الكشف على بعض مؤشرات التلوث البكتيري في اسماك MerluccisCapensis المستوردة والمتداولة بأسواق الشمال الغربي لدولة ليبيا

هبه محمد العموري[1], أماني الهادي المعاوي[1], فاطمة المبروك محمد[1], وجدان الطاهر شعبان[1], سارة عبدالرحمن هويسه[1], محمد رمضان الصقر[2], ابتسام عمر عامر[1]

[1]ميكروبيولوجيا الأغذية – قسم التقنية الحيوية والهندسة الوراثية – كلية التقنية الطبية صرمان/جامعة صبراته
[2] كلية الصيدلة – قسم الأحياء الدقيقة والمناعة/جامعة طرابلس

الملخص:

أجريت الدراسة لغرض التحري عن الملوثات البكتيرية في سمك فيليه *MerluccisCapensis* المستوردة والمتداولة في محلات بيع اللحوم بمدينتي صرمان وصبراتة, حيث فحص50عينة جمعت بصورة عشوائية وزرعت مستخلصات عينات السمك على أوساط زرعية إنمائية وتشخيصية مختلفة لغرض تقدير التعداد العام للأحياء المجهرية ،وعزل البكتيريا منها، وتصنيفها بالطرق الميكروبيولوجيا المخبرية. أظهرت نتائج الدراسة ارتفاع مستوى المحتوى البكتيري في سمك فيليه حيث شمل عزل البكتيريا الضمة *Vibrio metschnikovii* بمعدل97 % ، وبكتيريا الإشيرايكية القولونية *Escherichia coli* بمعدل 3% من العدد الكلي للعينات, وهي أعلى من الحدود المسموح بها للمحتوى البكتيري في المواصفة القياسية الليبية للأسماك المجمدة التي تم نشرها سنة 2007.

الكلمات المفتاحية: سمك الفيليه*MerluccisCapensis*، *Escherichia coli*، *Vibrio metschnikovii*والمعايير القياسية الليبية للأسماك المجمدة لسنة 2007.

Detection of Some Bacterial Contamination Indicators in Imported Fish MerlucciusCapensis and Traded In the Northern–West Libyan Markets

ABSTRACT:–

This study has been achieved to detect the bacterial contamination of imported Merluccius Capensis and traded in the shops selling meat cross couple of cities; which are Surman and Sabratha. 50 samples of imported MerlucciusCapensis were extraction by cultured in different diagnostic and nutrient cultures to detect bacterial contamination. The results of the imported MerlucciusCapensishas been showed that; high level in the count of those bacteria in addition to another the results showed that there were two types of bacteria present; 97% of the bacteria was *Vibrio metschnikovii*, and a further 3% of the total number of samples was *Escherichia coli*. All of these recorded numbers of Bacteria are above the Libyan specification standard for Frozen Fish which has been published in 2007.

Key words: *MerlucciusCapensis, Vibrio metschnikovii, Escherichia coli, Libyan standards for Frozen Fish in 2007.*

المقدمة:

تحتل الأطعمة البحرية مكانة متميزة في وجبات الإنسان نظراً لقيمتها الغذائية العالية، مما أدى إلى زيادة استهلاكها في تغذية الإنسان في كثير من دول العالم. وتعد الثروة السمكية إحدى ميادين التنمية الاقتصادية المهمة نظرا لكونها من الموارد الدائمة التي لها صفة الاستمرارية والتجدد، والتي

لا تنضب في ظل الاستغلال الاقتصادي الأمثل لها. [1]

كما تعتبر الأسماك من أهم مصادر الدهون المتعددة الغير مشبعة ذات الأحماض الذهنية طويلة السلسلة غير الضارة، والتي لا يستطيع الجسم البشرى تخليقها، ولكن في المقابل فإن الأسماك والمأكولات البحرية عموما من الأغذية سريعة الفساد إذا لم يتم تداولها بطريقة صحيحة، ويحدث فساد لحومها بواسطة التحلل الذاتي (لأنزيمي) ، أو التفاعلات

الكيميائية (الأكسدة) ،أو بوساطة النشاط الميكروبي أو العوامل الثلاثة مجتمعة.[3,2]

يمثل التلوث الميكروبي للأسماك أحد المشاكل التي تؤثر على نسبة الاستهلاك السمكي في كافة أنحاء العالم. و يعتمد عدد ونوع الميكروبات التي تتواجد في الأسماك على عوامل متعددة مثل الإجراءات الصحية المتبعة في عمليات الإنتاج والحفظ. ويتخذ العدد الكلي للبكتريا مؤشراً للنوعية ومدى مدة التخزين الملائمة للمنتجات , كما يعطي تقديراً لدرجة التلوث البكتيري والنظافة الصحية المطبقة.[2]

وهناك العديد من البكتيريا التي تحملها الأسماك ، ويتم انتقالها للإنسان عند تناولها ، ففي دراسة سجلت بأن عدد الإصابات في الولايات المتحدة الأمريكية تصل إلى 8000 حالة إصابة عن طريق أجناس بكتيريا *Vibrio spp* ،شملت 5200 حالة تسمم غذائي , انتقلت إلى الإنسان بعد تناول وجبات من الأسماك و المأكولات البحرية الحاملة للبكتيريا ، و الغير مطهية جيدا التي قد تؤدي إلى الموت. بينما سجلت 2800 حالة إصابة بالتسمم الغير منقولة بالغذاء نتج عنها الإصابة بالتهابات ،وأمراض خطيرة , غير أن الوعي بهذه الالتهابات محدودة.[4]

عزلت بكتيريا الضمة الميتشنيكوفية *Vibrio metschnikovii* لأول مرة عام 1981 من بيئة آجار الدم Blood agar لحالة التهاب مرارة لسيدة تبلغ من العمر 82 سنة مصابة بداء السكري.[5] ،وتتميز بكتيريا الضمة بأنها أحد أنواع البكتيريا البحرية المسببة للأمراض , سلبية لصبغة جرام، متحركة , لها شكل قضبان منحنية , موجبة لاختبار سكر اللاكتوز وسالبة لاختبار الاوكسيديز , تعمل انحلال كامل على آجار الدم , و قطر المستعمرات من 2-3 ملم ,كما تم عزلها من البيئات المائية المختلفة بما في ذلك مياه قليلة الملوحة ،والمياه البحرية ،ومياه الصرف الصحي , وكذلك من بعض الكائنات الحية كالمحار ،والطيور ،والدواجن.[8,7,6]

وتشير تقارير مراكز السيطرة والوقاية من الأمراض بأن عدد حالات الإصابة ببكتيريا *Vibrio spp* عن طريق الغذاء تصل إلى 3544 أي بمعدل (75%) من أصل 4754 ، بينما كانت عدد الإصابات الغير منقولة بالأغذية 2210 حالة بمعدل (25%) من هذه الإصابات.[9]

الهدف من البحث:

- التعرف على جودة سمك *Merluccius Capensis* المستوردة التي يتم بيعها في محلات اللحوم , وذلك من الناحية البكتريولوجي.
- دراسة معدل الثقافة والوعي بالطرق الصحيحة لنقل وتخزين ومناولة الأسماك لدي التجار.

المواد و الطرق المستخدمة:

- **جمع العينات**: 50 عينة من سمك *Merlucciu Capensis* المستوردة تم جمعها خلال شهري (أبريل و مايو) لسنة 2015 , بشكل عشوائي من محلات بيع اللحوم بالسوق الليبي في مدينتي صرمان و صبراته , واللتان تقعا 60 كيلومتر تقريبا غرب مدينة طرابلس , ومن تم وضعت العينات في حاوية من الفلين تحتوي على الثلج المجروش , بدرجة حرارة 0-18م°؛ ونقلت مباشرة إلى مختبر الإحياء الدقيقة بالكلية , لبدء إجراء الاختبارات اللازمة عليها في مدة أقصاها ساعتان.

