

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CAFFEINE IN ENERGY DRINKS AND TEAS

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA KOFEINA U ENERGETSKIM PIĆIMA I ČAJEVIMA

Marijana Marković¹, Jana Petrović¹, Svetlana Đogo Mračević², Aleksandar Lolić³, Marko Krstić²

¹ Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za analitičku hemiju, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Katedra za analitičku hemiju, Beograd, Srbija

Correspondence: marijana.markovic.maja@gmail.com

Abstract

Introduction: Caffeine is a natural alkaloid, isolated from more than 60 plant species. Over 80% of the world's population consumes caffeine on daily basis through the consumption of coffee, tea, chocolates and, more recently, energy drinks. As a pharmacologically potent substance caffeine is an ingredient of many medicaments available on the pharmaceutical market of Republic of Serbia without a doctor's prescription. Besides that, caffeine acts as a psychoactive stimulant, mild diuretic, and displays an interaction with some medicaments due to the induction of CYP1 and CYP2 isoenzymes. Keeping in mind all of the above, it is necessary to take into account the daily caffeine intake, as well as to control its content in energy drinks.

Aim: The aim of this study was spectrophotometric determination of caffeine content in energy drinks and tea, available in markets of the Republic of Serbia.

Material and Methods: Caffeine was determined by UV/VIS spectrophotometry in nine types of energy drinks and eight samples of black and green tea.

Results: The results showed that caffeine content in energy drink samples ranged from 26.81 to 35.44 mg/100mL and corresponds to declaration. The caffeine content in tea samples varies with the species (11.27-22.61 mg/100mL for green and 13.85-22.73 mg/100mL for black tea), but also with origin, growth conditions and tea processing.

Conclusion: The obtained data suggest that UV/VIS spectrophotometry can be used for routine determination and control of caffeine content in energy drinks and tea. It is important to note that caffeine intake through the usual daily consumption of tea and energy drinks should not have a negative impact on human health, but this alkaloid could be additionally consumed through other sources, which is especially important for certain groups of patients.

Keywords:

caffeine,
tea,
energy drinks,
UV/VIS
spectrophotometry

Sažetak

Uvod: Kofein je prirodni alkaloid, izolovan iz više od 60 biljnih vrsta. Preko 80 % svetske populacije svakodnevno unosi kofein u organizam kroz konzumaciju kafe, čajeva, čokolade i, u poslednje vreme, energetskih pića. Ne treba zanemariti činjenicu da kofein, kao farmakološki aktivna supstanca, ulazi u sastav mnogih lekova koji se na tržištu Republike Srbije izdaju bez lekarskog recepta. Sem toga, kofein je psihoaktivni stimulans, blag je diuretik i pokazuje interakciju sa nekim lekovima usled indukcije *CYP1* i *CYP2* izoenzima, zbog čega je potrebno voditi računa o količini koja se unese u organizam. U skladu s tim, važno je i da sadržaj kofeina u energetske pićima odgovara podacima koje proizvođači navode na deklaraciji.

Cilj: Cilj ovog rada bio je spektrofotometrijsko određivanje sadržaja kofeina u uzorcima energetskih pića i čajeva proizvođača dostupnih na tržištu R. Srbije.

Materijal i metode: Kofein je određivan metodom ultraljubičaste i vidljive (*UV/VIS*) spektrofotometrije u devet vrsta energetskih pića i po četiri uzorka crnog i zelenog čaja.

Rezultati: U uzorcima energetskih pića određeni sadržaj kofeina je u opsegu od 26,81 do 35,44 mg/100 mL i u skladu je s deklariranim sadržajem. Sadržaj kofeina u uzorcima čajeva varira u odnosu na vrstu (11,27-22,61 mg/100 mL zeleni i 13,85-22,73 mg/100 mL crni), ali je vezan i za poreklo, uslove gajenja i proces prerade čajeva.

