فصلنامه‌ی پژوهشهای نوین در شیمی تجزیه، زمستان ۱۳۹۳، دوره‌ی ۱، شماره‌ی ۱/ ۲۲-۹
Journal of Advanced Researches in Analytical Chemistry, Winter 2015, Vol. 1, No. 1/ 9-22

اندازه گیری آسپارتام در نوشابه های غیرالکلی به روش مشتق سازی پیش ستون و استخراج نقطه ابری با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مرضیه رشیدی‌پور[۱،*]، مژگان زارعی ونوول[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

یک روش جدید شامل مشتق‌سازی به همراه استخراج نقطه ابری برای اندازه‌گیری آسپارتام استفاده شد. عامل مشتق‌ساز شامل اورتوفتالدهید و مرکاپتوپراپیونیک اسید می‌باشد. جهت جداسازی و پیش تغلیظ مشتق تولید شده از تریتون X-۱۰۰ استفاده شد. پارامترهای مهم در استخراج نقطه ابری از قبیل دما، pH، زمان، قدرت یونی محلول و حجم تریتون X-۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور جداسازی و آنالیز کمی آسپارتام از ستون $C_{۱۸}$ با طول ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد. نتایج حاصله نشان می‌دهند که در شرایط بهینه دقت روش بر اساس میزان انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۶ درصد و صحت اندازه‌گیری آسپارتام بر اساس خطای نسبی کمتر از ۴ درصد می‌باشد. روش مشتق‌سازی پیش ستون و استخراج نقطه ابری توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می‌تواند روش مناسبی برای اندازه‌گیری آسپارتام موجود در نوشابه‌های غیر الکلی باشد.

واژه‌های کلیدی: آسپارتام، استخراج نقطه ابری، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مشتق‌سازی پیش ستون

[۱،*]. **نویسنده‌ی مسئول:** کارشناس ارشد شیمی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد؛ Email: m_rashidi80@yahoo.com

۱- مقدمه

آسپارتام با نام شیمیایی N-L-aspartyl-L-phenylalanine-1-methylester یک شیرین کننده بدون کالری است که با استفاده از دو آمینو اسید L-phenylalanine و L-aspartic acid سنتز می‌شود و به طور گسترده در صنایع دارویی، قنادی، غذایی، نوشیدنی‌ها و غذاهای رژیمی استفاده می‌شود (وایت[1]، ۱۹۸۴).

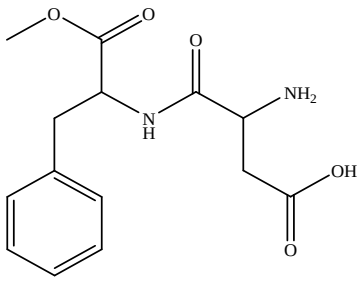
استفاده از آسپارتام در صنایع غذایی در سال ۱۹۸۱ توسط سازمان غذا و داروی آمریکا مورد تایید قرار گرفت و حد مجاز آن در نوشیدنی‌ها ۷۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اعلام شد (رایس[2] و همکاران، ۱۹۷۶). حلّالیت آسپارتام با توجه به ساختار شیمیایی آن به دما و pH وابسته است بطوریکه در دمای محیط و pH= ۷ حلّالیت آن تقریباً ۱۳/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است و در pH= ۲/۲ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش می یابد (بیوتلینگ[3] و همکاران، ۱۹۸۴). استفاده بیش از حد مجاز این ترکیب شیمیایی باعث تشدید و یا بروز بیماری‌هایی از جمله فیبرومیالژی، آرتریت، اسکلروز مولتیپل، پارکینسون، لوپوس اریتماتو، آلزایمر، نقص‌های هنگام تولد، سندرم خستگی مزمن، لنفوم، بیماری لایم، بیماری اختلال در توجه، بیماری‌های پانیک، افسردگی و سایر بیماری‌های روانی می‌گردد (سیلر[4] و همکاران، ۱۹۷۱؛ ایداردز و ساندایـن[5]، ۱۹۸۱؛ فانهاوسر و پچانیک[6]، ۱۹۸۴؛ لیم[7] و همکاران، ۲۰۰۶؛ بوستی[8] و همکاران، ۲۰۰۹). همین امر لزوم کنترل آن را در مواد خوراکی روشن می‌سازد. به دلیل اینکه این ترکیب فاقد گروه‌های کروموفور قوی بوده و تنها در طول موج‌های پایین فرابنفش دارای جذب می‌باشد، میزان حساسیت اندازه‌گیری آن کاهش یافته و تعیین مقدار دقیق آن را در نمونه‌ها با مشکل مواجه می‌کند. با توجه به این امر در این مطالعه سعی شده با استفاده از یک واکنش مشتق‌سازی مناسب یک گروه کروموفور به آسپارتام متصل کرده تا حد تشخیص[9] آن را افزایش دهیم.

