

Xây dựng phương pháp điện di mao quản xác định hàm lượng các amino axit tự do chính trong sản phẩm sữa ong chúa

Vũ Minh Tuấn¹, Ngô Thị Ngân^{1,2}, Nguyễn Mạnh Huy¹,
Nguyễn Thanh Đàm¹, Dương Hồng Anh^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 1/10/2018; ngày chuyển phản biện 4/10/2018; ngày nhận phản biện 2/11/2018; ngày chấp nhận đăng 8/11/2018

Tóm tắt:

Sữa ong chúa có chứa nhiều dưỡng chất quý, với nhiều loại amino axit quan trọng đối với sự phát triển của cơ thể. Nghiên cứu này trình bày việc xây dựng phương pháp điện di mao quản (CE) với detector đo độ dẫn không tiếp xúc (C⁴D) để định lượng 5 amino axit tự do có hàm lượng cao trong sữa ong chúa gồm lysin (Lys), alanin (Ala), prolin (Pro), axit glutamic (Glu) và axit aspartic (Asp). Các amino axit được phân tách trong mao quản với chiều dài hiệu dụng 48 cm và chất điện ly nền axit lactic 2M. Ở điều kiện tối ưu, đường chuẩn của các chất phân tích được xây dựng trong khoảng 2,0÷100 mg/l và có hệ số tương quan tốt ($R^2 > 0,999$). Phương pháp có độ đúng tốt với hiệu suất thu hồi trong khoảng 93÷115% với nền nước deion và nền mẫu thật. Quy trình đã được áp dụng thành công để phân tích các amino axit tự do nêu trên trong một số sản phẩm sữa ong chúa tươi hiện có trên thị trường.

Từ khóa: amino axit tự do, điện di mao quản, sữa ong chúa.

Chỉ số phân loại: 2.4

Tổng quan

Sữa ong chúa có thành phần hóa học đa dạng và phong phú, bao gồm các thành phần chính là nước, cacbonhydrat, protein, lipid và axit béo, còn lại là các vitamin, amino axit tự do, muối khoáng... Ngoài axit 10-hydroxy-2-decenoic (viết tắt: 10-HDA) được coi như một “đấu chuẩn” - marker, sữa ong chúa còn là một sản phẩm tự nhiên giàu amino axit rất quan trọng đối với con người và động vật. Sữa ong chúa chứa ít nhất 15 amino axit, quyết định tới giá trị dinh dưỡng của sản phẩm. Các amino axit tự do chiếm hàm lượng cao nhất là prolin, lysin, axit glutamic, alanin, axit aspartic... [1, 2]. Hàm lượng các amino axit trong sữa ong chúa thay đổi phụ thuộc vào nguồn sản xuất như chất lượng đàn ong, thời tiết, môi trường nuôi; vào điều kiện bảo quản như nhiệt độ, thời gian... Vì đây là những thành phần đặc hiệu và có giá trị nên hàm lượng của chúng sẽ quyết định chất lượng của sữa ong chúa.

Việc xác định hàm lượng các thành phần này trong sữa ong chúa được thực hiện tại các phòng thí nghiệm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc phương pháp sắc ký khí (GC). Trước khi phân tích bằng GC, cần có bước tách chất phân tích ra khỏi nền mẫu, sau đó dẫn xuất hóa chúng thành các cấu tử dễ bay hơi qua phản

ứng ankyl hóa, silyl hóa [3, 4]. Detector ion hóa ngọn lửa (FID) có thể được sử dụng để phân tích thành phần của các amino axit tự do, còn khi định lượng sẽ sử dụng detector khối phổ [3, 4]. Phương pháp HPLC với detector đo quang ở bước sóng 215 nm hoặc detector khúc xạ kế (RID), hoặc hiện nay là detector khối phổ kép (MS/MS) được sử dụng phổ biến hơn để xác định 10-HDA cũng như các amino axit tự do trong sữa ong chúa [5-7]. Tuy nhiên, các phương pháp này đều cần giai đoạn xử lý mẫu phức tạp, có chi phí cao, cùng với các yêu cầu kỹ thuật nghiêm ngặt, đồng thời tốn khá nhiều thời gian.