Zaključak: Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija se pokazala kao brza, precizna i jednostavna metoda za određivanje kofeina u energetske pićima i čajevima. Imajući u vidu dobijene rezultate, važno je istaći da unos kofeina kroz uobičajenu dnevnu konzumaciju čajeva i energetskih pića ne bi trebalo da utiče negativno na zdravlje ljudi. Svakako treba imati u vidu da se ovaj alkaloid dodatno može uneti i putem drugih izvora, što je posebno važno za određene grupe pacijenata.

Ključne reči:

kofein,
čaj,
energetska pića,
UV/VIS
spektrofotometrija

Uvod

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) je prirodni purinski alkaloid i verovatno je najčešće konzumirana farmakološki aktivna supstanca na svetu. U prirodi, kofein se nalazi u više od 60 biljnih vrsta, a najveći izvori su: seme kafe (do 2 %), kotiledoni kole (do 3 %) i list čaja (do 4 %) (1). Preko 80% svetske populacije svakodnevno unosi ovu supstancu u organizam kroz konzumaciju kafe, čajeva, čokolade i, u poslednje vreme, energetskih pića. Ne treba zanemariti da, kao farmaceutske aktivna supstanca, kofein ulazi u sastav mnogih lekova koji se na tržištu Republike Srbije izdaju i bez lekarskog recepta (engl. *Over the Counter, OTC*) (2).

Dodaje se najčešće analgeticima i antimigrenicima u pojedinačnim dozama od 65, odnosno 100 mg, zbog poboljšanja njihove resorpcije. Smatra se da, u kombinaciji sa analgeticima, deluje kao adjuvantni analgetik, poboljšavajući delovanje osnovnog analgetika (3).

Sem toga, treba imati u vidu da je kofein psihoaktivni stimulans (3), blag je diuretik i pokazuje interakciju sa nekim lekovima usled indukcije *CYP1* i *CYP2* izoenzima. U studijama koje su istraživale uticaj unosa kafe na metabolizam i biološku raspoloživost lekova supstrata za *CYP1A2*, značajno povećanje aktivnosti *CYP1A2* izoenzima pokazano je u slučaju povećane konzumacije kofeina (≥ 3 šoljice kafe dnevno), što je dokazano i u farmakogenetičkim studijama sprovedenim u Republici Srbiji (4,5). Ne sme se, međutim, zanemariti ni njegov efekat pri nižim koncentracijama, kada se ponaša kao kompetitivni inhibitor *CYP1A2* (6). Klinički značaj potvrđen je za interakcije kofeina sa efikasnošću ili bezbednošću terapije antipsihoticima (6,7). Štaviše, kofein se koristi i kao marker za

procenu fenotipa pacijenta za *CYP1A2*, odnosno za procenu brzine metaboličke transformacije lekova supstrata ovim metaboličkim putem. *CYP1A2* katalizuje N3-demetilaciju kofeina do paraksantina, čije se koncentracije mere prilikom *in vitro* ili *in vivo* određivanja metaboličkog odnosa i fenotipa za *CYP1A2* (8-10).

Imajući u vidu izraženo farmakološko delovanje kofeina i njegove različite izvore, sasvim je jasno da slučajevi predoziranja nisu neuobičajeni (11). Stoga je potrebno ograničiti i dnevni i pojedinačni unos ove supstance. Dnevni unos kofeina za zdravu odraslu osobu ne treba da bude veći od 300 do 400 mg kofeina, za trudnice 100-200 mg, a za adolescente starosti 12-18 godina maksimalno 100 mg. Deca mlađa od 12 godina ne bi trebalo da unose više od 2,5 mg po kilogramu telesne mase. U stručnoj literaturi se navodi da je maksimalni dozvoljeni dnevni unos za odraslu osobu kod određenih indikacija 1 g (2,3,12). Odrasle osobe u proseku unose 85-250 mg kofeina, što najviše zavisi od uobičajenih navika. Zbog potencijalnih terapijskih efekata, ali i moguće interakcije sa drugim lekovima, kao i ozbiljnih neželjenih efekata i široke dostupnosti, kofein je odavno zanimljiv naučnicima i predstavlja jedan od analita za čije određivanje su razvijene mnogobrojne analitičke metode. Najčešće korišćene metode su kolorimetrija (13), spektrofotometrija (14,15), tečna hromatografija visokih performansi (*HPLC*) (16,17), gasna hromatografija (18,19), fluorescenčna spektrofotometrija (20) i elektrohemijske metode analize (21). Spektrofotometrija u ultraljubičastoj i vidljivoj (*UV/VIS*) oblasti najčešće se koristi zbog zadovoljavajuće osetljivosti metode, selektivnosti i jednostavne pripreme uzoraka za analizu.

