg.

Në figurën 4 paraqiten rezultatet e gjetura për nivelin e kafeinës në 1 gram mostër kafe dhe të llogaritura për sasinë e kafeinës në një filxhan kafe. Nivelet e kafeinës në mostrat e kafes variojnë nga 38.8 deri në 61.7 mg/g kafe ose nga 85.5 deri në 135.8 mg/një filxhan kafe me vëllim 100 ml. Vlera mesatare e kafeinës tek mostrat e kafes të marra në studim ishte 49.3 mg/g ose 109.02 mg/një filxhan kafe. Minimumi i kafeinës u gjet për mostrën e kafes Luna. Vlerën më të lartë të kafeinës e ka mostra e kafes Lori (2). Nivelet e kafeinës në mostrat e ndryshme të kafes vijnë kryesisht nga origjina, periudha e vjeljes, mënyra e pjekjes, etj. Sasia e kafeinës në mostrat e kafes ishte në nivele shumë më të ulëta se norma e lejuar e saj prej 300 mg.

Në figurën 5 paraqiten rezultatet e gjetura për nivelin e kafeinës në 100 ml pije jo-alkoolike dhe të llogaritura për sasinë e kafeinës në një racion 330 ml. Nivelet e kafeinës në mostrat e pijeve alkoolike kanë variacionet më të mëdha. Ato ishin nga 33.6 deri në 147.7 mg/330 ml. Vlera mesatare e kafeinës në pijet jo-alkoolike ishte 59.3 mg/330 ml. Minimumi i kafeinës u gjet për mostrën Pepsi 1.5 L. Vlerën më të lartë të kafeinës e ka mostra Red Bull (pije energjike). Përqendrimi i kafeinës si shtesë ushqimore (aromatizues) në pijet energjike të marra nga marketet lokale, janë dukshëm më të larta sesa përqendrimet përkatëse tek pijet freskuese jo-alkoolike. Sasia e kafeinës në asnjë nga mostrat e pijeve jo-alkoolike nuk e kalonte vlerën e normës të lejuar e saj prej 300 mg. Kujdes duhet të tregohet me konsumimin e pijeve energjike. Ato nuk duhet të konsumohen më tepër se dy në ditë pasi rrezikojnë kalimin e normës për kafeinën.