---

1. White
2. Rice & et al
3. Beutling & et al
4. Seiler & et al
5. Edards & Sandine
6. Fannhauser & Pechanek
7. Lim & et al
8. Bosetti & et al
9. Limit of Detection (LOD)

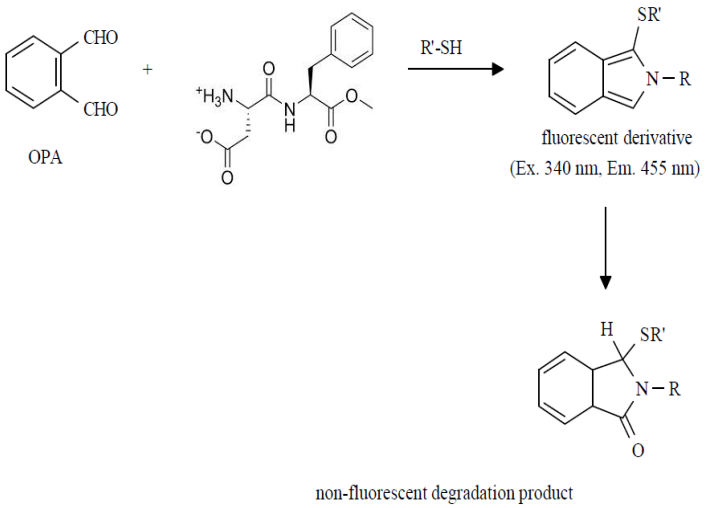
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] (HPLC)، یک روش انتخابی برای اندازه‌گیری مواد معدنی و آلی در ماتریس‌های مختلف است. برخی از ترکیبات با استفاده از HPLC شناسایی نمی‌شوند و نیاز به افزودن یک گروه کروموفور یا انجام یک واکنش اکسیداسیون، احیاء دارند. این مشکل گاهی اوقات نیز با انجام واکنش‌های مشتق‌سازی برطرف می‌شود. در مشتق-سازی پیش ستون[2] واکنش در راکتور (ظرف واکنش) قبل از تزریق به دستگاه HPLC بصورت دستی یا اتوماتیک انجام می‌شود.

همانطورکه از ساختار آسپارتام پیدا است این ترکیب دارای یک گروه آمین نوع اول می-باشد (شکل ۱). یکی از معرف‌هایی که برای تهیه مشتقات دارای جذب فرابنفش/ مرئی و فلورسانس در اثر واکنش با آمین‌های نوع اول مورد استفاده قرار گرفته اورتوفتالدهید می‌باشد. اورتوفتالدهید به عنوان یک ترکیب مناسب برای مشتق‌سازی آمین‌های نوع اول شناخته شده است (آدگین[3]، ۱۹۷۹؛ لایندراد و موپر[4]، ۱۹۷۹). این عامل مشتق ساز در محیط‌های بازی با pH های حدود ۱۱-۹ و در حضور یک مرکاپتان خیلی سریع با آمین‌های نوع اول واکنش می‌دهد (شکل ۲) (راد[5]، ۱۹۷۱).