Hiện nay, trong lĩnh vực thực phẩm, việc ứng dụng phương pháp điện di mao quản (CE), đặc biệt là điện di mao quản vùng (CZE) đang trở nên phổ biến bởi tính đơn giản, nhanh chóng, hiệu quả tách cao và tiêu tốn ít hóa chất, dung môi [8]. Phương pháp này còn là một kỹ thuật phân tích hướng tới hóa học xanh. Bài báo trình bày các kết quả xây dựng quy trình phân tích một số amino axit tự do có hàm lượng cao trong sữa ong chúa gồm lysin (Lys), alanin (Ala), prolin (Pro), axit glutamic (Glu) và axit aspartic (Asp) bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc. Một số mẫu sữa ong chúa tươi của Việt Nam đã được thu thập và phân tích bằng phương pháp đã tối ưu.

*Tác giả liên hệ: hoanggianga0@gmail.com

Development of capillary electrophoresis method to determine the content of major free amino acids in commercial royal jelly products

Minh Tuan Vu¹, Thi Ngan Ngo^{1,2}, Manh Huy Nguyen¹,
Thanh Dam Nguyen¹, Hong Anh Duong^{1*}

¹Research Centre for Environmental Technology and Sustainable Development, VNU University of Science

²Faculty of Chemistry, VNU University of Science

Received 1 October 2018; accepted 8 November 2018

Abstract:

Royal jelly contains a lot of valuable nutrients with several kinds of amino acids which are important to the development of human body. This study presented the development of the analytical method based on capillary electrophoresis (CE) using capacitively coupled contactless conductivity detector (C⁴D) for determination of five major free amino acids in royal jelly products including lysine (Lys), alanine (Ala), proline (Pro), glutamic acid (Glu), and aspartic acid (Asp). Five amino acids were separated in a capillary with an effective length of 48 cm and in 2M lactic acid electrolyte. At the optimised conditions, the linear ranges of calibration curves were from 2.0 to 100 mg/l, and the linearities were good ($R^2 > 0.999$). The method had good accuracy with the recoveries in range of 93–115% for deionised water and real sample matrixes. The procedure has been successfully applied to the determination of five major free amino acids in commercially available royal jelly products.

Keywords: capillary electrophoresis, free amino acids, royal jelly.

Classification number: 2.4

Thực nghiệm

Hóa chất và thiết bị

Tất cả hóa chất đều có độ tinh khiết phân tích và được cung cấp từ Tokyo Chemical Industry (Nhật Bản) hoặc Sigma-Aldrich (Đức). Dung dịch chuẩn gốc (1000 mg/l) của Lys, Ala, Pro, Glu và Asp được sử dụng để pha các dung dịch chuẩn. Các hóa chất dùng để pha dung dịch điện ly nền (BGE) bao gồm: axit formic, axit axetic, axit lactic, axit succinic và axit citric. Nước deion được dùng để pha các dung dịch chuẩn và xử lý mẫu, lấy từ máy lọc nước Simplicity UV, Millipore (USA).

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện trên hệ thiết bị điện di mao quản thao tác bằng tay (CE) sử dụng detector đo độ dẫn không tiếp xúc (C⁴D) tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ phân tích phục vụ kiểm định môi trường và an toàn thực phẩm (KLATEFOS), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Hệ thiết bị sử dụng nguồn cao thế ± 25 kV (Spellman, Anh), ghi dữ liệu nhờ bộ ghi e-corder (eDAQ, Úc). Cột mao quản silica nóng chảy đường kính trong (I.D) 50 μ m, đường kính ngoài là 365 μ m với độ dài tổng (L_{tot}) 60 cm và độ dài hiệu dụng (L_{eff}) 48 cm (Agilent, Mỹ) được sử dụng để tách chất. Trước lần phân tích đầu tiên của mỗi ngày, mao quản được ổn định hóa bằng dung dịch NaOH 0,1M trong 10 phút, sau đó là nước deion trong 10 phút và BGE trong 30 phút. Sau mỗi phép đo, mao quản được rửa bằng BGE trong vòng 3 phút.