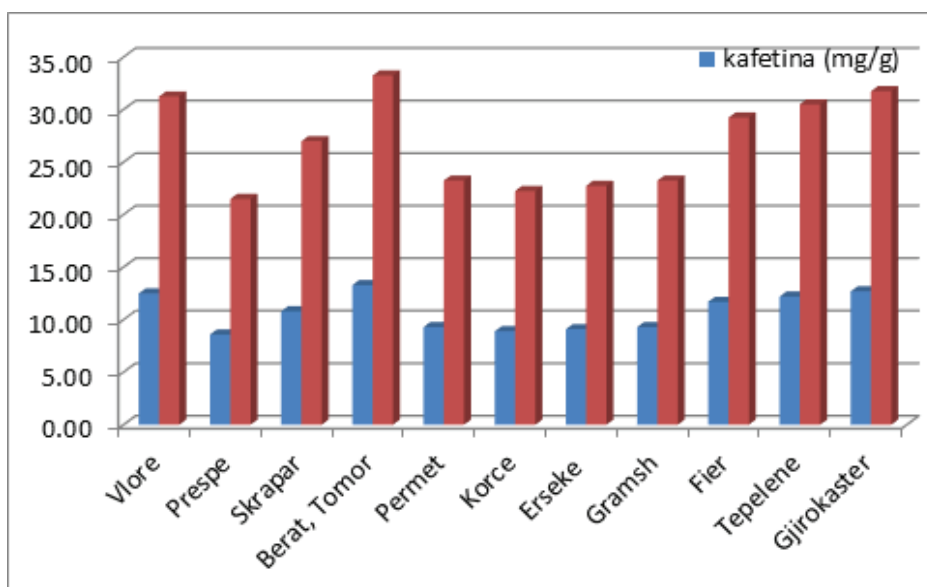


Figura 3. Përqendrimet e kafeinës në mostrat e çajit

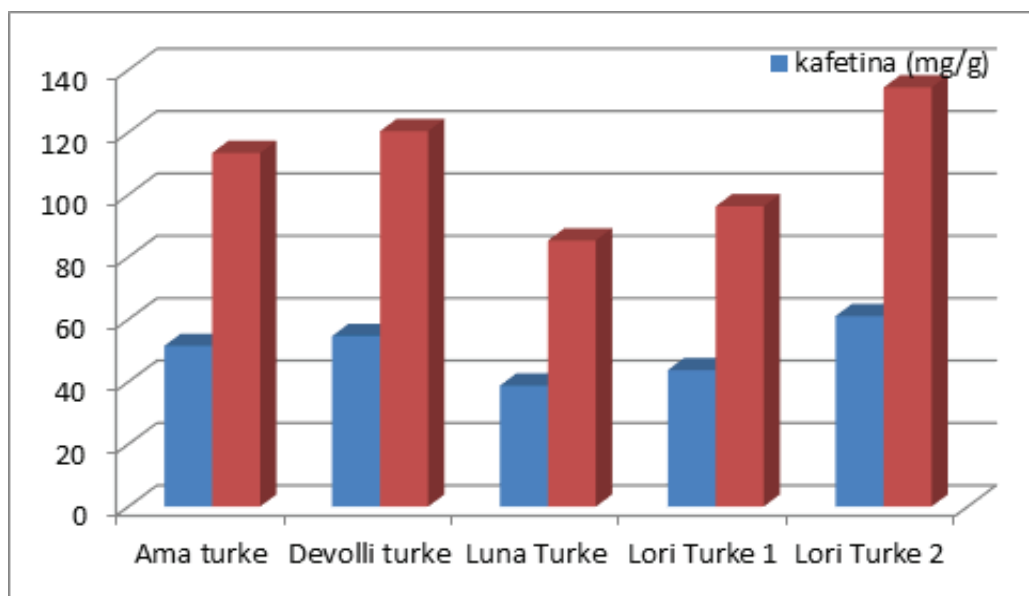


Figura 4. Përqendrimet e kafeinës në mostrat e kafes

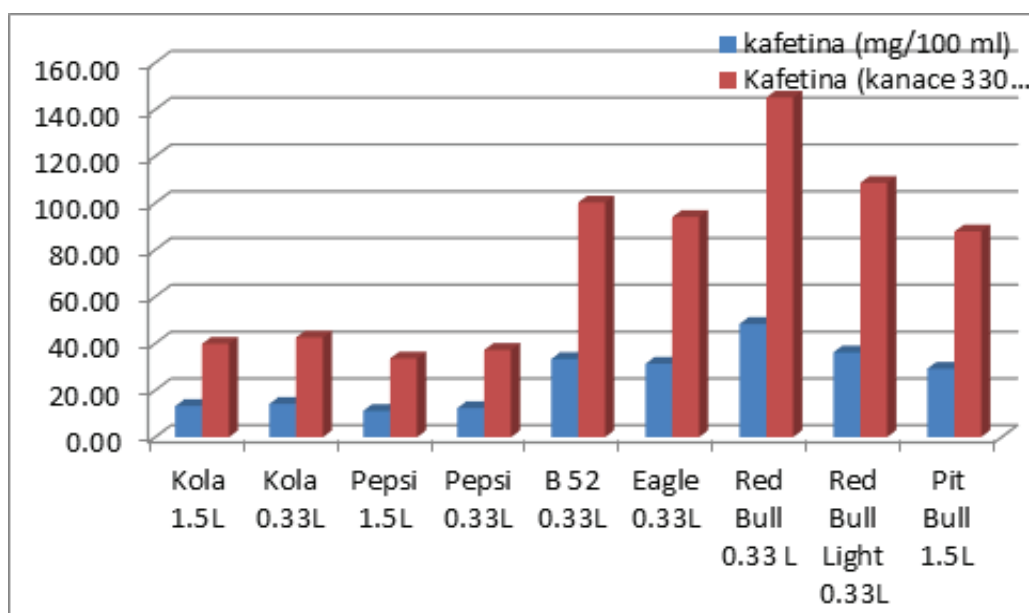


Figura 5. Përqendrimet e kafeinës në mostrat e pijeve jo-alkoolike

Diskutime

Në analizë është marrë përcaktimi i nivelit të kafeinës në mostra çaji, kafe dhe pije jo-alkoolike të cilat tregtohen në vendin tonë. Analiza e kafeinës u realizua me teknikën HPLC/DAD. Ndarja dhe izolimi i saj u realizua në kolonën S8 Zorbax C18 (150 mm × 4.6 mm × 0.5 μm). Faza lëvizëse e përdorur për ndarjen dhe izolimin e kafeinës ishte tretësira ujë: metanol (50 : 50). Metodën mbi kushtet e eluimit të secilit analit u përzgjedhën nga literatura. Pas vendosjes së parametrave analitike