شکل ۱. ساختار شیمیایی آسپارتام

[1]. High- Performance Liquid Chromatography (HPLC)
[2]. Pre-column Derivatization
[3]. Odgine
[4]. Lindroth & Mopper
[5]. Roth



شکل ۲. واکنش اورتوفتالدهید با آسپارتام (R=Aspartam)

مراحل فرآیند استخراج نقطه ابری به این صورت است که، ابتدا به محلول آبی محتوی جزء و یا اجزایی که باید استخراج شوند، سورفکتانت اضافه می‌شود. مقدار سورفکتانت اضافه شده باید به اندازه‌ای باشد تا تشکیل اجتماعات مایسلی در محلول را تأمین کند که این غلظت از سورفکتانت، غلظت بحرانی مایسلی[1] (CMC) نامیده می‌شود. سپس به منظور ابری شدن محلول، شرایط تغییر داده می‌شود (تغییر دما، افزایش نمک). به منظور بالا بردن سرعت جدایی دو فاز می‌توان از سانتریفوژ استفاده کرد. در این صورت مایسل‌ها در یک فاز با حجم کم به نام فاز غنی از سورفکتانت قرار می‌گیرند و گونه‌هایی که می‌توانند با اجتماع مایسل در محلول برهم‌کنش داشته باشند (یا به فرم طبیعی‌شان و یا بعد از مشتق‌سازی) به آسانی می‌توانند در حجم کوچک فاز غنی از سورفکتانت تغلیظ شوند. راندمان استخراج گونه‌هایی که به واحد مایسلی در محلول متصل می‌شوند به قدرت برهمکنش بین مایسل- حل شونده وابسته است (لیو[2] و همکاران، ۲۰۰۷؛ لیو، ژاو[3] و همکاران، ۲۰۰۷؛ ژو[4] و همکاران، ۲۰۰۹؛ سنتالاد[5] و همکاران، ۲۰۰۹).

---

1. Critical Micelle Concentration (CMC)
2. Liu & et al
3. Liu, Zhao & et al
4. Zhou & et al
5. Santalad & et al

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و معرف‌های استفاده شده

سورفکتانت غیر یونی تریتون X-۱۰۰ از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. اورتو فتالدهید، ۳- مرکاپتوپراپیونیک اسید، فسفریک اسید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم کربنات، سدیم سولفات، سدیم کلراید، متانول و استونیتریل از شرکت مرک آلمان خریداری شد. برای تهیه محلول‌ها و فاز متحرک از آب دیونیزه استفاده شد. پودر خالص آسپارتام از شرکت داروسازی باختر بیوشیمی تهیه گردید. نوشابه کوکاکولا رژیمی از بازار تهیه شد.

۲-۲- تهیه محلول مشتق ساز

محلول استوک اورتو فتالدهید با حل کردن مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از اورتو فتالدهید در ۳ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول مشتق ساز با مخلوط کردن ۳۰۰ میکرولیتر از محلول استوک اورتو فتالدهید، ۲۰ میکرولیتر مرکاپتوپراپیونیک اسید و ۴ میلی‌لیتر بافر بورات با pH=۱۰ تهیه گردید.

۲-۳- تهیه محلول‌های استاندارد

محلول استوک آسپارتام با حل کردن مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از آسپارتام در بالن حجم سنجی ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی بافر بورات با pH=۹ تهیه گردید. از محلول فوق استانداردهای با غلظت ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۴۰ و۱۸۰ میلی‌گرم بر لیتر در حجم ۱ میلی‌لیتر تهیه شد و به هر یک از آنها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌ساز اضافه شد.

۲-٤- تهیه محلول نمونه

غلظت تقریبی آسپارتام در نمونه نوشابه ۲۴۰ میلی‌گرم بر لیتر ذکر شده است. سه محلول با غلظت‌های تقریبی ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر از نوشابه در بافر بورات تهیه شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از این نمونه‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌ساز اضافه شد.

۲-۵- دستگاهوری

سیستم HPLC مدل شیمادزو دارای پمپ چهار حلّاله مدل LC-10ATvp به همراه شیر تزریق با لوپ ۲۰ میکرولیتر مدل D–14163، آشکارساز UV-Vis مدل SPD-M10Avp، ستون Eurospher, $C_{۱۸}$ (۵ µm، ۴/۶ × ۲۵۰ mm) همگی ساخت شرکت شیمادزو ژاپن، به منظور جداسازی و آنالیز کمی آسپارتام مورد استفاده قرار گرفتند.

شرایط کروماتوگرافی عبارتند از: فاز متحرک بافر پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH= ۲/۵ / استونیتریل به نسبت ۵۰ :۵۰ در سرعت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه. به منظور تعیین کمی دقیق، دتکتور در طول موج ۳۳۸ نانومتر تنظیم گردید. به منظور سانتریفوژ نمونه از دستگاه Eppendorf مدل 5810R ساخت کشور آلمان استفاده شد.