Cilj ovog rada bio je spektrofotometrijsko određivanje sadržaja kofeina u devet vrsta energetskih pića i po četiri uzorka crnog i zelenog čaja proizvođača čiji su proizvodi dostupni na tržištu Srbije.

Materijal i metode

Za spektrofotometrijsko određivanje kofeina korišćen je UV/VIS spektrofotometar (*Champaign, Illinois, SAD*), a od reagensa kofein (*Ph.Eur. Merck, Darmstadt, Nemačka*), natrijum-karbonat (*Tehnohemija, Beograd, Srbija*) i hloroform (*Zorka, Šabac, Srbija*). Svi korišćeni reagensi bili su analitičkog stepena čistoće (p.a).

Korišćeni su uzorci energetskih pića (EP 1 - EP 9), zelenog (ZČ 1 - ZČ 4) i crnog čaja (CČ 1 - CČ 4) kupljeni u lokalnim marketima u Beogradu.

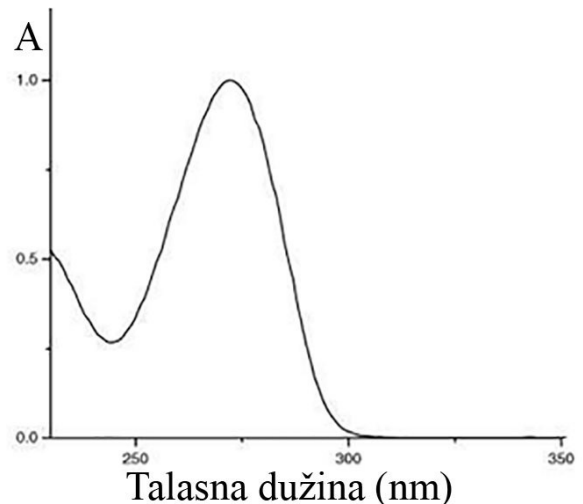
Priprema uzoraka

Zapremina od 50 mL energetskih pića preneti je u odgovarajuće čaše, nakon čega je degazirana u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 minuta. Zatim je 5,0 mL uzorka preneseno u levak za odvajanje, dodato je 10 mL dejonizovane vode, 1 mL 20% vodenog rastvora natrijum-karbonata i 20 mL hloroforma. Ekstrakcija je ponovljena dva puta, a kombinovani organski ekstrakt je prikupljan u normalnim sudovima. Zapremina od 5,0 mL ekstrakta je razblažena sa 5,0 mL hloroforma i tako pripremljen uzorak je ostavljen za snimanje. Svaki uzorak pojedinih energetskih pića je pripremljen u triplicatu.

Uzorci čaja su pripremani tako da je jedna kesica čaja prelivena sa 200 mL vrele dejonizovane vode u odgovarajućoj čaši, čaše su poklopljene sahatnim staklom i ostavljene da stoje 5 minuta. Nakon 5 minuta vrećice čaja su vađene i dodatno ocedene pomoću 2 sahatna stakla. Od svakog uzorka je odmereno 5 mL i preneseno u levak za odvajanje. Nakon toga je dodato 10 mL dejonizovane vode, 1 mL 20% vodenog rastvora natrijum-karbonata i, na kraju, 20 mL hloroforma. Postupak ekstrakcije je ponovljen dva puta. Zapremina od 5,0 mL ekstrakta je razblažena sa 5 mL hloroforma i tako pripremljen uzorak je ostavljen za snimanje. Svaki uzorak pojedine vrste čaja je pripremljen u triplicatu. Slepa proba je bila ista za oba uzorka i pripremljena je na isti način kao i uzorci za analizu u levku za odvajanje, ali sa odgovarajućom zapreminom dejonizovane vode umesto uzorka.