në aparaturë dhe në teknikën e trajtimit u analizuan mostra të çajit, të kafes dhe pijeve jo-alkoolike që tregtohen në vendin tonë (3; 4; 5; 6; 7; 10; 13). Metoda HPLC-DAD për përcaktimin sasiar të kafeinës në mostra çaji, kafe, pije energjike dhe pije jo-alkoolike shfaq një kohë të qëndrueshme të daljes dhe një limit detektimi prej 0.055 mg/L për një raport sinjal/zhurmë të barabartë me 3. Metoda është vlerësuar në termat e ndjeshmërisë, zonës lineare të punës, riprodhueshmërisë, ripërsëritshmërisë dhe rikuperimit analitik. Rikuperimi mesatar i kafeinës ishte 99.1 %. Nivelet më të larta të kafeinës i takojnë pijeve energjike dhe kafes turke. Në asnjë nga mostrat e analizuar nivelet e kafeinës nuk e kalojnë normën e lejuar prej 300 mg. Duhet të theksohet se raportimi i të dhënave është bërë vetëm për një pije standarde, që do të thotë se konsumatorët që konsumojnë më tepër se një pije mund të jenë të rrezikuar nëse konsumojnë sasi të atilla që mund të kalojnë normën e lejuar ditore të kafeinës.

Konkluzione

Qëllimi i këtij studimi është përcaktimi i parametrave të performancës të metodës të përcaktimit të kafeinës në mostra çaji, kafe dhe pije jo-alkoolike me teknikën e HPLC/DAD. Teknika është bashkëkohore dhe e rekomanduar nga standardet kombëtare dhe ndërkombëtare për analizën e kafeinës në mostrat e çajit, kafes dhe pijeve jo-alkoolike. Metoda është relativisht me kosto të lirë dhe e realizueshme dhe në kushte të mungesave laboratorike. Duhet thënë se ky është një punim modest, i pari që realizohet në vendin tonë. Numri i mostrave të analizuar është i kufizuar. Prandaj sugjerojmë që kjo analizë të jetë e vazhdueshme për mostra të cilat përmbajnë kafeinë. Gjithashtu sugjerojmë që të punohet më tej për rritjen e performancës analitike, duke u përdorur tretës të ndryshëm, teknika të ndryshme (injektive direkte) të trajtimit të mostrave apo dhe detektor me ndjeshmëri më të lartë dhe nivele detektimi më të ulëta si LC/MS/MS. Bazuar në të dhënat e këtij studimi, mund të themi se në asnjë nga mostrat e çajit, kafes apo pijeve jo-alkoolike nuk vihen re nivele që kalojnë normën e lejuar për përmbajtjen e kafeinës. Kujdes duhet të kihet nga konsumatorët të cilët konsumojnë më tepër se një masë standarde. Kjo mund të çojë në kalimin e normave dhe shfaqjen e efekteve negative të kafeinës. Kjo gjë duhet t'u bëhet e njohur konsumatorëve në etiketat e produkteve të cilët kanë nivele të larta të kafeinës.

Referenca

1. Andrews, K., A. Schweitzer, C. Zhao, J. M. Holden, J. M. Roseland, M. Brandt, J. Dwyer, M. Piçiano, L. Saldanha, K. Fisher, E. Yetley, J. Betz, L. Douglass. The caffeine content of dietary supplements commonly purchased in the US.: Analysis of 53 products having caffeine containing ingredients. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009; 389(1): 231-239.
2. Nour, V., Trandafir I., Ionică M.E. Chromatographic Determination Of Caffeine Contents In Soft And Energy Drinks Available On The Romanian Market Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, 2010; Vol 11 (3), pp. 351 – 358 ISSN 1582-540X.
3. Knight, C. A., Knight, I., Mitchell, D.C. Beverage caffeine intakes in young children in Canada and the US, *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 2006; Vol. 67 (2), 96-96.
4. 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*, 2008; 93 (1), 177-181.
5. Mumin, A., Akhter, K. F., Abedin, Z., Hossain, Z. Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE-HPLC), *Malaysian*

- Journal of Chemistry, 2006; 8 Vol. (1), 045-051.
6. Nour, V., Trandafir, I., Ionica, M. E. Quantitative determination of caffeine in carbonated beverages by an HPLC method, Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2008; Vol. 14 (1), 123-127.
 7. Barone, J. J., Roberts, H.R. Caffeine consumption (Review), Food and Chemical Toxicology, 1996; Vol. 34 (1), 119-29.
 8. International Food Information Council Foundation: Questions and Answers About Energy Drinks and Health (2009) <http://www.foodinsight.org/Resources/>
 9. Bispo, M. S., M. C. Veloso, H. L. Pinheiro, R. F. De Oliveira, J. O. Reis and J. B. De Andrade. Simultaneous determination of caffeine, the bromine and theophylline by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci., 2009; Vol. 40(1): 45-8.