۲-٦- روش استخراج نقطه ابری

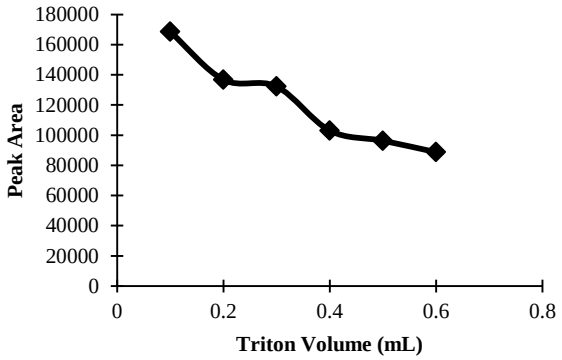
تحت شرایط بهینه مقدار ۴ میلی‌لیتر از محلول نمونه یا استاندارد و ۴ میلی‌لیتر بافر بورات با pH=۱۰ در یک لوله مخروطی ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد. مقدار ۰/۹ گرم نمک کلرید سدیم به آن اضافه شد. سپس با استفاده از یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر تریتون X-۱۰۰ به داخل نمونه سریع تزریق شد. در مرحله بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مشتق ساز توسط یک سرنگ هامیلتونی ۱۰۰ میکرولیتری به لوله حاوی نمونه منتقل شد. سپس نمونه به مدت ۱ دقیقه کاملاً هم زده شد و به مدت زمان ۵ دقیقه در یک حمام آبی ۵۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، فاز رویی جدا و به یک لوله آزمایش منتقل شد و مقدار یک میلی‌لیتر متانول به آن اضافه شد. سپس محلول کاملاً هم زده شد و پس از انحلال کامل مقدار ۲۰ میکرولیتر آن به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر حجم حلّال استخراج کننده

در این مطالعه از تریتون X-۱۰۰ که یک سورفکتانت غیریونی است به عنوان حلّال استخراج استفاده شد. استخراج توسط حجم‌های مختلفی از این حلّال استخراج کننده انجام گرفت. بعد از اضافه کردن حجم‌های مختلف محلول به مدت ۵ دقیقه در حمام آبی در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس این محلول ابری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی جمع‌آوری و در ۱ میلی‌لیتر متانول حل شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. اثر حجم‌های مختلف روی مقدار استخراج در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که حجم ۰/۱ میلی‌لیتر در مقایسه با دیگر حجم‌های بکار رفته راندمان استخراج بیشتری دارد. در حجم‌های بالاتر از ۰/۱ میلی‌لیتر به دلیل

افزایش حجم فاز غنی از سورفکتانت که حاوی آنالیت می‌باشد غلظت آنالیت کاهش می‌یابد. در حجم‌های کمتر از ۰/۱ میلی‌لیتر سیستم دو فازی جهت جدا کردن فاز آلی تشکیل نشد.



شکل ۳. اثر حجم حلّال استخراج کننده روی میزان استخراج آنالیت

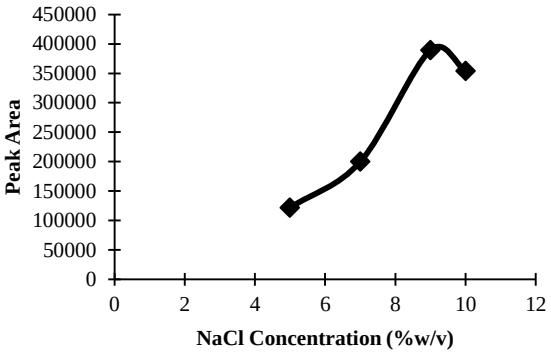
۳-۲- اثر pH نمونه

pH محلول نمونه بویژه در مورد ترکیبات دارای خصلت اسیدی یا بازی، پارامتر مهمی بوده که روی میزان راندمان استخراج آنالیت‌ها از محلول آبی تأثیر بسزایی دارد. با توجه به اینکه واکنش مشتق‌سازی بین آسپارتام و اورتوفتالدهید تنها در pH های قلیایی ۹ تا ۱۰ قابل انجام می‌باشد، بنابراین pH محلول در pH= ۹ توسط بافر بورات تثبیت شد.