- ***تجهيز العينات***

إعداد العينة المتجانسة للفحص البكتريولوجي, تم بواسطة سكين معقم أخذ قطع صغيرة من السمك بمقدار 10 جراماً, ثم هرست ، ووضعت في عبوات معقمة تحوي على 90 مل من ماء الببتون Peptone water ، وبعد ذلك أجريت سلسلة من التخفيفات العشرية ، مع استعمال القفازات المعقمة خلال جميع مراحل عمليات الجمع والتجهيز.

- ***تقدير عدد البكتيريا الهوائية الحية:***

تم تقدير عدد البكتيريا الهوائية الحية باستعمال مُستنبَت المرق المغَذِّي (Nutrient broth) رج التحضير جيدا ونقل بواقع 1 مل إلى 9 مل لتحضير التخفيف الأول ومنه حضرت بقية التخفيفات , وزرعت هذه التخافيف على الأطباق pour plate method لتخفيف 10^{3} إلى 10^{6} وحُضِنَت في درجة 37م° لمدة 24 ساعة وتم عد المستعمرات Total viable count [10].

- ***الكشف والتعرف عن البكتيريا الموجودة في سمك Merluccius Capensis.***

نقل 0.1 مل من التخفيف الأخير , ومن تم زراعتها مباشرة على أوساط مستخدمة لعزل البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة الجرام؛ بطريقة التخطيط الطبقي streak plate method, وشملت هذه المستنبتات كلا من:
(Nutrient agar, Blood agar & MacConkey agar) صنع شركة (Oxoid) وحضنت في درجة 37م° لمدة (24-48)ساعة؛ وبعد انقضاء فترة التحضين تم التعرف على المستعمرات النقية بواسطة وصف المستعمرات وعدها والقيام بالاختبارات التالية :صبغة الجرام واختبار القدرة على الحركة والاختبارات البيوكيميائية كاختبار نظام التعريف Analytical Profile Index (API) 20 E System الخاص بالبكتيريا المعوية من صنع شركة (Bio Merix) [12.11].

- **الجدول (1) استبيان يوضح كيفية نقل وتخزين ومناولة الأسماك بمحلات بيع الأسماك لدي التجار.**

السادة/ محلات بيع الأسماك،،،...نأمل منكم تعبئة البيانات التالية:		
المهنية.....	الجنسية:.....	مكان السكن:.....
السيد:.... نأمل الإجابة على الاستبيان وضع الإشارة ✓ على الإجابة		
• 1	هل السمك المعروض للبيع نظيفا ومحفوظ مبردا على درجة الحرارة المطلوبة والرطوبة المناسبة.؟	نعم ☐ لا ☐
• 2	إذا كانت الإجابة نعم ما هي درجة الحرارة المطلوبة لحفظ السمك المبرد و درجة الحرارة المطلوبة لحفظ السمك المثلج ؟	درجة الحرارة لحفظ المبرد ة تتراوح بين درجة الحرارة لحفظ ☐ المثلج درجة مئوية ☐
• 3	هل يكون نقل وتداول الأسماك وتقطيعها وعرضها بطريقة تحميه من التلوث؟	نعم ☐ لا ☐
• 4	هل تستخدم لسمك المبرد ثلاجة عرض ذات الواجهات الزجاجية؟	نعم ☐ لا ☐
• 5	إذا كانت الإجابة نعم هل الثلاجة مناسبة وحالتها جيدة تسمح للتحكم بدرجة الحرارة المطلوبة ؟	نعم ☐ لا ☐
• 6	هل يحيط الثلج بالأسماك من جميع الجوانب ويؤخذ ذوبان الثلج كمؤشر لارتفاع درجة الحرارة.؟	كاملة ☐غير كاملة☐
• 7	هل توفر مصرف في الثلاجة يسمح بمرور الماء الناتج من ذوبان الثلج ومنع تراكمه؟	نعم ☐ لا ☐
• 8	هل يكون فريزر الحفظ للسمك المجمد قادر على الاحتفاظ بدرجة حرارة لا تزيد عن -18 درجة مئوية؟	نعم ☐ لا ☐
• 9	هل تهتم بعدم زيادة الصناديق عن الحد المطلوب في الفريزر ؟	نعم ☐ لا ☐
• 10	هل تهتم بفترة صلاحية الأسماك المثلجة ؟	نعم ☐ لا ☐
• 11	إذا كانت الإجابة كم فترة الصلاحية ؟	أقل من شهر ☐ شهر ☐ أكثر من أشهر ☐
• 12	يجب حفظ الأسماك في الفريز مباشرة بعد استلامها من الموزع.	نعم ☐ لا ☐

• 13	منصة تقطيع السمك هل هي من مواد آمنة وغير ضارة على المستهلك وسهلة التنظيف ذات أسطح ملساء.	نعم ☐ لا ☐
• 14	هل تكون المواد المخاطية حول الخياشيم والعيون غير لامعة معتمة.	نعم ☐ لا ☐
• 15	هل ترجع لحم الظهر لوضعه الطبيعي بعد رفع الضغط بالاصبع.	نعم ☐ لا ☐
• 16	هل تتساقط القشور بسهولة عن الأسماك القشرية والأسماك الغير قشرية يكون سطحها غير أملس ومجعد.	نعم ☐ لا ☐
• 17	هل تظهر روائح غير مرغوبة من الاسماك.	نعم ☐ لا ☐
أقر بأن كامل المعلومات أعلاه صحيحة ,, ونسأل الله تعالى لنا و لكم دوام الصحة و العافية.. توقيع السيد /: .....التاريخ: ../.../2016م		

- ***التحليل الإحصائي***

حللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS [13]

النتائــج و المناقشــة

تبين من نتائج الدراسة ارتفاع العد الكلي للبكتريا في سمك Merluccius Capensis المستوردة والمتداولة بالأسواق الليبية وبينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p<0.05$) , وأن نسبة الملوثات البكتيرية في الأسماك المستوردة جاءت أكثر من الحدود الطبيعية المسموح بها حسب المواصفات والمعايير القياسية الليبية للأسماك المجمدة والتي تم نشرها لسنة 2007[17]. ويمكن تفسير هذه النسبة العالية نتيجة عدة أسباب منها: أن الأسماك المستوردة تكون كثيرة التعرض للتلوث عندما تكون مجهولة المنشأ, او عندما تكون الإجراءات خلال عمليات النقل والتخزين لا تتبع الشروط الصحية العالمية وهذا بدوره يؤدي لوصول الأسماك ملوثة إلى محلات البيع.

وتوضح خصائص وشكل المستعمرات و اختبار API20E للبكتيريا النامية التي تم عزلها بأنها سالبة لصبغة الجرام, حيث شملت بكتيريا الضمة الميتشنيكوفية *Vibrio metschnikovii* بمعدل 97% وبكتيريا الإشيرايكية القولونية *Escherichia coli* بمعدل 3%, والجدول رقم (2) يوضح اسم البكتيريا المعزولة والنسبة المئوية لها والعد الكلي للمستعمرات الحية بوحدة تكوين مستعمرة/مل (وت م/مل) في العينات المدروسة.

الجدول (2): البكتيريا المعزولة والنسبة المئوية والعد الكلي للمستعمرات الحية في وت م/مل.

البكتيريا المعزولة Bacterial isolates			
الوصف		الضمة لميتشنيكوفية *Vibrio metschnikovii*	الإشيرايكية القولونية *Escherichia coli*
العدد الكلي للمستعمرات الحية Total viable count		X 3 - 10^3 X 5 وت م/ز 10^6	10^3 X 3 وت م/ز
النسبة المئوية Percentage (%)		% 97	%3.0
خصائص المستعمرات Colonies characterization	الشكل Shape	كبيرة بها حواف خشنة عصوية سالبة لصبغة الجرام	صغيرة لونها وردي بها حواف ومحدبة عصوية سالبة لصبغة الجرام
	الحركة Motility	متحركة Motile	متحركة Motile
	تحلل آجار الدم Haemolytic activity	تحلل الدم بشكل كامل Beta haemolytic	غير محللة للدم Non-haemolytic

وتتوافق هذه الدراسة مع دراسات سابقة أقيمت على بعض أنواع السمك [4,5] التي أكدت على عزل نفس النوع من البكتيريا ، هذا وتشير عدد من الدراسات الأخرى بان البكتيريا *Vibrio metschnikovii* من أنواع البكتيريا البحرية المسببة للأمراض كالتهابات المعدة[16.15.14.9].