Tối ưu hóa quy trình phân tích các amino axit trên hệ thiết bị CE-C⁴D

Dung dịch hỗn hợp chuẩn của 5 amino axit ở nồng độ 40 mg/l được sử dụng để khảo sát các điều kiện phân tích. Trong các thí nghiệm, điện thế tách được giữ cố định ở giá trị -15 kV và thời gian bơm mẫu 30 s; trừ các thí nghiệm khảo sát điều kiện điện thế và thời gian bơm. Điều kiện phân tích được lựa chọn trên cơ sở đường nền ổn định, tín hiệu của các chất phân tích có diện tích lớn, hình dạng sắc nét, độ phân giải giữa các pic cạnh nhau có giá trị lớn hơn 1,5.

Nghiên cứu lựa chọn dung dịch điện ly nền: qua tham khảo tài liệu, một số loại BGE tại pH thấp (<2) trên cơ sở các axit hữu cơ với các nồng độ khác nhau được lựa chọn để nghiên cứu quy trình phân tích các amino axit bao gồm: 1) axit formic (0,1M tới 2,0M); 2) axit axetic (0,1 tới 4,0M); 3) axit lactic (0,1 tới 5,0M); 4) axit succinic (0,1 tới 0,5M) và 5) axit citric (0,1 tới 2,0M). Sau khi lựa chọn được dung dịch điện ly nền thích hợp, tiếp tục nghiên cứu lựa chọn điện thế tách và thể tích bơm mẫu.

Nghiên cứu lựa chọn điện thế tách: ảnh hưởng của điện thế tách đến thời gian di chuyển, sự phân tách giữa các tín hiệu chất phân tích được khảo sát với các giá trị thay đổi từ

-10 tới -20 kV.

Nghiên cứu lựa chọn thời gian bơm mẫu: ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến diện tích và hình dạng tín hiệu của chất phân tích được khảo sát với thời gian bơm mẫu thay đổi từ 10 tới 60 s.

Đánh giá phương pháp

Đường chuẩn được xây dựng theo phương pháp ngoại chuẩn (7 điểm) với nồng độ từng amino axit trong khoảng từ 2 tới 40 mg/l. Giá trị LOD và LOQ đối với các chất trong dịch chiết được tính bằng 3 và 10 lần tỷ lệ tín hiệu/nhiều nền, tương ứng. Giá trị giới hạn định lượng của phương pháp theo mg/g của các amino axit được tính bằng LOQ/20 (hệ số quy đổi tương ứng với hòa tan 1,0 g mẫu trong 50 ml nước). Trong nghiên cứu này, độ lặp lại của phương pháp được xác định thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của 7 phép phân tích lặp lại đối với dung dịch chuẩn đánh giá qua thời gian di chuyển và diện tích pic. Độ chính xác được xác định bằng hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn các amino axit ở nồng độ 5, 10, 20 mg/l vào nền nước deion và nền mẫu sữa ong chúa tươi.

Chuẩn bị và phân tích mẫu

Mẫu được xử lý như sau: cân một lượng chính xác (khoảng 1,0 g) mẫu sữa ong chúa tươi, hòa tan mẫu và định mức tới 50 ml bằng nước deion, sau đó lọc dung dịch thu được qua màng lọc 0,45 µm trước khi bơm vào thiết bị CE-C⁴D. Dịch lọc được phân tích bằng quy trình đã tối ưu ở trên. Thời gian di chuyển để định tính các amino axit được xác định lại sau khi thêm chuẩn, việc định lượng được thực hiện bằng phương pháp đường chuẩn. Kết quả phân tích hàm lượng các amino axit trong mẫu sản phẩm được tính dựa trên kết quả phân tích dịch lọc bằng CE-C⁴D và các hệ số khi chuẩn bị mẫu.