Za kvantifikaciju sadržaja kofeina u uzorcima korišćena je metoda standardne serije. Pripremljena je serija standardnih rastvora kofeina u hloroformu koncentracija 0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 i 25,0 $\mu\text{g/mL}$.

Na **grafikonu 1** prikazan je apsorpcioni spektar rastvora kofeina u hloroformu koncentracije 17,5 $\mu\text{g/mL}$, snimljen u oblasti talasnih dužina 230-350 nm. Kao što se vidi sa grafikona, apsorpcioni maksimum je na talasnoj dužini od 272 nm. Na izabranoj talasnoj dužini (272 nm) snimljeni su standardni rastvori i uzorci. Za seriju standardnih rastvora dobijena je linearna zavisnost apsorbcije od koncentracije kofeina uz odgovarajuću jednačinu prave $A = 49,319c(\text{mg/mL}) + 0,1519$ koeficijent korelacije (r^2) od 0,998.



Grafikon 1. Apсорpcioni spektar rastvora kofeina u hloroformu u opsegu talasnih dužina od 230 do 350 nm

Rezultati

U **tabeli 1** prikazane su izmerene vrednosti sadržaja kofeina u energetskim pićima.

Tabela 1. Sadržaj kofeina u uzorcima energetskih pića

Energetska pića	Sadržaj kofeina (mg/100 mL)*	Deklarisani sadržaj kofeina (mg/100 mL)
EP1	30,66 ± 0,95	max 30
EP 2	29,20 ± 0,71	max 32
EP 3	26,81 ± 0,48	min 25
EP 4	32,90 ± 0,74	32
EP 5	30,78 ± 0,65	32
EP 6	35,44 ± 1,01	32
EP 7	31,80 ± 0,87	max 32
EP 8	30,86 ± 0,15	max 32
EP 9	26,89 ± 0,39	max 30

*rezultat je predstavljen kao srednja vrednost ± standardna devijacija

U **tabeli 2** su prikazane izmerene vrednosti sadržaja kofeina u uzorcima zelenog i crnog čaja.

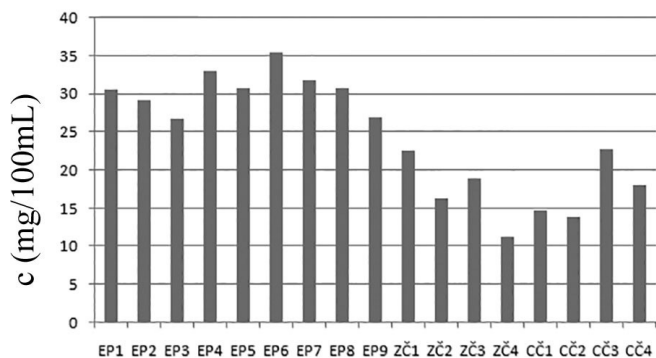
Tabela 2. Sadržaj kofeina u uzorcima čajeva

Uzorak	Sadržaj kofeina (mg/100 mL)*
ZČ 1	22,61 ± 0,56
ZČ 2	16,29 ± 0,84
ZČ 3	18,98 ± 0,36
ZČ 4	11,27 ± 0,18
CČ 1	14,78 ± 0,98
CČ 2	13,85 ± 0,44
CČ 3	22,73 ± 0,23
CČ 4	18,09 ± 0,88

*rezultat je predstavljen kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Diskusija

Na **grafikonu 2** su uporedno prikazani rezultati dobijeni za određivanje kofeina u uzorcima energetskih pića i čajeva. Uopšteno, veći sadržaj kofeina uočen je u uzorcima energetskih pića nego u uzorcima čajeva, što je i očekivano jer se kofein u energetska pića dodaje sa ciljem otklanjanja umora i poboljšanja energetskih performansi.