۳-۳- اثر قدرت یونی محلول

اضافه کردن نمک به محلول نمونه و تریتون باعث می‌شود که دو فاز آبی و سورفکتانت بدلیل افزایش دانسیته فاز آبی راحت تر جداسازی شوند. در این بررسی غلظت‌های ۰، ۵، ۷، ۹ و ۱۰ درصد وزنی- حجمی از نمک کلرید سدیم مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد زمانی که از نمک استفاده نشد هیچگونه جدایی فاز صورت نخواهد گرفت. نتایج مربوط به اثر غلظت نمک روی میزان استخراج آنالیت در شکل ۴ نشان داده شده است. بطوریکه از شکل مشاهده می‌شود با افزایش قدرت یونی تا ۹ درصد راندمان استخراج افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد. در نتیجه غلظت ۹ درصد نمک سدیم کلراید به عنوان قدرت یونی بهینه برای مطالعات بیشتر انتخاب گردید. به نظر می‌رسد با افزایش نمک میزان

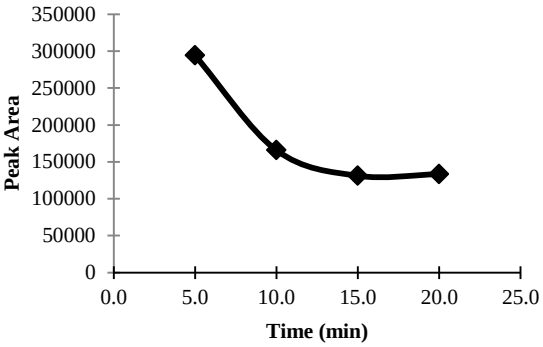
ویسکوزیته نمونه افزایش می یابد و انتقال آنالیت از فاز آبی به فاز سورفکتانت کمتر می‌شود به همین دلیل راندمان استخراج کاهش یافته است.



شکل ۴. اثر غلظت نمک روی میزان استخراج آنالیت

۳-٤- اثر زمان استخراج

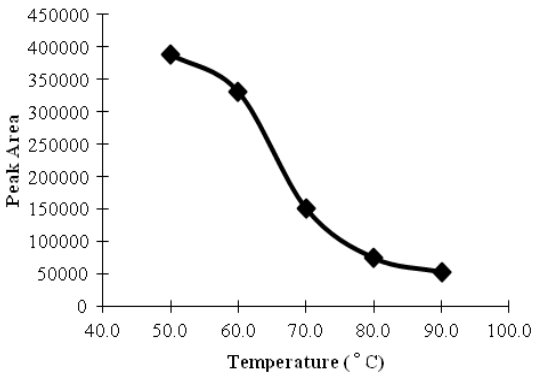
در این مطالعه اثر زمان استخراج در دمای ثابت ۵۰ درجه سانتیگراد روی راندمان استخراج بررسی گردید. نتایج این آزمایش در شکل ۵ نشان داده شده است. بطوریکه از شکل مشاهده می‌شود با افزایش مدت زمان استخراج مقدار آنالیت استخراج شده کاهش می‌یابد. علت این پدیده ممکن است بخاطر عدم پایداری زیاد محصول حاصل از واکنش مشتق‌سازی باشد. بنابراین مدت زمان استخراج ۵ دقیقه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.



شکل ۵. اثر زمان استخراج روی میزان استخراج آنالیت

۳-۵- اثر دمای استخراج

در روش استخراج نقطه ابری دمای استخراج یک پارامتر مهم می‌باشد. علت این اهمیت به خاطر این است که سورفکتانت در دمای خاصی می‌توان مایسل تشکیل دهد. در این مطالعه دمای استخراج در محدوده ۴۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد سیستم دو فازی حاصل نشد. نتایج مربوط به دماهای بالاتر در شکل ۶ نشان داده شده است. از نتایج پیداست که با افزایش دما میزان استخراج آنالیت کاهش می‌یابد. همانطور که قبلاً نیز اشاره شد علت این پدیده ممکن است بخاطر عدم پایداری حرارتی محصول واکنش مشتق‌سازی باشد (پورقبادی و همکاران، ۲۰۱۳). به هر حال، دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به عنوان دمای بهینه استخراج انتخاب گردید.