Kết quả và thảo luận

Xây dựng phương pháp

Lựa chọn dung dịch điện ly nền: các amino axit chứa cả nhóm chức cacboxyl và amino, do vậy tùy vào pH mà chúng có thể tồn tại trong dung dịch dưới dạng anion hoặc cation. Dựa trên các số liệu về pKa và pI của các chất cần phân tích trong bảng 1, có thể thấy rằng, việc sử dụng phương pháp điện di mao quản để tách các amino axit nêu trên có thể thực hiện được tại môi trường khá axit (cỡ pH<2), lúc này các chất cần phân tích tồn tại chủ yếu dưới dạng cation, hoặc tại môi trường có pH>11, khi đó các chất cần phân tích tồn tại chủ yếu dưới dạng anion. Để thuận tiện cho việc thực hiện phương pháp điện di mao quản, tránh ảnh hưởng của dòng EOF, phương án môi trường axit được lựa chọn và các chất được phân tích dưới dạng cation.

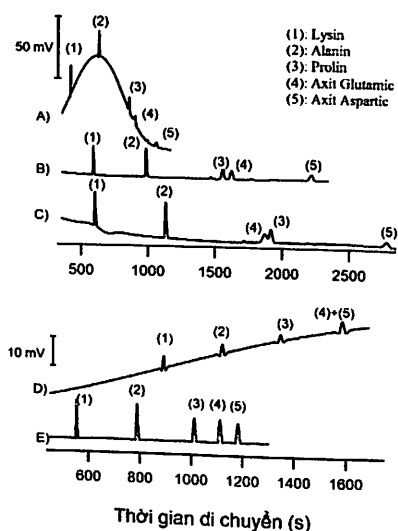
Bảng 1. Đặc tính của các amino axit cần phân tích.

Chất phân tích	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pI
Lysin	2,18	8,59	10,53	9,74
Alanin	2,34	9,69		6,00
Prolin	1,99	10,96		6,30
Axit glutamic	2,19	9,67	4,25	3,22
Axit aspartic	1,88	9,60	3,65	2,77

Chú thích: pKa₁: nhóm α-cacboxyl, pKa₂: nhóm α-amonium (axit liên hợp của nhóm α-amino), pKa₃: nhóm axit trong mạch.

Các axit hữu cơ với kích thước phân tử nhỏ được lựa chọn để khảo sát làm BGE gồm axit formic, axit axetic, axit lactic, axit succinic và axit citric. Vì detector sử dụng là C⁴D, nên nồng độ của các axit này trong BGE cũng được lựa chọn ở cỡ 0,1 mol/l tới vài mol/l để tránh sự ảnh hưởng của nền độ dẫn cao.

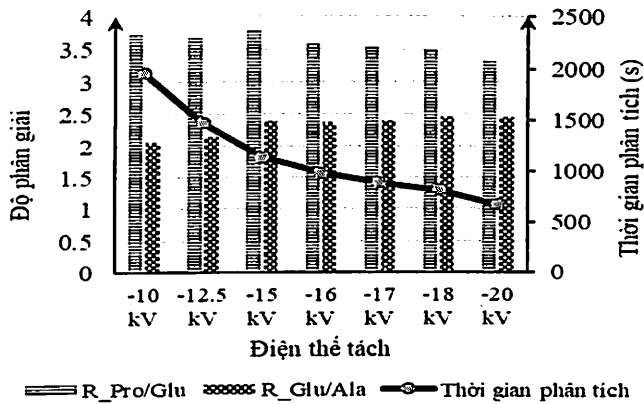
Kết quả khảo sát cho thấy: với axit formic đường nền không ổn định, các pic của Glu và Asp doãng; với axit axetic đường nền thẳng, xuất hiện cả 5 tín hiệu chất cần phân tích, tuy nhiên thời gian phân tích dài (>2000 s); sử dụng axit lactic trong khoảng 2-3M làm dung dịch điện ly cho đường nền thẳng ổn định, các pic của chất cần phân tích sắc nét tách khỏi nhau với thời gian phân tích <500 s; với axit succinic các tín hiệu của Pro và Glu không tách được hoàn toàn và thời gian phân tích >3000 s; với axit citric không tách được các pic Glu và Asp. Hình 1 là điện di đồ phân tích 5 amino axit khi sử dụng các dung dịch điện ly khác nhau (đối với từng loại BGE, nồng độ cho tín hiệu tốt nhất trong khảo sát được lựa chọn). Trên cơ sở kết quả khảo sát nêu trên, axit lactic với nồng độ 2M được lựa chọn làm dung dịch điện ly nền.



