

Análisis del perfil de aminoácidos de mieles de México por CLAR/F como estrategia para la determinación del origen geográfico.

Armijo Martínez Samantha^{1,*}, Paniagua Vega David^{1,2}, Lucio Gutiérrez Juan Ricardo¹, Saucedo Yáñez Alma L. ^{1,2}, Waksman de Torres Noemí¹, Cavazos Rocha Norma¹.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina. Departamento de Química Analítica. Av. Dr. José Eleuterio González 235, Mitras Centro, 64460 Monterrey, N.L. México. sarmijo.me5021@uanl.edu.mx.

² Cátedras CONACYT-UANL

RESUMEN

La miel es considerada un alimento nutracéutico debido a sus múltiples usos y beneficios, desde la antigüedad ha sido utilizado como un complemento alimenticio natural, y en la actualidad se ha ido introduciendo en la industria como un ingrediente en diversos productos cosméticos y farmacéuticos. Algunas de las moléculas responsables de estos beneficios son los aminoácidos, los cuales provienen mayoritariamente del polen presente en las flores de donde las abejas recolectan el néctar para la elaboración de la miel, por lo tanto, la composición puede variar dependiendo del origen botánico y geográfico. Debido a su gran valor nutracéutico, la miel es blanco de múltiples estrategias de adulteración, por lo tanto, resulta necesario mostrar la autenticidad de este alimento. En este trabajo se propone una estrategia analítica para la determinación del origen geográfico de la miel como prueba de autenticidad, por medio del análisis del perfil de aminoácidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección por Fluorescencia, seguido de un análisis quimiométrico, para establecer una huella dactilar del perfil de las muestras de cada región.

Palabras clave: Miel, autenticidad, cromatografía. Honey, authenticity, chromatography.

ABSTRACT

Honey is considered a nutraceutical food due to its multiple uses and benefits, since ancient times it has been used as a natural food supplement, and currently it has been introduced in the industry as an ingredient in various cosmetic and pharmaceutical products. Some of the molecules responsible for these benefits are amino acids, which come mainly from the pollen present in flowers from which bees collect nectar for honey production, therefore, the composition may vary depending on the botanical and geographical origin. Due to its great nutraceutical value, honey is the target of multiple adulteration strategies, therefore it is necessary to show the authenticity of this food. In this work, an analytical strategy is proposed to determine the geographical origin of honey as proof of authenticity, by analyzing the amino acid profile of different honeys in the country by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC), followed by a chemometric analysis, to establish a fingerprint profile of the samples from each region.

INTRODUCCIÓN

La miel es la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje (FAO, 2019). Al ser un producto con alto valor nutricional y presentar beneficios para la salud, se considera como un alimento nutraceutico (Luchese, 2017).

Actualmente se han reportado más de 300 sustancias bioactivas en la miel, las cuales son responsables de sus propiedades funcionales y características tan específicas, además de intervenir en la calidad de esta, ejemplo de esto, son los aminoácidos (Se et al., 2019), los cuales son moléculas orgánicas que están conformadas por un grupo amino en uno de los extremos de la molécula, y un grupo carboxilo en el otro extremo, estos grupos están separados entre sí por un único átomo de carbono, que es llamado carbono alfa. Una manera de clasificar a los aminoácidos es por la forma en la que se encuentran en la naturaleza, ya que se pueden encontrar de forma libre o formando péptidos y proteínas (Dergal, 1999).

Los aminoácidos libres, no se encuentran unidos a ningún otro aminoácido mediante uniones peptídicas, y debido a su bajo peso molecular, las plantas son capaces de asimilarlos de forma rápida, por tanto, son de gran importancia en la nutrición de las plantas. Debido a esto, al estar presente de manera libre en las plantas, la aportación y presencia de estas moléculas en el proceso de la recolección del néctar por parte de las abejas y su posterior transformación en miel es importante, ya que adquiere características del origen de donde se recolectó el néctar. Estas biomoléculas representan aproximadamente el 1% p/p, donde la cantidad de aminoácidos libres totales corresponde entre 10 y 200 mg/100 g, siendo la prolina el que se encuentra en mayor proporción, ya que corresponde aproximadamente a un 50% de este contenido (Iglesias, 2004).