شکل ۶. اثر دمای استخراج روی میزان استخراج آنالیت

۳-٦- ارزیابی کارایی روش

با آنالیز محلول‌های آبی حاوی غلظت‌های مختلف از آنالیت تحت شرایط بهینه نمودار کالیبراسیون بدست آمد. در این بررسی جهت نشان دادن اثر روش استخراج نقطه ابری روی میزان حساسیت روش یک نمودار کالیبراسیون قبل از انجام استخراج نقطه ابری و یک منحنی کالیبراسیون بعد از انجام استخراج رسم گردید. مقایسه شیب این دو منحنی نشان می‌دهد که بعد از استخراج به علت تغلیظ انجام شده حساسیت روش به مراتب بیشتر از زمانی است که استخراج صورت نگرفته باشد (شکل ۷). شرایط بهینه روش استخراج نقطه ابری عباتند از: ۰/۱ میلی‌لیتر تریتون X-۱۰۰، pH= ۹، زمان استخراج ۵ دقیقه، زمان سانتریفوژ ۱۰ دقیقه و دمای استخراج ۵۰ درجه سانتیگراد. محدوده خطی بعد از استخراج ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی-

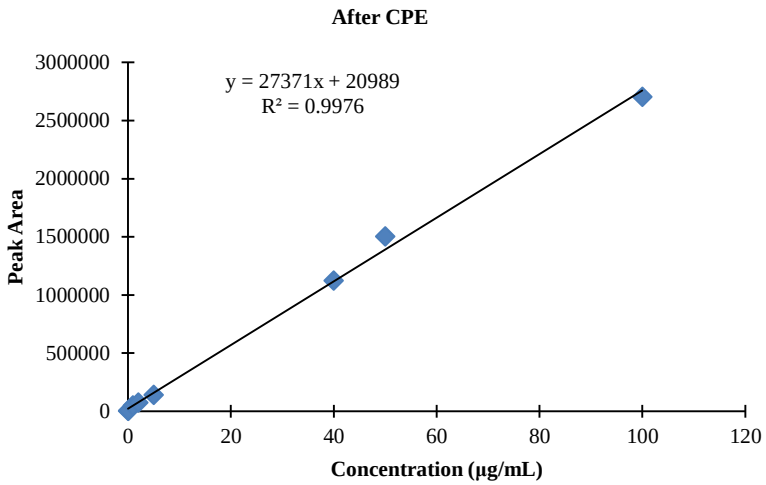
لیتر می‌باشد. انحراف استاندارد نسبی مربوط به ۶ استخراج متوالی ۶ درصد بدست آمد. حد تشخیص آنالیت توسط روش پیشنهادی بر اساس S/N= ۳ برابر با ۰/۰۰۳ میکروگرم بر می-باشد.

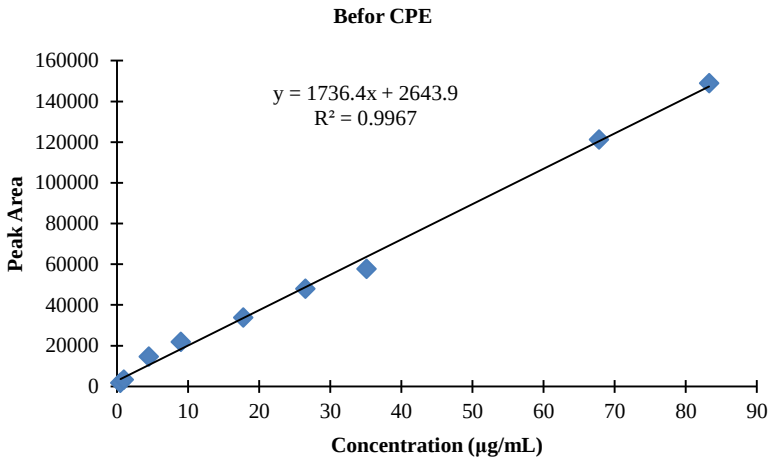
۳-۷- کاربرد روش برای آنالیز نمونه‌های واقعی