Hình 1. Điện di đồ phân tích các amino axit khi sử dụng các dung dịch điện ly nền khác nhau.

A) Axit formic 2M; B) Axit axetic 2M; C) Axit succinic 0,5M; D) Axit citric 2M; E) Axit lactic 2M. Các điều kiện phân tích khác được giữ cố định: điện thế tách -15 kV; thời gian bơm mẫu 30 s; mao quản silica nóng chảy I.D=50 µm, L_{tot}=60 cm, L_{eff}=52 cm.

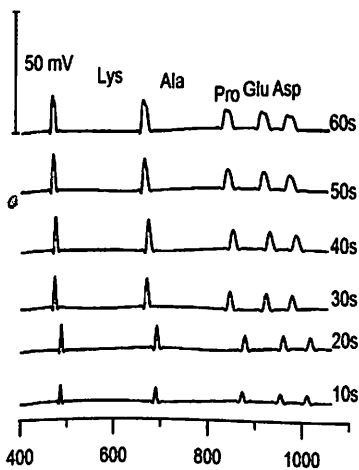
Lựa chọn điện thế tách: khi tăng độ lớn của điện thế tách, cường độ điện trường tăng làm cho các ion di chuyển nhanh hơn, các pic thu gọn lại và có hình dạng sắc nét hơn, đồng thời diện tích pic cũng nhỏ hơn (hình 2). So sánh các yếu tố về diện tích tín hiệu, độ phân giải và thời gian di chuyển cho thấy, tại thế tách -16 kV các giá trị thu được là phù hợp nhất. Vì vậy -16 kV được chọn làm điện thế cho quá trình tách tiếp theo.



Hình 2. Sự biến đổi của độ phân giải và thời gian phân tích của các amino axit tại các điện thế tách khác nhau.

Thời gian phân tích được xác định sau tín hiệu của pic cuối cùng (Asp). Các điều kiện phân tích khác được giữ cố định: BGE axit lactic 2M; thời gian bơm mẫu 30 s; mao quản silica nóng chảy I.D=50 μm, L_{tot}=60 cm, L_{eff}=52 cm.

Lựa chọn thời gian bơm mẫu: khi tăng thời gian bơm mẫu, lượng mẫu đi vào mao quản nhiều hơn, dẫn tới diện tích các pic tăng dần, hình dạng pic trở nên đồng rộng như tại hình 3. Trong nghiên cứu này, thời gian bơm mẫu là 40 s được lựa chọn nhằm đạt kết quả tốt về cả diện tích và hình dạng pic.



Hình 3. Điện di đồ phân tích các amino axit với thời gian bơm mẫu khác nhau.

Các điều kiện phân tích khác được giữ cố định: BGE axit lactic 2M, điện thế tách -16 kV; mao quản silica nóng chảy I.D=50 μm, L_{tot}=60 cm, L_{eff}=52 cm.