Además de la prolina, hay 26 aminoácidos en las mieles y sus proporciones relativas dependen de su origen (néctar o mielada). Dado que el polen es la principal fuente de aminoácidos de la miel, el perfil de aminoácidos de una miel podría ser característico de su origen botánico y geográfico. Los principales aminoácidos que han sido identificados en la miel son: ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), histidina (His), glicina (Gli), treonina (Thr), alanina (Ala), arginina (Arg), ácido gamma-aminobutírico (Gaba), prolina (Pro), tirosina (Tir), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cis), isoleucina (Ile), leucina (Leu), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), ornitina (Orn) y lisina (Lis) (Miguel et al., 2010).

En México, la producción de miel se desarrolla en todas las entidades federativas, y actualmente se encuentra en el octavo lugar a nivel mundial como productor de miel, y en el quinto lugar como exportador, con una producción de 61 mil toneladas y una exportación anual promedio de 33 mil toneladas en el año 2019 (SADER, 2020).

A nivel nacional, se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, producción de miel y especificaciones, de la secretaría de agricultura y ganadería, en donde se establecen las condiciones que debe cumplir la producción y comercialización de miel, la cual incluye características sensoriales, fisicoquímicas y el estudio melisopalínológico de la miel (NOM-004, 2020). Sin embargo, debido a su gran valor nutraceutico, y al tratarse del único edulcorante producido naturalmente que puede consumirse directamente sin ningún tipo de procesamiento extensivo, la miel ha ido cada vez al alza de demanda en el mercado, y debido a esto, se ha convertido en el tercer alimento más adulterado (Olmsted, 2016).

Dicha adulteración puede ser mediante tres métodos diferentes y utilizando diferentes adulterantes como se muestra en la Fig. 1 (Se et al., 2019):

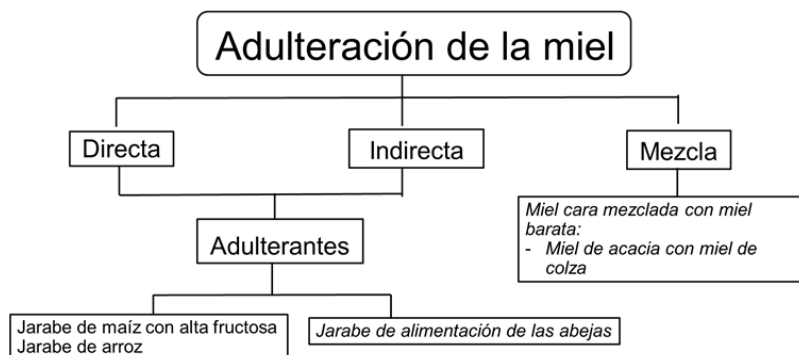


Figura 1. Formas de adulteración en la miel (Se et al., 2019)

Actualmente, existe otro fraude relacionado con el origen geográfico en la industria apícola, ya que hay miel importada de otros países, principalmente por China, que es re-etiquetada y vendida como producto de origen nacional a un precio muy bajo (Trifković et al., 2017). En consecuencia, la discriminación del origen de la miel y la diferenciación entre una miel adulterada y pura se convierte en un tema muy importante ya que impacta de manera negativa a la industria apícola mexicana. Por este motivo, es necesario el desarrollo de métodos apropiados que garanticen una competencia leal entre los productores de miel y puedan estar protegidos contra el fraude.

Debido a las limitaciones de las técnicas de autenticación clásicas, se han ido buscando otros enfoques usando métodos analíticos modernos más fiables para determinar los orígenes botánicos y geográficos de la miel. Los estudios incluyen la medición del perfil de carbohidratos, el contenido mineral, el perfil de compuestos fenólicos, perfil de aroma y el perfil de aminoácidos, utilizando herramientas analíticas avanzadas como técnicas cromatográficas, técnicas basadas en espectrometría de masas (MS), espectroscopía vibracional como infrarroja (IR) y técnicas Raman, resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de isótopos estables. Cabe resaltar, que en este último enfoque, la caracterización de perfiles de analitos como los aminoácidos, han sido útiles para la determinación del origen geográfico y botánico, haciendo énfasis en el uso de técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), como técnica para establecer una huella dactilar del perfil de estos compuestos, que puedan conducir al reconocimiento del patrón de una muestra, mediante el uso de quimiometría (Akbari et al., 2020) (Sun et al., 2017).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, con ayuda de métodos quimiométricos, el análisis del perfil cromatográfico de aminoácidos de muestras de miel de diferentes regiones del país con el fin de agrupar mieles mexicanas de acuerdo a su origen geográfico, como estrategia para la autenticidad de la miel.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos:

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Estándares de aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glicina (Gli), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala),

tirosina (Tir), metionina (Met), valina (Val), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y lisina (Lis), Sigma-Aldrich.

- Ortoftaldehído
- 2-Mercaptoetanol
- Tetrahidrofurano
- Acetonitrilo
- Metanol grado HPLC
- Borato de sodio
- Fosfato ácido de potasio anhidro
- Ácido Clorhídrico
- Agua bidestilada
- Agua desionizada con sistema Mili-Q

2. Equipos:

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- Potenciómetro
- Baño de ultrasonido
- Equipo para filtración de solventes Milipore
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Purificador de agua
- Campana de extracción
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett Packard 1100, equipado con desgasificador de línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de columna y detector de fluorescencia y UV-Vis de longitud de onda variable.
- Columna Atlantis T3, 150 mm x 2.1 mm, 3 μm de t.p.

3. Materiales:

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizó el siguiente material:

- Pipeta automática de volumen variable de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL
- Viales ámbar de 2 mL de tapa de rosca
- Insertos de vidrio de 250 μL
- Filtros PVDF 13 mm de 0.45 y 0.20 μm , Thermo Scientific.
- Tubos eppendorf de 2 mL

4. Metodología:

Para llevar a cabo el presente trabajo se siguió la siguiente metodología:

4.1 Obtención de muestras

Se trabajó con 37 muestras de miel multifloral de 8 estados de México, correspondientes a Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Sonora, Yucatán, Tamaulipas, Quintana Roo y Puebla. La mayoría de las muestras fue facilitada por apicultores quienes nos proporcionaron información de su procedencia. Las muestras fueron recolectadas durante agosto del 2020 a octubre del 2021, y fueron almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta su análisis.

4.2 Confirmación del método cromatográfico

Para la obtención de los perfiles de aminoácidos de las muestras de miel, se partió de métodos cromatográficos que previamente fueron validados por el grupo de trabajo, sin embargo, antes de realizar el estudio de los perfiles, se llevó a cabo una confirmación de este, con la finalidad de garantizar que el método se encuentra bajo control, de tal manera, que los cambios que se observen en los perfiles se deban únicamente a la naturaleza de la muestra. Para la confirmación se evaluaron los siguientes parámetros:

Selectividad: se evaluó por medio del análisis de blancos de derivatización de muestra, se obtuvo su cromatograma y se observó que no existiera presencia de señales que pudieran interferir con el análisis de los perfiles cromatográficos.

Repetibilidad: se eligió una muestra de miel aleatoriamente y se le realizó el tratamiento previo para el análisis de aminoácidos por la metodología establecida, por triplicado en un mismo día. Se realizó el análisis cromatográfico de los triplicados de la muestra bajo las condiciones del método, y se evaluó la desviación estándar relativa (DER) del tiempo de retención y del área de los analitos que componen el perfil, en donde se estableció un criterio $\leq 6\%$ (AOAC International, 2012).

Reproducibilidad: se eligió una muestra de miel aleatoriamente y se le realizó el tratamiento previo para el análisis de aminoácidos por la metodología establecida, por triplicado en tres días diferentes no consecutivos. Se realizó el análisis cromatográfico de los triplicados de la muestra bajo las condiciones del método, y se evaluó la desviación estándar relativa (DER) del tiempo de retención y del área de los analitos que componen el perfil, en donde se estableció un criterio $\leq 11\%$ (AOAC International, 2012).

4.3 Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos

Una vez confirmado el método cromatográfico, se realizó el análisis del perfil de aminoácidos por CLAR de cada una de las muestras, realizando un tratamiento previo, el cual consistió en una extracción y derivatización para su posterior análisis.

4.3.1 Tratamiento previo de las muestras

Todas las muestras fueron homogenizadas, posteriormente se pesaron 2 gramos de cada una y se añadieron 10 mL de agua/metanol en relación 1:1. La solución se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos y después se pasó a tubos eppendorf para centrifugarlos por 10 minutos a 8000 rpm., el sobrenadante obtenido se filtró con acrodiscos de 0.2 μm , y se recuperó el filtrado para posteriormente realizar una reacción de derivatización. Se tomaron 10 μL de la muestra filtrada, se añadieron 30 μL de solución de Ortoftaldehído y 60 μL de agua bidestilada, se agitó exactamente por un minuto y se recuperó la muestra en viales con insertos para ser inyectada en el cromatógrafo a los 3 minutos después de la reacción.

4.3.2 Condiciones cromatográficas

Todas las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de líquidos HP-1100 con detección de fluorescencia bajo las condiciones mostradas en la Tabla 1:

Tabla 1. Condiciones cromatográficas del método para el análisis de aminoácidos.	
Fase móvil A	Metanol/Buffer fosfatos/THF (12:85:3)
Fase móvil B	Metanol/Buffer fosfatos/THF (55:42:3)

Columna	Atlantis T3 150 x 2.1 mm 3 μ m t.p.
Flujo	0.2 mL/min.
Vol. inyección	5 μ L
Temperatura	37°C
Detección	Fluorescencia λ_{ex} = 356 nm y λ_{em} = 450 nm

La identificación de cada uno de los aminoácidos presentes en las muestras se realizó por medio del orden de elución y el tiempo de retención como se muestra en la Tabla 2:

Aminoácido	Tiempo de retención (min.)
Ac. Aspártico (Asp)	4.17
Ac. Glutámico (Glu)	6.06
Asparagina (Asn)	12.48
Serina (Ser)	16.10
Histidina (His)	17.24
Glicina (Gly)	20.96
Arginina (Arg)	22.20
Treonina (Thr)	25.75
Alanina (Ala)	27.38
Tirosina (Tyr)	30.28
Metionina (Met)	39.31
Valina (Val)	39.74
Triptófano (Trp)	40.13
Fenilalanina (Phe)	41.66
Isoleucina (Ile)	45.54
Leucina (Leu)	47.48
Lisina (Lys)	51.00

4.4 Análisis quimiométrico

A partir de cada uno de los 37 cromatogramas obtenidos del perfil de aminoácidos de las muestras, se obtuvo un vector de datos en formato csv., el cual se exportó a una hoja de Excel y después los datos se importaron al Software Matlab como herramienta de apoyo para el análisis quimiométrico. Una vez importados los datos, se realizaron pretratamientos de estos, enfocados en corrección de artefactos, y posteriormente se construyó un modelo de Análisis de Componentes Principales (PCA), para observar si existían tendencias o agrupaciones entre cada una de las muestras según su origen geográfico y el contenido de aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se trabajaron con 37 muestras de miel multifloral provenientes de diferentes estados del país, de las cuales se eligió una al azar para realizar la confirmación del método cromatográfico.

1. Confirmación del método cromatográfico

Para la evaluación de la selectividad, se descartó la presencia de señales que pudieran interferir con el análisis de los perfiles de las muestras de miel. A partir del cromatograma obtenido (Fig. 2) del blanco de derivatización (agua y solución derivatizante de ortoaldehído y 2 mercaptoetanol) se

observó que no existían señales interferentes, por tanto se puede concluir que el método tiene la capacidad de determinar los aminoácidos sin interferencia de los reactivos utilizados para su tratamiento previo.

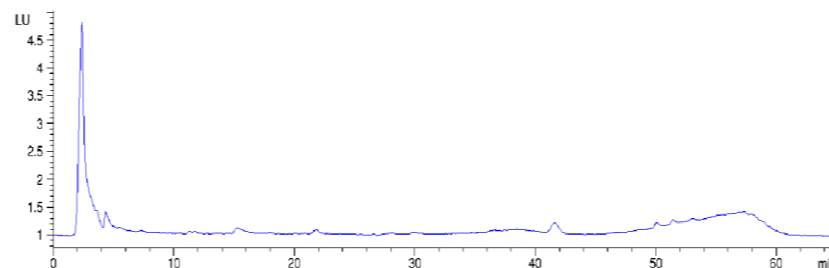


Figura 2. Cromatograma del blanco de derivatización

La precisión intradía e interdía, fueron evaluadas a través de la Desviación Estándar Relativa (DER) de los tiempos de retención (tR) y las áreas de los 14 aminoácidos presentes en la muestra elegida al azar, en la Fig. 3 se muestra un cromatograma del perfil de aminoácidos de la muestra elegida (miel de Jalisco). En el caso de la precisión intradía se obtuvieron rangos de DER del tR de 0.5% a 1.9%, mientras que para la DER de las áreas fue de 0.7 a 4.9%, quedando así dentro del criterio establecido por la AOAC del 6%. Para la precisión interdía, los rangos de DER de los tR para los 14 aminoácidos fueron de 0.7% a 2.2%, mientras que para el área fue de 3.7% a 10.9%, quedando por debajo del criterio establecido por la AOAC del 11%. Es así, que se demostró la precisión del método cromatográfico para la determinación del perfil de aminoácidos de muestras de miel, por tanto, al realizar el análisis de una misma muestra en diferentes días, se espera que los resultados sean repetitivos y reproducibles.

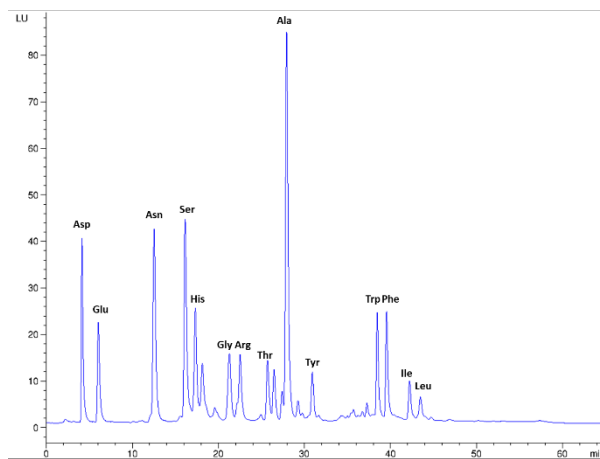


Figura 3. Cromatograma de muestra de miel de Jalisco

2. Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos

Una vez evaluado el método, se procedió al tratamiento previo de las 37 muestras por la metodología descrita para su posterior análisis cromatográfico. De cada una de las muestras se obtuvo el perfil cromatográfico y fue analizado detalladamente para evaluar el orden de elución y los tR de los aminoácidos presentes. En la Tabla 3 se muestran los aminoácidos presentes en las muestras evaluadas por estados del país, representando en color amarillo los aminoácidos presentes en mayor proporción. Se logró observar que en las muestras de miel de Sonora predominaban el ácido aspártico

y la asparagina, mientras que en muestras de miel de Yucatán era característica la presencia de la fenilalanina, esto también se observó con las muestras de Oaxaca y Quintana Roo.

Tabla 3. Aminoácidos presentes en muestras de miel de diferentes estados de México.

tR	Aminoácido	Sonora	Nuevo León	Tamaulipas	Jalisco	Puebla	Oaxaca	Yucatán	Quintana Roo
4.17	Ac. Aspártico (Asp)	*	*	*	*	*	*	*	*
6.06	Ac. Glutámico (Glu)	*	*	*	*	*	*	*	*
12.48	Asparagina (Asn)	*	*	*	*	*	*	*	*
16.10	Serina (Ser)	*	*	*	*	*	*	*	*
17.24	Histidina (His)	*	*	*	*	*	*	*	*
20.96	Glicina (Gly)	*	*	*	*	*	*	*	*
22.20	Arginina (Arg)	*	*	*	*	*	*	*	*
25.75	Treonina (Thr)	*	*	*	*	*	*	*	*
27.38	Alanina (Ala)	*	*	*	*	*	*	*	*
30.28	Tirosina (Tyr)	*	*	*	*	*	*	*	*
39.31	Metionina (Met)	*	*	*	*	*	*	*	*
39.74	Valina (Val)								
40.13	Triptófano (Trp)				*	*			
41.66	Fenilalanina (Phe)	*	*	*	*		*	*	*
45.54	Isoleucina (Ile)	*	*	*	*		*	*	*
47.48	Leucina (Leu)	*	*	*	*	*	*	*	*
51	Lisina (Lys)								

Dentro de los resultados observados, en todas las muestras no hubo presencia de valina y de lisina, además que se observa en muy pocas muestras la presencia del triptófano. Por otro lado, cabe mencionar que si bien, la alanina estaba presente en todas las muestras, se observó que se encontraba en mayor proporción en la muestra de Jalisco, por tanto, podría sugerir alguna característica importante al momento de la clasificación de las muestras por origen geográfico.

3. Análisis quimiométrico

Para el análisis quimiométrico, se exportó cada uno de los cromatogramas de las muestras en formato csv. a una hora de Excel, posteriormente los datos fueron importados al programa Matlab para su análisis quimiométrico. A partir de los datos importados se obtuvo una matriz de 37 muestras x 9028 variables, correspondientes a los tiempos de retención de los analitos, sin embargo, al analizar la matriz, se observó que había regiones que no aportaban información, por lo que se decidió eliminar las regiones del cromatograma, quedando una matriz de 37 x 5885 variables. A partir de esta matriz se realizó un alineamiento detallado de los perfiles utilizando el algoritmo de desplazamiento optimizado de correlación, en la Fig. 4 se muestra un ejemplo de la alineación para la señal del ácido aspártico.

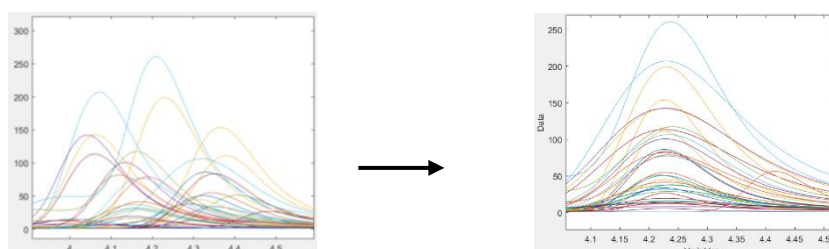


Figura 4. Ejemplo de alineamiento del tR de la señal del ácido aspártico usando el algoritmo de desplazamiento optimizado de correlación.

Una vez corregidos los artefactos de los perfiles se construyó un modelo de Análisis de Componentes Principales (PCA) para lo cual se realizó una normalización de área unidad, seguido de un centrado a la media, lo cual nos mostró los mejores gráficos de scores (Fig. 5), donde se observó que ciertas muestras como las de Yucatán tendían en su mayoría a agruparse a valores positivos de la componente uno, así mismo, las de Oaxaca también quedaban en valores positivos, pero estas alineadas al centro, mientras que las del resto de los estados predominaban a valores negativos de la primera componente.

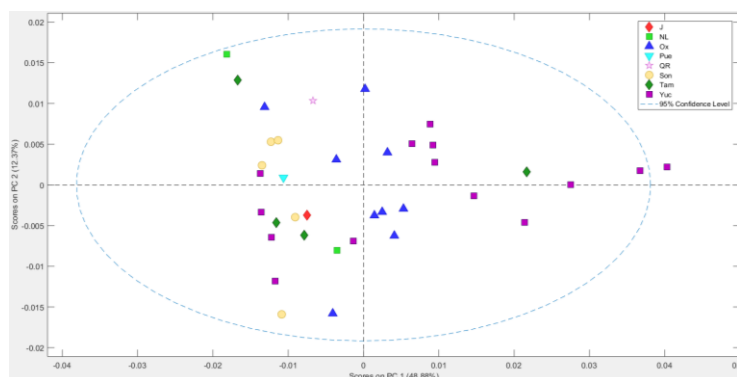


Figura 5. Gráfico de scores de las muestras de miel evaluadas por el Software Matlab.

Analizando el gráfico de loadings, se observó que las sustancias responsables para el comportamiento observado fueron la fenilalanina para los resultados que estaban en valores positivos de la componente uno, correspondientes a las muestras del sur del país, y para los valores negativos de la componente uno la señal responsable era el ácido aspártico como fue el caso de las muestras de Sonora. Por tanto, se pudiera mencionar que estas señales podrían representar una diferenciación entre el perfil de aminoácidos de muestras de miel del norte y sur de México, que nos ayude a identificar su origen geográfico al momento de querer saber su autenticidad.

CONCLUSIÓN

En el análisis de aminoácidos de 37 muestras de miel multifloral de diferentes estados de México se observó que hay señales que pudieran ser características de algunas regiones y que pudieran orientarnos al origen geográfico de las mismas, entre ellas el ácido aspártico para muestras de miel del norte del país, y la fenilalanina para muestras de miel del sur, sin embargo, es necesario abarcar más estudios para cubrir regiones que no se incluyeron en el trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (FAO). (2009). Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*. 51–53.
- Akbari, E., Baigbabaie, A., & Shahidi, M. (2020). Determination of the floral origin of honey based on its phenolic profile and physicochemical properties coupled with chemometrics. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 506–519.
- AOAC International. (2012). Guideline for Dietary Supplements and Botanical (Appendix K). *AOAC Official Method Analysis*, 8,9,11.
- Dergal, S. B. (1999). Química de los alimentos. *Editorial Alhambra Mexicana*, 1, 453–502.
- Iglesias, M. T. et al. (2004). *Usefulness of Amino Acid Composition To Discriminate between*

Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. 84–89.

Luchese, R. (2017). *Honey as a Functional Food World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher. February 2018.*

Miguel, J., Tulipani, A. S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). *Contribution of honey in nutrition and human health : A review Contribution of honey in nutrition and human health : a review. June 2014.*

SADER. (2010). Situación Actual y Perspectiva de la Apicultura en México. *Claridades Agropecuarias, 199*, 3–34.

Se, K. W., Wahab, R. A., Syed Yaacob, S. N., & Ghoshal, S. K. (2019). Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Journal of Food Composition and Analysis, 80*(April), 16–32.

Sun, Z., Zhao, L., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., Zheng, J., & Cao, W. (2017). Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical Analysis, 7*(5), 317–323.

Trifković, J., Andrić, F., Ristivojević, P., Guzelmeric, E., & Yesilada, E. (2017). Analytical methods in tracing honey authenticity. *Journal of AOAC International, 100*(4), 827–839.