من خلال الاستبيان في الجدول (1)الخاضع في الدراسة, تبين بوضوح أن عدم الاهتمام بالنظافة العامة للأسماك , خصوصا عند عرضها وبيعها في الأسواق , وأن التخزين الغير جيد للأسماك في درجات حرارة عالية ولمدة طويلة , هي من العوامل الأساسية التي أدت إلى تلوث الأسماك, وبالتالي تحللها وفسادها ، وفي نفس الوقت فقدها لقيمتها الغذائية.

كما تبين الدراسة التي تم التوصل إليها أن الكثير من صيادي وتجار الأسماك يفتقدون الثقافة والوعي الكامل بالطرق الصحية الصحيحة لنقل وتخزين ومناولة الأسماك , وليس لهم دراية بالعوامل السلبية التي تؤدي إلى تلوث وتعفن الأسماك وتلفها ، وهذا بدوره أدى إلى وجود اسماك ملوثة بالسوق الليبي.

التوصيات

- وضع البرامج التوعوية والتثقيفية لتأهيل كل من له علاقة في التعامل مع الأسماك لإتباع الطرق الصحية السليمة لصيد ونقل وتخزين ومناولة الأسماك.
- توفير كافة التسهيلات والإمكانيات والتجهيزات الحديثة , لتحسين عرض ومناولة وبيع الأسماك في السوق الليبي.
- الاهتمام بالطرق العلمية الصحيحة للتخلص من مخلفات الأسماك.
- تشديد و متابعة الرقابة الصحية على الأسماك المحلية والمستوردة من قبل الجهات الحكومية ذات الاختصاص.

المراجع

1. **محمد ,عبدالرزاق محمود** (1997) . الانتاج البحري العراقي للسنوات 1965-1992. في: المصائد البحرية العرقية. منشورات علوم البحار رقم 31:22-43.

2. **Huss**, **H**. **H**. (**1995**). Quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*,No. 348. Rome, FAO, 195 p.

3. **الدليمي, خلف صوقي داود** (1988) .علم الأحياء المجهرية للأغذية. الطبعة الثانية , دار الكتب الطباعة والنشر, جامعة الموصل : 345 صفحة.

4. **Mead PS**, **Slutsker L**, **Dietz V**, **et al**. (**1999**)Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis; 5:607–25.

5. **Hansen**,**W**.**; Freney**, **J**.**; Benyagoub**, **H**. ***et al***. (**1993**). Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. J. clin. Microbiol., 31: 2529-2530,

6. **Linde**, **H**.**J**.**; Kobuch**, **R**.**; Jayasinghe**. (**2004**). *Vibrio metschnikovii*, a rare cause of wound infection. **J**. **clin**. **Microbiol**., **42**: 4909-4911,.

7. **Jean-Jacques W**, **Rajashekaraiah KR**,**Farmer JJ**, **Hickman FW**, **Morris JG**, **Kallick CA**. (**1981**). *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. J Clin Microbiol.14:711–2.

8. **FarmerIII**, **J**.**J**.**; Janda**, **J**.**M**. **& Birkhead**, **K**. (**2003**). *Vibrio*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A. & YOLKEN,

R.H., ed. **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington, American Society for Microbiology, p. 706-718.

9. **Dechet**, **A.M.**, **P.A. Yu**, **N. Koram and Painter**, **J.**(**2008**). Non-foodborne *Vibrio* infections: an important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997-2006. Clin. Infect. Dis.46: 970-976.
10. **Biomerieux**. **2002**: Identification System For Enterobacteriaceae and Other Non-Fastidious Gram-Negative Rods. Http://Www.Biomerieux. Com.
11. **K. Arunagiri**, **K. Jayashree and T. Sivakumar**. (**2013**). Isolation and identification of Vibrios from marine food resources. interiation journal of current microbiology and applied sciences, 2 (7): 217-232.
12. **Miyake**, **M.; Honda**, **T. & Miwatani**, **T**. (**1988**). Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. **Infect**. **Immun**., **56**: 954-960.
13. **Al-Zooby M**, **Talaha A**. (**2003**). Statistic data base analysis with SPSS system. Jordan, University Publication.
14. **FarmerIII**, **J.J.; Hickman-Brenner**, **F.W.; Fanning**, **G.R.; Gordon**, **C.M. & Brenner**, **D.J**. (**1993**). Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. **J. clin. Microbiol**., **26**:2000, 1988.
15. **Prasad**, **R.H.V. & Kharidehal**, **N**. (**2006**). *Vibrio metschnikovii* sepsis in a Neonate. **Internet J. Pediat. Neonatol**., **6** (1).
16. **Wallet**, **F.; Tachon**, **M.; Nseir**, **S.; Courcol**, **R.J. & Roussel-Delvallez**, **M**. (**2005**). *Vibrio metschnikovii* pneumonia. **Emerg. infect Dis**., **11**: 1641-1642.
17. **المواصفات والمعايير القياسية الليبية للأسماك المجمدة والتي تم نشرها لسنة 2007.**

تقدير تركيز الكافيين في بعض المشروبات وتأثير إستهلاكه على عينة من طلبة جامعة طرابلس

إسراء سالم السعداوي [1]، إبراهيم غريبي إمحمد[2] ، سكينة سالم السعداوي[3]، صلاح علي الهبيل[4]

[1،2،4] قسم علوم وتقنية الأغذية /كلية الزراعة/جامعة طرابلس
[3] قسم العقاقير /كلية الصيدلة/جامعة طرابلس

الملخص

الكافيين (1,3,7-trimethylxanthine) مادة شبه قلوية، أبيض مر الطعم، يصنف من العقاقير المنشطة الأكثر استهلاكا حول العالم و له تأثير اعتمادي (نوع من الإدمان)،يتواجد في عدة مشروبات شائعة الاستهلاك كالمنبهات ومشروبات الطاقة والتي يسوق لها بشكل مكثف في الآونة الأخيرة من خلال حملات دعائية مكثفة تستهدف بالخصوص فئة الشباب والمراهقين. استهدفت هذه الدراسة عينة عشوائية من طلبة جامعة طرابلس شملت 250 طالب وطالبة لمعرفة أنواع المشروبات المنبهة الأكثر استهلاكا داخل الحرم الجامعي وخارجه وقياس الامتصاصية للعينات التي تم اختيارها باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) عند الطول الموجي 260 نانومتر بعد أن تم استخلاص الكافيين من العينات المستخدمة بواسطة محلول (Dichloromethane)، ثم تقدير تركيز الكافيين بها. توصلت هذه الدراسة إلى أن أعلى تركيز للكافيين من بين عينات المنبهات (قهوة تركية، نسكافيه، شاي لبتون أحمر/ أخضر، كاكاو) كان في القهوة التركية (78.29 ±3.4 ملغم/لتر) وأقل تركيز للكافيين من بينها كان في الكاكاو (28.7 ±0.84 ملغم/لتر) و في مشروبات الطاقة كان أعلى تركيز في العلامة التجارية Redbull (3.47± 79.76ملغم/لتر) واقل تركيز تم رصده في العلامة التجارية Bison (3.47± 50.69ملغم/لتر) وفي المشروبات الغازية أعلى تركيز للكافيين كان في مشروب Pepsi Diet (0.5±45.75 ملغم/لتر) وأقل تركيز كان في مشروب coca cola zero (1.86±40.14 ملغم/لتر). خلصت هذه الدراسة إلى أن تركيز الكافيين المستهلك من قبل غالبية الطلبة (59%) في العينة قيد الدراسة كان أكثر من الحدود القصوى المسموح باستهلاكها في اليوم 200ملغم/لتر والموضوعة من قبل منظمة الغذاء والدواء التابعة للأمم المتحدة . توصى الدراسة بالتوضيحوالتأكيد على خطورة الاستهلاك المكثف للمشروبات المحتوية على الكافيين والأضرار الناتجة عنها.

الكلمات المفتاحية: كافيين، قهوة، مشروبات الطاقة، استهلاك، طلبة الجامعة.

1- المقدمـــــة

الكافيين عقار شبه قلوي من عائلة مثيل زانثين (مجموعة الزانثينات), يتواجد بشكل طبيعي في أوراق,بذور وثمار أكثر من 63 صنف نباتي حول العالم. من أشهر مصادر الكافيين حبوب البن، حبوب الكاكاو، أوراق الشاي ونبات الجوارانا "guarana" ونبات المتة " Yerba mate". في حالته النقية يتواجد الكافيين على هيئة مسحوق أبيض اللون، مر الطعم، صيغته الكيميائية $C_8H_{10}N_4O$، اسمه العلمي 1,3,7-trimethylxanthine . يعود تاريخ الكافيين الي 4700 سنة قبل الميلاد عندما كان للشاي شعبية كبيرة في الصين. حددت منظمة الغذاء والدواء الامريكية FDA (Food and Drug Administration) الجرعة اليومية المسموح باستهلاكها بمقدار 200ملغم/يوم بينما تصل كمية الكافيين في بعض علب مشروبات الطاقة إلى 505 ملغم ،والذي يكافئ كمية الكافيين داخل 14 علبة كولا ،أو عدة أكواب من القهوة. يعمل الكافيين كمنبه للجهاز العصبي المركزي ويستعمل للتقليل من الإجهاد الجسدي، حيث يمنع النعاس ؛وذلك عن طريق منع نشاط الادينوسين الناقل العصبي الذي يفرز من المخ والمسؤول عن التقليل من نشاط الخلايا العصبية عن طريق ارتباطه بمستقبلاتها حيث يرتبط الكافيين الذي يشبه في تركيبه للادينوسين بمستقبلات الخلايا العصبية بدلا من الادينوسين فيزيد نشاطها (Wanyika et al. 2010 ,McIlvain. 2008, Olsen. 2013).

في دراسة بجامعة مارشال بولاية كنتاكي في الولايات المتحدة الامريكية لتحديد كمية الكافيين المستهلك من قبل طلبة الجامعة وأسباب استهلاكهم له، ولمعرفة الفوائد والأضرار الناجمة عن استهلاك الطلاب للكافيين. أشارت النتائج إلى أن 83% ،قد تعرضوا على الأقل لواحد من أعراض التسمم في الماضي، بينما تعرض 51% لواحد على الأقل من أعراض الانسحاب، وأكثر من 78% استهلكوا اعلى من الجرعة اليومية الموصي بها (200 ملغم /اليوم) وأكثر من 76% يستهلكون الكافيين للبقاء مستيقظين (McIlvain, 2008).

وفي دراسة في الهند حول تقدير الكافيين في مشروبات مختلفة، بيبسي، كوكاكولا، XXX، Power-ex، Red-bull، ماونتن ديو، thump up. وجد أن أعلى تركيز للكافيين كان في Power-ex (46µg/ml)، وبالتالي يعتبر أقوى منبه للجهاز العصبي المركزي من بين كل العينات ،ويعتبر ضار بالصحة ،وأقل تركيز للكافيين وجد في XXX (19.5µg/ml) ،بالتالي يعتبر أضعف منبه للجهاز العصبي المركزي (Karla. et al. 2014).

تم كذلك تقدير الكافيين في المشروبات المرطبة ،ومشروبات الطاقة في دراسة بنيجيريا ،حيث أظهرت النتائج أن تركيز الكافيين في المشروبات المرطبة كان أقل من الحد المسموح به بشكل ملحوظ، حيث احتوت الكوكاكولا على أقل تركيز كافيين ،فيما احتوى مشروب الطاقة Red bull على أعلى تركيز كافيين ،وتم استخدام جهاز (UV Spectrophotometer) في عملية التقدير (Amos-Tautua, et al. 2014).

أصدرت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية في بداية الثمانينات تحذيرات تفيد بأنه قد تم ربط الجرعات المرتفعة من الكافيين على المدى القصير أو الطويل بتشوهات الولادة، السرطان، أمراض القلب، وأمراض الجهاز العصبي المركزي، أما على المستوى الفسيولوجي فقد أظهر الكافيين تأثيراً سلبياً على الجهاز الدوري، وذلك برفع ضغط الدم، توسيع الأوعية الدموية، زيادة نشاط الادرينالين والنورادرينالين والرنين مما يؤدي الى رجفان ونوبات صرعية، الصداع، الأرق، وزيادة حرارة الجسم. (Goldstein et al. 2010)

الجرعات المنخفضة 20-200 ملغم/يوم من الكافيين تؤثر بشكل ايجابي على المزاج، وتزيد من الحيوية والنشاط والقدرة على التركيز، حيث أشارت دراسات حديثة للتأثير الإيجابي للجرعات المنخفضة على الأداء من خلال تنشيطه للجهاز العصبي المركزي، فيعمل الكافيين على التخلص من التعب والدوار، ويستعمل من قبل الرياضيين لتعزيز الأداء، حيث يحفز حرق الدهون، ويؤثر الكافيين أيضاً على الجهاز التنفسي ،ويستخدم لعلاج انخفاض أداء الجهاز التنفسي الذي قد تسببه بعض أنواع العقاقير ،وكعلاج لقصور الدورة الدموية. (Illy and Pizano 2004), (Wanyika et al. 2010)

من أهم أعراض الإقلاع عن الكافيين التثاؤب المستمر، الوهن، الاكتئاب، القلق، الصداع، صعوبة في التركيز، شعور بالغثيان والقيئ، تصلب في العضلات ،حيث تبدأ أعراض الإقلاع عن الكافيين في خلال 12-24 ساعة من الانقطاع، وتصل إلى أعلى معدل في خلال 20-48 ساعة ومن الممكن أن تدوم حتى أسبوع.(Babu et al. 2008, Reissig et al. 2009)

تتمتع المشروبات المحتوية على كافيين بشعبية كبيرة جداً ،وتلعب دور رئيسي في حياة الطلبة الجامعيين في كثير من الجامعات الوطنية والدولية ،فقد تزايد مؤخرا استهلاك كميات كبيرة من الكافيين من قبل الطلبة بشكل مثير للاهتمام قبل المحاضرات،

وبين الامتحانات، وفي أوقات الراحة مثل مشروبات الطاقة، القهوة، الشاي والمشروبات الغازية، ويسود اعتقاد بين طلبة الجامعة بأن المشروبات المحتوية على الكافيين تؤثر إيجابيا على مستوى التحصيل العلمي، تزيد من التنبيه، تعزز الأداء داخل الفصول الدراسية وتنشط الذاكرة، ويعود هذا الاعتقاد لعدة أسباب منها الدعاية والإعلان وحكم العادة.

ونظراً للنقص في البيانات الإحصائية المتعلقة باستهلاك طلبة الجامعات للكافيين، وزيادة استهلاك الكافيين، وخاصة من القهوة والمشروبات الغازية ومشروبات الطاقة بين الطلاب بشكل ملفت وتزايد الآثار الجسدية والسلوكية المرتبطة باستهلاكه. كان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد أنواع المشروبات المنبهة الأكثر استهلاكاً، وتقدير معدل وأسباب استهلاك المشروبات المحتوية على الكافيين، والتعرف على الآثار الجانبية الجسدية والسلوكية جراء استهلاك هذه المشروبات بين فئة الطلاب من خلال إجراء استبيان لعينة من طلبة جامعة طرابلس. كذلك تقدير تركيز الكافيين في

المشروبات المدرجة بالدراسة مثل الشاي، القهوة، بعض المشروبات الغازية ،وبعض مشروبات الطاقة ومدى مطابقة تركيزه في العينات للمواصفات القياسية المتبعة من قبل مركز المواصفات القياسية الليبية.

2- المواد وطرق البحث:

2.1 الاستبيان:

تم عمل استبيان ورقي واستبيان الكتروني لعينة عشوائية شملت 250 طالب وطالبة من طلبة جامعة طرابلس 52% منهم ذكور و 48% إناث تراوحت أعمارهم من 17-30 سنة، تم إعداد الاسئلة في الاستبيان لتكون شاملة لأنواع المشروبات التي يستهلكها الطلبة ، أسباب استهلاكهم لها والآثار الإيجابية والسلبية الناجمة عن استهلاكهم لهذه المشروبات.

2.2 المواد:

2.2.1 العينات:

تم تجميع العينات بناءً على البيانات التي أدرجها الطلبة في الاستبيان ،وعلى وتوفرها بمختلف مقاهي جامعة طرابلس ،حيث شملت الدراسة عدد 15 عينة مختلفة من المشروبات المحتوية على الكافيين.

2.2.2 المواد الكيميائية والأجهزة:

1. محلول كافيين قياسي (Caffeine Standard Solution)
2. محلول ثنائي كلوريد الميثان (Dichloromethane)
3. ماء مقطر (Purified Water)
4. جهاز قياس الطيف الضوئي نوع (6505 UV/Vis Spectrophotometer)

2.3 طرق التحليل:

2.3.1 تحضير المحلول القياسي:

تم تحضير محلول قياسي بتركيز(1000ppm) من الكافيين عن طريق إذابة (198.2ملغم) من الكافيين في (200.0ملمتر من الماء المقطر)، ثم حضرت محاليل قياسية بسحب 25، 12.5، 10، 7.5، 5، 2.5 مل من المحلول القياسي ،وتم نقلها إلى دوارق حجمية سعة 50مل كلا على حده، ثم أضيف ماء مقطر إلى العلامة.

2.3.2 تحضير العينات:

تم إضافة ماء مقطر مغلي إلى عدد 5 كؤوس سعة 250 مل تحتوي 2غم من القهوة التركية، 2غم من قهوة سريعة الذوبان(نسكافيه)، محتوى كيس شاي أسود(لبتون)، محتوى كيس شاي أخضر(لبتون)، 2غم كاكاو على التوالي. تم

تحريك العينات المحضرة بعصا زجاجية لمدة 30 ثانية وتركها تبرد لدرجة حرارة الغرفة، في حين المشروبات الغازية ومشروبات الطاقة تم إضافتها مباشرة من العلبة.

2.3.3 استخلاص الكافيين:

تم أخذ 50 مل من كلاً من المحاليل القياسية والعينات المحضرة، وضعت في قمع فصل وأضيف إليها 25مل من ثنائي كلوريد الميثان(Dichloromethane)، تم استخلاص الكافيين بقلب القمع 3 مرات على الأقل ،وتنفيس القمع بعد كل مرة، ثم إزالة طبقة ثنائي كلوريد الميثان في دورق نظيف وجاف ،وتكرر العملية مرتين لكل العينات.

2.3.4 قياس تركيز العينات:

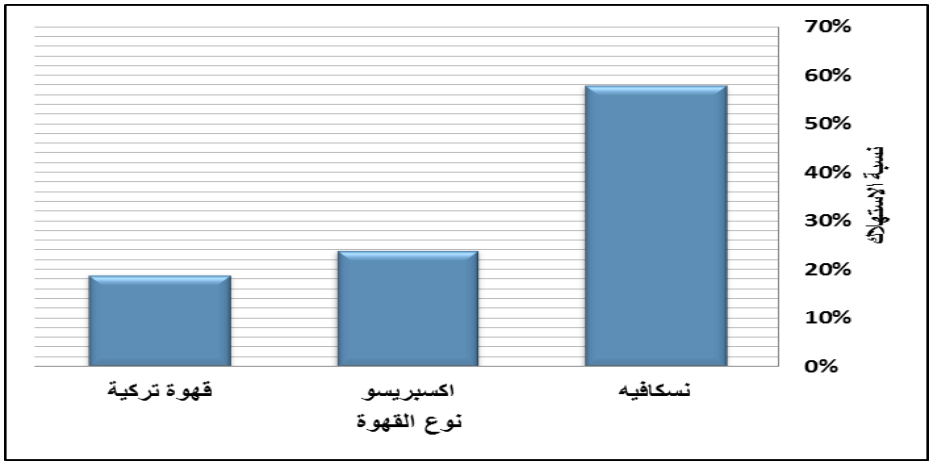
وضعت المحاليل القياسية في (quartz cuvettes) ،وتم قياس امتصاصيتها باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي عند طول موجي 260 نانوميتر ، واستخدم برنامج Microsoft Excel في عمل التحاليل الإحصائية.

3- النتائج والمناقشة :

3.1 الاستبيان :

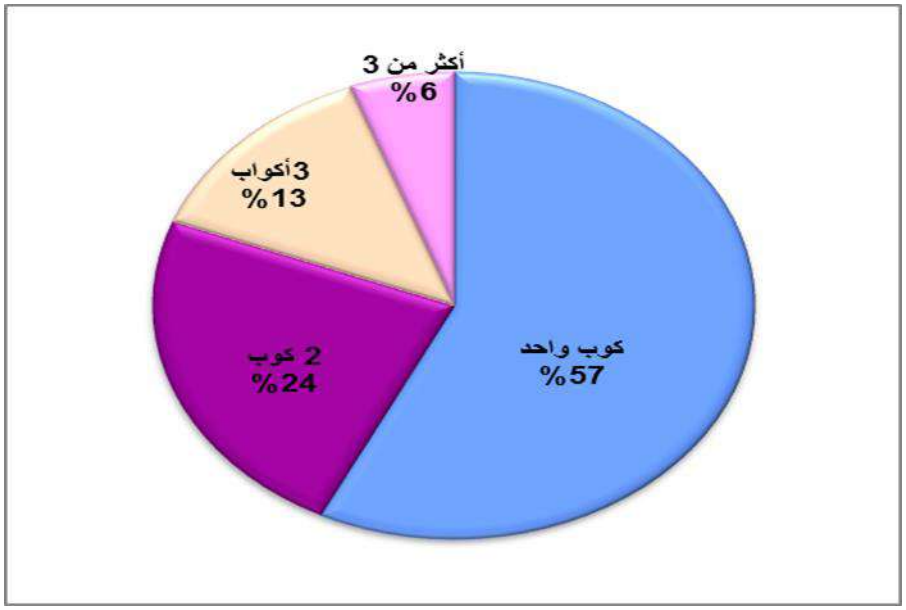
شملت الدراسة 250 طالب وطالبة من طلبة جامعة طرابلس 52% منهم ذكور و 48% إناث ،تراوحت أعمارهم من 17-30 سنة ،وتم تحليل النتائج باستخدام برنامج Microsoft excel.

من نتائج الاستبيان عن نوع القهوة التي يستهلكها الطلاب أجاب معظمهم بأنهم يستهلكون القهوة سريعة الذوبان(نسكافيه) بنسبة 58% ، و24% للقهوة المركزة (اكسبريسو)، وكانت أقل نسبة 19% لمن يستهلكون القهوة التركية ، كما هو موضح في الشكل رقم (1) حيث يتبين أن أعلى نسبة استهلاك كانت للنسكافيه.



شكل(1). نوع القهوة المستهلكة من قبل الطلبة بعينة الدراسة

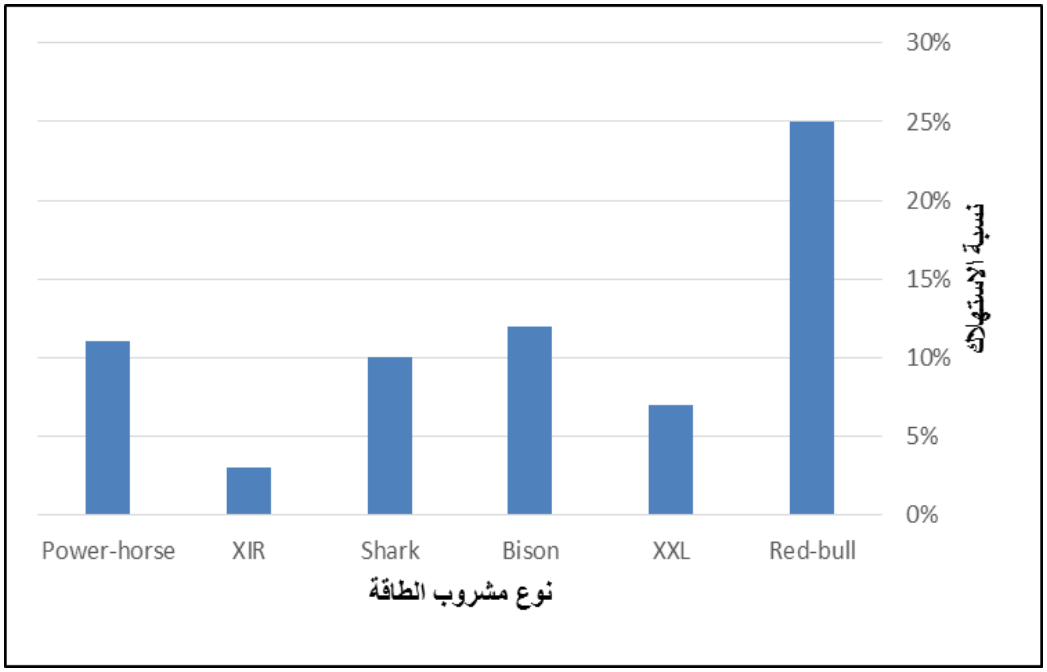
بالنسبة لعدد الأكواب المستهلكة يوميا كانت النتائج كما هو موضح في الشكل رقم (2) حيث تبين أن 57% من الطلبة يستهلكون كوب واحد من القهوة بشكل يومي، 24% يستهلكون كوبين، 13% يستهلكون 3 أكواب و 6% منهم يستهلكون أكثر من 3 أكواب في اليوم.



شكل(2). النسبة المئوية عدد اكواب القهوة المستهلكة/اليوم من قبل الطلبة بعينة الدراسة

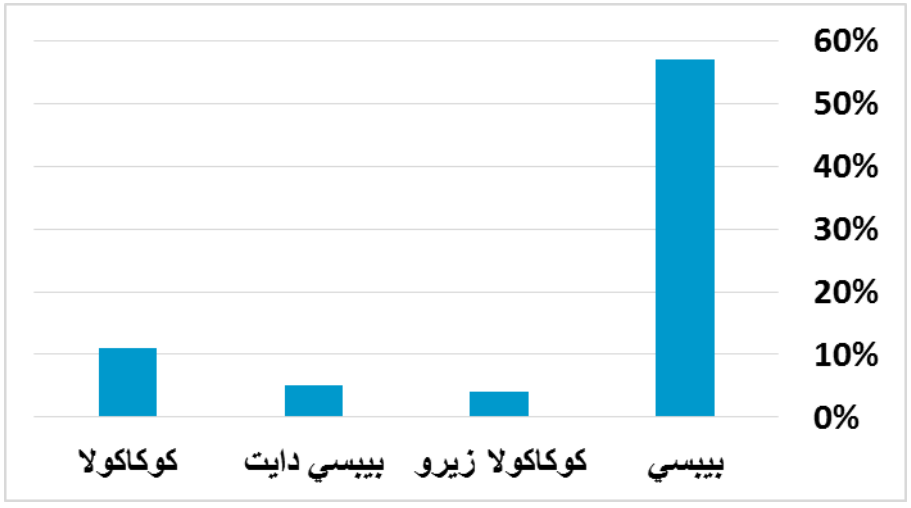
كذلك بالنسبة لنوع الشاي المستهلك أجاب 58% من الطلبة بعينة الدراسة بأنهم يستهلكون الشاي الاسود المكيس (لبتون) و48% يستهلكون الشاي الأخضر المكيس (لبتون)، 63% يستهلكون كوب واحد من الشاي في اليوم، 28% يستهلكون كوبين و9% يستهلكون أكثر من كوبين في اليوم.

وحول نوع مشروبات الطاقة المستهلكة اجاب 68% من الطلبة بعينة الدراسة بأنهم يستهلكون مشروبات الطاقة وكانت أعلى نسبة 25% كانت لمن يستهلكون مشروب Redbull و يستهلك 12% منهم مشروب Bison و11% يستهلكون مشروب Power horse، 10% يستهلكون مشروب Shark و 7% يستهلكون Power xxl، اما أقل نسبة 3% فكانت لمن يستهلكون مشروب XIR, كما هو موضح في شكل 3. وبالنسبة لعدد العلب المستهلكة بشكل يومي أجاب 19% منهم بأنهم يستهلكون علبة واحدة، 6% يستهلكون علبتين، 1% يستهلكون اكثر من علبتين في اليوم و 3% يستهلكون علبة بالأسبوع .



شكل(3). أنواع العلامات التجارية لمشروبات الطاقة الاكثر استهلاكا من قبل الطلبة بعينة الدراسة.

الدراسة بينت كذلك أن 79% من الطلبة يستهلكون المشروبات الغازية، حيث كما هو موضح بالشكل رقم (4) فإن 57% منهم يستهلكون علبة بيبسي في اليوم، 12% منهم يستهلكون علبة كوكاكولا في اليوم، 6% يستهلكون علبة بيبسي دايت في اليوم و4% يستهلكون علبة كوكاكولا زيرو بشكل يومي.



شكل(4) أنواع المشروبات الغازية المستهلكة/ اليوم من قبل الطلبة بعينة الدراسة

الاستبيان وضح كذلك أوقات الاحتياج للكافيين كما هو مبين بالجدول رقم (1) حيث 75% يحتاجونه في الصباح، 18% يحتاجونه في المساء ونفس النسبة يحتاجونها منتصف اليوم اما عند البدء في الدراسة فكانت نسبة الاحتياج

15%، وبالنسبة لأماكن استهلاك المشروبات المحتوية على الكافيين فإن 63% من الطلبة أجابوا بأنهم يستهلكونها داخل الحرم الجامعي و45% في البيت، بينما 27% يفضلون المقهى.

جدول(1). وقت الاحتياج للكافيين للطلبة بعينة الدراسة

الوقت	العدد	%
صباحاً	188	75
منتصف اليوم	45	18
مساءً	45	18
عند البدء في الدراسة	37	15

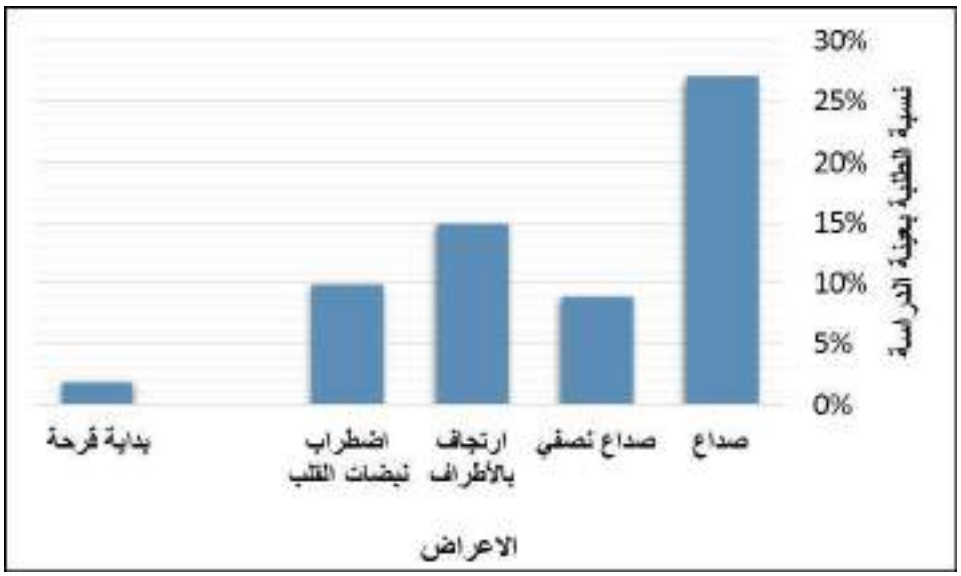
والجدول رقم (2) يوضح نتائج الاستبيان عن سبب استهلاك المشروبات المحتوية على الكافيين حيث يوضح أن (55%) يستهلكونها لتشعرهم بالتنبه، 49% يحبون طعم الكافيين بها، 46% تشعرهم بالنشاط و46% تزيد من قدرتهم على الفهم والتركيز وأقل نسبة 26% كانت لمن يستهلكون هذه المشروبات كعادة قديمة. نسبة متقاربة من الطلبة ربطوا بينوا استهلاكهم للكافيين ومقدرتهم على البدء في الدراسة (45%) والتركيز أثناء الامتحانات (55%).

جدول(2). أسباب استهلاك الكافيين للطلبة بعينة الدراسة.

التأثير	العدد	%
لتشعر بأنك متنبه	137	55
لأنك تحب طعمه	122	49
لتشعر بالنشاط	116	46
تزيد قدرتك على الفهم والتركيز في المحاضرات	115	46
للبقاء مستيقظا	109	44
ليشعرك بمزاج أفضل	108	43
لتخفيف الصداع	101	40
ليساعدك على الهدوء والاسترخاء	89	36
كعادة قديمة	65	26

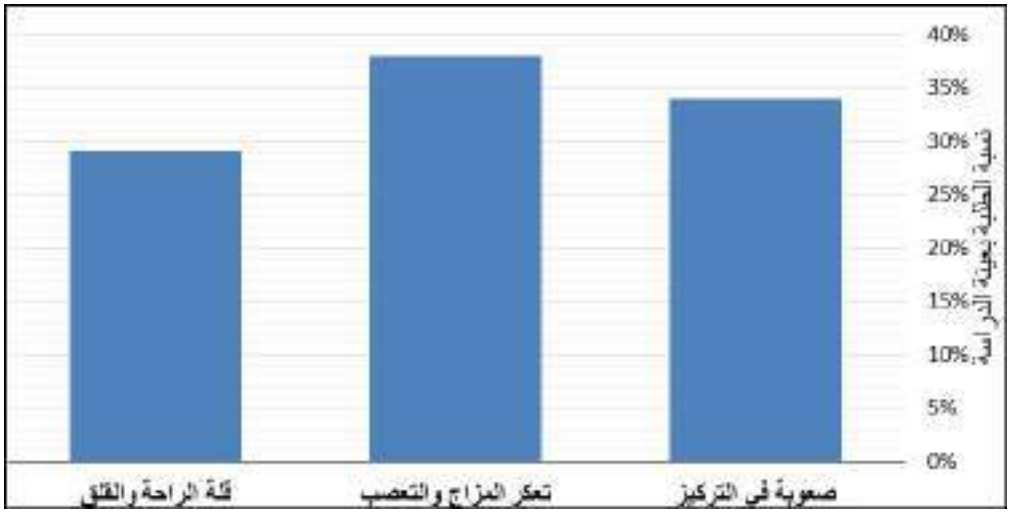
وبالنسبة للأثار الجانبية الصحية على الطلبة بسبب الاستهلاك المفرط للمشروبات المحتوية على الكافيين حيث تبين أن 27% من الطلبة بعينة الدراسة عانوا من صداع ،و9% من صداع نصفي ،و 15% حصل لهم ارتجاف بالأطراف ،و10% عانوا من اضطراب بضربات القلب ،

و 2% كانت لديهم بداية قرحة بسبب استهلاكها على الريق كما هو موضح بالشكل رقم (5).



شكل(5). أعراض الاستهلاك الزائد على الطلبة بعينة الدراسة

عند سؤال الطلبة عن ما شعروا به عند انقطاعهم عن استهلاك المشروبات المحتوية على الكافيين لفترة أجاب 38% ،منهم بأنهم عانوا من تعكر المزاج والتعصب، 34% عانوا من صعوبة في التركيز و29% عانوا من قلة الراحة والقلق ،كما هو موضح بالشكل رقم (6) , وهذا ما يتوافق مع دراسة أجريت في كينيا (Wanyika,2010). أما عن الفترة الزمنية لاختفاء تأثير الكافيين تبين أن 38% من الطلبة تم ذلك بعد ساعة واحدة ،و 24% منهم بعد ساعتين ،و19% منهم اختفى لديهم تأثير الكافيين في مدة 3-6 ساعات وهو المعدل الطبيعي لاختفاء تأثير الكافيين في الجسم.



شكل(5) . أعراض الانسحاب على الطلبة بعينة الدراسة

3.2 تقدير تراكيز الكافيين:

تم قياس قيم الامتصاصية (عند طول موجي 260 نانوميتر) لمجموعة تركيزات من محاليل قياسية للكافيين (100, 50, 40, 30, 20، 10 , (مغ/لتر)) تم تحضيرها (كما تم الإشارة لذلك في الطرق والمواد) وتم استعمالها لرسم المنحنى القياسي وكانت المعادلة الخطية التالية:

$$(Y = 53.21X + 1.0672)$$

$$R^2=0.99$$

حيث Y يمثل التركيز و X يمثل الامتصاصية .

الجدول التالي رقم (3) يبين محتوى الكافيين لمحاليل العينات المحضرة, حيث أعلى تركيز كان في النسكافيه وأقل تركيز في الكاكاو .

جدول(3). تركيز الكافيين في المشروبات المنبهة

العينة	متوسط تركيز الكافيين مغ/ لتر ± SD
نسكافيه	0.7± 75.9
قهوة تركية	2.6± 69.6
شاي أسود	1.2± 51.9
شاي أخضر	1.6± 47.4
كاكاو	0.8± 28.7

أما بالنسبة للمشروبات الغازية جدول رقم (4) يبين التركيزات المختلفة لكل العينات حيث كان أعلاها في مشروب البيبسي .

جدول(4). تركيز الكافيين في عينات المشروبات الغازية

العينة	متوسط تركيز الكافيين مغ/ لتر ± SD
بيبسي	0.5± 45.7
بيبسي دايت	1.9± 41.68
كوكاكولا	6.1± 41.59
كوكاكولا zero	1.8± 40.14

من بين كل عينات مشروبات الطاقة التي تم تحليلها احتوت عينة Redbull كما هو متوقع على أعلى تركيز للكافيين وهو ما يتوافق مع دراسة أجريت في نيجيريا (Amos-Tautua, et al. 2014) كما يوضح جدول 5 التالي :

جدول(5). تركيز الكافيين مغ/لتر في عينات مشروبات الطاقة

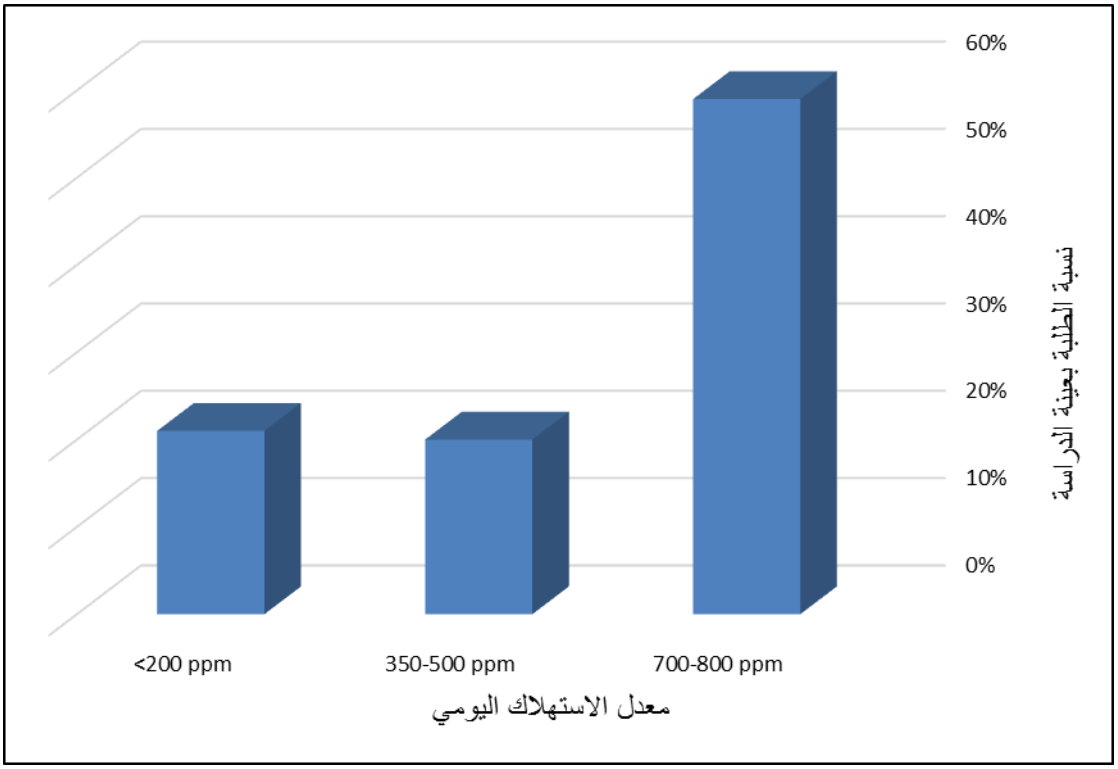
العينة	متوسط تركيز الكافيين مغ/ لتر ± SD
Redbull	3.47± 79.7
XiR	6± 77.32
Shark	4.1± 76.81
Power horse	9.5± 66.4
Bison	0.5± 56.3
Power xxl	1.8± 52.7

وكانت جميع العينات التي تم تحليلها مطابقة للمواصفات القياسية المتبعة من قبل مركز المواصفات القياسية الليبية. وعند قياس محتوى الكافيين للحصة الواحدة اليومية (تقريبا 50 مل) كانت النتائج كما هو موضح بالجدول رقم(6).

جدول(6). محتوى الكافيين للحصة الواحدة من العينات المحضرة (مغ)

العينة	حجم العينة الكلي(مل)	حجم العينة المقاس(مل)	محتوى الكافيين الحصة (مغ)
قهوة تركية	50	50	3.79
نسكافيه	200	50	60.7
شاي أسود	200	50	42.6
شاي أخضر	200	50	41.58
كاكاو	200	50	22.98
بيبسي	330	50	99.6
بيبسي دايت	330	50	99.5
كوكاكولا	330	50	90.5
كوكاكولاzero	330	50	87.4
Redbull	250	50	99.7
XiR	250	50	96.65
Shark	250	50	95.9
Power horse	250	50	83
Power xxl	250	50	66.8
Bison	250	50	63.32

الشكل رقم (6) يوضح نسبة الاستهلاك اليومي للمشروبات من قبل الطلبة ، حيث تبين أن 59% من الطلبة بعينة الدراسة قد تجاوز استهلاكهم للكافيين بشكل مفرط (ppm800-700) الجرعة اليومية المسموح باستهلاكها من قبل منظمة الأغذية والأدوية (FDA) وهي200 ملغم/لتر، وكذلك ما ورد بالمواصفات الليبية القياسية للمشروبات . وهو ما يتوافق مع دراسة امريكية بالخصوص (McIlvain. 2008)، تجاوز استهلاك 20% منهم للمعدل بشكل متوسط(ppm500-350)، بينما ظل استهلاك 21% فقط من الطلبة ضمن الحدود(ppm200).



شكل(6). نسبة الاستهلاك اليومي من المشروبات المحتوية على الكافيين للطلبة بعينة الدراسة

كما تبين من خلال الاستبيان أن 119 طالب حاولوا التخفيف من استهلاك المشروبات المحتوية على الكافيين نجح منهم 66 طالب في ذلك و131 طالب لم يحاول التخفيف من استهلاك الكافيين.

4- الخلاصة والتوصيات

غالبية طلبة جامعة طرابلس في عينة الدراسة يستهلكون مشروبات محتوية علي كافيين ،ومعظم الطلبة عانوا من الآثار الجانبية لاستهلاك الكافيين. الشريحة الأكبر من الطلبة بعينة الدراسة تجاوز استهلاكهم للكافيين داخل المشروبات الجرعة اليومية المسموح باستهلاكها من قبل كلٌ من منظمة الأغذية والأدوية (FDA) والمواصفات القياسية الليبية للمشروبات.

ومن أهم التوصيات التي تنصح بها هذه الدراسة ،هو وضع حلول ملائمة لحجم لمشكلة ،و توعية الطلبة بخطورة الاستهلاك المكثف للمشروبات المحتوية علي الكافيين ،وتوضيح الاضرار الناتجة عنها. ونظرا لخلو المواصفات القياسية الليبية للحد الأقصى المسموح به لتركيز الكافيين داخل عينات القهوة و الشاي و الكاكاو والقهوة سريعة الذوبان ،واكتفائهم بالحد الأدنى فقط، عليه توصي الدراسة بإدراج الحد الأقصى للكافيين في المواصفات المعنية بالمشروبات بأنواعها .

5-المراجـــــــع

1. المواصفات والمعايير القياسية الليبية رقم (16).لسنة 2006 م الخاصة بالمشروبات الغازية غير الكحولية.
2. المواصفات والمعايير القياسية الليبية رقم (396).لسنة 2013م الخاصة بالشاي بالشاي الأسود, الأخضر المنكه والمكيس.
3. Amos-Tautua, W., Martin, W. B. and Diepreye, E.R. 2014. Ultra-violet Spectrophotometric determination of caffeine in soft and en-ergy drinks available in Yenagoa, Nigeria. *Advance Journal of Food Science and Technology* 6(2), pp. 155-158.
4. Babu, K. M., Church, R. J. and lewander, W. 2008. Energy drinks: the new eye-opener for adolescents. *Clinical Pediatric Emergency Med-icine* 9, pp. 35-42.
5. Goldstein, E. R., Ziegenfuss, T., Kalman, D., Kreider, R., > Campbell, B., Wilborn, C., Taylor, L., Willoughby, D., Stout, J., Graves, B. S., Wildman, R., Ivy, J. L., Spano, M., Smith A. B. and Antonio, J. 2010. International society of sports nutrition position stand: caf-feine and performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 7(5), pp 1-15.
6. Illy, E. and Pizano, S. 2004. Coffee and health: New research findings; Proceedings of the International Seminar on Coffee and Health 40th Anniversary meeting of the ICO Cartagena (Colombia), September 15 2003. Chinchina (Colombia), The Commodities Press, 2004, pp. 1-77.
7. Karla, K., Kumar, S. and Maithani, J. 2011. Estimation of caffeine in different beverages by Ultraviolet spectroscopy. *International Jour-nal of Pharmacy and Life Science* 2(11), pp. 1214-1215.

8. McIlvain, G. E. 2008. Caffeine consumption patterns and beliefs of college freshmen. PhD Thesis, University of Kentucky.

9. Olsen, N. L. 2013. *Caffeine consumption habits and perceptions among university of New Hampshire students*. Graduation Thesis, University of New Hampshire.

10. Reissig, C. J., Strain, E. C. and Griffiths, R. R. 2009. Caffeinated energy drinks- agrowing problem. *Drug and Alcohol Dependence* 99(1-3), pp. 1-10.

11. The quantitative determination of caffeine in beverages and soft drinks using UV wavelength spectroscopy [Online]. Bibby Sceintific, Jenway. Available at : http://www.jenway.com/adminimages/A09_010A_Determination_of_Caffeine_in_Beverages_using_UV_Wavelength_Spectroscopy%281%29.pdf [Accessed: 22 June 2016]

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