Đánh giá phương pháp

Kết quả đánh giá phương pháp phân tích đã xây dựng được trình bày trong bảng 2. Hệ số hồi quy tuyến tính của các đường chuẩn thu được có giá trị rất tốt, với R²>0,999. Độ lặp lại của diện tích pic và thời gian di chuyển được thể hiện dưới dạng độ lệch chuẩn tương đối (RSD) trên nền nước deion đều nhỏ hơn 2% khi phân tích lặp lại 7 lần. Hiệu suất thu hồi đạt được từ 93 đến 115% khi thêm chuẩn các amino axit vào nền nước deion và nền mẫu sữa ong chúa. Các giá trị hiệu suất thu hồi này là chấp nhận được theo AOAC [9]. Các giá trị LOQ thu được trong khoảng 0,04-0,09 mg amino axit/g sữa ong chúa tươi.

Bảng 2. Các thông số đánh giá phương pháp.

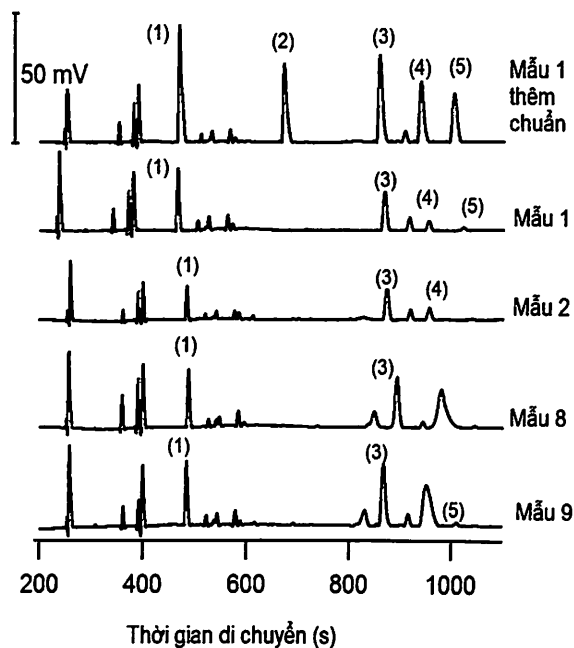
	Lys	Ala	Pro	Glu	Asp
Khoảng đường chuẩn (mg/l)	2÷100	2÷100	2÷100	2÷100	2÷100
Hệ số R ²	0,9996	0,9997	0,9998	0,9994	0,9994
Phương trình đường chuẩn	y=2,17x+2,72	y=2,97x+2,63	y=2,40x+0,96	y=2,35x+2,12	y=2,37x+1,60
LOD (mg/l)	0,22	0,26	0,50	0,45	0,55
LOQ (mg/l)	0,78	0,87	1,7	1,5	1,8
LOQ*(mg/g sữa ong chúa)	0,039	0,044	0,085	0,075	0,090
RSD _{diện tích} (%) (n=7)	1,0	1,2	1,4	1,3	1,8
RSD _{thời gian} (%) (n=7)	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9
Thời gian di chuyển (s) (n=7)	478±5	677±7	857±8	937±9	993±9
Hiệu suất thu hồi (%) nền nước deion và nền mẫu thực	97÷115	95÷106	93÷108	92÷101	97÷112

y là diện tích pic chất phân tích (mV.s); x là nồng độ chất phân tích (mg/l).

*tính toán dựa trên mẫu sữa ong chúa có khối lượng 1000 mg hòa tan vào 50 ml nước.

Sau khi xây dựng đường chuẩn và đánh giá phương pháp, 4 mẫu thật (bao gồm 3 mẫu sữa ong chúa tươi - mẫu 1, 2, 8 và 1 mẫu sữa ong chúa non tươi - mẫu 9) đã được phân tích nhằm định lượng 5 amino axit tự do nêu trên trong thành phần. Giản đồ điện di phân tích mẫu được minh họa trên hình 4.