از نوشابه رژیمی کوکاکولا به عنوان نمونه حقیقی در این بررسی جهت تعیین مقدار آسپارتام موجود در آن استفاده شد. با فرض درست بودن مقدار آسپارتام ذکر شده در برچسب نوشابه سه محلول با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این محلول‌ها همانند استانداردهای آسپارتام مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از طریق مقایسه مساحت زیر پیک مربوطه با پیک استاندردها صحت روش را تایید می‌کند. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. از آنجائیکه تنها یک نمونه واقعی در دسترس بود به منظور بررسی کاربرد روش سه غلظت متفاوت از این نمونه تهیه و مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج اثبات می کنندکه ماتریکس نمونه واقعی اثر خاصی روی روش استخراج نقطه ابری ندارد. بنابراین روش استخراج نقطه ابری را می‌توان برای تغلیظ و اندازه‌گیری آسپارتام در نمونه‌های نوشابه استفاده کرد. کروماتوگرام مربوط به یک نمونه استاندارد، نمونه حقیقی و بلانک در شکل ۸ نشان داده شده است.

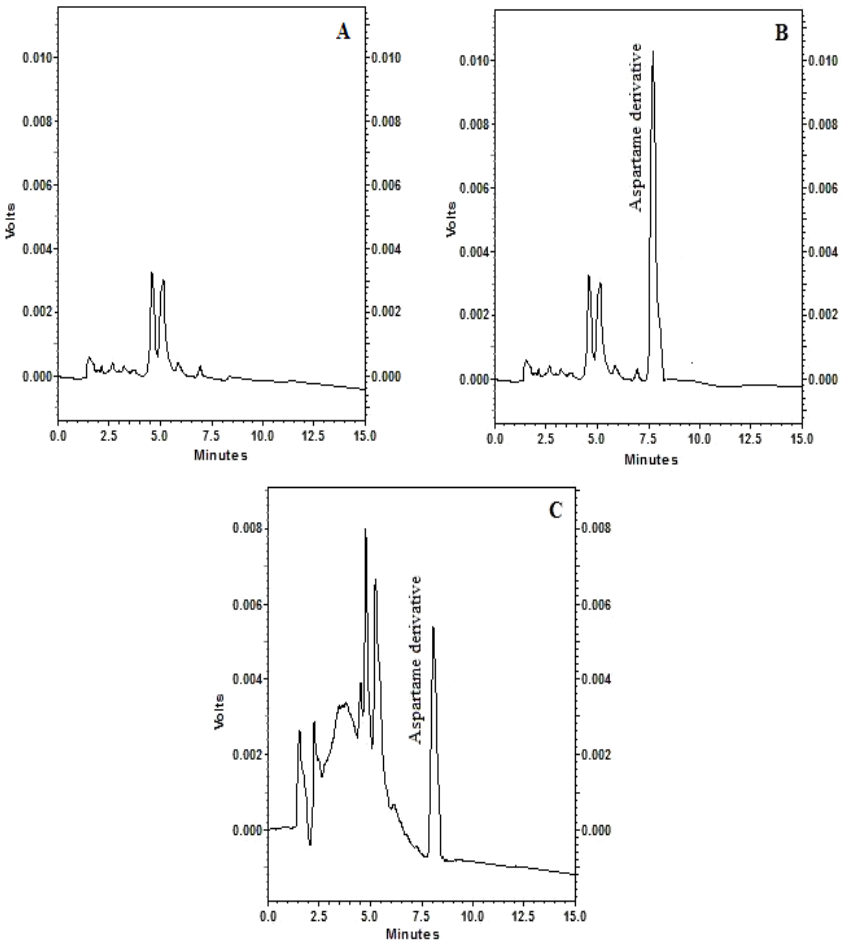
جدول ۱. نتایج مربوط به آنالیز نمونه واقعی

غلظت اضافه شده به نمونه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	غلظت بدست آمده (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	مقدار بازیافت (درصد)	RSD برای ۶ اندازه‌گیری تکراری
۱۰	۹/۸۸	۹۸/۸	۳/۵۰
۲۰	۱۹/۲۰	۹۶/۰	۳/۳۲
۵۰	۴۸/۵۰	۹۷/۰	۲/۵۴





شکل ۷. نمودارهای کالیبراسیون قبل و بعد از استخراج نقطه ابری



شکل ۸. کروماتوگرام بلانک (A)، استاندارد آسپارتام (B) و نمونه حقیقی (C)

۳- نتیجه‌گیری

آسپارتام یک شیرین کننده بدون کالری است که به طور گسترده در صنایع دارویی، قنادی، غذایی، نوشیدنی‌ها و غذاهای رژیمی استفاده می‌شود. به علت میزان جذب پایین آسپارتام در ناحیه فرابنفش- مرئی امکان اندازه‌گیری غلظت این ترکیب در مقادیر غلظتی کم با صحت بالا ممکن نمی‌باشد. با استفاده از روش مشتق‌سازی مشکل جذب پایین مرتفع گردید. از سوی دیگر به کمک استخراج نقطه ابری می‌توان از طریق تغلیظ نمونه حد آشکارسازی این ترکیب را تا حد بالایی ارتقاء داد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان ادعا

کرد که روش استخراج نقطه ابری همراه با مشتق‌سازی توسط اورتوفتالدهید را می‌توان با دقت و حساسیت بالایی برای اندازه‌گیری آسپارتام استفاده نمود.

۵- سپاسگزاری

مولفین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد به خاطر تأمین هزینه‌های مالی این مطالعه کمال تشکر و قدرانی را دارند.

منابع

Beutling, D., Scheibner, I.J., Scheibner, G. (1984). *Mh. Veterinärmed*, 39: 231.

Bosetti, C., Gallus, S., Talamini, R., Montella, M., Franceschi, S. and Negriand, E. (2009). Artificial Sweeteners and the Risk of Gastric, Pancreatic, and Endometrial Cancers in Italy, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 2235-2238.

Edards, S.T. and Sandine, W.J. (1981*).* Public health significance of amines in cheese, *Dairy Scientific*, 64: 2431.

Fannhauser, W. and Pechanek, U.Z. (1984). *Gesamt Hing; Grenzgeb*, 30: 66.

Lim, U., Amy, F. Subar., Mouw, T., Hartge, P., Lindsay, M. M. and Solomon, R. S. (2006). Consumption of Aspartame-Containing Beverages and Incidence of Hematopoietic and Brain Malignancies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 1654-1659.

Lindroth, P. and Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde, *Anal Chem*, 51: 1667.

Liu, W., W. Zhao, J., Chen, J. and Yang, M. (2007). A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan, dyes in chilli powder, *Anal Chim Acta*, 605: 41-45.

Liu, X., Chen, X.H., Zhang, Y.Y., Liu, W.T. and Bi, K.S.J. (2007). Determination of arbidol in rat plasma by HPLC–UV using cloud-point extraction, *Chromatogr*, B, 856: 273-277.

Odgin, J. J. (1979). *Liq Chromatogr*, 2: 1049.

Pourghobadi, Z., Heydari, R., Pourghobadi, R. and Rashidipour, M. (2013). Determination of gabapentin in human plasma using simultaneous cloud point extraction and precolumn derivatization by HPLC, *Monatsh Chem*, 144: 773-779.

Rice, S.L., Eitenmiller R.R. and Koeler P.E. (1976). *Milk Food Technol*, 39: 166.

Roth, M. (1971). Fluorescence reaction for amino acids, *Anal Chem*, 43: 880-882**.**

Santalad, A., Srijaranai, S., Burakham, R., D. Glennon, J. and L.Deming, R. (2009). Cloud-point extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of carbamate insecticide residues in fruits, *Anal Bioanal Chem*, 394: 1307-1317.

Seiler, N., Domisch, L. and Schneider, H. (1971). Biochemistry and Function of Biogenic Amines in the Central Nervous System, *Angew; Chem, Int. Ed. Eng*, 10: 51.

White, P.C. (1984). Recent developments in detection techniques for high-performance liquid chromatography. Part I. Spectroscopic and electrochemical detectors. A review, *Analyst*, 109: 677-697.

Zhou, J., Chen, J., Cheng, Y., Li, D., Hu, F. and Huixin, L. (2009). Determination of Prometryne in water and soil by HPLC–UV using cloud-point extraction, *Talanta*, 79: 189-193.