Grafikon 2. Poređenje dobijenih vrednosti sadržaja kofeina za uzorke energetskih pića i čajeva

Sadržaj kofeina u energetskim pićima se kreće u opsegu od 26,81 do 35,44 mg/100 mL napitka, što je uglavnom u skladu sa deklarisanim sadržajem, pri čemu su za uzorke EP1, EP4 i EP6 (**tabela 1**), izmerene vrednosti koje su veće od deklarisanih za 2,2 do 10,75 %.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima u sličnim studijama sprovedenim na energetskim pićima dostupnim na tržištu Republike Srbije (22), odnosno Bugarske (23). Sadržaj kofeina u energetskim pićima u Republici Srbiji je regulisan pravilnicima (24,25) i iznosi 320 mg/L, pa se može zaključiti da sadržaj kofeina u uzorcima EP4 i EP6 ipak nije u skladu sa propisanom granicom (24,25). U novije vreme, neke članice Evropske agencije za bezbednost hrane (engl. *European Food Safety Authority, EFSA*) izrazile su zabrinutost zbog velike potrošnje energetskih pića, posebno kod adolescenata (osoba starosti od 10 do 18 godina). Evropska agencija za bezbednost hrane je 2013. godine objavila novi Izveštaj o potrošnji energetskih napitaka kod određenih grupa potrošača i rezultati ukazuju da su deca i adolescenti najugroženija grupa (26). S tim u vezi, *EFSA* smatra da je bezbedan unos kofeina u pojedinačnoj dozi za odraslog čoveka 200 mg, što je značajno manje od njegovog maksimalno dozvoljenog sadržaja koji je propisan pravilnicima (27).

Sadržaj kofeina u ispitivanim uzorcima čajeva je u opsegu od 11,27 do 22,73 mg/100 mL (**tabela 2, grafikon 2**). Prema podacima iz literature, imajući u vidu da se crni čaj dobija fermentacijom i oksidacijom zelenog čaja, sadržaj kofeina u crnom čaju bi trebalo da bude veći nego u zelenom (28,29). Rezultati dobijeni u ovoj studiji, u tom smislu, nisu u saglasnosti sa podacima iz literature. Sadržaj kofeina u ispitivanim uzorcima zelenog čaja varira od 11,27 (ZČ4) do 22,61 mg/100 mL (ZČ1), a u uzorcima crnog čaja od 13,85 (CČ2) do 22,73 mg/100 mL napitka (CČ3). Treba, međutim, imati u vidu da uzorci crnog i zelenog čaja ispitivani u ovom radu

nisu uzorci istog proizvođača, niti istog mesta uzgoja čaja, pa ih je u tom smislu nezahvalno porediti.

Prema podacima iz literature, sadržaj kofeina u zelenom čaju je 4,85-21,74 mg/100 mL napitka, a u crnom 1,85-46,41 mg/100 mL napitka (28,29). Ovo su, međutim, samo prosečne vrednosti jer je kofein u ovim biljkama prirodno sintetisana supstanca, te ne postoje zakonske regulative niti obaveza proizvođača da, s tim u vezi, istakne sadržaj ove supstance na proizvodu (28,29). Iz rezultata dobijenih u ovom radu (**tabela 2**) može se uočiti da je sadržaj kofeina u ispitivanim uzorcima uglavnom u okviru prosečnih vrednosti za ove vrste čajeva (sa izuzetkom uzoraka ZČ1), ali ove vrednosti međusobno variraju, što može biti posledica više različitih faktora kao što su: geografsko poreklo, klimatski uslovi, uslovi gajenja, različiti fenotipovi iste biljke, korišćenje različitih fitohemikalija, sezona berbe (proleće, leto ili jesen). Važni faktori svakako jesu i uslovi sušenja, skladištenja i čuvanja, ali i pripreme čaja (28,30-35).

Dobijeni rezultati pokazuju da je sadržaj kofeina, bez obzira na to što je u ispitivanim uzorcima u skladu sa regulativom (energetska pića), odnosno uobičajenim vrednostima (čaj), ipak značajan i potrebno je pri konzumiranju ovih napitaka biti posebno obazriv, naročito kada je u pitanju osetljiva populacija kao što su deca, trudnice, doilje i osobe koje u svojoj terapiji koriste lekove koji interaguju sa kofeinom (36).

Zaključak

Primenjena *UV/VIS* spektrofotometrijska metoda se pokazala kao brza, precizna i jednostavna metoda za određivanje kofeina u energetskim pićima i čajevima. Dobijeni rezultati su pokazali da nema značajnijeg odstupanja sadržaja kofeina u energetskim pićima u odnosu na deklarisanu vrednost. Kada su u pitanju čajevi, sadržaj kofeina je u okviru prosečnih vrednosti koje se mogu očekivati u ovoj vrsti napitaka i varira, što je verovatno uzrokovano fenotipom, ali i brojnim spoljašnjim uticajima tokom uzgoja i skladištenja. Imajući u vidu dobijene rezultate, važno je istaći da unos kofeina kroz uobičajenu dnevnu konzumaciju čajeva i energetskih pića ne bi trebalo da utiče negativno na zdravlje ljudi. Svakako treba imati u vidu da ovo nije jedini put unosa ovog alkaloida, te da on interaguje sa određenim lekovima, pa posebnu pažnju pacijentima treba skrenuti na unos kofeina pri propisivanju i izdavanju lekova sa uskom terapijskom širinom.

Literatura

1. Kovačević N. Osnovi farmakognozijske. Treće izdanje. Beograd: Srpska školska knjiga; 2004.
2. Đorđević S, Antunović M, Kilbarda V, Perković-Vukčević N, Jović-Stošić J, Vučinić S. Kofein: farmakokinetički i toksikološki profil stimulansa u sportskoj praksi. *MD-Medical Data*. 2015; 7(3):233-6.
3. Martindale: The Complete Drug Reference. 39th ed. London: Pharmaceutical Press; 2017.

4. Đorđević N, Ghotbi R, Bertilsson L, Janković S, Akillu E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64(4):381–5.
5. Urry E, Jetter A, Landolt HP. Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutr Metab (London).* 2006; 13:-Art.66(9 pages).
6. Mora F, Molina JD, Zubillaga E, López-Muñoz F, Álamo C. CYP450 and Its Implications in the Clinical Use of Antipsychotic Drugs. *J Clin Exp Pharmacol.* 2015; 5(3):-Art.176 (10 pages).
7. Djordjevic N, Radmanovic B, Cukic J, Baskic D, Djukic-Dejanovic S, Milovanovic D, et al. Cigarette smoking and heavy coffee consumption affecting response to olanzapine: The role of genetic polymorphism. *World J Biol Psychiatry.* 2018; 21(1):29–52.
8. Preston C, Baxter K. *Stockley's Drug Interactions.* 10th ed. London: Pharmaceutical Press; 2013.
9. Pokrajac M, Vučićević K, Miljković B. *Farmakokinetika.* Beograd: Farmaceutski fakultet Beograd; 2019.
10. Adams CD. *Stockley's Drug Interactions: Stockley's Drug Interactions Pocket Companion 2013.* Tenth edition. J Med Libr Assoc. 2014; 102(3):221.
11. Nordentoft M, Qin P, HelwegLarsen K, Juel K. Time-trends in method-specific suicide rates compared with the availability of specific compounds. The Danish experience. *Nord J Psychiatry.* 2006; 60(2):97-106.
12. Nacionalni registar lekova. Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva; 2018.
13. Venkatesh S, Swamy MM, Reddy YS, Suresh B, Sethuraman M. A simple method for determination of caffeine content in tea samples. *Anc Sci Life.* 1994; 14(1–2):35–8.
14. Khalid A, Ahmad S, Raza H, Batool M, Khan Lodhi R, Tul Ain Q, et al. Determination of Caffeine in Soft and Energy Drinks Available in Market by using UV/Visible Spectrophotometer. *Fam Med Med Sci Res.* 2016; 5(4):1-5.
15. Batool M, Khalid A, Raza H. Determination of Caffeine in Soft and Energy Drinks Available in Market by UV. *Arch Nanomedicine Open Access J.* 2018; 1(2):35-40.
16. Komes D, Horžić D, Belščak A, Ganič KK, Baljak A. Determination of Caffeine Content in Tea and Maté Tea by using Different Methods. *Czech J. Food Sci.* 2009; 27:213-6.
17. Grujić-Letić N, Rakić B, Šefer E, Milanović M, Nikšić M, Vujić I, et al. Quantitative determination of caffeine in different matrices. *Maced Pharm Bull.* 2016; 62(1):77–84.
18. Grab FL, Reinstein JA. Determination of Caffeine in Plasma by Gas Chromatography. *J Pharm Sci.* 1986; 57(10):1703–6.
19. Sereshti H, Samadi S. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chem.* 2014; 158:8–13.
20. Weldegebreal B, Redi-Abshiro M, Chandravanshi BS. Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans. *Chem Cent J.* 2017; 11(1):1–9.
21. Švorc L. Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8:5755-73.
22. Nedeljković T, Pavlović , Dilber S, Sobajic S, Michaličkova D, Đorđević B. Određivanje sadržaja kofeina i taurina u energetskim napicima i dijetetskim proizvodima hplc tehnikom. *Hrana i ishrana.* 2017; 58(1):19-26.
23. Papanov S, Pankova S, Ivanov K, Ivanova S, Doncheva D, Pencheva I. Analytical methods for quantity control of food supplements containing caffeine. *Int J Nutr Food Sci* 2015; 4: 14-17.
24. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima osvežavajućih bezalkoholnih pića. Službeni list RS. br 88/2017.
25. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda. Službeni glasnik RS, br.7/2017.
26. External scientific report: Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks. EFSA Supporting Publications 2013: EN-394.
27. EFSA Scientific opinion on the safety of caffeine. *EFSA J* 2015; 13(5):4102-222.
28. Chin JM, Merves ML, Goldberger BA, Sampson-Cone A, Cone EJ. Caffeine Content of Brewed Teas. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(8):702–4.
29. Heckman MA, Well J, Gonzales De Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety and Regulatory Matterd. *J Food Sci.* 2010; 75(3):77-87.
30. Wang LY, Wei K, Jiang YW, Cheng H, Zhou J, He W, et al. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). *Eur Food Res Technol.* 2011; 233(6):1049-55.
31. Wei K., Wang L, Zhou J, He W, Zeng J, Jiang Y, et al. Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. *Food Chem.* 2011; 125(1):44-8.
32. Ahmed S, Griffin TS, Kraner D, Schaffner MK, Sharma D, Hazel M, et al. Environmental factors variably impact tea secondary metabolites in the context of climate change. *Front. Plant Sci.* 2019; 10:939.
33. Gai Z, Wang Y, Jiang J, Xie H, Ding Z, Ding S, et al. The quality evaluation of tea (*Camellia sinensis*) varieties based on the metabolics. *Hort Sci* 2018; 54(3):409–15.
34. Han WY, Huang JG, Li X, Li ZX, Ahammed GJ, Yan P, et al. Altitudinal effects on the quality of green tea in east China: a climate change perspective. *Eur. Food Res. Technol.* 2017; 243(2):323–30.
35. Li F, Dong C, Yang T, Ma J, Zhang S, Wei C, et al. Seasonal theanine accumulation and related gene expression in the roots and leaf buds of tea plants (*Camellia Sinensis* L.). *Front. Plant Sci.* 2019; 10:1397.
36. Lamy S., Houivet E, Benichou J, Marret S, Thibaut F. Caffeine use during pregnancy: prevalence of use and newborn consequences in a cohort of French pregnant women. *Eur Archi Psych Clin Neurosci.* 2020, rad u štampi, doi: 10.1007/s00406-020-01105-2.