Các kết quả phân tích mẫu thực thu được trong bảng 3 cho thấy sự có mặt của cả năm amino axit tự do trong mẫu sữa ong chúa tươi. Pro có hàm lượng cao nhất trong khoảng 1,90 tới 4,69 mg/g. Lys là amino axit thiết yếu cho cơ thể, có hàm lượng cao tiếp theo trong khoảng 1,01 tới 3,87 mg/g. Glu và Asp có mặt trong một số mẫu ở khoảng nồng độ từ



Hình 4. Điện di đồ phân tích các amino axit: (1) lysin, (2) alanin, (3) prolin, (4) axit glutamic và (5) axit aspartic trong các mẫu sữa ong chúa.

Các điều kiện phân tích gồm BGE axit lactic 2M; điện thế tách -16 kV; thời gian bơm mẫu 30 s; mao quản silica nóng chảy I.D=50 µm, L_{tot}=60 cm, L_{eff}=52 cm.

0,20 tới 0,72 mg/g. Ala chỉ xuất hiện trong mẫu sữa ong chúa non ở hàm lượng gần giới hạn định lượng 0,05 mg/g. Có thể nhận thấy mẫu sữa ong chúa non có hàm lượng các amino axit, đặc biệt là Lys vượt trội so với các mẫu còn lại.

Bảng 3. Kết quả phân tích hàm lượng 5 amino axit tự do trong một số mẫu sữa ong chúa.

Mẫu	Hàm lượng các amino axit tự do (mg/g)				
	Lys	Ala	Pro	Glu	Asp
Sữa ong chúa tươi					
Mẫu 1	2,74	< LOD	3,04	0,72	0,23
Mẫu 2	1,01	< LOD	1,90	0,77	< LOQ
Mẫu 8	2,51	< LOD	3,93	< LOD	< LOQ
Sữa ong chúa non tươi					
Mẫu 9	3,07	0,05	4,69	< LOD	0,20
LOD	0,011	0,013	0,025	0,023	0,028
LOQ	0,039	0,044	0,085	0,075	0,090

Kết luận

Trong nghiên cứu này, quy trình phân tích sử dụng CZE kết hợp với detector C⁴D đã được xây dựng để định lượng 5 amino axit chính trong sữa ong chúa. Phương pháp phân tích đã được đánh giá thông qua các thông số về đường chuẩn, độ lặp lại, độ đúng và thử nghiệm phân tích một số mẫu sữa ong chúa tươi. Các kết quả thu được cho thấy phương pháp CZE-C⁴D đáp ứng được mục tiêu kiểm soát chất lượng thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học Quốc gia Hà Nội mã số QG.18.05. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Viuda Martos, Y. Ruiz Navajas, J. Fernández López, J.A. Pérez Álvarez (2008), "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly", *Journal of Food Science*, **73**(9), pp.117-124.

[2] M.F. Ramadan, A. Al-Ghamdi (2012), "Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review", *Journal of Functional Foods*, **4**(1), pp.39-52.

[3] F. Ferioli, E. Armaforte, M.F. Caboni (2014), "Comparison of the Lipid Content, Fatty Acid Profile and Sterol Composition in Local Italian and Commercial Royal Jelly Samples", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **91**(6), pp.875-884.

[4] R. Balkanska, I. Zhelyazkova (2015), "Determination of amino acids and protein content in fresh and commercial royal jelly from Bulgaria", *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **29**(3), pp.485-490.

[5] J. Kim, J. Lee (2010), "Quantitative analysis of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly products purchased in USA by high performance liquid chromatography", *Journal of Apicultural Science*, **54**(1), pp.77-85.

[6] C.I. Pavel, L.A. Mărghitas, D.S. Dezmirean, L.I. Tomos, V. Bonta, A. Şapcaliu, A. Buttstedt (2014), "Comparison between local and commercial royal jelly-use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter", *Journal of Apicultural Research*, **53**(1), pp.116-123.

[7] Leo M.L. Nollet, Fidel Toldra (2012), *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, CRC Press.

[8] M.Y. Pinero, R. Bauza, L. Arce (2011), "Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories", *Potential Applications*, **32**, pp.1379-1393.

[9] http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf.