

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología



VNiVERSiDAD
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de isoflavonas en legumbres.

*Development of analytical methodologies for the
analysis of isoflavones in legumes.*

Lara Pérez Martín

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



VNiVERSiDAD
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE
ISOFLAVONAS EN LEGUMBRES.**

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGIES FOR THE ANALYSIS OF
ISOFLAVONES IN LEGUMES.

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Salamanca presenta la licenciada Lara Pérez Martín.

Salamanca, 26 de Mayo de 2015

Fdo: Lara Pérez Martín



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

Plaza de los Caídos, s/n 37008. Salamanca
Tel.: +34 923 29 44 83 Fax:+34 923 29 44 83
dpto.qanyb@usal.es

D.^ª M.^a Milagros Delgado Zamarreño y D.^ª Myriam Bustamante Rangel, profesoras Titular y Contratado Doctor de la Universidad de Salamanca en el área de Química Analítica y directoras del trabajo **“Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de isoflavonas en legumbres”**, realizado por la licenciada en Ciencias Químicas Lara Pérez Martín para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 26 de Mayo de 2015

Fdo: M.M.Delgado Zamarreño

Fdo: M. Bustamante Rangel

Deseo expresar mi agradecimiento a la Junta de Castilla y León por la concesión de una beca de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (ORDEN EDU 1204 / 2010) y a la Universidad de Salamanca por las ayudas concedidas.

Este trabajo, realizado en el Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, ha sido financiado por los proyectos CTQ 2008-02200/BQU y CTQ 2011-24075 del Ministerio de Ciencia e Innovación, así como el proyecto SA017A08 y el Grupo de Excelencia GR-65 de la Junta de Castilla y León.

Es muy difícil resumir las experiencias y sensaciones vividas a lo largo de estos casi cinco años en unas pocas líneas sin olvidarse de nada ni de nadie. Así que por si acaso, y de antemano, perdón por si me olvido de alguno de vosotros.

En primer lugar y sin duda alguna, quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a las responsables de que este trabajo haya salido adelante, a mis directoras, D^a M^a Milagros Delgado Zamarreño y D^a Myriam Bustamante Rangel. Gracias por vuestras ideas, vuestro apoyo y motivación constante. Gracias por la confianza que depositasteis en mí al entrar en este Departamento y permitirme trabajar con vosotras. Espero que éste no sea más que el inicio de una larga trayectoria en el campo de la investigación y haber cumplido vuestras expectativas. Nunca podré olvidar que cualquier trabajo posterior será debido a estos inicios.

Sería imposible no dar las gracias a D^a Rita Carabias, responsable de mi formación en mi etapa como estudiante, y de mis primeros pasos en la investigación al permitirme realizar esa beca de colaboración con su grupo. Jamás olvidaré esas clases magistrales de mis primeros años de carrera que tanto me animaron a continuar y a cogerle “gustillo” a “eso” de la Química Analítica.

De igual modo quisiera dar las gracias al resto del grupo de investigación por hacerme sentir afortunada de pertenecer a él, por su acogida y su confianza depositada en mí. A Encarna por su preocupación constante de que todo fuera bien, a Jesús, a Javi por estar siempre dispuesto a aportar ideas y a echar una mano, a César por mostrarme que la docencia aunque dura, puede ser también muy gratificante. A todos los miembros del Departamento de Química Analítica por haberme hecho sentir “como en casa” en el día a día. El trabajo se hace mucho más llevadero con gente como vosotros al lado. Gracias especialmente a Bernardo, en cierto modo responsable de mi entrada en el Departamento. Gracias por estar siempre pendiente de que todo fuera bien, por tus múltiples consejos en cualquier ámbito y sobre todo por hacerme sentir cuidada en todo momento. Gracias a Ana y Fernando Luis por hacernos las cosas más fáciles a “los de ahí abajo”. Gracias a “la parte” de Nutrición y Bromatología del Departamento

por vuestra acogida; Susana, Nacho, Raúl, María José, Joaquín, gracias por toda vuestra ayuda.

Sin lugar a dudas el laboratorio no sería el mismo sin la gente de “ahí abajo”, sin los becarios. Gracias por el día a día, por todas las experiencias vividas, por todo lo que hemos compartido, por haberme permitido conocer a todos y cada uno de vosotros y por todo lo que me habéis enseñado. Sarita gracias por hacerme más fácil la entrada en el laboratorio, que de primeras “asustáis” un poco siendo tan piña; Paradinas gracias por tu espontaneidad alegrándonos a todos un poquito cada día; Casas gracias por enseñarme que hay que tener carácter en esta vida. Gracias Miguel por tu cordura y tu apoyo incondicional; “Valen”, por tu buen corazón, eres de las mejores personas que conozco, no cambies nunca; Rosa por todas tus historias; Pedro, por hacernos reír en cada café y Álvaro, que aunque entraste con mal pie has sabido ganarte el corazón de los analíticos. Cris Gil, Patri, gracias por todos los momentos que hemos vivido juntas, por escucharme siempre que lo he necesitado y porque sé que me llevo dos grandes amigas. “Mami” Gloria, gracias por ser como eres y por cuidarnos a todos, te echamos mucho de menos. Maite gracias por demostrarme lo importante que es tener fuerza de voluntad y perseverancia, ¡ya saldrán esos picos!; Iris, Cris Pérez, Marta, dejasteis un gran recuerdo en mí. Josemi, aunque nunca coincidimos en el laboratorio, siempre has cuidado de mí y me has aconsejado en todo lo posible, sabes que siempre te estaré agradecida y que aquí tienes una amiga para cuando lo necesites.

Llegamos a la “peor” parte, como agradecer todos estos años a “Fondo Norte”. Demasiadas vivencias, buenos y malos momentos, risas, desesperación...no os puedo considerar un grupo de trabajo, sino una pequeña familia, **MI** pequeña familia. En primer lugar gracias a Diego, nunca tendré palabras suficientes para demostrarte lo agradecida que estoy. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por todas tus enseñanzas en el campo de la cromatografía y de la espectrometría de masas, por estar ahí no solo en los buenos momentos si no también en los malos, y no sólo en el ámbito laboral. Sé que te irá muy bien en cualquier proyecto que emprendas. “Juanillo”, gracias simplemente por ser como eres, por todo lo que me has cuidado y todo lo que te has preocupado por mí, por todas y cada una de tus palabras de ánimo. Rachel, mi “compi” de ese “Periodo

formativo no incluido en máster”, siempre formaremos parte de ese “selecto” club de siete. Gracias por iniciar conmigo esta experiencia, no se me ocurre mejor compañera de camino que tú. Gracias por estar a mi lado, por todo lo que hemos vivido y superado juntas, por ser una de las “raras” de la música y la “marquesita” que faltaba. Siempre serás mi compañera “*chekendengue*”. María, me faltan palabras para darte las gracias. Gracias por alegrarnos cada día en el laboratorio, por no desanimarte nunca, por toda esa fuerza que tienes, por ser compañera y amiga, por todos los caminos de vuelta a casa juntas, porque te quedas “liderando” Fondo Norte como nadie lo sabría hacer mejor. Cris Fer, mi “compi” de directoras, parece que viniste a reforzar mi ánimo. Aprendí de ti lo mejor y lo que más falta me hacía, a tener paciencia. “Angelito”, orgánico en práctica y analítico de adopción, gracias por todo el apoyo que me has brindado y tus palabras de consuelo en los peores momentos. Dices que yo te enseñé que la vida no sólo es química, tú me ayudaste a recordar que hay que perseguir con tenacidad lo que se quiere. Víctor, *nano*-compañero incorporado recientemente a “Fondo Norte”, gracias por tu compañía, por tus palabras de ánimo y por estar siempre dispuesto a echar una mano, ¡toda la informática que he aprendido desde que te tengo al lado! Por último Leticia/ Leti / *LetiPrincess* / *LetiReina* / *Titicia* o como prefieras, no podías faltar. Gracias por ser como eres, por llevar la alegría por donde te mueves, por hacerme recobrar la ilusión con la que empecé, por ayudarme en todo momento. Gracias por convertirte en mi confidente y amiga dentro y fuera del laboratorio. Aún nos queda mucho por vivir juntas. Recuerda que no hay más distancia que la que marcan las personas, no los kilómetros.

El laboratorio no sería el mismo sin los momentos de descanso en el café. Gracias a Vicen, Estrella y Lamas por hacer más fácil el día a día, por cada comentario de ánimo y por lo bien que siempre nos habéis tratado. No imagináis cuanto me acordé de vosotros en cada café en Alemania y sobre todo de tu tortilla, Estrella, cada vez que veía aquel *chucrut* alemán. ¡Ni punto de comparación!

Sobran las palabras de agradecimiento para mis padres, nunca encontraría las necesarias para expresar cuánto agradezco todos los esfuerzos y sacrificios que habéis hecho a lo largo de todos estos años para que yo sea la persona que soy hoy en día. Gracias por apoyarme en cada momento, por

aguantar cada día de mal humor, por estar siempre a mi lado sin preguntar nada, porque lo único que queréis es mi felicidad. Gracias simplemente por ser mis padres.

Gracias a Álvaro, mi sentido común cuando era necesario. A pesar de las idas y venidas, buenos y malos momentos, siempre estuviste ahí, apoyándome, confiando en mí y sabiendo que sería capaz de terminar esta Tesis y todo lo que me propusiera. Nunca dudaste de mí en ningún momento a pesar de que yo sí lo hiciera. Gracias por ser ese impulso que tanto necesito y hacerme creer en mí misma, ya sabes *“Todo arde si se aplica la chispa adecuada”*.

Gracias a mi “hermana” Laura, porque 18 años no son más que un inicio y lo sabes. Gracias por aguantarme lo que no está escrito, por cada “collección” dado en el momento preciso, por saber cuándo coger una llamada de teléfono y por darme la seguridad de no estar sola nunca. Gracias por tu apoyo, por cada una de tus palabras y sobre todo de tus actos, gracias simplemente por estar ahí y porque sé que seguirás estándolo. Chele, gracias por tu serenidad y templanza, por saber tranquilizarme y saber qué decir en cada momento, por ser único en tu especie. Gracias sin ninguna duda por ser mi amigo.

Manuel, soplo de aire fresco que necesitaba para reencontrarme y continuar. Gracias por estar ahí, por sacarme una sonrisa en los malos momentos y hacerme reír cada día. Gracias porque sin saber cómo hacerlo, has conseguido apoyarme cuando lo he necesitado, gracias por hacerme sentir útil de nuevo.

En definitiva, simplemente

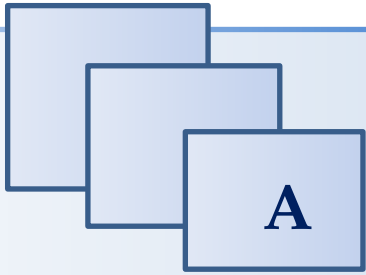
GRACIAS

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Ganz besonders gilt dieser Dank meinem Professor, Herrn Sascha Rohn, der stets großes Vertrauen in mich steckte und mich an seinen Projekten am Institut für Lebensmittelchemie in Hamburg teilnehmen ließ.

Auch möchte ich mich bei dem gesamten Kollegium für alle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Valeria Reim, für ihre Unterstützung und für das, was ich von ihr lernen durfte. Viel Erfolg und nur das Beste für deine Doktorarbeit.

*Cuando abandones tus sueños
sabrás que has muerto.*

Enrique Ortiz de Landázuri



ACRÓNIMOS

AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i> Asociación de Comunidades Analíticas
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i> Extracción acelerada con disolventes
BGE	<i>Background Electrolyte</i> Medio de separación Electroforético
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar Zonal
DAD	<i>Diode Array Detector</i> Detector de Barrera de Diodos
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> Dimetilsulfóxido
d - SPE	<i>dispersive – Solid Phase Extraction</i> <i>Extracción en fase sólida dispersiva</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EOF	<i>Electroosmotic Flow</i> Flujo Electroosmótico
ER	<i>Estrogenic Receptor</i> Receptor Estrogénico
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> Ionización por Electrospray
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Administración de alimentos y medicamentos
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i> Hormona Folículo-Estimulante
GC	<i>Gas Chromatography</i> Cromatografía de Gases
HCA	<i>Hierarchical Clustering Analysis</i>

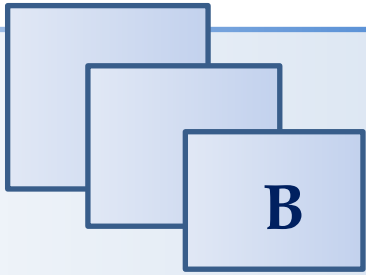
ACRÓNIMOS

	Análisis Jerárquico de Agrupamientos
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Interacciones Hidrofilicas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IP	<i>Identification Point</i> Punto de Identificación
IT	<i>Ion Trap</i> Trampa Iónica
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> Extracción Líquido-Líquido
LOD	<i>Limit of Detection</i> Límite de Detección
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> Límite de Cuantificación
MAE	<i>Microwave Assisted Extracción</i> Extracción Asistida por Microondas
MLOD	<i>Method Limit of Detection</i> Límite de Detección del Método
MRM o SRM	<i>Multiple Reaction Monitoring or Selected Reaction Monitoring</i> Seguimiento de Reacción Múltiple
MS	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas en Tándem
NPLC	<i>Normal-Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida en Fase Normal
NSM	<i>Normal Stacking Mode</i> Modo de Apilamiento Normal
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> Análisis de Componentes Principales

PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i> Extracción mediante Líquidos Presurizados
PLS-DA	<i>Partial least squares Discriminant Analysis</i> Análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales
PNP	<i>Programmed Nebulizing-gas Pressure</i> Presión del gas de nebulización programada
PSA	Primary Secondary Amine Amina Primaria Secundaria
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i> Politetrafluoroetileno
PVDF	<i>Polivinylidene Difluoride</i> Difluoruro de polivinilideno
Q	<i>Quadrupole</i> Cuadrupolo
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i> Triple Cuadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto y Seguro
RPLC	<i>Reversed-Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida en Fase Inversa
RSD	Relative Standard Deviation Desviación Estándar Relativa
SALLE	<i>Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i> Extracción líquido - líquido asistida por sales
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> Extracción mediante Fluidos Supercríticos
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> Extracción en fase sólida
SPME	<i>Solid-Phase Micro-Extraction</i> Micro-Extracción en Fase Sólida
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

ACRÓNIMOS

	Cromatograma de Ion Total
	<i>Total Ion Electropherogram</i>
TIE	Electroferograma de Ion Total
	<i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
UAE	Extracción Asistida por Ultrasonidos
	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
	<i>Ultra High Quality Water</i>
UHQ	Agua Ultrapura



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS. ISOFLAVONAS.....	3
1.1.1. Isoflavonas.....	8
1.1.1.1. Naturaleza Química.....	8
1.1.1.1. Origen y Biosíntesis	10
1.1.1.1. Biodisponibilidad.....	15
1.1.1.1. Actividad estrogénica y antiestrogénica. Efectos sobre la salud.....	17
1.2. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS.....	29
1.2.1. Tratamiento de muestra previo al análisis de alimentos.....	31
1.2.1.1. Tratamiento de muestra previo en el análisis de isoflavonas.....	33
1.2.2. Determinación de compuestos bioactivos en alimentos.....	43
1.2.2.1. Cromatografía líquida.....	44
1.2.2.2. Electroforesis capilar.....	63
1.2.2.3. Determinación de isoflavonas en alimentos.....	73
II. OBJETO.....	81
III. EXPERIMENTAL.....	87
3.1. PATRONES, DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	89
3.1.1. Patrones: Isoflavonas y flavonoides.....	89
3.1.2. Disolventes y reactivos.....	89
3.2. DISOLUCIONES ESTÁNDAR.....	91
3.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.....	92
3.3.1. Sistemas de tratamiento de muestra.....	92
3.3.2. Configuraciones instrumentales.....	95
3.3.2.1. Cromatografía líquida.....	95
3.3.2.2. Electroforesis capilar.....	96
3.1. MUESTRAS ANALIZADAS.....	97

IV. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS.....	103
4.1. EXTRACCIÓN MEDIANTE LÍQUIDOS PRESURIZADOS.....	105
4.1.1.Objetivo.....	107
4.1.2.Introducción.....	108
4.1.3.Resultados y discusión.....	117
4.1.4.Conclusiones.....	144
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 404 (2) (2012) 361.....	145
4.2. EXTRACCIÓN EMPLEANDO LA METODOLOGÍA QuEChERS.....	153
4.2.1.Objetivo.....	155
4.2.2.Introducción.....	157
4.2.3.Resultados y discusión.....	166
4.2.4.Conclusiones.....	197
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN. <i>Talanta</i> 100 (2012) 320.....	199
4.3. ESTUDIO DE LA PUESTA EN CONTACTO ENTRE MUESTRA Y DISOLVENTE EN LA METODOLOGÍA QuEChERS.....	211
4.3.1.Objetivo.....	213
4.3.2.Introducción.....	214
4.3.3.Resultados y discusión.....	218
4.3.4.Conclusiones.....	235
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN. <i>Phytochem. Anal.</i> 25 (2013) 170.....	237
4.4. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS EN LEGUMBRES MEDIANTE CE – MS.....	247
4.4.1.Objetivo.....	249
4.4.2.Introducción.....	250
4.4.3.Resultados y discusión.....	254
4.4.4.Conclusiones.....	271
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN. <i>Current Anal. Chem.</i> 11 (2015) 117.....	273

V. CLASIFICACIÓN DE LEGUMBRES EN FUNCIÓN DE SU CONTENIDO EN ISOFLAVONAS.....	283
5.1. OBJETIVO.....	285
5.2. INTRODUCCIÓN.....	286
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	294
5.4. CONCLUSIONES.....	322
VI. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DOMÉSTICOS SOBRE EL CONTENIDO DE ISOFLAVONAS EN LEGUMBRES.....	323
6.1. OBJETIVO.....	325
6.2. INTRODUCCIÓN.....	326
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	329
6.4. CONCLUSIONES.....	334
VII. CONCLUSIONES.....	335
VIII. SUMMARY IN ENGLISH.....	341
APÉNDICE A: ESPECTROS DE MS/MS.....	373
APÉNDICE B: MENCIÓN “DOCTORADO INTERNACIONAL”	385



I

INTRODUCCIÓN

1.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS.

ISOFLAVONAS

Hoy en día, los alimentos no solamente tienen la finalidad de satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios para los humanos sino que, además, intentan prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental de los consumidores. En la actualidad, existe una nueva rama de investigación centrada en el estudio de las propiedades nutricionales de los alimentos con objeto de controlar su calidad. Dentro de estos estudios, destaca el reciente interés por los compuestos bioactivos en matrices alimentarias.

Los compuestos bioactivos son aquellos constituyentes presentes de forma intrínseca en los alimentos, capaces de producir algún tipo de efecto beneficioso para la salud humana. Los alimentos que contienen este tipo de componentes se denominan alimentos funcionales. Esta terminología fue empleada por primera vez en 1984 en Japón, al impulsar un proyecto nacional con el fin de investigar las implicaciones entre la medicina y la alimentación, con objeto de garantizar un buen nivel de vida a una población con una esperanza de vida cada vez más elevada. Por este motivo, en 1991 surgió la necesidad de una política mundial que regulara la comercialización de este tipo de alimentos, “Alimentos para uso sanitario específico” (*Food for Specified Health Use, FOSHU*¹).

El interés mostrado por Japón por este tipo de alimentos denominados alimentos funcionales, fue rápidamente extendido a otros lugares como Europa o EEUU, quienes vieron en el estudio de estos alimentos, además de una disminución de los costes en servicios sanitarios, un potencial económico para la industria de la alimentación. Debido a la importancia de este campo de aplicación, surge de nuevo la necesidad de una regulación legal más estricta en el ámbito de los “alimentos funcionales”.

El 20 de Diciembre de 2006 se aprobó el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Dicho documento ha sido rectificado y modificado en función de las necesidades actuales. Es necesario aportar pruebas científicas que avalen las propiedades saludables de estos alimentos. Para ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) desarrolló un programa que permitiese garantizar un alto grado de

¹ K. Yamada, N. Sato-Mito, J. Nagata, K. Umegaki; *J. Nutr.* 138 (2008) 1192S

protección del consumidor y restablecer y mantener la confianza en el suministro alimentario. Según establece el Reglamento (CE) nº 178/2002, del 28 de Enero de 2002, esta asociación también es responsable de la recopilación y el análisis de datos científicos, la identificación de los riesgos emergentes y el apoyo científico a la Comisión. Desde 1993, regulado por la *Food and Drug Administration* (FDA), en EEUU se permite alegar en el etiquetado de diversos productos, propiedades tales como la reducción del riesgo a padecer determinadas enfermedades.

Berner y O'Donnell² sugirieron una clasificación de acuerdo a la función que realizan dichos alimentos y que los convierte por tanto en funcionales. Se proponen diversos ingredientes que hacen de un alimento, un alimento funcional: los probióticos, los prebióticos, la fibra, los antioxidantes, los fitoquímicos, etc.

Los fitoquímicos son sustancias de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida, pero que tienen efectos positivos en la salud. Dentro de estos compuestos fitoquímicos, destacan aquellos que presentan una débil actividad estrogénica, los fitoestrógenos.

El término fitoestrógeno apareció por primera vez en literatura en los años 80, y desde ese momento el número de citas bibliográficas en las que ha sido empleado se ha visto incrementado exponencialmente, apareciendo tanto en revistas biomédicas como nutricionales.

Existen alrededor de 300 tipos diferentes de especies vegetales que presentan actividad estrogénica, sin embargo, muy pocas de ellas son consumidas por el hombre. Otras presentan estrógenos esteroideos que, al tener la misma estructura que los que se generan de forma natural en los animales, no pueden ser considerados como fitoestrógenos según la definición más estricta³. Un claro ejemplo son los fitosteroles, como β -sitosterol, campesterol o estigmasterol, incapaces de unirse a los receptores estrogénicos (ER) o de producir actividad estrogénica⁴.

² L.A. Berner, J.A. O'Donnell; *Int. Dairy J.* 8 (1998) 355

³ H. Adlercreutz; *Lancet. Oncol.* 3 (2002) 364

⁴ V.A. Baker, P.A. Hepburn, S.J. Kennedy, P.A. Jones, L.J. Lea; *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 13

Los fitoestrógenos más relevantes para la salud humana son la daidzeína y la genisteína procedentes de la soja, la biochanina-A procedente de los garbanzos, la formononetina procedente del trébol y los cumestanos y lignanos derivados de la linaza. Casi todos estos compuestos se presentan de forma natural, glucosilados en las plantas, hecho a tener en cuenta puesto que la biodisponibilidad de estos glucoconjugados es diferente a la de las agliconas no sustituidas.

Dos de los fitoestrógenos más importantes para el hombre, el equol y la enterolactona, no se acumulan en las plantas, si no que son producto de la degradación microbiana en el intestino de la daidzeína de la soja y del secoisolariciresinol y matairesinol de la linaza^{5,6}.

Es importante el conocimiento de los niveles de fitoestrógenos en la dieta, como ayuda a los estudios epidemiológicos. Gran parte del esfuerzo implicado en la investigación radica en el desarrollo de métodos para la cuantificación de fitoestrógenos en plantas o extractos de las mismas, en tejidos e incluso en fluidos corporales.

Existe una amplia gama de métodos para la determinación de fitoestrógenos, desde técnicas comúnmente conocidas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría UV o de masas^{7,8,9,10}, a otros más complejos como los métodos inmunológicos, tales como el ensayo de inmuno-absorbancia ligado a una enzima¹¹, el ensayo de microtitulación con ER humano¹² o el análisis de unión a ER utilizando un ensayo con genes baliza de levaduras¹³.

⁵ K.D.R. Setchell, N.M. Brown, E. Lydeking-Olsen; *J. Nutr.* 132 (2002) 3577

⁶ L.Q. Wang; *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 289

⁷ S. Barnes, L. Coward, M. Kirk, J. Sfakianos; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (1998) 254

⁸ C.S. Kim, Y.S. Lee; *J. Food Sci. Technol.* 32 (2000) 25

⁹ C.J. Liu, J.W. Blount, C.L. Steele, R.A. Dixon; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 14578

¹⁰ C.C. Wang, J.K. Prasain, S. Barnes; *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 3

¹¹ C. Bennetau - Pelissero, C. Le Houerou, V. Lamothe, F. Menn, P. Babin, B. Bennetau; *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 305

¹² S.D. Garrett, H.A. Lee, P.M.K. Friar, M.R.A. Morgan; *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4106

¹³ D.M. Miller-Martini, R.Y.K. Chan, N.Y. Ip, S.J. Sheu, Y.H. Wong; *Phytother. Res.* 15 (2001) 487

1.1.1. ISOFLAVONAS

En 1923 Allen Doisey describió por primera vez productos derivados de las plantas con actividad estrogénica. No fue hasta los años 80 cuando se otorgó a estas sustancias el término fitoestrógeno y prácticamente hasta el año 2000 no se tuvieron evidencias constatadas acerca de la actividad de dichas sustancias.

La primera evidencia científica acerca de la actividad estrogénica de las plantas proviene de una revisión de los estudios sobre el efecto negativo de la ingesta de trébol en la fertilidad del ganado vacuno y ovino¹⁴. Este efecto estaba relacionado concretamente con la isoflavona formononetina, por lo que un objetivo clave de estudio fue la obtención de nuevos campos de trébol con un menor índice de formononetina¹⁵. De igual modo, las isoflavonas pueden afectar a la fertilidad aviar. Recientemente se ha retomado la hipótesis planteada en 1976 de que la codorniz de California cambia su preferencia alimentaria, en época de escasez de alimentos, a especies de la familia de las *Leguminosae* por presentar un mayor índice de formononetina y así controlar su fertilidad¹⁶.

1.1.1.1. Naturaleza química

Las isoflavonas son una subclase de flavonoides con una estructura química similar a la del estradiol y con una actividad estrogénica débil, por lo que se puede decir que pertenecen a la familia de los fitoestrógenos. La estructura básica es un núcleo de flavona compuesto por dos anillos de benceno (A y B) unidos a un anillo C heterocíclico. Se diferencian principalmente de los flavonoides en que el anillo B se encuentra unido por la posición 3 en lugar de por la posición 2 del anillo heterocíclico central del esqueleto cromano^{17, 18}.

¹⁴ S. Seested, P. Norgaard, H. Ranvig; *Dansk Veterinaertidsskrift* 83 (2000) 6

¹⁵ B. Boller; *Agrarforschung* 3 (1996) 486

¹⁶ A.S. Leopold, M. Erwin, J. Oh, B. Browning; *Science* 191 (1976) 98

¹⁷ E. Gikas, A. Alesta, G. Economu, A. Karamanos, A. Tsarbopoulos; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (8) (2008) 1181

Las isoflavonas, son más concretamente, heterociclos de oxígeno que contienen un esqueleto 3-fenilcromano que puede estar hidrolizado en las posiciones 4' o 7¹⁹. Su variabilidad estructural es inmensa debido a que implica no sólo el número y complejidad de sus sustituyentes, sino también los diferentes niveles de oxidación del heterociclo e incluso la presencia de anillos adicionales, como los metilendioxi o dimetilcromeno²⁰.

En base a la sustitución en los carbonos 5 y 6 podemos distinguir las tres formas libres principales: daidzeína, genisteína y gliciteína²¹. Se suelen encontrar de forma mayoritaria conjugadas con carbohidratos formando glucósidos, denominados daidzina, genistina y glicitina, respectivamente. Además, estos glucósidos pueden estar esterificados con grupos acetilo o malonilo. Existen dos formas libres minoritarias: la formononetina y la biochanina-A, precursores de daidzeína y genisteína respectivamente²². Los grupos fenólicos en las terminaciones de la molécula le otorgan una excepcional estabilidad desde el punto de vista químico, bioquímico y biológico²³.

En la tabla 1.1 se muestra la estructura básica del isoflavonoide acompañado de los distintos sustituyentes que dan lugar a los diferentes tipos de isoflavonas.

¹⁸ C.B. Patil, S.K. Mahajan, S.A. Katti; *J. Pharm. Sci.* 1 (3) (2009) 11

¹⁹ J.L. Penalvo, T. Nurmi, H. Adlercreutz; *Food Chem.* 87 (2004) 297

²⁰ P.M. Dewick; 1994. *The isoflavonoids. In The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*, ed. JB Harborne, pp. 117–238 London: Chapman and Hall

²¹ D.L. Luthria, R. Biswas, S. Natarajan; *Food Chem.* 105 (2007) 325

²² W. Mazur; *Bailliere Clin. Endoc.* 12 (4) (1998)

²³ H. Adlercreutz; *Bailliere Clin. Endoc.* 12 (4) (1998)

Tabla 1.1. Isoflavonas y sus estructuras químicas.

AGLICONAS					GLUCÓSIDOS				
COMPUESTO	SÍMBOLO	R ₁	R ₂	R ₃	COMPUESTO	SÍMBOLO	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzeína	Den	H	H	OH	Daidzina	Din	H	H	H
Genisteína	Gen	OH	H	OH	Genistina	Gin	OH	H	H
Gliciteína	Glen	H	OCH ₃	OH	Glicítina	Glin	H	OCH ₃	H
Formononetina	For	H	H	OCH ₃					
Biochanina-A	Bio	OH	H	OCH ₃					

1.1.1.2. Origen y biosíntesis

Actualmente, se conocen más de 300 plantas que presentan compuestos con actividad estrogénica, aunque la familia que presenta una mayor abundancia en fitoestrógenos es la *Leguminosae*, también denominada *Fabaceae*. Esta familia se caracteriza generalmente por tratarse de semillas a menudo comestibles. Existen 13.000 especies de legumbres conocidas, de las cuales alrededor de 20 son consumidas por el hombre.

Sin embargo, la presencia de isoflavonas en las leguminosas se limita a la subfamilia *Papilionoideae*²⁰. De todas ellas, la más destacable por la abundante presencia de isoflavonas es la soja²⁴, en la que se acumulan grandes cantidades, a niveles de mg, de daidzeína, genisteína y sus respectivos glucósidos, además de pequeñas cantidades de gliciteína y cumestrol. Otras semillas pertenecientes a esta especie que presentan isoflavonas y son consumidas por el hombre son los garbanzos (donde

²⁴ W.M. Mazur, J.A. Duke, K. Wähälä, S. Rasku, H. Adlercreutz; *J. Nutr. Biochem.* 9 (1998) 193

predomina la biochanina-A), los brotes de alfalfa (donde predominan los glucósidos y la formononetina)^{25, 26, 27}, las lentejas y las alubias.

Las agliconas son escasas en los tejidos de las plantas, presentándose en baja concentración, pero sus conjugados glucósidos sí que prevalecen en dichos tejidos. Así, daidzina, genistina y glicitina son las isoflavonas mayoritarias en especies como la soja, kudzu (*Pueraria lobata*), fabes o frijoles. El trébol rojo por su parte, destaca por contener principalmente formononetina y biochanina-A²⁸.

La mayor concentración de isoflavonas conocida se encuentra en la raíz del kudzu (cerca de 200.000 µg / 100g), seguido de la soja (37.300 – 187.600 µg / 100g) y los garbanzos (1.150 - 3.600 µg / 100g)⁵.

La leguminosa más estudiada en cuanto al contenido en isoflavonas es la soja, así como los productos derivados de ésta. Se encuentran altos niveles de daidzeína y genisteína en alimentos tradicionales a base de soja como la proteína de soja, el concentrado de soja o la harina de soja, y niveles insignificantes de genisteína en productos altamente procesados como el miso o la salsa de soja.

Todas estas sustancias pertenecen a la familia de las leguminosas²⁹; no obstante, podemos encontrar isoflavonas en frutas, vegetales y otras sustancias como diferentes tipos de brotes, frutos secos, espárragos, ajo o regaliz^{30,31}, generalmente en menor cantidad²².

Cabe destacar su presencia en el té o en bebidas alcohólicas. Rosenblum y cols. fueron capaces de determinar biochanina-A en bourbon en 1987 y a partir del desarrollo del inmunoensayo en 1998, Lapčík pudo determinar daidzeína, genisteína, formononetina y biochanina-A en cerveza²². En este caso predominan las formas libres de las isoflavonas y no los glucósidos

²⁵ A.A. Franke, J.H. Hankin, M.C. Yu, G. Maskarinec, S.H. Low, L.J. Custer; *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 977

²⁶ K. Reinli, G. Block; *Nutr. Cancer* 26 (1996) 123

²⁷ H.J. Wang, P.A. Murphy; *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1666

²⁸ J. Vacek, B. Klejdus, L. Lojková, V. Kubán; *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2054

²⁹ W. Mazur, H. Adlercreutz; *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1759

³⁰ P.L. Horn-Ross, S. Barnes, M. Lee, L. Coward, J.E. Mandel; *Cancer Cause Control* 11 (2000) 289

³¹ P.C. Pillow, C.M. Duphorne, C. Shine, J.H. Contois, S.S. Strom; *Nutr. Cancer* 33 (1999) 3

como es habitual, debido a que en los alimentos fermentados tiene lugar una hidrólisis a través de las hidrolasas bacterianas³².

La cantidad de isoflavonas en las diferentes especies se ve influenciada por los genotipos de las mismas, las prácticas agrícolas, el tiempo de maduración y recolección, el almacenaje, las condiciones climáticas, las condiciones del procesado, etc²³. Los niveles de fitoestrógenos en las semillas de soja pueden variar significativamente dependiendo de dichos factores³³. Más del 75% de las semillas de soja cultivadas actualmente en los Estados Unidos son transgénicas para la resistencia al herbicida glifosato (Roundup™). El glifosato inhibe la biosíntesis de shikimato, un precursor del aminoácido fenilalanina a partir del cual derivan las isoflavonas. Se ha demostrado recientemente que la aplicación de Roundup™ a diversas dosis en el campo no parece afectar a los niveles de fitoestrógenos en la soja³⁴.

La biosíntesis de las isoflavonas es simple, tiene lugar a partir de una de las rutas generales de los fenilpropanoides que dan lugar a los flavonoides en las plantas superiores. Esta vía se inicia mediante el aminoácido fenilalanina y una especie intermedia de la misma ruta, la naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) en la biosíntesis de la genisteína, o liquiritigenina (4',7-dihidroxiflavanona) en la biosíntesis de la daidzeína (Figura 1.1).

³² X. Xu, H.J. Wang, P.A. Murphy, S. Hendrich; *J. Nutr.* 130 (2008) 798

³³ A.C. Eldridge, W.F. Kwolek; *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 394

³⁴ S.O. Duke, A.M. Rimando, P.F. Pace, K.N. Reddy, R.J. Smeda; *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 340

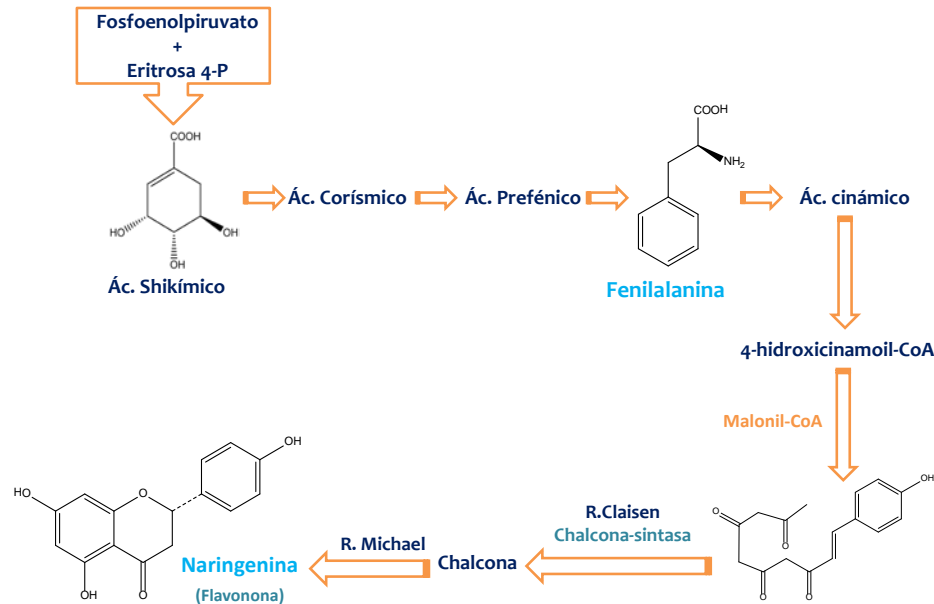


Figura 1.1. Formación de la naringenina, especie intermedia en la ruta biosintética de la isoflavona genisteína.

La flavonona se somete primero a la abstracción de un radical de hidrógeno en C-3, seguido por la migración del anillo B de C-2 a C-3 y la subsiguiente hidroxilación del radical resultante en C-2. Esta reacción requiere NADPH y oxígeno molecular, siendo catalizada por la enzima 2-hidroxiisoflavonona-sintasa. La reacción es estereoselectiva, por lo que no se generan (2R)-flavononas. La 2- hidroxiflavonona resultante es inestable, por lo que se deshidrata dando lugar a la genisteína o a la daidzeína a pH ácido³⁵ (Figura 1.2).

³⁵ W. Jung, O. Yu, S.M.C. Lau, D.P. O'Keefe, J. Odell; *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 208

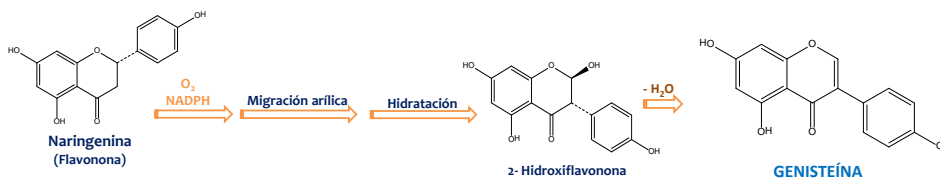


Figura 1.2. Ruta biosintética de las isoflavonas. Formación de genisteína.

La daidzeína difiere de la genisteína por la falta de un grupo hidroxilo en la posición 5. Este grupo surge de forma natural de las condensaciones cabeza-cola de los residuos de malonil-CoA en la formación de la naringenina.

La formononetina y la biochanina-A están metiladas en la posición 4' del anillo B. El origen de esta sustitución ha sido un tema de amplio debate durante muchos años. En la actualidad se han propuesto dos modelos diferentes; en ambos el sustrato para la O-metilación es la 2-hidroxiflavonona intermedia producida en la síntesis de daidzeína o genisteína, antes de la deshidratación para dar la isoflavona.

Uno de los modelos propone que la O-metilación está catalizada por la enzima 7-O-metiltransferasa^{36,37}, mientras que el segundo plantea que es la enzima 2,7,4'-hidroxisoflavonona-sintasa la que cataliza la metilación en posición 4', seguida de una deshidratación para dar lugar a la isoflavona (formononetina o biochanina-A)³⁸.

La conversión de las isoflavonas en sus glucosil-derivados depende de la acción de las enzimas glucosil y malonil transferasas^{39,40}.

³⁶ C.J. Liu, R.A. Dixon; *Plant Cell* 13 (2001) 2643

³⁷ C. Zubieta, R.A. Dixon, J.P. Noel; *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001) 271

³⁸ T. Akashi, Y. Sawada, N. Shimada, N. Sakurai, T. Aoki, S. Ayabe; *Plant Cell Physiol.* 44 (2003) 103

³⁹ J. Koester, R. Bussmann, W. Barz; *Arch. Biochem. Biophys.* 234 (1984) 513

⁴⁰ J. Köster, W. Barz; *Arch. Biochem. Biophys.* 212 (1981) 98

1.1.1.3. Biodisponibilidad

La mayoría de isoflavonas se encuentran como conjugados glucosídicos en las plantas, situándose generalmente en las vacuolas de las células centrales. Así pues, su biodisponibilidad dependerá de las tasas de captación relativas de las formas conjugadas y libres de cada individuo, la hidrólisis de los glucósidos por las bacterias o enzimas presentes en el intestino y un metabolismo adicional como el que ocurre en el hígado para la degradación de los glucurónidos mediante orina y bilis.

La genisteína presenta niveles de concentración plasmáticos superiores a los de la daidzeína, aún incluso siendo suministrados en el mismo nivel de concentración, debido a que la daidzeína es distribuido más ampliamente en el cuerpo. Sin embargo, la genisteína presenta una mayor biodisponibilidad que la daidzeína, pudiendo aumentar la biodisponibilidad conjunta si los compuestos son ingeridos como glucósidos⁴¹. En los seres humanos, genisteína y daidzeína son transportadas fácilmente a través de monocapas de células epiteliales intestinales, apareciendo en el plasma sanguíneo de forma más rápida y en mayor concentración que los glucósidos⁴².

De esta manera, se deduce que la forma preferente de absorción de las isoflavonas es la aglicona⁴³, debido a su alta liposolubilidad y menor peso molecular. Así pues, la absorción requiere una hidrólisis previa de los glucósidos. Al ingerirse, éstos son hidrolizados por β -glucosidasas de la mucosa intestinal y de bacterias de la flora bacteriana. Las agliconas formadas pueden ser directamente absorbidas o bien ser metabolizadas. De los metabolitos generados destaca el equol (Figura 1.3), por presentar una mayor actividad estrogénica que la propia isoflavona y por poder ser en gran parte responsable de los efectos fisiológicos de la ingesta de isoflavonas⁵. La conversión de las isoflavonas a equol puede estar influenciada por

⁴¹ K.D.R. Setchell, N.M. Brown, P. Desai, L. Zimmer-Nechemias, B.E. Wolfe; *J. Nutr.* 131 (2001) 1362 S

⁴² A. Steensma, H.P.J.M. Noteborn, R.C.M. VanderJagt, T.H.G. Polman, M.J.B. Mengelers, H.A. Kuiper; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7 (1999) 209

⁴³ K.D.R. Setchell, N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirschner, J.E. Heubi; *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2002) 447

factores que afectan a las poblaciones microbianas del intestino, como los niveles de carbohidratos y fibra dietética ⁴⁴.

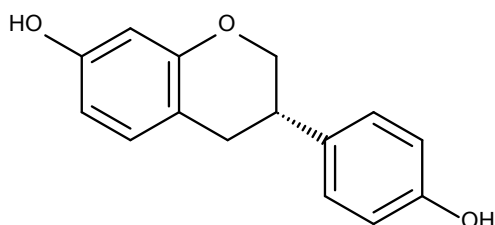


Figura 1.3. Estructura química del metabolito equol, procedente de la daidzeína.

En la actualidad existen evidencias que sugieren que la capacidad de producir equol no es la misma en todos los seres humanos, y que algunas personas no presentan dicha capacidad⁵. Existen varios estudios en los que se ha comprobado que la excreción de equol sólo se produce en aproximadamente el 35% de los casos, ya sean hombres o mujeres⁴⁵. Se sugiere, por tanto, que los humanos capaces de metabolizar dicha sustancia presentan una respuesta más favorable a las isoflavonas⁴⁶. Esta capacidad de producir equol se asocia al consumo de altas cantidades de soja de forma continuada. Los niveles urinarios de equol en los humanos que consumen una dieta rica en soja pueden ser aproximadamente 100 veces mayores que los observados en adultos que consumen pequeñas cantidades de soja en su dieta.

Una vez absorbidas las isoflavonas son conjugadas con ácido glucurónico y con sulfato en el hígado o en el intestino para ser, junto con sus metabolitos, excretadas por la bilis y la orina⁴⁷.

⁴⁴ J.W. Lampe, S.C. Karr, A.M. Hutchins, J.L. Slavin; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 3 (1998) 335

⁴⁵ J.L. Slavin, S.C. Karr, A.M. Hutchins, J.W. Lampe; *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1492 S

⁴⁶ T.E. Hedlund, P.D. Maroni, P.G. Ferucci, R. Dayton, S. Barnes, K. Jones, R. Moore, L.G. Ogden, K. Wähälä, H.M. Saxketr, K.J. Gray; *J. Nutr.* 135 (6) (2005) 1400

⁴⁷ *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación con las consecuencias asociadas al consumo de isoflavonas* (AESAN-2007-002)

1.1.1.4. Actividad estrogénica y antiestrogénica. Efectos sobre la salud

1.1.1.4.1. *Actividad estrogénica*

Las isoflavonas presentan la capacidad de unirse a receptores estrogénicos, dependiendo de la metilación o glucosidación de sus grupos hidroxilo. Del mismo modo, se encuentra una selectividad hacia los receptores tipo β frente a los α ⁴⁸. El equol no presenta dicha selectividad y es capaz de unirse a ambos ER (ER α y ER β), siendo más estable y oxidante que la daidzeína de la que procede. De esta selectividad se deducen los efectos beneficiosos de las isoflavonas, puesto que se piensa que los receptores α (ER α) tienen una actividad estrogénica asociada a la proliferación epitelial en el pecho, mientras que los ER β no⁴⁹.

La afinidad de las isoflavonas por los receptores estrogénicos es mayor que la mostrada por el 17- β -estradiol, pero los complejos resultantes son funcionalmente equivalentes. Ambos complejos son capaces de inducir la actividad transcripcional, aunque para ello sea necesario que la concentración de genisteína o daidzeína sea 10^4 veces mayor que para el 17- β -estradiol⁵⁰.

Estudios recientes ponen de manifiesto la posibilidad de una dualidad en la actividad estrogénica de las isoflavonas, así pues poseen actividad estrogénica y antiestrogénica. Parece ser que esta actividad agonista o antagonista depende de la cantidad de estrógenos endógenos, actuando como agonistas a concentraciones bajas de estrógenos, como es el caso de las mujeres que padecen menopausia, y como antagonistas a concentraciones elevadas^{51,52}.

⁴⁸ L.A. Fitzpatrick; *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 32 (2003) 233

⁴⁹ M.F. McCarty; *Med. Hypotheses* 66 (2006) 1093

⁵⁰ M.C. Navarro Moll; *Ginecol. Obset. Clin.* 6 (2005) 159

⁵¹ C.E Wood, T.C. Register, A.A. Franke, M.S. Anthony, J.M. Cline; *Cancer Res.* 66 (2006) 1241

⁵² C.S. Hwang, H.S. Kwak, H. Lim, S.H. Lee, Y.S. Kang, T.B. Choe, H.G. Hur, K.O. Han; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101 (2006) 4

1.1.1.4.2. *Efectos sobre la salud humana*

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios para corroborar los efectos beneficiosos que el consumo de fitoestrógenos ocasiona sobre el ser humano. Existe la amplia creencia de que el consumo de suplementos dietéticos que contienen fitoestrógenos otorga al organismo un aporte anticancerígeno, la capacidad para aliviar ciertas dolencias post-menopáusicas etc. Los compuestos bioactivos principales de estas formulaciones son los fitoestrógenos de la soja, la puerarina del kudzu o la formononetina de los tréboles y de la alholva⁵³. Otro ejemplo es la raíz de regaliz, que contiene glabridina⁵⁴.

Es importante destacar que pueden existir otros componentes activos en los alimentos que contribuyan a los efectos observados. Algunos de los efectos beneficiosos relacionados con las isoflavonas se describen a continuación:

- *Menopausia*

La menopausia se asocia a un incremento de la concentración en suero de la hormona estimulante de los folículos (FSH), fallo ovárico y unos niveles reducidos de estradiol. La ingesta de isoflavonas es recomendada en mujeres menopáusicas para reducir sus síntomas: sofocos, sudores nocturnos y sequedad vaginal^{55,56}; actuando así como una alternativa a la Terapia Hormonal Sustitutiva (THS), que se podría asociar a un incremento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o cáncer de mama.

Diferentes autores⁴⁷ han estudiado la influencia que ejercen las isoflavonas sobre los síntomas de la menopausia, los resultados han sido contradictorios. En algunos casos se afirma que los extractos de trébol rojo no presentan ninguna eficacia en la mejora de los síntomas, ni tampoco la

⁵³ E. Benlhabib, J.I. Baker, D.E. Keyler, A.K. Singh; *J. Med. Food* 5 (2002) 109

⁵⁴ S. Tamir, M. Eizenberg, D. Somjen, I. Sarit, J. Vaya; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78 (2001) 291

⁵⁵ P. Albertazzi, F. Pansini, G. Bonaccorsi, L. Zanotti, E. Forini, D. De Aloysio; *Obstet. Gynecol.* 91 (1998) 6

⁵⁶ J.L. Balk, D.A. Whiteside, G. Naus, E. De Ferrari, J.M. Roberts; *J. Soc. Gynecol. Invest.* 9 (2002) 238

soja y sus productos derivados. Sin embargo, estudios llevados a cabo en Japón y con un número de participantes mayor en los ensayos produjeron conclusiones diferentes, había relación directa entre el consumo de isoflavonas y la disminución de los síntomas. En el mismo sentido, Cassidy y cols. en 2006⁵⁷ concluyen que los extractos de isoflavonas de soja pueden ser efectivos combatiendo síntomas como los sofocos.

En España se llevó a cabo un estudio con 190 mujeres post-menopáusicas en el que se observó una disminución estadísticamente significativa de la incidencia de varios síntomas asociada al consumo de isoflavonas⁵⁸, sin efectos secundarios negativos⁵⁶. La Sociedad Española de Ginecología Fitoterápica (SEGIF), en 2007, concluye que se ha demostrado la eficacia de las isoflavonas para tratar los sofocos, mientras que aún no se ha evidenciado su eficacia en otros síntomas del climaterio⁴⁷. Aunque estos compuestos presenten un cierto grado de eficacia en los síntomas del climaterio, éste es inferior al obtenido a partir de la Terapia Hormonal Sustitutiva⁵⁹.

- Enfermedades cardiovasculares

Existen evidencias epidemiológicas de una menor incidencia de estas enfermedades en países asiáticos, posiblemente debido a una dieta menos rica en grasas saturadas y un gran consumo de soja frente a países europeos y norteamericanos. Sin embargo, no se puede deducir si los efectos antihipercolesterolemicos son debidos a diferentes componentes de la soja o solamente a sus fitoestrógenos.

Las mujeres post-menopáusicas tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares debido, en parte, a los niveles elevados de colesterol que acompañan a la pérdida de la secreción de estrógeno endógeno. En las mujeres premenopáusicas, la genisteína parece mejorar el perfil de los lípidos plasmáticos, la proporción de colesterol total y de

⁵⁷ A. Cassidy, P. Albertazzi, I. Lise Nielsen, W. Hall, G. Williamson, I. Tetens, S. Atkins, H. Cross, Y. Manios, A. Wolk, C. Steiner, F. Branca; *Proc. Nutr. Soc.* 65 (2006) 76

⁵⁸ A. Albert, C. Altare, F. Baro, E. Buendia, A. Cabero; *Phytomedicine* 9 (2002) 85

⁵⁹ M.G. Glazier, M.A. Bowman; *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 1161

lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como mejorara la proporción de colesterol HDL / LDL⁶⁰. El mismo efecto se observó en un estudio llevado a cabo con mujeres post-menopáusicas⁶¹. Los efectos protectores de los fitoestrógenos de la soja son más significativos en individuos con niveles iniciales de colesterol elevados, siendo menor su efecto en individuos con índices normales de colesterol^{62,63}.

La FDA ha aprobado el beneficio de consumir 25 g de proteína de soja al día para reducir los niveles de colesterol en sangre⁶⁴, lo que equivaldría a unos 6 mg de genisteína / día. La American Heart Association recomienda no consumir isoflavonas como suplementos, mientras que recomienda consumir productos de soja que podrían tener efectos beneficiosos para la salud cardiovascular, como consecuencia de su alto contenido en grasas poliinsaturadas, fibras, vitaminas y minerales y su bajo contenido en grasas saturada.

Es posible que el efecto antioxidante de las isoflavonas aumente la protección cardiovascular, inhibiendo la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno y aniones superóxido. El equol inhibe la expresión de una NADPH-oxidasa provocando un descenso de la producción de radical peroxinitrilo, lo que determina una disminución en la oxidación de las LDL limitando la formación de ateromas⁵⁰.

En un estudio sobre el potencial toxicológico de los fitoestrógenos, no se observaron efectos adversos para niveles de genisteína de aproximadamente 120 mg / kg al día en rata⁶⁵. El efecto hipocolesterolémico de una dieta rica en soja puede implicar interacciones entre las isoflavonas y la proteína de soja⁶⁶.

⁶⁰ B.E. Merz-Demlow, A.M. Duncan, K.E. Wangen, X. Xu, T.P. Carr; *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1462

⁶¹ M.J.J. de Kleijn, Y.T van der Schouw, W.F. Wilson, D.E Grobbee, P.F Jacques; *J. Nutr.* 132 (2002) 276

⁶² J.M. Hodgson, I.B. Puddey, L.J. Beilin, T.A. Mori, K.D. Croft; *J. Nutr.* 128 (1998) 728

⁶³ M.J. Tikkanen, H. Adlercreutz; *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1

⁶⁴ A. Jefferson; *Nutr. Food Sci.* 33 (2003) 16

⁶⁵ K. Okazaki, S. Okazaki, H. Nakamura, Y. Kitamura, K. Hatayama; *Arch. Toxicol.* 76 (2002) 553

⁶⁶ M.R. Peluso, T.A. Winters, M.F. Shanahan, W.J. Banz; *J. Nutr.* 130 (2000) 2333

· Osteoporosis

La deficiencia de estrógenos en mujeres post-menopáusicas puede conllevar la pérdida total del hueso, debido a un aumento de la resorción ósea y una disminución de su formación. Las mujeres del sureste asiático presentan una menor incidencia de osteoporosis. Este hecho propició la hipótesis de que los fitoestrógenos podían ser una alternativa a la terapia hormonal en la prevención de dicha patología.

Como en otros casos, los estudios no resultaron del todo concluyentes en la influencia que los estrógenos tienen sobre la osteoporosis. Se sugiere que las isoflavonas modulan el sistema de la osteoprotegerina, cuya alteración puede causar la osteoporosis. La genisteína, más concretamente, es la encargada de estimular la actividad de la osteoprotegerina, siendo esta actividad moderada suficiente para estimular una formación continuada de los huesos⁶⁷. Se ha comprobado que las isoflavonas podrían estimular la formación ósea osteoblástica, inhibir la resorción osteoclástica del hueso⁶⁸ y prevenir la pérdida total del hueso, tal y como se ha podido observar hasta el momento en ratones^{69,70}.

Estos efectos han sido confirmados en mujeres post-menopáusicas mediante ensayos clínicos. Una dieta rica en isoflavonas puede atenuar la pérdida ósea en la zona lumbar y en la cadera^{71,72,73}. Sin embargo estos efectos no fueron observados en mujeres premenopáusicas⁷².

Recientemente se ha observado que el consumo de té favorece el aumento de la densidad mineral ósea, por lo que es posible que los flavonoides, antioxidantes presentes en el mismo, sean responsables de este efecto⁷⁴.

⁶⁷ C. Morris, J. Thorpe, L. Ambrosio, M. Santin; *J. Nutr.* 136 (5) (2006) 1166

⁶⁸ H. Ebisawa, Y. Koshihara; *Soy Protein Res.* 4 (2001) 129

⁶⁹ P. Fantì, M.C. Monier-Faugere, Z. Geng, J. Schmidt, P.E. Morris; *Osteoporos. Int.* 8 (1998) 274

⁷⁰ Y. Ishimi, C. Miyaura, M. Ohmura, Y. Onoe, T. Sato; *Endocrinology* 140 (1999) 1893

⁷¹ D.L. Alekel, A.St. Germain, C.T. Pererson, K.B. Hanson, J.W. Stewart, T. Toda; *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 844

⁷² J. Mei, S.S.C. Yeung, A.W.C Kung; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 5217

⁷³ N. Morabito, A. Crisafulli, C. Vergara, A. Gaudio, A. Lasco; *J. Bone Miner. Res.* 17 (2002) 1904

⁷⁴ C. Wu, Y. Yang, W. Yao, F. Lu, J. Wu, C. Chang; *Arch. Intern. Med.* 162 (2002) 1001

· Función cognitiva

Al igual que en el caso anterior, el agotamiento de estrógeno podría estar también relacionado con un mayor riesgo de sufrir enfermedades neurodegenerativas.

La THS favorece la memoria episódica y semántica en mujeres postmenopáusicas sin embargo, en un estudio se observó que una dieta rica en soja mejoraba la memoria de los voluntarios en cuestión de semanas, ya fueran hombres o mujeres⁷⁵. Una serie de estudios sobre la estructura del cerebro, el aprendizaje, la memoria y la ansiedad en ratas, condujo a la conclusión de que un alto consumo de fitoestrógenos durante un período de tiempo relativamente corto, puede alterar significativamente el volumen de las regiones del cerebro de dimorfismo sexual, aumento de ansiedad, y mejorar el aprendizaje y la memoria visual-espacial en hembras, pero no en machos⁷⁶. En general, los machos superan a las hembras en una prueba de laberinto, pero este dimorfismo sexual se invirtió cuando los animales fueron alimentados con una dieta rica en isoflavonas⁷⁷.

Estos estudios son muy interesantes en vista de la posible importancia de los estrógenos en los trastornos cerebrales y neuronales, tales como la enfermedad de Alzheimer, especialmente en mujeres.

· Cáncer

Las características estructurales de la genisteína y de la daidzeína les confieren capacidad para unirse de forma estereoselectiva a ER β (forma epitelial prominente en próstata, cerebro, tracto urinario y células del seno) y proteínas de unión, pudiendo ejercer actividad tanto estrogénica como antiestrogénica. Esto puede ser un factor importante para los aparentes vínculos entre la ingesta de isoflavonas y la reducción del riesgo a padecer

⁷⁵ S.E. File, N. Jarrett, E. Fluck, R. Duffy, K. Casey, H. Wiseman, *Psychopharmacology* 157 (2001) 430

⁷⁶ E.D. Lephart, T.W. West, K.S. Weber, R.W. Rhees, K.D.R. Setchell; *Neurotoxicol. Teratol.* 24 (2002) 5

⁷⁷ T.D. Lund, T.W. West, L.Y. Tian, L.H. Bu, D.L. Simmons; *BMC Neurosci.* (online) 2 (2001) 1

cánceres dependientes de hormonas²⁹. La genisteína afecta potencialmente a las tasas de aclaramiento de andrógenos y estrógenos y con ello a la disponibilidad de las hormonas a las células diana.

Existen correlaciones significativas que ponen de manifiesto una reducción en la incidencia de cáncer de mama y mortalidad por cáncer de próstata en humanos con una dieta rica en isoflavonas⁷⁸. Estudios epidemiológicos en Singapur, revelan que el consumo de soja se puede relacionar con la reducción del riesgo de padecer cáncer. Cabe destacar que estos efectos positivos son atribuidos a una dieta rica en isoflavonas y no a condiciones genéticas, puesto que la población asiática emigrada a Occidente que ha adoptado una dieta occidental baja en isoflavonas de soja, presenta un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y de próstata⁷⁹.

Estas observaciones han sido reproducibles en otros muchos estudios hasta la actualidad. En base al conocimiento de la dieta y los niveles excretados en orina de daidzeína, genisteína y equol de poblaciones asiáticas en comparación con poblaciones occidentales, se ha propuesto que las isoflavonas de soja sean las responsables de la reducción del riesgo de cáncer.

- Cáncer de mama

Las isoflavonas presentan efectos complejos en el crecimiento de células cancerígenas cultivadas *in vitro*. La biochanina-A presenta una actividad multifásica en células del carcinoma mamario humano, siendo estimulante a concentraciones muy bajas (inferiores a 10 µg / mL), citostático a concentraciones intermedias (40 µg / mL) y citotóxico a concentraciones elevadas⁸⁰. Estos efectos son dependientes de los ER. Otro estudio pone de manifiesto que la genisteína puede actuar como un

⁷⁸ O. Ganry; *Eur. J. Cancer Prev.* 11 (2002) 519

⁷⁹ H.P. Lee, L. Gourley, S.W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, N.E. Day; *Lancet* 337 (1991) 1197

⁸⁰ J.T. Hsu, H.C. Hung, C.J. Chen, W.L. Hsu, C.W. Ying; *J. Nutr. Biochem.* 10 (1999) 510

modulador selectivo, lo que implicaría un reclutamiento selectivo de isoflavonas que activaría la transcripción del RNA ⁸¹.

La genisteína es el único isoflavonoide probado con actividad agonista de estrógenos e inhibidora del crecimiento de células de cáncer de mama ⁸², siendo más eficaz en la inhibición del crecimiento de las líneas celulares mamarias no neoplásicas. Esto apoya la idea de que una exposición temprana a genisteína puede ser importante como quimioprevención al cáncer de mama. Los niveles de ingesta son claves para la existencia de un equilibrio entre el riesgo y la quimioprevención del cáncer de mama ⁸³.

- Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es la segunda causa más frecuente de muerte relacionada con el cáncer en hombres en Estados Unidos, y no existe un tratamiento eficaz para la enfermedad una vez que éste se convierte en metastásico.

En algunos estudios se han observado relaciones inversas entre la administración de genisteína y la incidencia y mortalidad por cáncer de próstata ²³. El crecimiento celular del cáncer de próstata disminuye con la ingesta de genisteína ⁸⁴. Sin embargo, entre 1996 y 1998 se desarrolló un estudio en EEUU que puso de manifiesto que la ingesta de cumestrol y daidzeína reducía de forma más significativa la incidencia de cáncer de próstata que la genisteína; aunque todavía se intentan discernir los mecanismos de influencia de las isoflavonas sobre este tipo de cáncer ⁸⁵.

Las isoflavonas no provocan daños en el ADN ni fomentan el crecimiento de las células cancerígenas, como se pensaba en un principio del equol. De hecho, algunas de las isoflavonas suprimen el crecimiento de dichas células ⁸⁶. Mientras que la daidzeína presenta efectos inhibidores débiles de

⁸¹ P. Diel, S. Olf, S. Schmidt, H. Michna; *Planta Med.* 67 (2001) 510

⁸² D.T. Zava, G. Duwe; *J.Nutr. Cancer* 27 (1997) 31

⁸³ M. Maggiolini, D. Bonofiglio, S. Marsico, M.L. Panno, B. Cenni; *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 595

⁸⁴ M.R. Mentor, C.A. Lamartiniere, I.E. Eltom, N.M. Greenberg, A. Elgavish; *Cancer Res.* 61(2001) 6777

⁸⁵ A.M. Mahmoud, W. Yang, M. C. Bosland; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 140 (2014) 116

⁸⁶ M. Raschke, K. Wähälä, L. Beatrice; *J.Nutr.* 96 (3) (2006) 426

la proliferación de las células epiteliales de la próstata, el equol presenta efectos muy potentes a concentraciones micromolares⁸⁷. La conversión de daidzeína a equol puede ser, por tanto, un factor importante en la prevención dietética del cáncer de próstata.

- Otros tipos de cáncer

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de productos no fermentados de soja puede disminuir el riesgo de padecer cáncer de colon. La genisteína también puede ser relacionada con la inhibición del crecimiento celular y / o el desarrollo de los cánceres inducidos químicamente en estómago, vejiga, pulmón y sangre.

La inhibición del crecimiento del cáncer de estómago por parte de la biochanina-A y la genisteína consiste en la estimulación de una vía de transducción de señales que conduce a la apoptosis⁸⁸.

· Otros efectos

- Inflamación e inmunidad

La raíz de regaliz se utiliza comúnmente en la medicina tradicional china para tratar la inflamación, las alergias y el asma. Aunque el regaliz contiene triterpenos bioactivos y chalconas, se demostró recientemente que era la isoflavona licoricidina la encargada de la inhibición del factor activador de liso-plaquetas (PAF)⁸⁹. Se ha demostrado igualmente que una dieta rica en isoflavonas puede reducir los marcadores inflamatorios⁹⁰.

⁸⁷ T.E. Hedlund, W.U. Johannes, G.J. Miller; *Prostate* 54 (2003) 68

⁸⁸ K. Yanagihara, A. Ito, T. Toge, M. Numoto; *Cancer Res.* 53 (1993) 5815

⁸⁹ J. Bielenberg; *Phytotherapie* 22 (2001) 289

⁹⁰ J.F. Regal, D.G. Fraser, C.E. Weeks, N.A. Greenberg; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223 (2000) 372

- Reproducción y fertilidad

Los fitoestrógenos se identificaron por primera vez debido a sus efectos sobre la fertilidad en ovejas que pastaban tréboles, tal y como se indicó al inicio de esta Memoria. La genisteína y la 8-prenilnaringenina aumentan la capacidad fértil de los espermatozoides en ratas⁹¹. Se ha comprobado en ratas que una exposición a largo plazo de genisteína en el útero durante el periodo de lactancia y hasta 130 días después de la gestación, no presentó efectos adversos en la función gametogénica⁹².

En mujeres post-menopáusicas se ha demostrado que una ingesta de isoflavonas durante seis meses no aportó ningún efecto sobre la histología del endometrio⁵⁶. Sin embargo, las isoflavonas se han asociado a las fluctuaciones de los niveles de estrógeno y progestina vinculados a la migraña menstrual⁹³.

- Aspectos negativos

En investigaciones con ratones, los estudios han revelado que el consumo de soja o fitoestrógenos da lugar a una alteración de los niveles de andrógenos LH y FSH. Los efectos negativos, sobre el tamaño de camada y la producción de espermatozoides, se observan sólo durante una exposición larga, durante toda la vida, lo que sugiere que períodos más cortos de exposición pueden no causar efectos perjudiciales sobre la reproducción masculina en roedores⁹⁴.

A pesar de la gran cantidad de estudios que sugieren una quimioprevención del cáncer debido a la ingesta de genisteína, otros muchos sugieren la posibilidad de un efecto contrario. En los últimos años están apareciendo diferentes estudios encaminados a conocer los inconvenientes derivados de

⁹¹ S.A. Adeoya-Osiguwa, S. Markoulaki, V. Pocock, S.R. Milligan, L.R. Fraser; *Hum. Reprod.* 18 (2003) 100

⁹² D. Roberts, V.D.N. Rao, W.D. Schlaff, C.A. Awoniyi; *Endocrine* 13 (2000) 281

⁹³ B.E. Burke, R.D. Olson, B.J. Cusack; *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 283

⁹⁴ C.R. Cederroth, C. Zimmermann, S. Nef; *Mol. Cell. Endocrinol.* 355 (2012) 192

la ingesta de isoflavonas tomadas con la soja y productos derivados o bien con los suplementos alimenticios⁹⁵.

Se debe de señalar, como resumen de esta introducción, que en muchos casos los estudios sobre los efectos beneficiosos no son siempre concluyentes. Actualmente siguen apareciendo diferentes investigaciones en cuyos resultados se recoge la idea de que pequeñas dosis de isoflavonas pueden ejercer un efecto beneficioso y perjudicial cuando se ingieren cantidades elevadas de las mismas; es decir, las isoflavonas son sustancias que presentan lo que en toxicología se conoce como hormesis⁹⁶.

Como conclusión se podría indicar que una dieta variada y equilibrada es un requisito previo para disfrutar de buena salud, y los productos por separado tienen una importancia relativa respecto del conjunto de la dieta. Los alimentos “funcionales” no curan ni previenen enfermedades por sí solos. Una persona sana que sigue una dieta equilibrada ya ingiere todos los nutrientes que necesita sin tener que recurrir necesariamente a ningún suplemento adicional.

⁹⁵ H.B. Patisaul, W. Jefferson; *Front. in Neuroendocrin.* 31 (2010) 400

⁹⁶ R.C.M. Siow, G.E. Mann; *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 468

1.2. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS

1.2.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIO AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La mayoría de compuestos naturales son una mezcla compleja, homogénea o no, de diversas sustancias químicas. Para convertir una matriz real en un formato de muestra capaz de ser analizado por cualquier técnica es necesario llevar a cabo un tratamiento de muestra adecuado. Los principales objetivos de la etapa de preparación de la muestra son extraer y concentrar los analitos de interés, así como eliminar o reducir las posibles interferencias. De este modo se consigue aumentar la eficacia del procedimiento y mejorar la sensibilidad. Los tratamientos de muestras más habituales incluyen secado, tamizado, extracción de diversos componentes, eliminación de interferencias, pre-concentración, reacciones químicas de hidrólisis, derivatización, etc. La naturaleza de la muestra y el analito en estudio determinan el tipo de procedimiento, técnica o condiciones que hay que utilizar en cada momento. Una característica deseable en el procedimiento es que en el tratamiento no haya evolución de los analitos, para así poder obtener el perfil del contenido de las sustancias en estudio presentes en la muestra.

La etapa de preparación de la muestra es una de las etapas clave en el proceso analítico total, tiene un efecto sobre todos los pasos posteriores del ensayo y es crítica para la identificación, la cuantificación y la confirmación de todos los analitos. La calidad de los datos analíticos depende directamente del proceso de preparación de muestra, y un error puede ser transferido durante el proceso dando como consecuencia un método analítico no fiable.

Los métodos analíticos tradicionales de preparación de muestra conducen con frecuencia a pérdidas del analito de interés, pudiendo invalidar el ensayo entero, o bien que hasta el método de separación más robusto ocasione datos erróneos. Por lo tanto, la preparación de la muestra es una etapa clave a optimizar en cualquier método analítico, con objeto de mejorar con ello la fiabilidad y la exactitud de las determinaciones.

A pesar de su importancia, a lo largo de décadas la etapa de preparación de muestra se ha visto eclipsada por la etapa de análisis final. Acontecimientos notables en la instrumentación, la espectroscopía, la espectrometría de masas y la cromatografía han ocasionado un rápido avance de los métodos para la separación y la detección de complejos multi-componentes que contienen cantidades traza de los analitos de interés. Sin embargo, al aumentar la sensibilidad y la exactitud de las técnicas analíticas, se debe prestar una mayor atención a la etapa de preparación, que debe ser más selectiva y precisa.

La investigación en este campo también pretende reducir el impacto medioambiental, utilizando menores volúmenes de disolventes orgánicos y que éstos sean menos contaminantes. La selección apropiada de la técnica así como de sus condiciones, es el objetivo esencial para obtener dichos resultados. Si los métodos utilizados son eficientes, es factible una reducción del disolvente, con su impacto medioambiental asociado, eliminando pasos de preconcentración previos que lleven al analito a la concentración adecuada para la medida.

Entre los procedimientos utilizados en la preparación de muestra en el análisis de alimentos, el más importante es la extracción de los analitos de interés de la matriz de la muestra. Puede variar en el grado de selectividad, rapidez o conveniencia dependiendo del tipo de técnica, las condiciones utilizadas, así como del analito de interés. La mayoría de los métodos de extracción se siguen fundamentando en técnicas convencionales como la extracción líquido – líquido o la extracción por Soxhlet. Actualmente esta situación ha cambiado con la introducción y desarrollo de nuevas tecnologías como: extracción asistida por ultrasonidos (UAE), extracción mediante microondas (MAE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción en fase sólida (SPE). El desarrollo de estas técnicas está íntimamente ligado a las tendencias de los últimos años de buscar métodos más rápidos, capaces de determinar muestras más pequeñas, con una mayor capacidad de extracción, más específicos y selectivos.

Además de los avances en el desarrollo de los nuevos métodos, se deben destacar los avances tecnológicos que permiten automatizar la parte

manual del proceso analítico, como es la preparación de muestra, su manejo o evaporación. El aumento del nivel de automatización de sistemas analíticos tiene varias ventajas, incluyendo la reducción de la variabilidad y el error procedente de la manipulación de la muestra, así como permitir que el analista se centre en áreas como la interpretación de datos y la toma de decisiones.

Además de estas ventajas implícitas en los procesos automatizados, destaca su fácil acoplamiento a otras etapas del proceso analítico. De hecho, la conjunción entre las etapas de preparación de muestra y la instrumentación analítica es una de las áreas más crecientes en el campo del análisis de alimentos. En este contexto, se puede señalar que la utilización conjunta de técnicas de extracción diferentes produce buenos resultados.

A continuación se recoge una revisión bibliográfica de las técnicas de pretratamiento de muestra en el análisis de isoflavonas en alimentos, posteriormente las técnicas desarrolladas en este trabajo, extracción mediante líquidos presurizados, PLE, y extracción mediante la metodología QuEChERS se tratarán en los capítulos correspondientes.

1.2.1.1. Tratamiento de muestra previo en el análisis de isoflavonas

El análisis de isoflavonas en diferentes tipos de matrices se encuentra en auge en la última década, posiblemente debido a sus reconocidas propiedades beneficiosas para el organismo.

El procedimiento más ampliamente utilizado para el aislamiento de isoflavonas es la extracción con disolventes. En primer lugar, es necesario tener en cuenta la naturaleza de la muestra. El tratamiento previo a la extracción no es el mismo para una muestra sólida que para una líquida. Las muestras sólidas presentan la necesidad de ser trituradas para obtener una homogeneidad en las mismas; posteriormente pueden ser secadas,

congeladas, etc. Las muestras líquidas, sin embargo, pueden ser directamente almacenadas, congeladas, e incluso liofilizadas y tratadas como sólidas; excepcionalmente, pueden ser inyectadas directamente en el sistema de análisis previa filtración. La forma de poner en contacto disolvente y muestra también puede ser muy diferente, pudiendo ser una simple agitación, una humectación con posterior agitación, utilizando un Soxhlet, etc.

La extracción de compuestos orgánicos, como son las isoflavonas, puede verse influenciada por una gran cantidad de factores como son: polaridad y volumen de disolvente, temperatura, cantidad y tipo de muestra, e incluso duración de la extracción⁹⁷.

Los primeros estudios llevados a cabo versan acerca de la naturaleza del disolvente extractante. El primer estudio sobre la extracción de isoflavonas fue desarrollado por Eldrige⁹⁸ en 1982. Realizó pruebas con disolventes puros (MeOH, EtOH, ACN y AcOEt) y mezclas de MeOH : H₂O y EtOH : H₂O, llevando a cabo la extracción a reflujo. El disolvente que producía los mejores resultados era MeOH al 80%.

Otro pionero en este tipo de análisis fue Murphy⁹⁹, quien también llevó a cabo un estudio comparativo de disolventes para la extracción de isoflavonas en granos de soja, utilizando un método de agitación por inversión manual. En este caso la extracción con acetonitrilo era la más eficiente. Posteriormente, Song y cols.¹⁰⁰ replantearon el método de Murphy añadiendo diferentes cantidades de agua acidificada. En vista de estos nuevos datos, Murphy¹⁰¹ comprobó que la cantidad de agua ejercía un efecto significativo en la extracción de estos analitos, y que éste variaba dependiendo del tipo de matriz.

⁹⁷ M.A. Rostagno, A. Villares, E. Guillamón, A. García-Lafuente, J.A. Martínez; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2

⁹⁸ A.C. Eldrige; *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 353

⁹⁹ P.A. Murphy; *J. Chromatogr. A.* 211 (1981) 166

¹⁰⁰ T. Song, K. Barua, G. Buseman, P.A. Murphy; *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1474 S

¹⁰¹ P.A. Murphy, T. Song, G. Buseman, K. Barua, G.R. Beecher, D. Trainer, J. Holden; *J. Agric. Food. Chem.* 47 (1999) 2697

En 2001, Griffith y Collison¹⁰² propusieron un extractante basado en ACN:H₂O con la adición de una pequeña cantidad de DMSO, resultando esta propuesta mucho más eficiente que las anteriores.

Lin y Giusti¹⁰³ evaluaron los efectos de la polaridad del disolvente y de la acidificación en la eficacia de la extracción. Comprobaron que los disolventes sin acidificar son más efectivos en la extracción de las malonil-isoflavonas que los acidificados, mientras que en la extracción de los glucósidos, al igual que en la de acetil-glucósidos y agliconas, la presencia de ácido era menos importante. Estos autores también observaron que la presencia de acidez en los disolventes favorece la transformación de isoflavonas durante la extracción. Esto debería ser evitado con objeto de cuantificar las isoflavonas como se presentan realmente en las muestras.

La conclusión de estos trabajos, desde el punto de vista del aislamiento de estas sustancias, es que para elegir el disolvente de extracción se debe de tener en cuenta el tipo de isoflavonas mayoritariamente presentes en la muestra y, según su polaridad, elegir el más adecuado, teniendo en cuenta en dicha elección tanto la naturaleza del disolvente como su porcentaje en las mezclas con agua.

Otro de los factores a tener en cuenta en la extracción de estos analitos es la temperatura, debido a la influencia que la misma puede tener no sólo en la eficacia de la extracción sino también sobre la estabilidad de las isoflavonas extraídas y la posible transformación entre ellas. Rostagno⁹⁷ fue el primero en desarrollar un estudio exhaustivo sobre la importancia de la temperatura en la extracción de isoflavonas, aunque previamente diferentes autores ya lo habían considerado. Así Kudou y cols.¹⁰⁴ estudiaron la extracción de isoflavonas en semillas de soja a temperatura ambiente y a 80°C, y Coward y cols.¹⁰⁵ realizaron estudios sobre la extracción en alimentos a base de soja a esas mismas temperaturas y a 4°C. En ambos estudios comprobaron que la eficacia de la extracción depende de la naturaleza de las isoflavonas, observando que a menor temperatura se extraen mejor los malonil-

¹⁰² A.P. Griffith, M.W. Collison; *J. Chromatogr. A.* 913 (2001) 397

¹⁰³ F. Lin, M.M. Giusti; *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 3795

¹⁰⁴ S. Kudou, Y. Fleury, D. Welti, D. Magnolato, T. Uchida, K. Kitamura, K. Okubo; *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 2227

¹⁰⁵ L. Coward, M. Smith, M. Kirk, S. Barnes; *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1486 S

glucósidos, mientras que los glucósidos se extraen mejor a temperatura elevada. Sugirieron también que existe una transformación de los malonil-glucósidos en glucósidos a 80°C. Este hecho también fue comprobado por Barnes y cols.¹⁰⁶ en leche y proteínas de soja, llegando a la conclusión de que, además de la temperatura, el tiempo favorece la transformación. estudiaron la extracción a 80°C, a temperatura ambiente y a 4°C. Otro resultado importante de estos estudios fue que la extracción del total de isoflavonas es constante a las diferentes temperaturas.

Con objeto de evitar la inestabilidad de las isoflavonas se han utilizado inhibidores de las β -glucosidasa. Toebes y cols.¹⁰⁷ encontraron que el tris-hidroximetil-amino-metano (*Tris*) podía ser un inhibidor de esta enzimas en extractos de trébol rojo, comprobando que se obtenían cantidades mayores de malonil derivados, llegando incluso a obtener cantidades extraídas 24 veces mayores en presencia de *Tris*.

Las muestras de alimentos que contienen isoflavonas son, en su mayor parte, sólidas, reduciéndose las muestras líquidas a leche o zumos a base de soja. Tanto los disolventes utilizados como las técnicas empleadas son las mismas en ambos casos¹⁰⁸. En algunos casos se utilizan sistemas de reflujo, pero causan la degradación de los malonil-derivados a los respectivos glucósidos y agliconas, cambiando por tanto el perfil de las isoflavonas²⁸.

En la tabla 1.2 se hace un breve resumen de las técnicas convencionales más empleadas en la extracción de isoflavonas en matrices de alimentos.

¹⁰⁶ S. Barnes, M. Kirk, L. Coward; *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2466

¹⁰⁷ A.H.W. Toebes, V. de Boer, J.A.C. Verkleij, H. Lingeman, W.H. Ernst; *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4660

¹⁰⁸ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 265

Tabla 1.2. Técnicas de extracción aplicadas para el aislamiento de isoflavonas en matrices alimentarias.

	MUESTRA	TRATAMIENTO DE MUESTRA	COMENTARIO	REF
ELL	<i>Pueraria Lobata</i>	n-butanol / agua	Extracción en dos fases	28
SPE	Trébol rojo	Sobre extractos metanólicos, se aplica 2D-SPE	Comparación sonicación y agitación magnética	109
	Soja	Aplicación sobre extractos etanólicos	Estudio de diferentes sorbentes	110
SPME	Alimentos	Columna capilar de sílice	Hidrólisis para favorecer la extracción de glucósidos	111
Hidrólisis		Básica	Mismos resultados que el método oficial de la AOAC de 2001	112
		Enzimática Disolvente ACN	Hidrólisis mediante β -Glucuronidasa (<i>H.Pomatia</i>)	
		Ácida	Reflujo HCl Tiempo >2h . Conversion Din→Den Pérdida Gen	

Una de las técnicas de extracción más empleadas en el caso de muestras líquidas es la extracción en fase sólida (SPE). Como es bien sabido, esta técnica es fácilmente automatizable y permite un menor consumo de disolvente, así como un menor tiempo de análisis. Sin embargo, se debe señalar que no se encuentran referencias bibliográficas sobre la utilización directa de este tipo de extracción para este tipo de analitos. SPE sí se ha

¹⁰⁹ B. Klejdus, D. Vitamvášová, V. Kubán; *Anal. Chim. Acta* 450 (2001) 81

¹¹⁰ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 110

¹¹¹ K. Mitani, S. Naritmasu, H. Kataoka; *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 169

¹¹² H. Schwartz, G. Sontag; *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 204

utilizado para limpiar y preconcentrar extractos obtenidos después de un aislamiento mediante disolventes, como en el caso de muestras de trébol rojo (*Trifolium pratense*)¹⁰⁹. Sobre los extractos metanólicos obtenidos aplicaron extracción en fase sólida utilizando sorbentes de diferente polaridad antes de inyectarlos en el sistema cromatográfico. Rostagno y cols.¹¹⁰ estudian la influencia que tienen diferentes sorbentes sobre extractos etanólicos de soja en la limpieza de los mismos y la preconcentración de los analitos.

La microextracción en fase sólida (SPME) se ha utilizado en muy contadas ocasiones para aislar isoflavonas en alimentos. Se puede mencionar el trabajo de Mitani y cols.¹¹¹, que determinan daidzeína y genisteína en alimentos que tienen soja como base. En el trabajo se utiliza un capilar de sílice funcionalizada acoplado on-line a la válvula de inyección en el sistema cromatográfico, automatizando con ello el sistema de extracción. Solamente se consiguen extraer agliconas, por ello los autores realizan una hidrólisis ácida previa con objeto de determinar el total de isoflavonas.

Las metodologías que incluyen hidrólisis en el tratamiento de muestra se han utilizado tanto en métodos oficiales de análisis como el de la AOAC¹¹³, como en trabajos de investigación para desarrollar nuevas metodologías. En todos los métodos la hidrólisis va unida a una etapa de extracción. Delmonte y cols.¹¹⁴ analizan complementos dietéticos que tienen como base soja, trébol rojo y kudzu. Estudian la influencia que tienen diferentes tratamientos de muestra que incluyen extracción y procesos de hidrólisis, tanto ácida como alcalina. Según estos autores la aplicación de hidrólisis básica rompe la unión éster entre ácido malónico o acético y el correspondiente glicósido; mientras que la hidrólisis ácida rompe la unión entre la molécula de glucosa y la aglicona. Es decir, si se aplican ambas, todos los ésteres y glicósidos se transformarían en sus correspondientes agliconas. Estos autores recomiendan la hidrólisis cuando no se dispone de patrones como ésteres o glicósidos, cuantificando el total de agliconas.

¹¹³ *Official Methods of Analysis*, 17th ed., Method 2001.10, AOAC International, Gaithersburg, MD, 2000 (Chapter 45.4.14)

¹¹⁴ P. Delmonte, J. Perry, J. I. Rader; *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 59

Recientemente otros autores, Schwartz y Sontang¹¹², llevan a cabo un estudio exhaustivo de la influencia que los diferentes tipos de hidrólisis (ácida, alcalina o enzimática) ejercen en el análisis de isoflavonas en alimentos. Los diferentes métodos de preparación difieren en el tiempo e instrumentación requeridos, la robustez y su aplicabilidad en el análisis de muestras complejas con bajo contenido en soja. Estos autores proponen la hidrólisis enzimática mediante β -glucuronidasa de *Helix Pomatia* cuando se trate de evaluar el total de agliconas, tanto libres como provenientes de glucósidos y de sus ésteres.

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es considerada por algunos autores dentro de técnicas modernas de extracción, aunque para otros es una modalidad de extracción con disolventes ya que el uso de ultrasonidos, en su versión de sonda o baño, potencia el contacto entre muestra y disolvente. Rostagno y cols. han estudiado este tipo de extracción tanto en alimentos basados en soja¹¹⁵, como en bebidas que la contienen¹¹¹. Concluyen que los factores más influyentes en la extracción son el tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo de extracción; es decir, las mismas variables que influyen en la extracción tradicional. Para estos autores la presencia de agua es fundamental en el disolvente de extracción, los disolventes que aportaron los mejores resultados fueron EtOH 50%, MeOH 50% y ACN 40%.

Otros autores¹¹⁶ comparan la extracción de isoflavonas en diferentes alimentos derivados de la soja (harina y proteínas), con distintos disolventes 80% ACN y HCl 0.1 M, 80% MeOH y 80% EtOH, asistida o no por ultrasonidos. La eficacia en la extracción es superior cuando la extracción es asistida por ultrasonidos frente a la extracción convencional, incluso utilizando en este último caso 5 extracciones consecutivas. En este trabajo se puso de manifiesto que en la extracción asistida por ultrasonidos, el 80% ACN y HCl 0.1 M era el mejor extractante para el caso de malonil-glucósidos, en muestras de proteína de soja. La presencia de HCl puede incrementar la extracción de este tipo de isoflavonas; sin embargo, el tiempo no es una variable influyente por encima de 15 minutos. Estos autores concluyen que la naturaleza de la matriz de la muestra, concretamente la presencia de

¹¹⁵ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; *J. Chromatogr. A*, 1012 (2003) 119

¹¹⁶ A. Achouri, J.I. Boye, D. Belanger; *Food Res. Int.* 38 (2005) 1199

proteínas, debido a las fuertes uniones proteínas-polifenol, tiene un gran impacto en la eficacia de la extracción.

Tabla 1.2. (Continuación) Técnicas de extracción aplicadas para el aislamiento de isoflavonas en matrices alimentarias.

	MUESTRA	EXTRACTANTE	COMENTARIO	REF
	Soja y derivados	MeOH 50%, EtOH 50%, ACN 40%	Extracción cuantitativa en 20 minutos a 60 °C	115
UAE	Harina de soja	80% MeCN + HCl 0.1 M, 80% MeOH; 80% EtOH	Cuantitativa en 15 min	116
	Harina de soja	Disolventes puros	Extracción de DEN y GEN	117
	Bebidas de soja y zumo	MeOH, EtOH	Optimizan relación muestra:disolvente	111
	Soja	CO ₂ 70 % MeOH	Optimización de variables	118
SFE	Pastel de soja	CO ₂ 70 % EtOH	Degradación malonil-derivados	119
	Hipocotilos de soja	CO ₂ y modificadores	Efectos significativos en la extracción	120
	Derivados de soja	CO ₂ y modificadores	Estudio del tamaño de partícula	121
	Soja	MeOH-EtOH	Estudio de la temperatura, disolventes, tiempo etc.	122
MAE	Soja	80% ACN, Sonicación + HCl tratamiento previo a MAE	Extracción de agliconas. Diseño factorial de experimentos fraccionado	123

¹¹⁷ T. Bajer, M. Adam, L. Galla K. Ventura; *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 122

¹¹⁸ M.A. Rostagno, J.M.A. Araújo, D. Sandi; *Food Chem.* 78 (2002) 111

¹¹⁹ T. Kao, J. Chien, B. Chen; *Food Chem.* 107 (2008) 1728

¹²⁰ J.M.A. Araújo, M.V. Silva, J.B.P. Chaves; *Food Chem.* 105 (2007) 266

¹²¹ Y.B. Zuo, A.W. Zeng, X.G. Yuan, K.T. Yu; *J. Food Eng.* 89 (2008) 384

¹²² M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; *Anal. Chim. Acta* 588 (2007) 274

¹²³ M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, A. Mangia; *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 274

Una de las técnicas más recientemente utilizadas para la extracción de isoflavonas en diferentes matrices, fundamentalmente soja y derivados, ha sido la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Como es bien sabido, en esta técnica el agente extractante es un fluido supercrítico, un gas en condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico. El más utilizado es el CO₂, por su bajo coste y toxicidad y por la facilidad con que se alcanzan los parámetros críticos. Entre los parámetros a optimizar en este tipo de extracción se encuentran la presión y la temperatura. Al igual que en la mayoría de extracciones de otras sustancias, también en la extracción de isoflavonas se utilizan modificadores como metanol, etanol o acetonitrilo. El fluido supercrítico modificado presenta una variación en sus propiedades además de un incremento en su polaridad, lo que facilita la solubilidad de los analitos. Además, la presencia del modificador posibilita una mayor desorción de los analitos por parte de la matriz. Por ello, en la mayoría de las extracciones se utilizan fluidos supercríticos en presencia de un modificador^{118,119,120,121}.

SFE es una de las técnicas más complejas para la extracción de isoflavonas en matrices alimentarias; en opinión de algunos autores como Rostagno¹¹⁸, se necesita un mayor estudio de esta técnica, sobre todo desde el punto de vista de la estabilidad de los analitos durante la etapa de tratamiento de muestra.

Por último, se considera la extracción asistida por microondas (MAE). En este tipo de tratamiento se extraen los analitos de la muestra aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado; es decir, de constante dieléctrica alta, como agua, metanol o etanol. La eficacia de esta técnica depende de varios factores, como las propiedades del disolvente, las constantes dieléctricas, los componentes a extraer y el tipo de muestra. Rostagno y cols.¹²² llevan a cabo un estudio detallado de este tipo de extracción y optimizan todos los parámetros que pueden influir. Este tipo de técnica permite obtener extracciones cuantitativas en menos de 20 minutos. No observaron degradación de isoflavonas si se aplica el protocolo adecuado.

Otros autores¹²³ han optimizado los parámetros que influyen en la extracción de agliconas mediante MAE utilizando un diseño de

experimentos factorial fraccionado. Sobre la muestra de soja llevan a cabo un tratamiento previo con mezclas de ACN : H₂O durante 15 minutos, y en presencia de HCl, se lleva a cabo la extracción MAE.

1.2.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS

El crecimiento del interés de la población por la nutrición humana y la salud ha dado lugar a un desarrollo espectacular de la demanda de análisis para un amplio número de componentes de los alimentos. Estos análisis abarcan desde la determinación de macronutrientes como proteínas, azúcares y lípidos, hasta los más complejos métodos de determinación de micronutrientes y otros compuestos que tienen influencia en la salud, como las isoflavonas.

En muchos casos se requiere el conocimiento de la composición de los alimentos con propósitos nutricionales; por ejemplo, es necesario saber con dichos fines el contenido de proteínas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, etc. Otros compuestos, como micotoxinas, residuos de pesticidas, etc. se evalúan para asegurar su ausencia o establecer que sus niveles de concentración se encuentran dentro de la legalidad vigente.

Todos los productos naturales varían en su composición. Dos muestras de animales de la misma raza o plantas de la misma especie pueden ser muy diferentes. En general, los nutrientes que están íntimamente asociados con la estructura y el funcionamiento metabólico muestran menor variación que aquellos que se acumulan en partes localizadas de la planta o el animal. Muestran asimismo alta variabilidad en su contenido los nutrientes químicamente inestables.

La proporción de alimentos procesados en la dieta de los países desarrollados ha aumentado considerablemente. Esto, unido al incremento de la preocupación por la producción y consumo de alimentos y bebidas de calidad, hacen necesario el disponer de métodos analíticos para la determinación de la variación de los contenidos en los nutrientes más significativos en cada etapa de la producción y comercialización, con el fin de minimizar su destrucción.

En las dos últimas décadas se han desarrollado gran variedad de metodologías analíticas para la detección y cuantificación de fitoestrógenos y sus metabolitos. Las técnicas más utilizadas, dentro de las metodologías

propuestas, incluyen la separación de analitos mediante cromatografía de gases o de líquidos y la electroforesis capilar, acoplados a diferentes detectores (UV, electroquímicos, de fluorescencia, MS o RMN). Se debe señalar que las técnicas más ampliamente utilizadas en la determinación de isoflavonas son cromatográficas.

En el siguiente apartado se hace mención a las técnicas utilizadas en el desarrollo del trabajo presentado, cromatografía líquida y electroforesis capilar.

1.2.2.1. Cromatografía líquida

Desde los años 70, la introducción paulatina de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) como técnica de separación ha supuesto un importante progreso en las ciencias analíticas. La cromatografía líquida en fase inversa (RPLC, *Reversed-Phase Liquid Chromatography*), en la que se utilizan fases estacionarias hidrofóbicas, sílice funcionalizada con cadenas alquílicas; y fases móviles polares, mezclas de tampón acuoso y ACN / MeOH, ha sido y es, sin duda, la modalidad más utilizada. Hoy en día, aproximadamente un 70% de las separaciones que se llevan a cabo por HPLC son RPLC.

La gran aplicabilidad de RPLC se debe principalmente a su versatilidad y al desarrollo constante de nueva instrumentación y fases estacionarias. Como norma general, la retención aumenta con la hidrofobicidad de la fase estacionaria y con el porcentaje de tampón acuoso en la fase móvil. Así, los analitos polares se retienen en menor grado que los no polares. A pesar de su amplia implantación, las separaciones de compuestos de elevada polaridad y basicidad usando RPLC presentan aún algunas limitaciones. El análisis de algunos compuestos polares requiere el uso de altos porcentajes de tampón acuoso, incluso en las columnas de RPLC más inertes, lo que genera perfiles de pico inadecuados. Así, compuestos muy hidrofílicos, como carbohidratos u otros compuestos de bajo peso molecular y elevada polaridad, presentan una retención muy pobre en RPLC eluyendo muy cerca del volumen muerto, lo que dificulta en gran medida la separación entre

ellos y los interferentes polares de la matriz, incluso con fases móviles 100% acuosas¹²⁴.

Hasta hace poco, la principal alternativa a RPLC era la cromatografía en fase normal (NPLC, *Normal Phase Liquid Chromatography*) que conlleva el uso de fases estacionarias polares y disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo, etc.) como fase móvil. A diferencia de RPLC, la retención aumenta al hacerlo la polaridad de los analitos y de la fase estacionaria o al reducir la polaridad de la fase móvil. NPLC presenta una baja eficiencia para el análisis de compuestos polares, con picos cromatográficos altamente asimétricos. Esta modalidad cromatográfica es, además, incompatible con la espectrometría de masas como método de detección. Además, en el caso de compuestos de elevada polaridad, éstos pueden presentar una retención excesiva en NPLC o, incluso, no ser suficientemente solubles en los disolventes orgánicos no polares o de muy baja polaridad.

En los últimos años, la incorporación de la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) ha hecho posible la separación, mediante cromatografía de partición, de compuestos muy polares no resueltos por otro tipo de cromatografía. En HILIC se combinan las fases estacionarias utilizadas normalmente en NPLC (sílice sin modificar o modificada con grupos polares o polímeros polares) con las fases móviles empleadas en RPLC (disolventes orgánicos polares, generalmente mezclas ACN/H₂O con un mínimo del 2% H₂O). La atracción de moléculas de agua por los grupos polares de la fase estacionaria forma una capa acuosa sobre la superficie de dicha fase; un analito polar disuelto en la fase móvil experimenta un proceso de partición entre ésta y la capa de la fase acuosa semi-inmovilizada. Aunque en muchos casos pueden existir interacciones multimodales (electrostáticas, por puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, etc.) además del reparto. En la actualidad se encuentran en el mercado diferentes fases estacionarias que permiten la resolución de muestras que contienen estos solutos de gran polaridad.

La técnica de HPLC, y en los últimos años la cromatografía de alta resolución ultrarrápida (UHPLC), da lugar a buenas resoluciones entre compuestos químicos similares presentes en muchos componentes de los alimentos. Sin

¹²⁴ B.K. Lavine, D.T. Corona, U.D.N.T. Perera; *Microchem. J.* 103 (2012) 49

embargo, en la práctica, las ventajas que ofrece su alto poder de resolución se ven disminuidas por los laboriosos procedimientos de extracción que se requieren, a menudo, para aislar los componentes de interés con un porcentaje de recuperación suficientemente elevado.

Los variados materiales usados como fases estacionarias y el gran número de disolventes para cromatografía que pueden utilizarse, hacen que la técnica pueda aplicarse a la mayoría de los componentes de los alimentos. Es interesante resaltar que las aplicaciones de la cromatografía al análisis de alimentos se han desarrollado paralelamente a las de otros campos, tales como la Bioquímica, la Química Farmacéutica y la Toxicología.

Las aplicaciones de la cromatografía líquida de alta resolución en el campo de la tecnología de alimentos incluyen, por una parte, los ensayos analíticos, cualitativos y cuantitativos, sobre la composición de los productos y, por otro lado, la verificación de la calidad de los productos elaborados. Además, se aplica al análisis de componentes tanto de las materias primas como de los productos elaborados, así como para el control de cambios producidos durante el procesado y el almacenamiento.

Los sistemas de detección utilizados en la actualidad en cromatografía líquida hacen que sea una técnica, además de precisa, muy sensible, aunque no siempre se requiere esta característica en el análisis de determinados componentes de los alimentos.

1.2.2.1.1. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

El acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas (LC-MS) es relativamente reciente, habiéndose desarrollado a lo largo de los últimos 30 años. Los grupos de investigación pioneros en este campo fueron liderados por Talrose¹²⁵, Homing¹²⁶ y Scott¹²⁷. El desarrollo

¹²⁵ V.L. Tal'rose, V.E. Skurat, I.G. Gorodetskii, N.B. Zolotai; *Russ. J. Phys. Chem.* 46 (1972) 456

¹²⁶ D.I. Carroll, I. Dzidic, E.C. Homing, R.N. Stillwell; *Appl. Spectrosc. Rev.* 17 (1981) 337

¹²⁷ R.P.W. Scott, C.G. Scott, M. Munroe, J. Hess; *J. Chromatogr.* 99 (1974) 395

instrumental fue llevado a cabo principalmente por Arpino¹²⁸, Ishii¹²⁹, Henion¹³⁰ y Fenn¹³¹.

Como técnica híbrida, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas mantiene y aún a las principales ventajas de las dos poderosas técnicas de las que proviene. De la cromatografía líquida (LC) toma la compatibilidad con matrices líquidas y la alta eficiencia y selectividad en la separación; el 80 % de las especies orgánicas conocidas pueden separarse por LC¹³². De la espectrometría de masas (MS) toma su capacidad para discernir estructuras, masas moleculares, fórmulas empíricas y su elevada selectividad y sensibilidad, así como su gran margen lineal en el análisis cuantitativo.

Sin embargo, presenta como principales desventajas su alto coste y el requerimiento de personal cualificado, todo ello derivado de la dificultad práctica a la hora de combinar ambas técnicas. Dichas dificultades son principalmente tres:

- La incompatibilidad de los caudales, al tener que introducir el efluente de la columna en el sistema de alto vacío del espectrómetro de masas (un caudal líquido acuoso de 1 mL min⁻¹ equivale aproximadamente a un caudal gaseoso de 3000 mL min⁻¹ a 350°C y 1 atm).
- La incompatibilidad de la fase móvil, al ser frecuente en cromatografía líquida el uso de aditivos no volátiles (tampones, etc.).
- La ionización de analitos no volátiles y térmicamente lábiles.

La solución a los problemas planteados por estas dificultades conllevó el desarrollo de las interfaces LC-MS.

¹²⁸ P.J. Arpino, G. Guiochon, P. Krien, G. Devant; *J. Chromatogr.* 185 (1979) 529

¹²⁹ S. Tsuge, M.V. Novotny, D. Ishii; 1985. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 217

¹³⁰ A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion; *Anal. Chem.* 59 (1987) 2642

¹³¹ J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse; *Mass Spectrom. Rev.* 9 (1990) 37

¹³² L.R. Snyder, J.J. Kirkland; 1991. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* ed. Wiley, New York

- Interfaces LC-MS

El desarrollo de las interfaces LC-MS ha sufrido importantes cambios estratégicos a lo largo de su corta historia. El paso determinante que limitaba la aplicabilidad del acoplamiento era la vaporización de los analitos. En este sentido, el desarrollo de interfaces en las que se produce una desolvatación muy suave al vaporizarse pequeñas gotas del disolvente se considera que fue el paso crucial para el éxito final del acoplamiento LC-MS¹³³. Este hecho se vio ratificado por el éxito del termospray (TSP, *ThermoSPray*). Esta interfaz, desarrollada por Vestal y cols. a finales de los 70¹³⁴, se basa en la generación de un chorro de vapor y pequeñas gotas líquidas en un tubo vaporizador caliente. La nebulización ocurre por la disrupción causada en el líquido por el vapor formado. La ionización se lleva a cabo de forma similar a la ionización química clásica, en la que interviene el tampón volátil disuelto en la fase móvil. El termospray fue la interfaz más utilizada durante muchos años, período en el cual se produjo la expansión y consolidación del acoplamiento LC-MS.

La fase móvil pasó así de ser el portador activo de LC, a ser un constituyente esencial del proceso de ionización. De todos modos, la fase móvil continuaba imponiendo fuertes demandas y restricciones en la instrumentación, especialmente por problemas relacionados con los equipos de vacío y la compatibilidad con diferentes disolventes. Las principales interfaces desarrolladas en este sentido, son las que realizan la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas a presión atmosférica, las denominadas interfaces de ionización a presión atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*).

Aunque estas interfaces ya habían sido descritas, fueron Horning y Carroll^{135,136} los que las desarrollaron en los años 70, consiguiendo que fueran comercializadas en los 80. En éstas, tanto la nebulización como la ionización se producen a presión atmosférica.

¹³³ P.J. Arpino, O. Guiochon; *J. Chromatogr.* 251 (1982) 153

¹³⁴ C.R. Blakey, M.J. McAdams, M.L. Vestal; *J. Chromatogr.* 158 (1978) 261

¹³⁵ E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell; *Anal. Chem.* 45 (1973) 936

¹³⁶ D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, M.G. Horning, E.C. Horning; *Anal. Chem.* 46 (1974) 706

La evolución de esta instrumentación llevó al desarrollo de diferentes técnicas para ionizar en fase líquida tales como la ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)¹²⁶, la fotoionización a presión atmosférica (APPI, *Atmospheric Pressure Photoionization*)¹³⁷ y la ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*).

En el desarrollo de esta Memoria, únicamente ha sido utilizada la técnica de ionización por electrospray, por lo que será la única detallada a continuación.

- *Ionización por electrospray (ESI)*

La primera aplicación del electrospray en espectrometría de masas se remonta a las investigaciones de Dole en 1968¹³⁸, dándose además la primera explicación lógica del fenómeno de electrospray, el modelo de cargas residuales (CRM, *Charges Residue Model*). Pero fue en los años 80 cuando surgió el desarrollo de la ionización por electrospray de la mano de Yamashita y Fenn,^{139,140} como respuesta a uno de los mayores desafíos de la época, encontrar la forma de analizar compuestos de alto peso molecular y termolábiles. Dichos hallazgos condujeron a John B. Fenn^{139,141} a compartir con Tanaka el Premio Nobel de Química en 2002 por el desarrollo de dicha interfaz.

Esta técnica de ionización se basa en la generación, a partir de la solución de analitos, de una nube formada por diminutas gotas cargadas eléctricamente, que es sometida a la acción de un fuerte campo eléctrico.

El mecanismo por el que se producen la nebulización y la ionización en electrospray sigue siendo un importante campo de investigación, ya que su conocimiento permitirá mejorar aún más la técnica en términos de

¹³⁷ D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins; *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653

¹³⁸ M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice; *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240

¹³⁹ M. Yamashita, J.B. Fenn; *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451

¹⁴⁰ C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn; *Anal. Chem.* 57 (1985) 675

¹⁴¹ J.B. Fenn. (Nobel Lecture) "Electrospray Wings for Molecular Elephants"

sensibilidad. Para explicar los fenómenos que tienen lugar en el electrospray existen dos modelos en constante controversia: el modelo de cargas residuales de Dole¹³⁸ (1968) y el modelo de evaporación de iones de Iribarne y Thomson¹⁴² (1976). Posiblemente ambos modelos son válidos dependiendo de los diferentes analitos y disolventes.

Se pueden distinguir dos etapas en el proceso de ionización. En la primera etapa tiene lugar una nebulización del líquido que ocasiona una reducción del tamaño de las gotas cargadas debido a la evaporación de moléculas de disolvente neutras, ocasionando un aumento de la fuerza del campo eléctrico en la superficie de la gota y dando por tanto lugar a la ionización.

Es en este último punto donde ambas teorías difieren. Mientras que en el modelo de evaporación de iones, los iones pasan directamente a la fase gaseosa cuando las gotas son lo suficientemente pequeñas y cargadas; en el modelo de cargas residuales, la tensión superficial no puede vencer la repulsión de los iones (alcanzándose el límite de inestabilidad de Rayleigh) produciéndose la explosión de la gota y formándose con ello el cono de Taylor. Se consiguen así gotas de pequeño tamaño con un solo ion, que pasa a fase gaseosa por evaporación del disolvente¹⁴³. El proceso de evaporación de la gota se favorece introduciendo una corriente gaseosa caliente o calentando el capilar de introducción de la muestra.

El modelo de cargas residuales es el más ampliamente aceptado y se muestra en la figura 1.4.

¹⁴² J.V. Iribarne, B.A. Thomson; *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287

¹⁴³ W.M.A. Niessen; *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 179

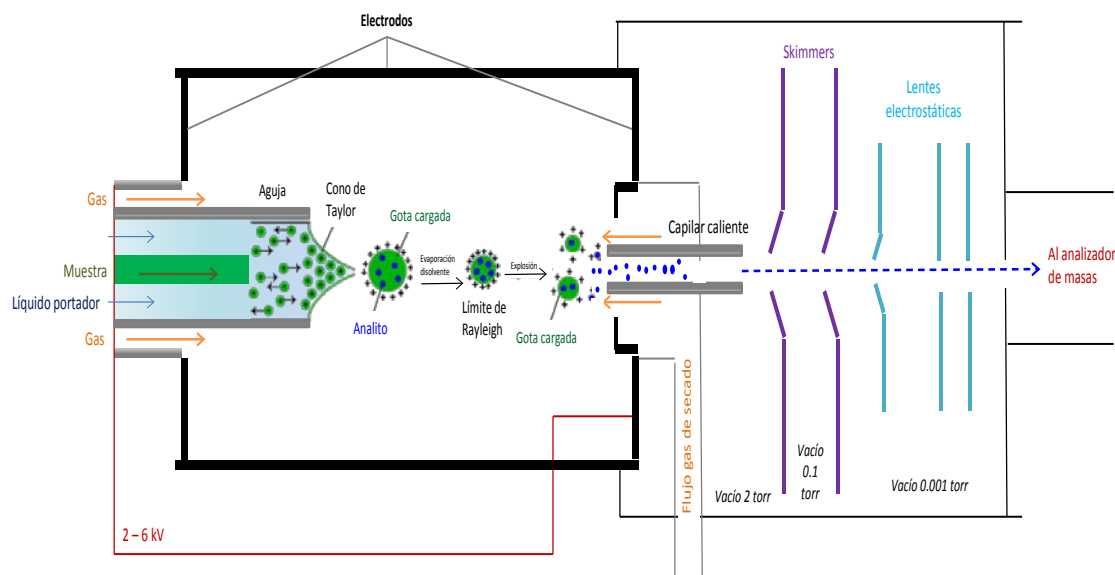


Figura 1.4. Representación esquemática de un interfaz LC-ESI-MS de segunda generación con la formación de iones detallada.

En la práctica, el proceso de ionización en el electrospray ocurre por un mecanismo más complejo ya que, tras la evaporación de los iones preformados en fase líquida, se producen reacciones ion-molécula en fase gaseosa que juegan un papel importante en el proceso de ionización.

Las interfaces ESI utilizadas actualmente pertenecen a una segunda generación desarrollada y comercializada en 1993. Presentan mejoras en tres partes del sistema:

- En la aguja del spray, al incorporar un sistema de nebulización neumática que complementa a la nebulización por electrospray.
- En el sistema del cono de muestreo, al introducir sistemas de transferencia más eficaces como un capilar calentado.

- En los dispositivos de recogida y enfoque de iones, reemplazando las lentes convencionales por sistemas cuadropolares, hexapolares u octapolares.

Esta segunda generación permite usar caudales, procedentes de la columna cromatográfica, de hasta 1 mL min^{-1} . En la figura 1.4 se muestra esquemáticamente una interfaz ESI actual, en la configuración *on-axis*. Esta configuración es la más simple y en ella el *spray* se genera en la dirección de la entrada de los iones al espectrómetro de masas, pudiéndose presentar problemas de contaminación. En la configuración *Z-spray*, el *spray* está dirigido en dirección perpendicular al orificio de entrada del espectrómetro de masas con lo que se reduce la entrada de componentes no ionizables y poco volátiles de la matriz. Así, las interfaces *Z-spray* presentan una eficacia de vaporización superior a la de la configuración *on-axis* y permiten disminuir los problemas de supresión de la ionización.

A pesar de las ventajas que presenta ESI frente a otras fuentes de ionización, cabe destacar que ninguna de ellas presenta una ionización universal. En este sentido, la carencia más importante es la ionización de moléculas apolares, hecho sólo en parte solventado por la interfaz APPI. En la figura 1.5, se muestran las diversas interfaces disponibles comercialmente para LC-MS y su intervalo de aplicabilidad en cuanto a masa molecular y polaridad.

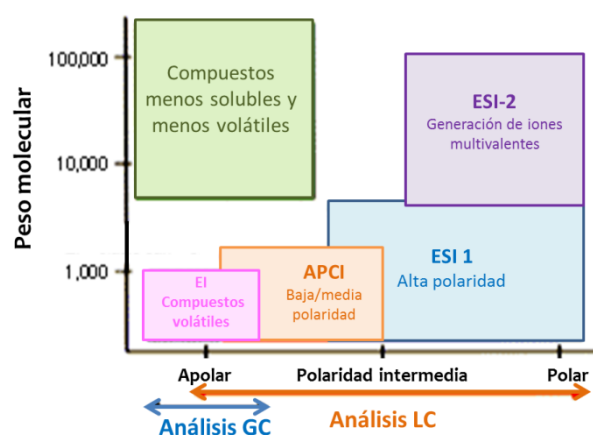


Figura 1.5. Aplicabilidad de diferentes interfaces de LC-MS en función de la polaridad y masa molecular del analito en estudio.

Las interfaces más utilizadas son APCI y ESI. En ellas, las especies detectadas más frecuentemente son iones moleculares protonados $[M+H]^+$ para moléculas básicas o iones moleculares desprotonados $[M-H]^-$ para moléculas ácidas. Además de estos iones, es habitual la formación de aductos con otras especies presentes en el medio como iones sodio, potasio, amonio o cloruro. Aunque la interfaz ESI es la más indicada para compuestos iónicos o muy polares y APCI para los menos polares, hay un amplio margen de polaridades en las que ambas interfaces pueden funcionar aceptablemente; en estos casos la elección de una u otra va a depender de la sensibilidad alcanzada en cada caso específico. Como norma general ESI suele dar lugar a determinaciones más sensibles.

En todo caso cabe destacar que, en oposición a lo que ocurre en GC-MS, la eficiencia de la ionización depende de las diferencias entre interfaces y otros factores como la composición de la fase móvil o el voltaje de cono. Por ello, en LC-MS, resulta de menor utilidad el uso de librerías de espectros a la hora de comparar resultados.

1.2.2.1.2. Analizadores de espectrometría de masas

El analizador es la parte esencial de un espectrómetro de masas y de él dependen en mayor grado las características más importantes del sistema como la resolución y la sensibilidad. El principio físico en el que se basa su diseño y la forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga (m/z) es lo que diferencia a los instrumentos de espectrometría de masas. Los analizadores más utilizados son: cuadrupolo (*Q, Quadrupole*), trampa de iones (*IT, Ion Trap*), tiempo de vuelo (*TOF, Time-Of-Flight*), resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (*FT-ICR, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) y orbitrap. Los principales parámetros analíticos que distinguen a estos equipos son la resolución y la masa exacta. La resolución se define como la anchura a media altura y marca la capacidad del analizador para distinguir entre dos picos con m/z similares. La exactitud es definida como la diferencia relativa entre el valor de m/z experimental (m/z_{exp}) y verdadero (m/z_{ver}), expresada habitualmente en partes por millón (ppm).

$$\frac{m/z_{exp} - m/z_{ver}}{m/z_{ver}} \cdot 10^6$$

Otras características analíticas a considerar son el intervalo de masas, la linealidad y el coste.

En la presente Memoria únicamente se detallarán los analizadores de tipo cuadrupolo y trampa iónica por ser los únicos posteriormente utilizados en el desarrollo de la misma.

- Analizador cuadrupolo (Q)

Actualmente, este diseño de espectrómetro de masas es el más extendido, debido a que es simple, ofrece reproducibilidad, precisión y sensibilidad para la cuantificación, además de un precio razonable.

Un cuadrupolo consiste en cuatro barras conductoras dispuestas en paralelo. A los pares de barras situadas en posición opuesta se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF) (Figura 1.6). Los iones avanzan a lo largo del analizador siguiendo trayectorias oscilantes, siendo repelidos y atraídos por las barras, dependiendo directamente de su relación m/z . Así, el cuadrupolo actúa como filtro de masas, de forma que de todos los iones provenientes de la fuente sólo se transfieren al detector los seleccionados, con una resolución de 1 u. Permite analizar relaciones m/z en el intervalo 10-3000 u con una exactitud en torno a 100 ppm. Su velocidad de adquisición ronda los 10 Hz y el intervalo de linealidad es, aproximadamente, de 10^6 . Cabe destacar, como principal ventaja, su bajo coste en comparación con otros analizadores.

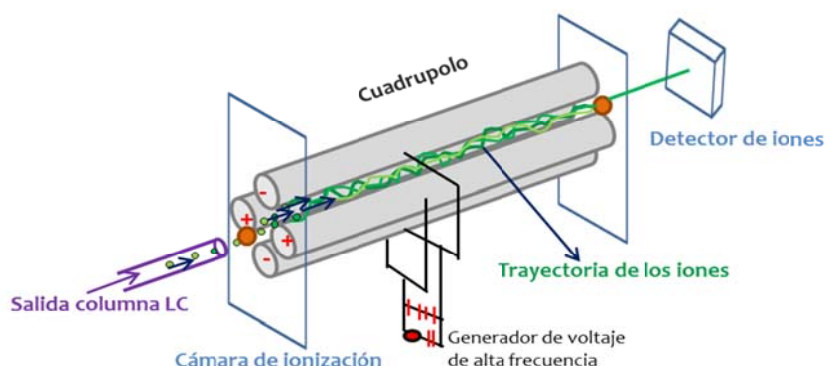


Figura 1.6. Analizador de masas tipo cuadrupolo.

Recientemente se ha desarrollado una modificación del cuadrupolo en el que las barras presentan forma hiperbólica. Esta configuración permite mejorar la sensibilidad, la resolución (0.1 u) y la exactitud (≈ 5 ppm). Como desventaja, presenta una velocidad de adquisición inferior (5 Hz).

- Trampa iónica (IT)

De forma general se define una trampa iónica como una combinación de campos eléctricos y magnéticos capaces de confinar iones en una región a vacío. Wolfgang Paul, quien fue galardonado con el premio Nobel de física en 1989 por sus trabajos en este campo, la introdujo como analizador en un sistema de espectrometría de masas en 1960; motivo por el cual también suele denominarse trampa de Paul¹⁴⁴.

La trampa iónica está formada por dos electrodos metálicos hiperbólicos enfrentados y un electrodo hiperbólico de anillo en la región intermedia, a los que se aplican campos eléctricos de corriente alterna y continua (Figura 1.7).

¹⁴⁴ R.E. March, J.F.J. Todd; Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, Ed. John Wiley & Sons (2005)

Los iones son atrapados en el espacio existente entre los tres electrodos por campos eléctricos de corriente alterna (oscilantes) y de corriente continua (no oscilantes). El voltaje de radiofrecuencia de corriente alterna se hace oscilar entre los dos electrodos hiperbólicos si se desea excitar los iones. El voltaje de corriente alterna director se aplica en el electrodo de anillo. Los iones son inicialmente arrastrados axialmente (de arriba abajo) mientras que son empujados radialmente. Posteriormente se produce el fenómeno inverso siendo los iones empujados axialmente y arrastrados radialmente. Bajo estas fuerzas los iones adquieren un movimiento complejo formando una nube que oscila entre un estado alargado y estrecho y otro corto y ancho (figuras de Lissajous). La introducción de un gas amortiguador que facilita el confinamiento de los iones (He a 1 mm Hg) permitió la introducción de las primeras trampas comerciales desarrolladas por Stafford y cols. a mediados de los 80¹⁴⁵. Junto a éste, el hecho determinante que permitió el éxito comercial de las trampas iónicas fue el control de las líneas de estabilidad-inestabilidad. Esto permitió construir dispositivos con una resolución en relaciones m/z de una unidad, lo que permite aislar un ion, fragmentarlo y expulsar los fragmentos selectivamente hacia el detector. Permite analizar relaciones m/z en el intervalo 50-5000 u, su velocidad de adquisición ronda los 10 Hz y el intervalo de linealidad es, aproximadamente, de 10^5 . En comparación con otros analizadores su coste es moderado.

¹⁴⁵ G.C. Stafford, P.E. Kelley, J.E.P. Syka, W.E. Reynolds, J.F.J. Todd; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 60 (1984) 85

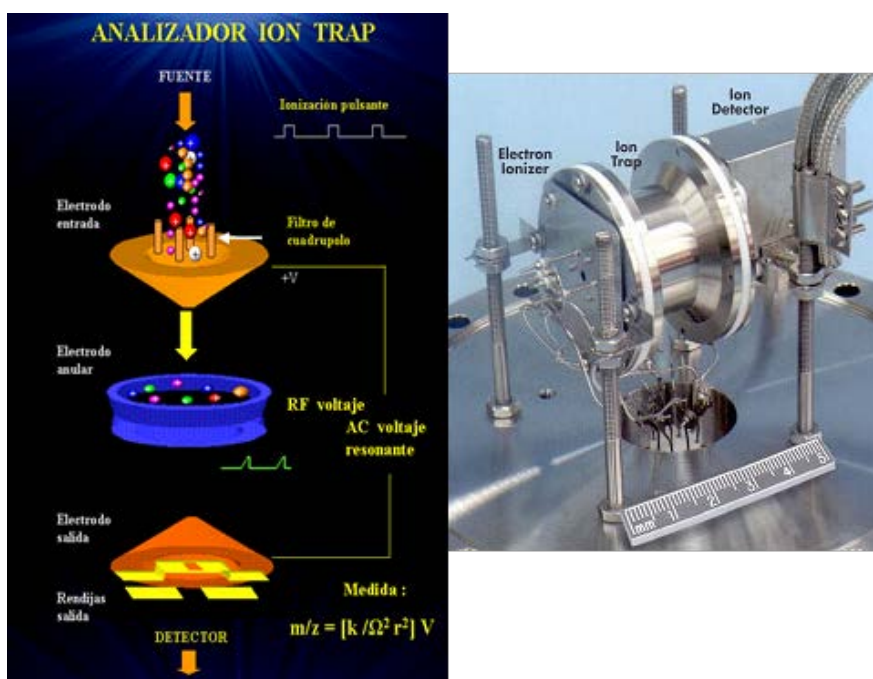


Figura 1.7. Trampa iónica tridimensional (Trampa de Paul).

En la figura 1.8 se muestra la cadena temporal de sucesos en un barrido de iones producto.

Posteriormente a la trampa de Paul (3D) se desarrolló la trampa iónica lineal (LIT, *Linear Ion Trap*)¹⁴⁶ formada por cuatro electrodos paralelos situados de forma similar a los electrodos del cuadrupolo. Las principales ventajas de esta configuración son una mayor capacidad de confinamiento de iones, velocidades de adquisición más rápidas y mayor simplicidad para su construcción, sin que se produzca deterioro en ninguno de los demás parámetros analíticos.

¹⁴⁶ J.C. Schwartz, M.W. Senko, J.E.P. Syka; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 659



Figura 1.8. Representación gráfica de un barrido de iones producto en una trampa iónica.

1.2.2.1.3. Espectrometría de masas en tándem

Las fuentes de ionización desarrolladas para el acoplamiento LC-MS, ESI y APCI principalmente, son fuentes muy blandas, lo que equivale a que para la gran mayoría de los analitos se genera un único ion, correspondiente a la molécula completa ($[M+H]^+$, $[M-H]$, $[M+Na]^+$...). Al no haber fragmentación, se obtiene información útil sobre la masa del compuesto, pero existe una carencia de información estructural necesaria para asegurar que la señal obtenida corresponde a un cierto analito y no a otro compuesto isobárico que podía contener la muestra analizada. Para obtener dicha información y aumentar la especificidad de las determinaciones cuantitativas se pueden combinar varios analizadores de masas en el tiempo o en el espacio, dando lugar a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La espectrometría de masas en tándem, comúnmente abreviada como tándem MS o MS/MS, consiste en la realización de análisis de masas consecutivos entre los cuales se intercala una etapa de fragmentación de la molécula. En la figura 1.9 se muestra esquemáticamente un proceso general de tándem MS. En primer lugar se produce la generación no selectiva de iones en la fuente (ESI, APCI, etc.). Todos los iones formados son conducidos al primer analizador de masas que selecciona los iones precursores deseados. Éstos son entonces conducidos a la celda de colisión donde son fragmentados. Así se produce una colección de iones producto (fragmentos de los iones precursores) que son posteriormente

separados en el segundo analizador para ser, finalmente, registrados en el detector.

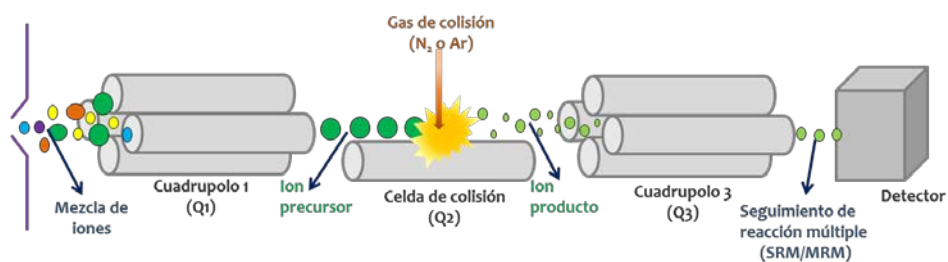


Figura 1.9. Proceso general de tándem MS.

La fragmentación de los iones en tándem MS se lleva a cabo en la celda de colisión. A los iones que alcanzan esta etapa se les suministra energía por colisión con átomos o moléculas neutras, por absorción de radiación o por transferencia o captura de electrones. El método más habitual, denominado disociación inducida por colisión (*CID*, *Collision Inducted Dissociation*) o disociación activada por colisión (*CAD*, *Collision Activated Dissociation*) conlleva la colisión del ion con un átomo o molécula neutra en fase gaseosa, lo que provoca la ruptura del ion. Habitualmente se utilizan como gases de colisión helio, argón, xenón o nitrógeno.

En cuanto a la instrumentación en espectrometría de masas en tándem pueden distinguirse dos grandes grupos de equipos:

- Los equipos en los que se realizan las diferentes etapas con elementos individuales: el primer analizador, la celda de colisión y el segundo analizador son dispositivos instrumentales separados en el espacio.
- Los equipos en los que se realizan las diferentes etapas en un único dispositivo: el primer analizador, la celda de colisión y el segundo analizador son un único sistema que separa las etapas en el tiempo.

Así, en tándem MS en el espacio los diferentes elementos individuales (conectados a alto vacío) pueden ser sectores magnéticos, cuadrupolos, o tiempos de vuelo. Sin embargo, en tándem MS en el tiempo, se requiere que los iones permanezcan atrapados en una única región del espacio lo que conlleva la utilización de una trampa iónica, orbitrap o un equipo de resonancia ciclotrónica de iones (ICR-MS).

El equipo de masas en el espacio más habitual y sencillo es el triple cuadrupolo (QqQ). Permite realizar cualquiera de las modalidades existentes, todas ellas limitadas a una única etapa de fragmentación (MS^2). Se utiliza, principalmente, en la modalidad SRM (*Selected Reaction Monitoring*) donde presenta muy alta sensibilidad. Sin embargo, para asegurar la confirmación de los analitos es necesario, habitualmente, seguir al menos dos transiciones diferentes. Recientemente se ha evaluado la capacidad de un QqQ con cuadrupolos hiperbólicos¹⁴⁷. Este equipo permite trabajar con la alta sensibilidad habitual del QqQ mejorando, además, los parámetros de resolución (Q_1 : 0.1 u; Q_2 : 0.7 u) y exactitud (≈ 3 ppm).

Otra configuración del sistema QqQ es aquella en la que el último cuadrupolo del sistema QqQ es sustituido por un analizador de masas de alta resolución como, por ejemplo, un tiempo de vuelo (QTOF). Se consigue así alta resolución y exactitud, aunque se reducen la sensibilidad y el intervalo de linealidad. Al igual que el QqQ, permite realizar cualquiera de las modalidades existentes, todas ellas limitadas a una única etapa de fragmentación.

El equipo de masas en el tiempo más habitual es la trampa iónica (IT). Sólo permite realizar barridos de iones producto y seguimientos de reacción múltiple, eso sí, con tantas etapas de fragmentación como se desee (MS^n).

Finalmente, se han desarrollado equipos híbridos que permiten realizar análisis de MS en tándem tanto en el espacio como en el tiempo. El más conocido es el qTRAP, de Applied Biosystems, que está basado en la sustitución del tercer cuadrupolo por una trampa de iones lineal (QqLIT).

¹⁴⁷ O. Nuñez, H. Gallart-Ayala, I. Ferrer, E. Moyano, M.T. Galcerán; *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 164

La tabla 1.3 muestra los espectrómetros de masas en tándem más habituales y sus principales características.

Tabla 1.3. Espectrómetros de masas en tándem más frecuentemente utilizados para el análisis de moléculas orgánicas a nivel de trazas.

Analizador de masas	Modalidad habitual	Aplicaciones principales	Características
Triple cuadrupolo QqQ	Seguimiento de reacción múltiple (SRM/MRM)	Cuantificación múltiple de analitos prefijados	- Alta selectividad - Muy alta sensibilidad - Resolución: 1 u - Baja sensibilidad en barrido completo
Qq-TOF	Barrido de iones producto	Análisis de analitos no prefijados (<i>screening</i>) Confirmación por espectro total de MS/MS	- Alta resolución: 10-15000 - Alta precisión: 1-10 ppm - Barrido ultrarrápido - Baja sensibilidad en barrido completo
Trampa iónica IT (2D o 3D)	Barrido de iones producto	Cuantificación múltiple de analitos prefijados Confirmación por espectro total de MS/MS	- Alta sensibilidad en barrido completo - Información estructural adicional por MS ⁿ
qTRAP® (QqQ o QqIT)	MRM o Barrido de iones producto	Cuantificación múltiple de analitos prefijados Confirmación por espectro total de MS/MS	- Aúna las características positivas del QqQ y la IT: muy alta sensibilidad y alto poder de confirmación

La selección del equipo de MS/MS depende de los objetivos del análisis, presentando cada uno sus ventajas y limitaciones. QqQ presenta una elevada selectividad y sensibilidad en modo SRM, sin embargo, la sensibilidad es muy baja en modo scan completo. La sensibilidad de IT es moderada, tanto en SRM como en scan completo, permitiendo además realizar múltiples etapas de MS (MSⁿ), aunque su capacidad de almacenamiento de iones es limitada. El equipo híbrido QqLIT aúna las principales ventajas de QqQ e IT. Por su parte, QqTOF, orbitrap e ICR

permiten la obtención de masas exactas y, por lo tanto, de fórmulas moleculares. Como principal desventaja se puede decir que QqTOF solo permite una etapa de MS/MS (MS^2) y es menos sensible que QqQ en modo SRM. Los analizadores orbitrap e ICR sí permiten realizar MS^n y presentan elevada sensibilidad, pero sus bajas velocidades de adquisición los hacen parcialmente incompatibles con técnicas de cromatografía rápida (UHPLC).

1.2.2.1.4. Adquisición de los datos en MS/MS

La adquisición de datos en MS/MS ofrece gran versatilidad, existiendo diferentes modos de adquisición cuyas características los hacen idóneos para diferentes objetivos concretos. Las diferentes modalidades que se pueden aplicar son¹⁴⁸:

- *Barrido de iones producto (product ion scan)*

El primer analizador permanece constante permitiendo el paso de un único ion precursor, con determinada relación m/z, mientras que, tras la fragmentación en la celda de colisión, el segundo analizador registra todos los iones producto. Esta configuración se utiliza habitualmente para identificar las múltiples transiciones que puede presentar un analito (análisis de confirmación), además de servir para identificar las transiciones posteriormente utilizadas para cuantificar en el modo de seguimiento de reacción múltiple.

- *Barrido de iones precursores (precursor ion scan)*

En este caso, el primer analizador hace un barrido de todos los iones precursores en un intervalo de relaciones m/z, mientras que ahora es el segundo analizador el que permanece constante seleccionando un solo ion producto.

¹⁴⁸ L. Sleno, D.A. Volmer; *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1091

- Barrido de pérdida de moléculas neutras (neutral loss scan)

Tanto el primer analizador como el segundo realizan un barrido de todas las masas, pero en este caso sólo se registran las señales que corresponden a pérdidas de masa predeterminadas entre el primer y el segundo analizador. Esta modalidad se utiliza para la identificación selectiva de compuestos estructuralmente relacionados.

- Seguimiento de reacción múltiple (MRM, Multiple reaction Monitoring o SRM, Selected Reaction Monitoring)

Ambos términos, MRM y SRM, se emplean para denominar la misma modalidad de trabajo. En este caso, tanto el primer como el segundo analizador seleccionan un predeterminado par de iones precursor y producto. De esta forma se consigue un análisis muy selectivo que permite incrementar la sensibilidad. Esta modalidad es análoga al seguimiento de ion seleccionado (SIM) en la espectrometría de masas simple.

Aunque en bibliografía se pueden encontrar los dos términos, MRM y SRM, la IUPAC recomienda utilizar SRM para la medida de un ion producto procedente de un ion precursor. En la práctica, el término MRM se emplea cuando se mide más de una transición (ion precursor → ion producto) en un único análisis cromatográfico.

1.2.2.2. Electroforesis capilar (CE)

En el análisis de alimentos, la electroforesis capilar (CE, *Capillary Eletrophoresis*) es una alternativa viable a técnicas de separación más tradicionales como LC o GC. Además, el acoplamiento CE-MS presenta características muy atractivas al combinar el alto poder de separación de CE con la selectividad y el poder de identificación de MS. La aplicación de

CE para el análisis de alimentos ha sido ampliamente revisada^{149,150}; cabe señalar que esta técnica también se ha utilizado en el análisis de compuestos bioactivos^{151,152,153}.

La electroforesis fue introducida como técnica de separación por Tiselius en el año 1937. El hecho puntual que marca el inicio de las técnicas electroforéticas capilares es el trabajo publicado en 1981 por Jorgenson y LuKacs¹⁵⁴. Desde este primer trabajo, la electroforesis capilar ha evolucionado pasando de ser un método de baja resolución y aplicación relativamente limitada, a presentar una extensa variedad de modalidades de incomparable poder de resolución y excepcional versatilidad.

La instrumentación básica para realizar separaciones electroforéticas es relativamente sencilla y consta de cinco elementos fundamentales: una fuente de alto voltaje, un capilar de sílice fundida donde tiene lugar la separación, viales que contengan el electrolito tampón, dos electrodos inertes y un detector. Un montaje artesanal de este tipo permitiría buenas separaciones. Sin embargo, la precisión sería bastante deficiente debido a la falta de control de la temperatura y a la escasa automatización del sistema. Actualmente los sistemas comerciales solventan todos estos problemas y dotan a esta técnica de una gran precisión analítica.

La separación mediante electroforesis capilar tiene lugar en columnas capilares de pequeño diámetro interno (10 - 200 μm) construidas con materiales química y eléctricamente inertes, transparentes a la luz UV-visible, flexibles y robustos. Los capilares más utilizados son los de sílice fundida.

Los dos parámetros clave en los que se fundamenta la separación electroforética son: la velocidad electroforética de un analito considerado y

¹⁴⁹ V. García-Cañas, A. Cifuentes; *Electrophoresis* 29 (2008) 294

¹⁵⁰ M.C. Boyce, *Electrophoresis* 28 (2007) 4046.

¹⁵¹ M. Bustamante-Rangel, M.M. Delgado-Zamarreño, R. Carabias-Martínez, J. Domínguez-Álvarez; *Anal. Chim. Acta* 709 (2012) 113

¹⁵² F. Kvasnicka; *Electrophoresis* 28 (2007) 3581

¹⁵³ L. Suntornsuk; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 679

¹⁵⁴ J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs; *Anal. Chem.* 53 (1981) 1302

la velocidad electroosmótica de la disolución de electrolito que rellena el capilar.

- Velocidad electroforética

La velocidad electroforética se define como el movimiento que experimentan las especies cargadas en presencia de un campo eléctrico. Al actuar un campo eléctrico sobre una partícula cargada, ésta experimenta una fuerza de tipo eléctrico que la comienza a mover y una fuerza en sentido contrario, debido al rozamiento de ésta entre las láminas del fluido, que viene determinada por la Ley de Stockes.

Prácticamente desde el comienzo del análisis se puede considerar que se consigue un estado estacionario y por lo tanto la partícula se mueve a una velocidad electroforética constante.

Las especies pequeñas y de mayor carga tendrán mayor movilidad electroforética que las de menor carga y mayor tamaño.

- Velocidad electroosmótica

La electroósmosis es un importante fenómeno en la electroforesis capilar, y hace referencia al desplazamiento del disolvente en un capilar cuando se aplica un campo eléctrico en sus extremos. Este hecho se produce debido a la doble capa eléctrica que se genera en la superficie cargada de la pared del capilar y se pone de manifiesto porque el líquido en su conjunto se mueve en dirección catódica.

La superficie del capilar se carga negativamente a valores de pH superiores a 3 y provoca la formación de una doble capa eléctrica. Los aniones son repelidos mientras que los cationes más próximos se adsorben sobre la pared del capilar formando una capa, capa de Stern, estrecha e inmóvil incluso bajo la influencia de un campo eléctrico (ζ , es el potencial generado en la interfase sólido – líquido). A continuación, existe una capa difusa y móvil con carácter sustancialmente catiónico conocida como la *capa de Gouy-Chapman*. A mayor distancia de la pared, la solución es eléctricamente neutra y no se manifiesta el potencial ζ .

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos, las cargas positivas de la capa difusa migran hacia el cátodo y, como estos iones están solvatados, arrastran al grueso de la disolución. De esta forma, la dirección y la velocidad del flujo electroosmótico depende de la polaridad y magnitud del potencial ζ en la pared del capilar.

El flujo electroosmótico se origina en la zona difusa de la doble capa y aunque ésta sea muy estrecha, se transmite a través del diámetro del capilar, presumiblemente por enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua o interacciones de Van der Waals de los constituyentes del tampón, generando un perfil de flujo plano. Este perfil plano presenta grandes ventajas frente al perfil parabólico propio del flujo a presión, ya que se minimizan las variaciones de la velocidad de flujo en la sección del capilar. Esto se traduce en una reducción de la dispersión axial de los analitos separados consiguiéndose una alta eficacia de pico, frecuentemente superior a 10^5 platos teóricos.

La existencia simultánea en el interior del capilar del flujo electroosmótico y de la migración electroforética hace que la velocidad de desplazamiento a lo largo del capilar de las especies (cationes, aniones y moléculas neutras) sea la resultante de la suma vectorial de sus distintas movilidades electroforéticas con la movilidad electroosmótica (Figura 1.10).

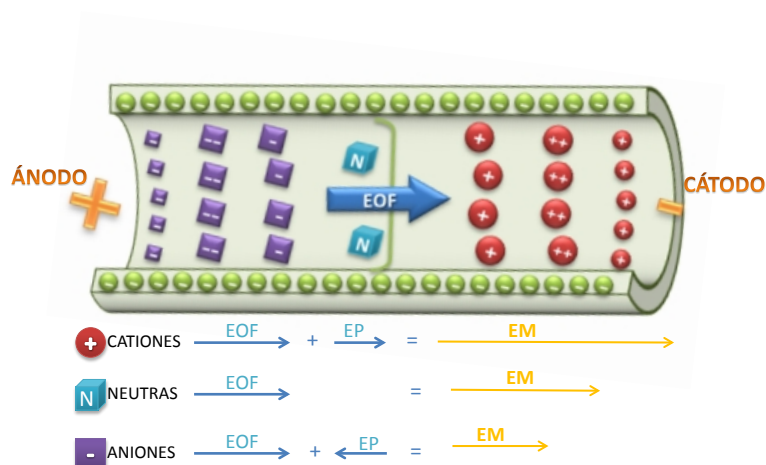


Figura 1.10. Movilidad de los iones dentro del capilar en presencia de flujo electroosmótico.

1.2.2.2.1. *Modalidades de electroforesis capilar. Electroforesis capilar zonal*

Existen diferentes modalidades de electroforesis capilar en función de cómo se produzca la separación de los analitos. Se suelen dar diferentes clasificaciones según se empleen medios de electrolitos continuos o discontinuos, o la separación se produzca de forma cinética o se alcance un estado estacionario, o bien que en la separación intervenga o no un reparto cromatográfico. Se consideran generalmente seis modalidades de electroforesis:

- Modalidades estrictamente electroforéticas
 - Electroforesis capilar zonal (CZE)
 - Electroforesis capilar en gel (CGE)
 - Enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)
 - Isotacoforesis capilar (CITP)

- Modalidades en las que existe un reparto entre fases
 - Cromatografía electrocinética capilar (EKC), o micelar (MEKC)
 - Electrocromatografía capilar (CEC)

A continuación se describe brevemente el fundamento de la modalidad de Electroforesis capilar zonal, que es la utilizada en este trabajo.

La electroforesis capilar zonal es el modo más sencillo de electroforesis capilar desde un punto de vista instrumental. Las separaciones son llevadas a cabo en un electrolito soporte homogéneo que puede contener ciertos aditivos para mejorar la separación. Como se ha indicado anteriormente, pueden coexistir flujos electroósmotico y electroforético o bien solamente electroforético. Al aplicar el voltaje, las sustancias con carga se separarán en el interior del capilar en función de su movilidad electroforética, que está relacionada directamente con su relación carga/radio.

Los componentes iónicos se separan en bandas discretas cuando la movilidad individual de cada soluto es suficientemente diferente a la de todos los demás. De esta forma se consiguen separaciones tanto de iones inorgánicos como orgánicos (moléculas de síntesis farmacéutica, plaguicidas, péptidos, etc.).

Esta forma de separación es la más utilizada en la resolución de mezclas que contienen isoflavonas, analitos objeto de estudio de este trabajo.

1.2.2.2. *Acoplamiento de electroforesis capilar con espectrometría de masas con ionización por electrospray*

El acoplamiento instrumental de electroforesis capilar con espectrometría de masas presenta un notable interés, ya que aúna las características de dos técnicas analíticas sumamente potentes¹⁵⁵. Por un lado, la electroforesis capilar (CE), que presenta una elevada eficacia como técnica de separación, pero cuya sensibilidad con detectores espectrofotométricos está limitada por el pequeño paso óptico condicionado al diámetro interno del capilar de separación. Por otro lado, la espectrometría de masas (MS), técnica de detección de gran selectividad y sensibilidad, con tiempos de respuesta rápidos, cuya capacidad para alcanzar bajos límites de detección a la vez que proporcionar información estructural sobre los analitos ha sido ampliamente demostrada en su utilización como detector en cromatografía líquida¹³⁰.

En comparación con el acoplamiento entre espectrometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS), el acoplamiento con electroforesis capilar (CE-MS) presenta una serie de características propias, ya que la interfaz entre ambas técnicas debe ser compatible con las características eléctricas de la separación electroforética. Por ello, esta interfaz ha sido objeto de múltiples investigaciones.

La primera descripción del acoplamiento CE-MS propuesta por Smith y cols. en 1987¹⁵⁶ utilizaba una envoltura metálica alrededor del extremo de salida

¹⁵⁵ E. Jane Maxwell, D.D.Y. Chen; *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 25

¹⁵⁶ J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith; *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230

del capilar, que sustituía al electrodo terminal de la configuración CE tradicional y permitía cerrar el circuito eléctrico. Los autores demostraron que con este capilar metalizado se cumplían los requisitos necesarios para generar un electrospray adecuado para la posterior detección por MS.

Este diseño inicial fue modificado rápidamente por estos mismos autores¹⁵⁷ para proponer la utilización de un líquido adicional conductor que permitía el contacto eléctrico, a la vez que incrementaba la compatibilidad en cuanto a la composición del electrolito de fondo utilizado en CE con la generación de un electrospray estable.

En los últimos 25 años se han descrito una amplia variedad de modificaciones en las interfaces con objeto de maximizar la potencialidad del acoplamiento CE-MS. De forma genérica, estos desarrollos se pueden estructurar en dos grupos de interfaces en función de si utilizan o no un líquido adicional.

- *Interfaces de líquido adicional*

Las interfaces de líquido adicional son las únicas disponibles comercialmente. Estas interfaces se basan en la utilización de un flujo de líquido que se mezcla con el flujo electroforético a la salida del capilar. Este flujo adicional tiene varias funciones.

- Establecer contacto eléctrico entre el electrodo y el medio de separación electroforético (BGE, *Background Electrolyte*) que circula dentro del capilar para que se lleve a cabo la separación electroforética.

- Permitir modificar la composición del medio electroforético de separación para hacerlo más compatible con el proceso de ionización por electrospray y, por tanto, con la detección por espectrometría de masas.

- Aportar estabilidad al electrospray, ya que el flujo electroforético no es capaz de mantener por sí mismo un electrospray estable salvo que se trabaje en condiciones extremas que maximicen el flujo electrosmótico.

¹⁵⁷ R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth; *Anal. Chem.* 60 (1988) 436

Las interfaces comerciales actuales emplean un diseño coaxial de tres tubos concéntricos que se muestra de forma detallada en la figura 1.11. El tubo más interno es el capilar de separación que sobresale ligeramente ($\sim 2 \mu\text{m}$) del segundo tubo, a través del cual circula el líquido adicional, también denominado “líquido envolvente”. El tercer y más externo de los tubos aporta el gas necesario para mejorar la nebulización y el proceso de desolvatación, aumentando aún más la estabilidad del electrospray.

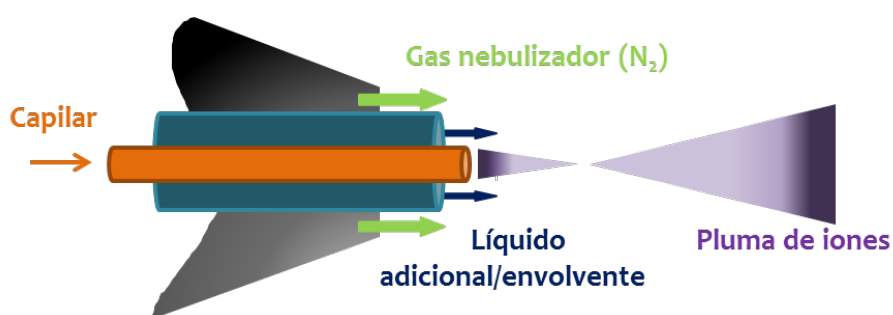


Figura 1.11. Configuración de tubos concéntricos por los que circulan el líquido adicional y el gas de nebulización.

La ventaja de la configuración coaxial es que no existe volumen muerto, por lo que la separación obtenida en el capilar no se ve alterada por flujos adicionales hasta que los analitos han salido de él. Como desventaja, se requieren altos flujos del líquido adicional ($\sim 2 \mu\text{L min}^{-1}$) para trabajar de forma estable en esta configuración, lo que conlleva la dilución de los analitos. Además, el flujo adicional alrededor del capilar puede crear succión, lo que puede conllevar perfiles de flujo parabólico y menores resoluciones.

Con el fin de reducir el efecto de dilución, manteniendo las ventajas de la interfaz con líquido adicional, se han planteado diversas configuraciones alternativas. Una de ellas es la de unión líquida, donde el líquido adicional se añade al flujo electroforético en una unión en forma de T a través de un espacio estrecho ($25\text{-}50 \mu\text{m}$) comprendido entre el capilar y la aguja del

electrospray^{158,159}. Desafortunadamente, el proceso de mezcla ortogonal produce un ensanchamiento de los picos y reduce la eficiencia de la separación^{160,161}.

Más recientemente se han desarrollado interfaces de líquido adicional que utilizan flujos mucho menores (en algunos casos menores de 200 nL·min⁻¹). Una de estas configuraciones, la de unión líquida presurizada, es similar al diseño de la unión líquida original; sin embargo, la unión es ligeramente más ancha (hasta 300 µm) y se localiza en un reservorio presurizado de líquido adicional. La adición de presión ayuda a prevenir la desfocalización del flujo electroforético en el espacio de unión líquida, lo que conlleva una menor pérdida en la resolución. Para evitar que se produzcan contraflujos, debido a la diferencia de presión, el extremo inicial del capilar debe estar presurizado. El líquido del reservorio establece el contacto eléctrico entre el BGE y el electrodo y también mantiene un flujo constante en la punta del electrospray, si el flujo electroforético no es suficiente¹⁶². El flujo adicional en esta “unión presurizada” también introduce un factor de dilución, aunque inferior al que se produce en el caso del diseño coaxial.

A pesar de la dilución inherente a las interfaces con líquido adicional, éstas ofrecen importantes ventajas. Dado que la disolución que sale de la interfaz está principalmente formada por líquido adicional, es posible utilizar electrolitos o aditivos en la separación electroforética que de otra manera serían incompatibles con ESI-MS. Además, la utilización del líquido adicional simplifica la necesidad de crear contacto eléctrico en el extremo del capilar electroforético. Finalmente, las interfaces de líquido adicional son generalmente robustas y se adaptan bien a la comercialización, lo que ha ayudado a que la técnica se haya expandido. El diseño de tipo coaxial sigue siendo el más utilizado, en posición ortogonal al cono muestreador del espectrómetro de masas.

¹⁵⁸ T. Wachs, R.L. Sheppard, J. Henion; *J. Chromatogr. B Biomedical Applications* 685 (1996) 335

¹⁵⁹ M. Jussila, K. Sinervo, S.P. Porras, M.L. Riekkola; *Electrophoresis* 21 (2000) 3311

¹⁶⁰ W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J. Vandergreef; *J. Chromatogr.* 636 (1993) 3

¹⁶¹ S. Pleasance, P. Thibault, J. Kelly; *J. Chromatogr.* 591 (1992) 325

¹⁶² S. Fanali, G. D’Orazio, F. Foret, K. Kleparnik, Z. Aturki; *Electrophoresis* 27 (2006) 4666

• *Interfaces sin líquido adicional*

Aunque la primera interfaz descrita por Olivares y cols. en 1987 para el acoplamiento *CE-ESI-MS* fue de hecho, una interfaz sin líquido adicional¹⁵⁶, este diseño fue rápidamente reemplazado por las interfaces con líquido adicional. Recientemente las interfaces que no utilizan líquido adicional están ganando nuevamente popularidad debido a la búsqueda constante de una mejora en los límites de detección con dispositivos en los que no se produzca dilución de la muestra. Se han propuesto diversas modificaciones instrumentales en este sentido, cuyas mejoras se relacionan con una de estas tres características fundamentales del acoplamiento *CE-MS*: la estrategia para establecer el contacto eléctrico, la forma de la punta del extremo de salida del capilar y la robustez del montaje de los diferentes componentes, como requisito importante para su comercialización.

Como conclusión global sobre el acoplamiento entre *CE* y *ESI-MS* puede decirse que este acoplamiento instrumental ha experimentado un notable desarrollo en las últimas dos décadas, hasta el punto en que se utiliza de forma rutinaria en laboratorios de investigación en Química Analítica. A ello han contribuido las interfaces disponibles comercialmente. Sin embargo, la incorporación de esta técnica en otros campos de investigación es relativamente lenta, debido a varios retos que se presentan con respecto a la utilización de muchos tipos de electrolitos y aditivos, que todavía son incompatibles con el sistema *CE-MS*.

1.2.2.3. Determinación de isoflavonas en alimentos

Habitualmente, la determinación de isoflavonas se lleva a cabo empleando cromatografía líquida o electroforesis capilar; sin embargo, también se han descrito métodos de determinación utilizando cromatografía de gases e incluso inmunoensayo.

1.2.2.3.1. *Cromatografía de gases (CG)*

Debido a su elevada resolución, selectividad y sensibilidad, esta técnica ha sido empleada en el análisis de fitoestrógenos, principalmente en fluidos biológicos¹⁶³. Sin embargo, debido a la baja volatilidad de estos compuestos, el procedimiento requiere una etapa previa de derivatización de la muestra. Esto implica una preparación de la muestra con diferentes etapas de extracción, como pre-concentración, purificación, hidrólisis y formación de un trimetilsilil-éter. Como consecuencia de ello, se pueden generar pérdidas de analitos durante la determinación; para corregir tales pérdidas se suele utilizar un patrón interno.

Adlercreutz y cols.¹⁶⁴ realizan diversos estudios fármaco-cinéticos acerca de los fitoestrógenos utilizando GC-MS y proponen un método basado en la dilución isotópica (ID-GC-MS) para la cuantificación de dichos compuestos. En un principio la técnica se desarrolló para muestras de fluidos biológicos, pero se ha utilizado también en muestras de alimentos^{24,165}.

Liggins y cols.¹⁶⁶ evalúan el contenido de daidzeína y genisteína en 80 muestras de alimentos, incluyendo frutos secos y frutas. Antes de la determinación, los autores llevan a cabo una hidrólisis enzimática de las muestras, seguida de una extracción con acetato de etilo y la etapa de derivatización. La separación y cuantificación se lleva a cabo empleando GC-

¹⁶³ Q. Wu, M. Wang, J.E. Simon; *J. Chromatogr. B* 812 (2004) 325

¹⁶⁴ H. Adlercreutz, T. Fotsis, C. Bannwart, K. Wähälä, T. Makela, G. Brunow, T. Hase; *J. Steroid Biochem.* 25 (1986) 791

¹⁶⁵ W. Mazur, T. Fostis, K. Wähälä, S. Ojala, A. Salakka, H. Adlercreutz; *Anal. Biochem.* 233 (1996) 169

¹⁶⁶ J. Liggins, L.J.C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W.A. Coward, S.A. Bingham; *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 326

MS. Solamente en 37 de las muestras analizadas encontraron cantidades detectables de agliconas, ya que los límites de cuantificación de la metodología empleada estaban alrededor de 1 µg / Kg.

Kuo y Ding¹⁶⁷ analizan daidzeína y genisteína, junto con Bisfenol A, en fórmulas lácteas infantiles, utilizando GC-MS después de su derivatización como trimetilsilil ésteres. Como tratamiento de muestra para el aislamiento y preconcentración de analitos utilizan una etapa de ultracentrifugación seguida de SPE con una columna C-18 para eliminar los interferentes de la matriz.

Otros autores¹⁶⁸ proponen la utilización de cartuchos Oasis HLB para simplificar la etapa de purificación de la muestra previa a la derivatización. Antes de llevar a cabo esta limpieza realizan hidrólisis enzimática y ácida de las muestras. Aplican el método desarrollado a la determinación de fitoestrógenos en plantas medicinales.

Más recientemente, Ferrer y cols.¹⁶⁹ realizan estudios de la fragmentación de diferentes fitoestrógenos utilizando GC acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (GC-MS/MS). El método desarrollado consiste en una extracción líquido-líquido con acetato de etilo previa a la derivatización. Utilizando esta metodología identifican fitoestrógenos en leche de soja y en el efluente de una planta procesadora de leche de soja.

1.2.2.3.2. Cromatografía líquida (HPLC)

A pesar de las ventajas que presenta la cromatografía de gases (resolución, selectividad y sensibilidad), la cromatografía líquida es la técnica más empleada en la determinación de compuestos bioactivos en alimentos. En comparación con la GC, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ofrece la ventaja de operar a temperaturas de columna más bajas y sin necesidad de derivatizar los analitos; además la preparación de la muestra es mucho más simple. Generalmente, la separación mediante LC se lleva a cabo

¹⁶⁷ H. Kuo, W. Ding; *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 67

¹⁶⁸ S.H. Lee, B.H. Jung, S.Y. Kim, B.C. Chung; *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 452

¹⁶⁹ I. Ferrer, L.B. Barber, E.M. Thurman; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6024

en fase inversa, utilizando como fase móvil mezclas de metanol o acetonitrilo con agua en presencia de modificadores ácidos, tales como fórmico o acético. Esto permite aumentar la separación y la resolución y mejora la forma de los picos cromatográficos, aunque en muchos casos es necesario trabajar en régimen de gradiente^{163, 170}.

La forma más sencilla de llevar a cabo la detección de este tipo de analitos es utilizando un detector de barrera de diodos, puesto que todas las estructuras de las isoflavonas contienen al menos un anillo aromático. Empleando este tipo de detección algunos autores han llevado a cabo la determinación total de agliconas en muestras de trébol rojo¹⁷¹, de agliconas, glucósidos y sus acetyl y malonil derivados en leche de soja¹⁷², etc. La principal limitación de esta técnica es que no es suficientemente sensible cuando el nivel de isoflavonas en las muestras es bajo¹⁷³. Este tipo de detección, considerada clásica, está incorporada en la actualidad a la mayoría de los sistemas LC-MS como detección previa a la espectrometría de masas. En revisiones bibliográficas llevadas a cabo por distintos autores^{163,170,173} se pueden encontrar diferentes aplicaciones en la utilización del detector de barrera de diodos en la determinación de isoflavonas en muestras biológicas y de alimentos.

Aunque en menor número, también se han desarrollado metodologías analíticas que utilizan detección electroquímica tras la separación cromatográfica, tanto en su versión amperométrica como coulombimétrica, para la determinación de isoflavonas^{174,175,176}. Su ventaja frente a la detección espectrofotométrica es que presenta una mayor sensibilidad y selectividad. Cabe señalar los trabajos de Peñalvo y cols.¹⁷⁷ y de Schwartz y Sontag¹⁷⁸;

¹⁷⁰ E. Rijke, P. Out, W.M.A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman; *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 31

¹⁷¹ Q. Wu, M. Wang, J.E. Simon; *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 195

¹⁷² N. Toro-Funes, I. Odriozola-Serrano, J. Bosch-Fusté, M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogués, M. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou; *Food Chem.* 135 (2012) 2832

¹⁷³ A.P. Wilkinson, K. Wähälä, G. Williamson; *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 93

¹⁷⁴ T. Nurmi, W. Mazur, S. Heinonen, J. Kokkonen, H. Aldercreutz; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1

¹⁷⁵ T. Kraushofer, G. Sontag; *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 61

¹⁷⁶ L. Zubik, M. Meydani; *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 1459

¹⁷⁷ L. Peñalvo, T. Nurmi, H. Aldercreutz; *Food Chem.* 87 (2004) 297

que utilizan detección coulombimétrica con una red de electrodos aplicando diferentes potenciales, en el margen de 200 a 800 mV, dependiendo de los analitos a detectar. Las muestras analizadas fueron soja y suplementos de soja y trébol rojo, respectivamente, cuyos contenidos en isoflavonas son relativamente altos. En ambos casos estudian diferentes tipos de tratamiento de muestra.

Es bien sabido que la detección mediante fluorescencia da lugar a una mayor sensibilidad y selectividad que la detección espectrofotométrica, con relaciones señal - ruido 150 veces mejores que dicha técnica. Este tipo de detección fue utilizada por Richelle¹⁷⁹ para analizar isoflavonas en fluidos biológicos empleando una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 310 nm.

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas ha contribuido de forma excepcional en la determinación de fitoestrógenos en matrices complejas. El acoplamiento LC-ESI-MS presenta una gran sensibilidad y estabilidad en la ionización, especialmente para compuestos polares como los fitoestrógenos. Debido a ello, ha sido una de las técnicas más utilizadas en la determinación de este tipo de compuestos.

De este modo se han determinado isoflavonas en distintas especies de trébol rojo, aplicando cromatografía líquida acoplada con detección UV y espectrometría de masas (HPLC-UV-ESI-MS)¹⁷¹. Rijke y cols.¹⁸⁰ han utilizado cromatografía líquida con detección UV, fluorescente y espectrometría de masas para la determinación de flavonoides en hojas de diferentes especies de la familia de las leguminosas. Emplearon la detección fluorescente para identificar las isoflavonas, en base a su fluorescencia nativa, y los otros dos tipos de detección para la cuantificación.

La ionización utilizando APCI también ha sido aplicada al análisis de isoflavonas. Así, Chen y cols.¹⁸¹ han llevado a cabo la determinación

¹⁷⁸ H. Schwartz, G. Sontag; *Monatsch. Chem.* 139 (2008) 865

¹⁷⁹ M. Richelle, S. Pridmore-Merten, S. Bodenstab, M. Enslin, E.A. Offord; *J. Nutr.* 132 (2002) 2587

¹⁸⁰ E. Rijke, H. Zappey, F. Ariese; *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 995

¹⁸¹ L.J. Chen, X. Zhao, S. Plummer, J. Tang, D.E. Games; *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 60

cuantitativa y la caracterización estructural de isoflavonas en suplementos nutricionales utilizando LC-APCI-MS.

Otros autores han empleado también la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem, empleando detectores tanto de triple cuadrupolo^{182,183} como de tiempo de vuelo¹⁸⁴.

Konar y cols.¹⁸⁵ determinan isoflavonas libres y conjugadas en legumbres, utilizando cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas con triple cuadrupolo, en modo positivo o negativo en función de los tipos de isoflavona. El tratamiento de muestra es relativamente sencillo, extracción de analitos mediante metanol en medio ácido. En su estudio concluyen que los garbanzos son la fuente más importante de isoflavonas, con contenidos más altos que lentejas y alubias. Los mismos autores¹⁸⁶ estudian el efecto de diferentes tratamientos de muestra sobre la determinación de isoflavonas, lignanos y coumestanos utilizando esta metodología, LC-MS/MS. El detector de espectrometría de masas fue un triple cuadrupolo, la polaridad elegida para la ionización fue positiva (en el caso de glucósidos) o negativa (en el caso de agliconas). Los alimentos vegetales estudiados - alubias verdes, zanahorias, coliflor y alcachofa - presentaban unos contenidos en isoflavonas y coumestanos muy bajos.

1.2.2.3.3. Electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar se ha utilizado en menor medida que la cromatografía líquida, aunque esta técnica posee una elevada capacidad de separación y resolución, no requiere una cantidad de muestra elevada y disminuye el tiempo de análisis.

¹⁸² M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, A. Mangia; *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 274

¹⁸³ P. Vila-Donat, G. Caprioli, F. Maggi, M. Ricciutelli, E. Torregiani, S. Vittori, G. Sagratini; *Food Chem.* 174 (2015) 487

¹⁸⁴ M.J. Lee, J.M. Chung, H. Kim, M.Y. Jung; *Food Chem.* 176 (2015) 254

¹⁸⁵ M. Konar, E.S. Poyrazoglu, K. Demir, N. Artic; *J. Food Compos. Anal.* 25 (2012) 173

¹⁸⁶ M. Konar, E. S. Poyrazoglu, K. Demir, N. Artic; *J. Food Compos. Anal.* 26 (2012) 26

En el análisis de isoflavonas se observan varias de las modalidades que presenta esta técnica. Así, utilizando electroforesis capilar en su modalidad zonal con detección espectrofotométrica (CZE-DAD) Aussenac y cols.¹⁸⁷ determinaron isoflavonas en soja, y Fang y cols.¹⁸⁸ en kudzu. Otros autores^{189,190} han empleado detección electroquímica acoplada a la separación electroforética (CE-ED) para la determinación de isoflavonas en alimentos.

La modalidad de MEKC, que emplea una pseudo-fase estacionaria generada dentro del capilar por la adición de micelas, también ha sido utilizada para la determinación de isoflavonas^{191,192}. Esta técnica es especialmente útil para la separación de especies neutras.

Destaca la escasa utilización del acoplamiento CE-MS, a pesar de las elevadas posibilidades que presentaría en el análisis de isoflavonas en cualquier tipo de matriz¹⁵¹.

1.2.2.3.4. Otras técnicas de determinación

Las técnicas de inmunoensayo también se han utilizado en el análisis de compuestos bioactivos, principalmente en matrices biológicas, debido a las ventajas que presenta en cuanto a sensibilidad y especificidad, además de un coste relativamente bajo. Los tipos de inmunoensayo más utilizados en el análisis de fitoestrógenos incluyen el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Esta técnica ha sido empleada por Bennetau-Pelissero y cols.¹⁹³ para determinar daidzeína y genisteína en alimentos y fluidos biológicos. Estos autores sintetizaron haptenos a partir de algunas isoflavonas, capaces de unirse a la albúmina de

¹⁸⁷ T. Aussenac, S. Lacombe, J. Dayde; *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 1480S

¹⁸⁸ C. Fang, X. Wan, H. Tan, C. Jiang; *Ann. Chim.* 96 (2006) 117

¹⁸⁹ Y.Y. Peng, J.N. Ye; *Fitoterapia* 77 (2006) 171

¹⁹⁰ Y. Peng, Q. Chu, F. Liu, J. Ye; *Food Chem.* 87 (2004) 135

¹⁹¹ G.A. Micke, N.M. Fujiya, F.G. Tonin, A.C.O. Costa, M.F.M. Tavares; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1625

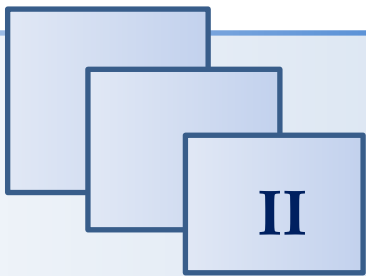
¹⁹² Y. Zhang, J. Chen, L. Zhao, Y.P. Sh; *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 987

¹⁹³ C. Bennetau-Pelissero, B. Arnal-Schnebelen, V. Lamothe, P. Sauvant, J.L. Sagne, M.A. Verbruggen, J. Mathey, O. Lavialle; *Food Chem.* 82 (2003) 645

suero bovino (BSA) y a la tiroglobulina porcina (Thyr). Los ensayos ELISA se basaban en la competencia entre las isoflavonas libres y las conjugadas con Thyr-hapteno de anticuerpos específicos.

En los últimos años se ha desarrollado el TR-FIA, que se fundamenta en la formación de quelatos con marcadores fluorescentes; para ello se suelen utilizar elementos del grupo de los lantánidos. En particular, L'homme¹⁹⁴, estudió los metabolitos de daidzeína en plasma y orina utilizando Eu.

¹⁹⁴ R. L'homme, E. Brouwers, N. Al-Maharik, O. Lapcik, R. Hampl, H. Mikol, K. Wähälä, H. Aldercreutz; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81 (2002) 353



OBJETO

En los últimos años está aumentando el interés por conocer, además de las propiedades nutricionales, las propiedades bioactivas de los alimentos. Se entiende como compuesto bioactivo aquel que está presente de forma natural en el alimento y que puede producir algún tipo de efecto beneficioso para la salud. Entre los compuestos bioactivos se encuentran especies tales como los fitoestrógenos, entre los que destacan isoflavonas como la daidzina o la genistina, lignanos como el secoisolariciresinol o coumestanos como el coumestrol.

El objetivo general de la investigación es desarrollar metodologías analíticas que posibiliten el análisis de isoflavonas en alimentos de amplio consumo.

Las legumbres son alimentos con un alto contenido en proteínas, carbohidratos, fibra y otros micronutrientes como pueden ser las vitaminas; también presentan una amplia variedad de fitoestrógenos. La soja presenta altos contenidos de estas sustancias y ha sido un alimento muy estudiado desde el punto de vista de sus propiedades bioactivas. El consumo de soja es poco habitual en España, al contrario que el de otras legumbres como lentejas, garbanzos y alubias, por lo que se consideró interesante tener constancia de la presencia de estos compuestos bioactivos en este tipo de alimentos.

Las metodologías analíticas se fundamentan en una etapa de tratamiento de muestra, crítica en el desarrollo de métodos de análisis de alimentos, y otra etapa en la que se lleva a cabo la separación, identificación y cuantificación de los analitos. Uno de los problemas fundamentales en este tipo de determinaciones es la complejidad de las matrices y la necesidad del aislamiento de los analitos para su posterior determinación. Además, los compuestos bioactivos analizados se encuentran en cantidades muy pequeñas en las muestras estudiadas.

Los métodos clásicos de preparación de muestra en el caso del análisis de alimentos son laboriosos, requieren de una gran cantidad de disolventes orgánicos y suelen aportar grandes errores en la determinación. En este sentido, es importante disponer de métodos que reduzcan el consumo de disolventes orgánicos y la manipulación de la muestra, permitiendo la eliminación de etapas de limpieza y llevar a cabo una preconcentración de

los analitos con el fin de aumentar la eficacia en la extracción. Otro factor importante es que dicha etapa sea fácilmente automatizable.

Por ello, uno de los objetivos concretos del presente trabajo es desarrollar etapas de tratamiento de muestra que cumplan estos requisitos y, además, sean compatibles con cromatografía líquida o electroforesis capilar como métodos de separación y medida. Por otra parte, las isoflavonas pueden encontrarse en las plantas en forma libre o como derivados glucosilados, siendo distinta su biodisponibilidad. Por tanto, otro factor interesante a considerar es utilizar tratamientos de muestra que permitan aislar a los analitos en la forma en la que están presentes, de forma natural, en las muestras.

Los métodos de extracción utilizados para lograr este objetivo fueron extracción mediante líquidos presurizados (PLE) y extracción utilizando la metodología QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe).

La mayoría de las aplicaciones de la extracción mediante líquidos presurizados se han centrado en la determinación de contaminantes en muestras ambientales, siendo su aplicación en alimentos más escasa. Por su parte, la metodología QuEChERS es una metodología principalmente enfocada a la extracción de residuos de pesticidas de frutas y vegetales. Prácticamente no existen referencias bibliográficas acerca de la utilización de dicha metodología para extraer sustancias naturalmente presentes en las muestras.

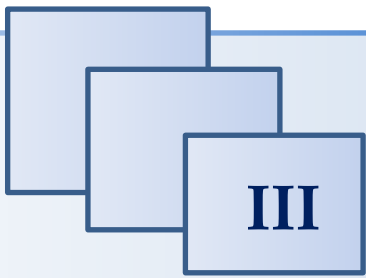
En la presente Memoria se recoge la puesta a punto de tratamientos de muestra basados en la extracción con líquidos presurizados y una versión modificada del método QuEChERS, adaptada a muestras de legumbres, para la extracción de compuestos naturalmente presentes en dichas matrices. En el caso de la metodología QuEChERS se ha llevado a cabo además un estudio referente a la problemática de la puesta en contacto de muestra y disolvente durante la extracción, puesto que este punto ha sido considerado clave a la hora de mejorar la eficacia en dicha extracción.

La cromatografía líquida en fase inversa ha sido la técnica más ampliamente utilizada para determinar compuestos bioactivos en cualquier tipo de muestra; sin embargo, la electroforesis capilar ha sido escasamente utilizada

en el análisis de fitoestrógenos. En este trabajo el objetivo fue utilizar tanto cromatografía líquida como electroforesis capilar para la separación de los analitos una vez aplicados los tratamientos de muestra desarrollados.

La detección se ha llevado a cabo utilizando espectrometría de masas; el acoplamiento de ambas técnicas de separación a la detección se ha realizado mediante una conexión ESI-MS. Es bien conocido que la espectrometría de masas mejora la selectividad y sensibilidad que aporta la detección espectrofotométrica. En el caso de cromatografía líquida el detector empleado es de espectrometría de masas en tándem, en su versión de triple cuadrupolo.

En última instancia y aplicando las metodologías desarrolladas a muestras de garbanzos lentejas y alubias, se estudia la posibilidad de clasificar los diferentes tipos de legumbres en función de su variedad, según los perfiles de las isoflavonas presentes. Por último, teniendo en cuenta que las distintas técnicas de procesado a las que pueden ser sometidos los alimentos antes de su ingesta pueden variar el contenido en las distintas isoflavonas, se estudia dicha variación al someter las legumbres a distintos tratamientos, similares a los habitualmente empleados.



EXPERIMENTAL

3.1. PATRONES, DISOLVENTES Y REACTIVOS

3.1.1. Patrones: Isoflavonas y flavonoides

- *Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)*

Daidzina (DIN) CAS RN [552-66-9]
Glicitina (GLIN) CAS RN [40246-10-4]
Genistina (GIN) CAS RN [529-59-9]
Daidzeína (DEN) CAS RN [486-66-8]
Gliciteína (GLEN) CAS RN [40957-83-3]
Genisteína (GEN) CAS RN [446-72-0]
Formononetina (FOR) CAS RN [485-72-3]
Biochanina-A (BIO) CAS RN [491-80-5]
Apigenina (API) CAS RN [520-36-5]
6-Metoxiflavona (6MT) CAS RN [26964-24-9]
2,2,5,7,8-Pentametil-6-cromanol (PMC)
CAS RN [950-99-2]

- *Extrasynthese (Genacy Cedex, Francia)*

3',4'-Dimetoxiflavona (3,4 DMF) CAS RN [4143-62-8]
4,4'-Dimetoxichalcona (DMCH) CAS RN [2373-89-9]
7,8-Dimetoxiflavona (7,8 DMF) CAS RN [66548-54-1]

3.1.2. Disolventes y reactivos

3.1.2.1. *Preparación de fases móviles*

- Agua ultrapura, UHQ (18.2 M Ω ·cm a 25 °C, COT < 10 ppb) obtenida mediante un sistema de purificación Wasserlab Ultramatic (Noain, España)

- Metanol (MeOH), grado HPLC, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania)
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania)
- Ácido fórmico puro (>98%) suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania)
- Ácido acético glacial (99.8%), grado HPLC, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Acetato amónico (>98%), grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Isopropanol (99.8%), grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)

3.1.2.2. Otros disolventes y reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) para análisis, suministrado por Panreac (Barcelona, España)
- Amoníaco concentrado (25%), grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Ácido clorhídrico concentrado (37%) para análisis, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Etanol (EtOH), grado HPLC, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania)
- Tierra de diatomeas *Chem Tube Hydromatrix* de Varian, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Arena de playa lavada suministrada por Scharlau (Barcelona, España)

- Sulfato sódico anhidro (>98%) suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Sorbente C18, tamaño de poro 60 Å, suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- Sílica gel 40 desecante (0.2 - 0.5 mm) suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania)
- Sulfato de magnesio anhidro (>97%) suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- Cloruro sódico R.A. suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Citrato de trisodio di-hidratado R.A. suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
- Hidrogenocitrato de disodio sesqui-hidratado *purum p.a.* (> 99.0%) suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- PSA (*primary secondary amine*, cadenas de N-aminoetil aminopropilo unidas a sílice) suministrado por Supelco (Bellefonte, USA)

3.2. DISOLUCIONES ESTÁNDAR

El disolvente empleado para la elaboración de soluciones estándar se seleccionó de acuerdo a la solubilidad de los analitos y su compatibilidad con los sistemas cromatográfico y electroforético.

Así pues, las disoluciones estándar de isoflavonas así como los patrones internos, se prepararon disolviendo el patrón en metanol, calentando en los casos en que es necesario, o adicionando agua tipo UHQ caliente. Las disoluciones de isoflavonas (agliconas 1000 ppm, glucósidos y gliciteína 500 ppm) fueron conservadas y almacenadas a - 4 °C hasta su utilización.

La 6-metoxiflavona y la apigenina fueron disueltas en dimetilsulfóxido, por lo que el patrón fue conservado en lugar fresco y seco, pero a temperatura ambiente, en un frasco topacio.

3.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN

3.3.1. Sistemas de tratamiento de muestra

Todas las muestras a analizar requieren una trituración previa a la extracción. Para ello se empleó una trituradora Knifetec™ 1905, Foss (Barcelona, España) como la mostrada en la figura 3.1.



Figura 3.1. Trituradora Knifetec™.

La extracción de los diversos analitos se realizó empleando diferente instrumentación, dependiendo del tipo de extracción llevada a cabo.

· La extracción mediante líquidos presurizados se llevó a cabo empleando un sistema de extracción automatizada ASE™ 100 de la casa comercial Dionex (Sunnyvale, California). Se emplearon celdas de extracción, de acero, de 11 mL con filtros de celulosa y botellas colectoras de 250 mL. (Figura 3.2) Los extractos obtenidos fueron filtrados con jeringa

de vidrio a través de filtros de $0.45\ \mu\text{m}$ de Nylon de la casa comercial Osmonics (Minnetonka, MN, EEUU) y de $0.50\ \mu\text{m}$ de PTFE Advantec suministrados por Dismic (Japón) antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

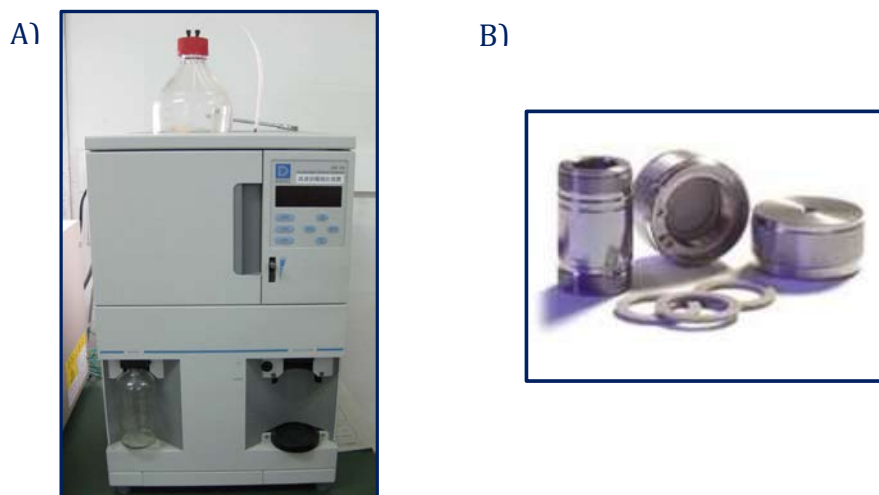


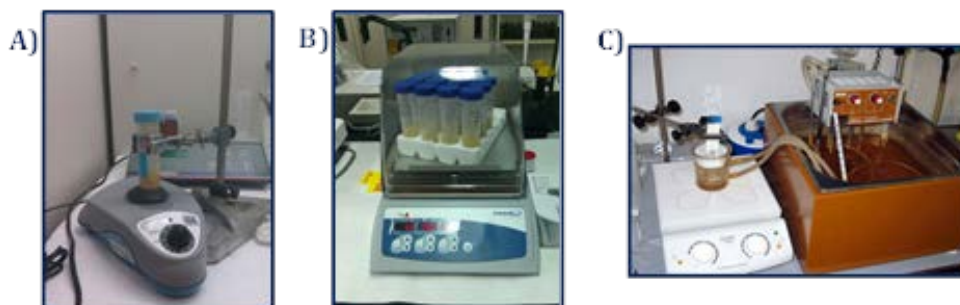
Figura 3.2. A) Sistema de extracción mediante líquidos presurizados, ASE™ 100, de la casa comercial Dionex. B) Celdas de extracción de acero de 11 mL.

· La extracción de los analitos empleando la metodología QuEChERS se llevó a cabo empleando diferentes sistemas de agitación. La puesta en contacto de la muestra y el disolvente se realizó utilizando un Vórtex ZX Classic Velp Scientifics (Milán, Italia); un agitador magnético Jenway 100 HB502 (Staffordshire, UK) conectado a un termostato de inmersión de la marca SBS, y una bandeja agitadora con termostatización VWR (Radnor, Pensilvania, USA) para las metodologías de extracción convencionales (*stirring*). En el caso de las extracciones asistidas con ultrasonidos se empleó una sonda de ultrasonidos Microson Ultrasonic Cell Disruptor de Misonix (Farmingdale, NY, USA) y un baño de ultrasonidos Bandelin Electronic Ultrasound bath (Berlín, Alemania) acoplado a un termostato de inmersión, (Figura 3.3). Tras su centrifugación en una centrífuga serie H-103 N suministrada por Kokusan Enshinki (Tokio, Japón), todos los extractos

III. EXPERIMENTAL

obtenidos fueron filtrados con jeringa de vidrio a través de filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ de PVDF de la casa comercial Scharlau (Barcelona, España).

I. Métodos convencionales. *Stirring*



II. Extracción asistida por ultrasonidos

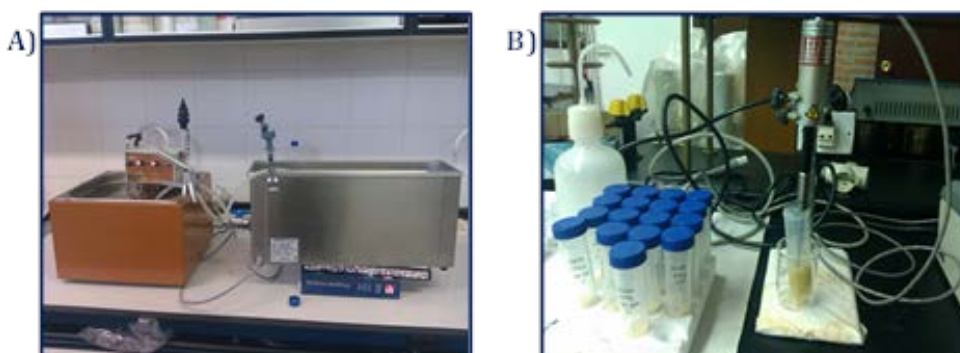


Figura 3.3. Sistemas de agitación empleados para poner en contacto muestra y disolvente en la metodología QuEChERS: IA) Vórtex, IB) Bandeja agitadora, IC) Agitador magnético conectado a un termostato de inmersión, IIA) Baño de ultrasonidos conectado a un termostato de inmersión y IIB) Sonda de ultrasonidos.

El resto de material empleado fue el habitual de laboratorio, abarcando desde tubos de plástico de rosca de 50 mL hasta diferente material volumétrico de vidrio, balanzas analíticas, agitadores magnéticos, etc.

3.3.2. Configuraciones instrumentales

3.3.2.1. *Cromatografía líquida*

Las columnas analíticas de fase inversa (RPLC) utilizadas fueron una Synergi 4 μ Hydro-RP 80Å (250 x 4.6mm) suministrada por Phenomenex (Torrance, CA, EEUU) y una Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 x 4.6 mm) empaquetada con partículas de 1.8 μ m suministrada por Agilent (Waldbronn, Alemania).

Los equipos de cromatografía líquida empleados fueron Agilent 1100 y Agilent 1200 Series de Hewlett Packard (Waldbronn, Alemania). Ambos modelos están constituidos por una bomba de alta presión, un inyector automático con un bucle de inyección de 1500 μ L, una válvula de seis vías, un desgasificador de membrana y un detector de barrera de diodos (DAD) que permite registrar el espectro de cada pico cromatográfico en el margen de longitudes de onda de 190 a 400 nm. El modelo 1100 está controlado por el *software* Agilent HP ChemStation, versión B.01.03 y el modelo 1200 por el *software* MassHunter, versión B.04.01. Ambos permiten la recogida de los datos procedentes de los detectores y la posterior integración de las señales.

Para la detección mediante LC-MS se emplearon dos espectrómetros; una trampa iónica Agilent MSD Trap XCT y un triple cuadrupolo Agilent 6410 Triple Quad. Ambos sistemas permiten una ionización mediante electrospray (ESI) pudiendo trabajar en modo positivo o en modo negativo (Figura 3.4).

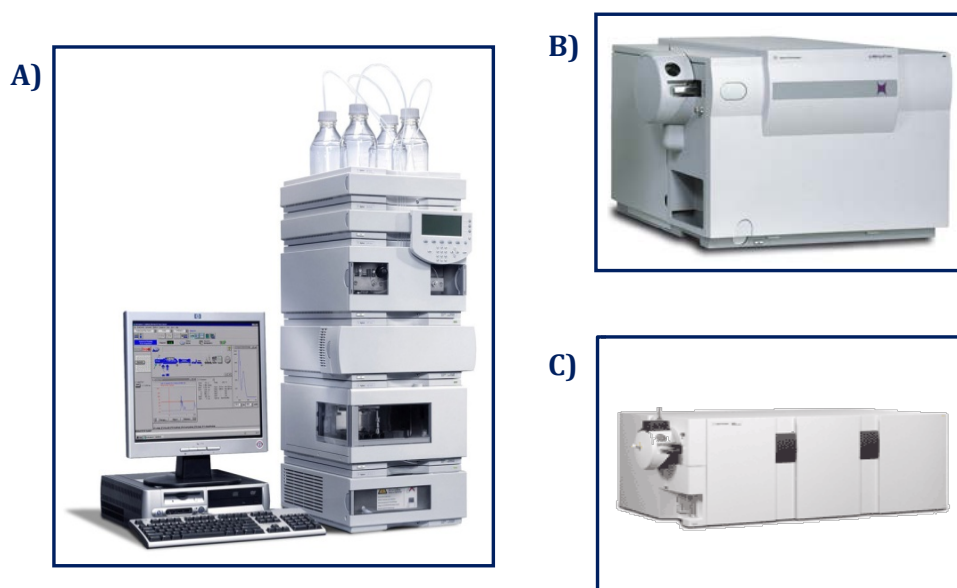


Figura 3.4. A) Sistema de cromatografía líquida Agilent 1100, B) Espectrómetro de trampa iónica Agilent MSD Trap XCT, C) Espectrómetro Agilent 6410 Triple Quad.

3.3.2.2. Electroforesis capilar

Los capilares empleados en la separación electroforética fueron de sílice fundida, con un diámetro interno de 50 μm y una longitud de 87.5 cm. Los capilares fueron suministrados por CM Scientific (ShIPLEY, West Yorkshire, Reino Unido).

La separación electroforética se llevó a cabo en un equipo Agilent Hewlett Packard 3D (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector espectrofotométrico de barrera de diodos (DAD). Para la detección por CE-MS se empleó un detector de cuadrupolo simple Agilent LC/MSD SL, con una interfaz de electrospray (ESI). Dicha interfaz CE-MS tiene un diseño de tipo coaxial por el que circula el líquido adicional impulsado mediante una bomba isocrática HP 1100 Series de Hewlett Packard (Waldbronn, Alemania) (Figura 3.5).

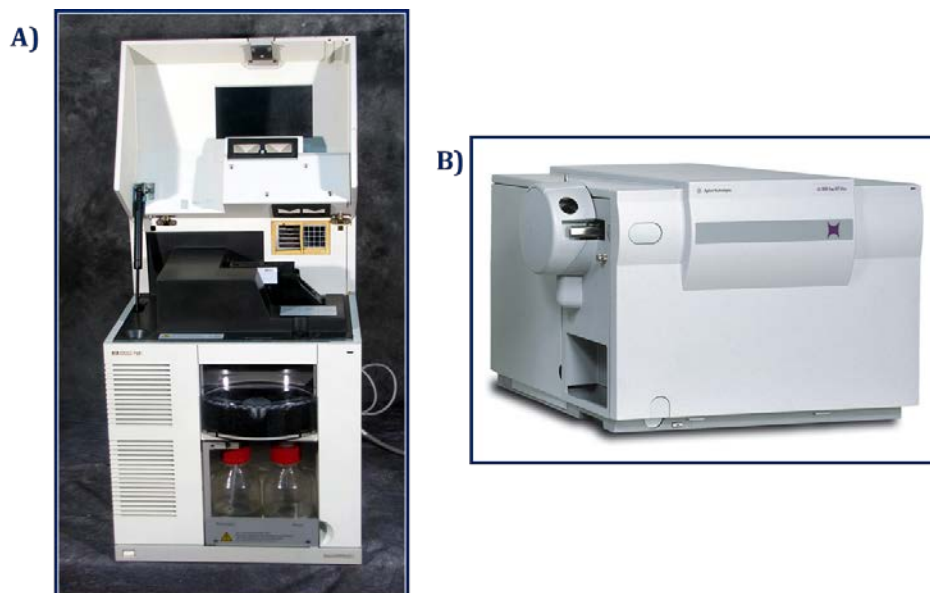


Figura 3.5. A) Equipo de electroforesis capilar Hewlett Packard 3D abierto para mostrar el dispositivo donde se colocan los capilares, B) Detector de cuadrupolo simple Agilent.

Todo el sistema está controlado por el *software* Agilent HP ChemStation, versión B.04.01, que permite la recogida de los datos procedentes de ambos detectores y la integración posterior de las señales.

3.4. MUESTRAS ANALIZADAS

Las muestras analizadas fueron tres tipos de legumbres, garbanzos, lentejas y alubias, de distintas variedades, procedencias y distribuidores. Las muestras fueron conservadas en lugar fresco y seco hasta su utilización, evitando la humedad.

Dichas muestras eran trituradas previamente a su análisis, conservando el polvo obtenido en botes cerrados y siendo descartado a los 2 días de obtención.

El número de muestras utilizadas en el desarrollo de la investigación ha sido numeroso. Como ejemplo, en las tablas 3.1, 3.2 y 3.3, se recogen las muestras analizadas en el estudio correspondiente a la clasificación de legumbres (Capítulo 5).

La nomenclatura empleada en dichas tablas es la siguiente:

- HC: Hidratos de Carbono
- P: Proteínas
- G: Grasa
- F: Fibra
- Ca: Calcio, Mg: Magnesio, Fe: Hierro

Tabla 3-1. Muestras de garbanzos analizadas.

DENOMINACIÓN COMERCIAL	PROCEDENCIA	DISTRIBUIDOR	SIGLAS	ENVASADO	FECHA DE CONSUMO PREFERENTE	COMPOSICIÓN
FUENTESAÚCO	La vellés	Tipo I	Fm	14/04/2011	14/10/2012	
	La vellés	Tipo II	Fch	06/03/2012	06/10/2013	
		Tipo I	Ftg		jul-13	
PEDROSILLO		Tipo I	Psc	03/02/2011		HC: 58.98% P: 22.06% G: 4.95% F: 3.98% Ceniza: 3.10% Humedad: 8.12% Ca: 0.04 Mg: 0.06 mg Fe: 48.35 mg
		Tipo III	Pbo	16/04/2012	16/10/2013	
	Andalucía	Tipo IV	Pa		23/10/2013	P: 20% HC: 57.8% G: 6.5%
	La vellés	Tipo III	Pm	08/10/2012	08/04/2014	
	Piedrahita	Tipo V	Prg		jul-14	
PICO PARDAL	Villalón de Campos	Tipo I	Ppa	22/05/2011	22/11/2013	P: 22% HC: 61.6% G: 3.5% F: 4.5% Fe: 8 mg
	León	Tipo VI	Ppv		11/12/2013	
LECHOSO	Alcalá de los Gazules	Tipo VII	Lc	28/06/2011	28/12/2013	
		Tipo IV	La		28/08/2013	P: 20% HC: 57.8% G: 6.5%
	Andalucía	Tipo VIII	Lci	08/06/2012	06/12/2013	P: 22.7% HC: 56.62% G: 6.87%
MARAGATO	León	Tipo I	M	02/11/2011	02/05/2013	
GORDO	Salamanca	Tipo II	Gs	13/12/2011	13/06/2013	P: 22% HC: 61-6% G: 3.5%
CASTELLANO	León	Tipo VI	Cv		21/05/2013	
		Tipo VIII	Cci	09/03/2012	06/09/2013	
ECOLÓGICO		Tipo IX	Ec		09/07/2013	P: 20% HC: 57.8% G: 6.5%
	México	Tipo IV	Mxa		13/03/2014	P: 20% HC: 57.8% G: 6.5%
	México	Tipo IX	Mxh		04/09/2013	P: 20.12% HC: 58.95% G: 8.5% F: 19.37% Na: 0.005 mg

Tabla 3.2. Muestras de lentejas analizadas.

DENOMINACIÓN COMERCIAL	PROCEDENCIA	DISTRIBUIDOR	SIGLAS	ENVASADO	FECHA DE CONSUMO PREFERENTE	COMPOSICIÓN
LA ARMUÑA		Tipo I	Al	30/11/2010		
		Tipo I	Ald	26/09/2012	26/03/2014	
	La vellés	Tipo II	Ach		24/03/2014	
	Gomecello	Tipo III	Li		01/03/2014	
PARDINA	La vellés	Tipo II	Ps	15/06/2011	15/12/2012	
	León	Tipo IV	Pl			
	Palencia	Tipo I	Pv	10/02/2011	10/08/2013	
		Tipo V	Pci	28/09/2012	28/03/2014	P: 24.77% HC: 61.65% G: 2.08%
	Barco de ávila	Tipo I	Pba		jul-14	
	USA	Tipo VI	Pa		13/01/2013	P: 22% HC: 56.4% G: 2% P: 22.94% HC: 61.41% G: 1.94% F: 24.61% Na: 0.001 mg
CASTELLANA	USA	Tipo VII	Ph	13/03/2012	13/09/2013	
	Canadá	Tipo VIII	Ca	10/09/2012	10/03/2014	P: 22.94% HC: 61.41% G: 1.94%
	León	Tipo I	Cv		02/01/2014	
		Tipo V	Cci	20/06/2012		
VERDINA	León	Tipo I	Wv	02/12/2010	02/05/2013	
EXTRAFINA	USA	Tipo VI	Ea		15/05/2013	P: 22% HC: 56.4% G: 2%
RÁPIDA	USA	Tipo VII	Rh		12/07/2013	P: 24.96% HC: 61.03% G: 2.5% F: 24.39% Na: 0.001mg
ECOLÓGICA		Tipo VII	Ec		27/11/2012	P: 22% HC: 56.4% G: 2%
	Canadá	Tipo VII	Lh	30/01/2012	30/07/2013	P: 22.94% HC: 61.41% G: 1.94% F: 24.61% Na: 0.001mg
	Gomecello	Tipo II	Lp	12/11/2012		

Tabla 3.3. Muestras de alubias analizadas.

DENOMINACIÓN COMERCIAL	PROCEDENCIA	DISTRIBUIDOR	SIGLAS	ENVASADO	FECHA DE CONSUMO PREFERENTE	COMPOSICIÓN	
RIÑÓN	La Armuña	Tipo I	Rar	07/02/2011	10-dic		
	León	Tipo I	Rvg			P: 20% HC: 58.3% G: 2.5% F: 4.5% Fe: 8 mg	
	Villanueva de Jamúz	Tipo II	Rd		22/11/2013		
	Argentina	Tipo III	Rla		06/03/2013	P: 20% HC: 58.3% G: 2.5%	
	La velles	Tipo IV	Rls	26/04/2012	26/10/2013	P: 21% HC: 61.4% G: 1.2%	
	León	Tipo V	Rl				
	Benavente	Tipo I	Rvb		23/11/2013		
	Piedrahita	Tipo I	Rrg		jul-13		
	Argentina	Tipo VI	Ra	05/09/2012	05/03/2014	P: 23.21% HC: 57.56% G: 1.99%	
	Argentina	Tipo VII	Rh		01/03/2013	P: 23.21% HC: 57.56% G: 1.99% F: 29.58% Na: 0.005 mg	
FABA	Luarca	Tipo VIII	FP	01/11/2011	may-13		
		Tipo IX	FCI	03/02/2012	02/08/2013	P: 22.43 % HC: 58.33% G: 2.11%	
	Piloña	Tipo X	FA	cosecha 11/12			
JUDÍAS	Asturias	Tipo XI	FV	15/10/2012	15/04/2014		
	Barco de ávila	Tipo IV	JB				
	León	Tipo I	JV		30/07/2013		
	LA GRANJA	Tipo XII	GH		08/05/2013		
	PLANCHETA	Tipo I	PV		26/09/2013		
	REDONDA MANTECA	Tipo I	RV		02/05/2013		
	NEGRITA	Argentina	Tipo V	NL	29/12/2011	29/06/2013	



IV

**EXTRACCIÓN Y
DETERMINACIÓN
DE ISOFLAVONAS**

4.1. EXTRACCIÓN MEDIANTE LÍQUIDOS PRESURIZADOS

4.1.1. OBJETIVO

El objetivo principal de este capítulo es la aplicación de la extracción mediante líquidos presurizados, PLE, para el aislamiento de isoflavonas de muestras de legumbres, antes de su determinación mediante cromatografía líquida.

Este tipo de extracciones presenta la ventaja de la automatización de la etapa de tratamiento de muestra, lo que permite minimizar la transmisión de posibles errores en la determinación.

Cada etapa del proceso será analizada de forma sistemática con el fin de optimizar la extracción. El objetivo es desarrollar una única etapa de extracción y limpieza, obteniendo extractos limpios y pequeños volúmenes de extracto. Por este motivo se analizarán parámetros como temperatura, tiempo de extracción, número de ciclos de extracción, disolvente extractante, tipo de dispersante y, por supuesto, cantidad de muestra, ya que los efectos de matriz dependen de la composición de ésta.

Una vez optimizado el tratamiento de muestra, los extractos obtenidos se separarán y determinarán mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica con red de diodos.

La confirmación de los analitos determinados se comprobará con un detector de trampa iónica.

La metodología desarrollada se validará aplicando el método oficial de la AOAC 2008.03 descrito para la determinación de isoflavonas en muestras de soja.

En última instancia, se verificará la aplicabilidad del método propuesto analizando muestras comerciales de legumbres de la región de Castilla y León.

4.1.2. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se desarrolla una metodología de tratamiento de muestra basada en la extracción mediante líquidos presurizados para el aislamiento de isoflavonas en muestras de legumbres.

La extracción mediante fluidos a alta presión es una técnica de preparación de muestra que implica el uso de disolventes líquidos a presión y temperatura elevadas para mejorar el rendimiento de la extracción de analitos de matrices sólidas, en comparación con las técnicas realizadas a temperatura ambiente y presión atmosférica.

Esta técnica ha recibido diversas denominaciones, siendo las más utilizadas:

- Extracción acelerada con disolventes, ASE (*Acelerated Solvent Extraction*).
- Extracción con fluidos a alta presión, PFE (*Pressurized Fluid Extraction*).
- Extracción con líquidos a alta presión, PLE (*Pressurized Liquid Extraction*).
- Extracción con disolventes a alta presión, PHSE (*Pressurized Hot Solvent Extraction*) o HPSE (*High-Pressurized Solvent Extraction*).
- Extracción con disolvente subcrítico, SSE (*Subcritical Solvent Extraction*).
- Extracción con agua subcrítica, SWE (*Subcritical Water Extraction*).
- Extracción con agua caliente, HWE (*Hot Water Extraction*).
- Extracción con agua caliente a presión, PHWE (*Pressurized Hot Water Extraction*).

En este trabajo se empleará el término PLE por ser la denominación más ampliamente aceptada.

Las principales ventajas de esta técnica son el aumento de la eficacia de extracción, la reducción en el consumo de disolventes y en el tiempo empleado en la extracción, y la posibilidad de automatización. Este tipo de extracción puede llevarse a cabo en modo estático o en modo dinámico, en este trabajo se utiliza la modalidad en estático.

Como se indicó anteriormente, PLE es una técnica para la extracción de muestras sólidas y semisólidas que usa disolventes líquidos convencionales a temperatura y presión elevadas para aumentar la eficacia del proceso de extracción. El uso de temperaturas elevadas acelera la cinética de extracción, mientras que la alta presión mantiene el disolvente líquido por encima de su punto de ebullición.

La eficacia de la extracción depende de la naturaleza de la matriz, del analito a extraer y de la ubicación del analito dentro de la matriz. En la extracción de analitos de muestras sólidas se distinguen tres etapas:

1. Desorción desde una partícula sólida.
2. Difusión a través del disolvente localizado dentro de un poro de la partícula.
3. Transferencia al volumen del fluido, solubilización en el disolvente.

Cada etapa depende de diversos factores, por lo que se deben estudiar sistemáticamente los efectos de varios parámetros experimentales tales como la temperatura, la presión, el tiempo de extracción, el número de ciclos y el tipo de disolvente usado.

4.1.2.1. Efecto del tipo de disolvente

El disolvente de extracción debe ser capaz de solubilizar los analitos de interés, minimizando la co-extracción de otros componentes de la matriz. Al elegir el disolvente de extracción se debe tener en cuenta que la polaridad de éste debe ser similar a la de los analitos a extraer. Asimismo es importante considerar la compatibilidad con la separación y determinación posteriores.

En este tipo de extracciones el disolvente a utilizar sólo presenta una condición, que su temperatura de autoignición no esté comprendida en el rango de trabajo habitual en esta técnica (40 - 200°C), como es el caso del disulfuro de carbono, el éter dietílico o el 1,4-dioxano. En general tampoco se suelen utilizar ácidos o bases fuertes, debido a que son corrosivos. Por

tanto, los disolventes empleados son los mismos que los aplicados en métodos convencionales de extracción, incluso los que no son efectivos en estos métodos, ya que la modificación de la presión y la temperatura durante el proceso aumenta el poder solubilizante del disolvente.

4.1.2.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más importantes que afectan a la eficacia y selectividad en PLE. El uso de temperaturas elevadas durante el proceso afecta a las propiedades del disolvente, produciendo, entre otros fenómenos:

- Un incremento en la solubilidad de los analitos.
- Un aumento de la difusión.
- Una disminución de las fuertes interacciones entre los analitos y los componentes de la matriz (fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y atracciones dipolo-dipolo). Estas interacciones dependen de la estructura química de la matriz y los analitos.
- Una disminución de la viscosidad y de la tensión superficial del disolvente. Esto permite una mejor penetración dentro de los poros y entre las partículas de la matriz, lo cual mejora la transferencia de masa.

4.1.2.3. Efecto de la presión

La principal razón por la que se emplea una presión elevada durante el proceso de extracción es para mantener el disolvente en estado líquido a temperaturas por encima del punto de ebullición.

Además, la elevada presión facilita la extracción de muestras en las que los analitos han sido atrapados en los poros de la matriz. La presión “fuerza” a introducir al disolvente en zonas de las matrices que normalmente no estarían en contacto en condiciones atmosféricas. Por ejemplo, si los analitos están atrapados en los poros, y el agua (o incluso una burbuja de aire) tiene obstruida la entrada del poro, el disolvente no puede acercarse a

estos analitos y extraerlos. Por tanto, con presiones elevadas (junto con la reducción de la tensión superficial del disolvente originada por temperaturas elevadas) se facilita la entrada del disolvente en el poro y el contacto con los analitos.

Se podría decir que los principales efectos¹⁹⁵ en las extracciones al emplear presiones y temperaturas elevadas son:

- Aumento de la solubilidad y transferencia de masa.
- Ruptura del equilibrio superficial.

4.1.2.4. Efecto de la matriz

El efecto de la matriz de la muestra depende de la composición de ésta. Las muestras de alimentos pueden diferenciarse significativamente en sus propiedades físico-químicas, tipo de componentes presentes o granulación (diámetro de partícula). Estos parámetros afectan en la sorción y en la retención de los analitos. La complejidad del procedimiento analítico aumenta con el número de componentes orgánicos presentes en la muestra. El efecto de la matriz condiciona la elección del extractante y otros parámetros.

4.1.2.5. Aplicaciones analíticas de la extracción con líquidos presurizados

La mayor parte de las aplicaciones están enfocadas a la determinación de contaminantes, y las muestras investigadas son principalmente alimentos, productos industriales, tejidos de animales y plantas, suelos y sedimentos, siendo estas dos últimas las más frecuentes.

En diferentes revisiones bibliográficas^{195,196,197} se recogen estudios comparativos de esta técnica con otros métodos de extracción para

¹⁹⁵H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namiésnik; *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 149

muestras sólidas - como Soxhlet, extracción asistida por microondas (MAE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), etc. - para la determinación de contaminantes en suelos y sedimentos. Los disolventes más empleados para la extracción de este tipo de analitos son acetona, diclorometano, hexano, tolueno, metanol, o mezclas de estos disolventes.

Utilizando esta metodología, Antunes y cols.¹⁹⁸ han determinado dioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados y bifenilos policlorados coplanares en suelos y sedimentos contaminados utilizando tres ciclos de extracción con hexano y tolueno a 150°C. García-Galán y cols.¹⁹⁹ determinaron triazinas y sus metabolitos en suelos empleando también tres ciclos de extracción con mezclas acetona-metanol a 65°C. La extracción con líquidos presurizados también se ha aplicado para la determinación de bisfenol A y sus derivados clorados en lodos de depuradora²⁰⁰ empleando como disolvente extractante acetato de etilo a 100°C con tres ciclos de extracción. Este mismo disolvente, mezclado con un 10 % de metanol, se ha empleado en la extracción de contaminantes orgánicos de diferentes clases (hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, parabenos, bisfenoles, etc.) de muestras de suelos para su posterior determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem²⁰¹. En algunos casos la extracción de los contaminantes va seguida de una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE)^{202,203}.

Aunque en la mayoría de los casos se emplean tres ciclos de extracción y temperaturas por encima de los 100°C, algunos autores²⁰⁴ han comprobado que la utilización de mezclas de disolventes y etapas adicionales de extracción con PLE eran factores más influyentes en la eficacia de la

¹⁹⁶ E. Björklund, T. Nilsson; *TRAC-Trend Anal. Chem.* 19 (2000) 434

¹⁹⁷ J.R. Dean; *TRAC-Trend Anal. Chem.* 19 (2000) 553

¹⁹⁸ P. Antunes, P. Viana, T. Vinhas, J.L. Capelo, J. Rivera, E.M.S.M. Gaspar; *Talanta* 75 (2008) 916

¹⁹⁹ M.J. García-Galán, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló; *J. Hydrol.* 383 (2010) 30

²⁰⁰ N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, J.L. Vilchez; *Talanta* 101 (2012) 1

²⁰¹ B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, R.A. Pérez, J.L. Tadeo; *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 9

²⁰² J.M. Traverso-Soto, P.A. Lara-Martín, V.M. León, E. González-Mazo; *Talanta* 110 (2013) 171

²⁰³ M.R. Burkhardt, S.D. Zaugg, T.L. Burbank, M.C. Olson, J.L. Iverson; *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 104

²⁰⁴

O. Kiguchi, K. Saitoh, N. Ogawa; *J. Chromatogr. A* 1142 (2007) 262

extracción que la temperatura o el número de ciclos de extracción. Otros autores²⁰⁵ han puesto de manifiesto que las características físico-químicas de la matriz ambiental influyen en el rendimiento de la extracción.

En el análisis de alimentos, la extracción con líquidos presurizados se ha aplicado de forma mayoritaria en la determinación de contaminantes. Algunos ejemplos de estas aplicaciones son las determinaciones de residuos de fluoroquinolona en alimentos infantiles²⁰⁶, de diferentes tipos de contaminantes halogenados en pescado²⁰⁷, de disruptores endocrinos en cereales²⁰⁸, de residuos antimicrobianos en carne²⁰⁹, o de otros contaminantes halogenados en tejidos de hígado de oveja²¹⁰ o de pescado²¹¹.

Aunque la mayoría de las aplicaciones de PLE están dirigidas a la extracción de contaminantes de diferentes tipos de muestras, esta técnica también se está empleando para el aislamiento de compuestos bioactivos de matrices naturales^{212,213,214}.

Una de las principales ventajas que ofrece PLE sobre otras técnicas de extracción, como Soxhlet o extracción asistida por ultrasonidos, es que disminuye de forma significativa el tiempo de extracción, la cantidad de disolventes y la manipulación de la muestra. Este hecho ha sido comprobado por Flores-Péres y cols.²¹⁵, demostrando además que el uso de PLE aumenta la eficacia de la extracción de terpenos, ácidos grasos y vitamina E en hojas de plantas. Matthäus y Brühl²¹⁶ compararon también diferentes métodos de extracción, como SFE, PLE, MAE, etc. para la determinación del contenido en tocoferoles, diglicéridos y ácidos grasos libres en diferentes tipos de

²⁰⁵ S. Josefsson, R. Westbom, L. Mathiasson, E. Björklund; *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 94

²⁰⁶ E. Rodriguez, F.N. Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 605

²⁰⁷ R. Ghosh, K.J. Hageman, E. Björklund; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7242

²⁰⁸ R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz; *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 207

²⁰⁹ V. Carretero, C. Blasco, Y. Picó; *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 162

²¹⁰ Z. Zhang, E. Ohiozebau, S.M. Rhind; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1203

²¹¹ B. Subedi, S. Usenko; *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 30

²¹² R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez; *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1

²¹³ A. Mustafa, C. Turner; *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 8

²¹⁴ M. Herrero, M. Castro-Puyana, J.A. Mendiola, E. Ibañez; *TRAC-Trend Anal. Chem.* 43 (2013) 67

²¹⁵ V. Flores-Péres, J. Saffi, M.I.S. Melecchi, F.C. Abad, R. de Assis -acques, M.M. Martinez, E. Conceicao-Oliveira, E.B. Caramao; *J. Chromatogr. A* 1105 (2006) 115

²¹⁶ B. Matthäus, L. Brühl; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 95

semillas, colza, girasol y soja. En este caso no encuentran diferencias significativas entre los distintos métodos probados, salvo en el caso de los tocoferoles, para los que se encuentran contenidos más altos con SFE.

El equipo de Papagiannopoulos^{217,218}, en combinación con otros autores de la compañía Dionex, desarrolló una metodología automatizada que acopla la extracción con líquidos presurizados, la extracción en fase sólida y HPLC para el análisis de muestras sólidas como malta y lúpulo.

Otras aplicaciones de PLE en este campo son la determinación de catequinas en hojas de té y pepitas de uva²¹⁹, vitamina K1 en leches enriquecidas y fórmulas infantiles²²⁰, carotenoides en alimentos procesados²²¹ o microalgas²²², β -carotenos e isómeros de vitamina E en aceite de palma²²³, antocianinas en batata²²⁴, inositoles en piñones²²⁵. Nuestro grupo de investigación ha utilizado esta metodología para el aislamiento de vitaminas A y E en fórmulas infantiles²²⁶, isómeros de vitamina E²²⁷ y β -sitosterol²²⁸ en frutos secos y semillas, y tocoferoles y tocotrienoles en cereales^{229,230}.

Existen pocos antecedentes sobre la utilización de PLE para la determinación de isoflavonas. Todas ellas se refieren a la determinación de

²¹⁷ M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa; *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 9

²¹⁸ M. Papagiannopoulos, A. Mellenthin; *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 345

²¹⁹ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso; *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 19

²²⁰ J.R. Chase; *J. AOAC Int.* 83 (2000) 407

²²¹ D.E. Breithaupt; *Food Chem.* 86 (2004) 449

²²² L. Jaime, I. Rodríguez-Meizoso, A. Cifuentes, S. Santoyo, S. Suarez, E. Ibáñez, F.J. Señorans; *LWT - Food Sci. Technol.* 43 (2010) 105

²²³ M.M. Sanagi, H.H. See, W.A.W. Ibrahim, A.A. Naim; *Anal. Chim. Acta*, 538 (2005) 71

²²⁴ V.D. Truong, Z. Hu, R.L. Thompson, G.C. Yencho, K.V. Pecota; *J. Food Compos. Anal.* 26 (2012) 96

²²⁵ L. Ruiz-Aceituno, S. Rodríguez-Sánchez, J. Sanz, M.L. Sanz, L. Ramos; *Food Chem.* 153 (2014) 450

²²⁶ M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, M. García-Jiménez, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez; *Talanta* 70 (2006) 1094

²²⁷ M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez; *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 249

²²⁸ M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, D. Martínez-Pelarda, R. Carabias-Martínez; *Anal. Sci.* 25 (2009) 765

²²⁹ M. Bustamante-Rangel, M.M. Delgado-Zamarreño, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez; *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 216

²³⁰ M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, S. Sierra-Manzano, M. Verdugo-Jara, R. Carabias-Martínez; *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1430

estos analitos en muestras con alto contenido en los mismos, como soja y trébol; sin embargo no se han encontrado referencias bibliográficas en las que se emplee este tipo de extracción para el aislamiento de isoflavonas en muestras de legumbres de amplio consumo en España, como garbanzos y lentejas.

Rostagno y cols.²³¹ evaluaron la viabilidad de PLE para el aislamiento de las isoflavonas presentes en la soja. Las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la extracción fueron: 100°C, 100 atm, 3 ciclos de extracción de 7 minutos y etanol al 70 % como disolvente extractante. Comprobaron que a temperaturas superiores a 100°C los malonil derivados se degradan a los correspondientes glucósidos, y éstos se transforman en la aglicona correspondiente por encima de 150°C.

Klejdus y cols.²³² determinaron isoflavonas en alimentos derivados de la soja utilizando una extracción en dos etapas. En una primera etapa se realiza una extracción con hexano para eluir los compuestos lipofílicos; en la segunda etapa se lleva a cabo la extracción de las isoflavonas utilizando metanol al 60% con ácido fórmico al 0.3 %, a 100°C, 130 bar y dos ciclos de extracción de 5 min. En otro trabajo²³³, estos autores proponen llevar a cabo la aplicación de ultrasonidos a la muestra antes de la PLE. De este modo lograron aumentar el rendimiento de la extracción, debido probablemente a la destrucción de las paredes celulares durante el tratamiento con ultrasonidos.

Luthria y cols.²¹ compararon diferentes técnicas y disolventes para la extracción de las isoflavonas de la soja. La innovación más importante fue la adición de DMSO a las mezclas EtOH:H₂O propuestas por otros autores. Observaron un aumento en la eficacia de la extracción, posiblemente debido a la solubilidad de las isoflavonas en este disolvente.

²³¹ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso; *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 169

²³² B. Klejdus, J. Vacek, V. Adam, J. Zehnálek, R. Kizek, L. Trnková, V. Kubán; *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 101

²³³ B. Klejdus, R. Mikelová, J. Petřlová, D. Potesil, V. Adam, M. Stiborová, P. Hodek, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubán; *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 71

Zgórka²³⁴ llevó a cabo un estudio del impacto de la metodología de extracción sobre las recuperaciones de las isoflavonas de cinco especies de trébol. Comprobó que la PLE proporcionaba ventajas significativas tales como óptima eficacia de extracción, menores costes de reactivos y buena precisión y exactitud, comparada con otros métodos de extracción convencionales y con la extracción asistida por ultrasonidos.

²³⁴ G. Zgórka; *Talanta* 79 (2009) 46

4.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.3.1. Procedimiento Analítico

La etapa de preparación de muestra mediante extracción con líquidos presurizados consta de una serie de pasos descritos a continuación.

La muestra triturada (2-3 gramos de legumbre) se mezcla de forma homogénea con el agente dispersante, tierra de diatomeas, para prevenir la compactación de la muestra en el interior de la celda de extracción, en cuyo interior se ha colocado previamente un filtro de celulosa.

Una vez cerrada la celda, se introduce en el interior del horno hermético del sistema ASE™ y se somete al proceso de extracción. La celda comienza a llenarse con el disolvente extractante calentándose hasta la temperatura programada, 90°C, a una presión de 110 bares. Dicha presión y temperatura se mantendrán a lo largo de un tiempo prefijado, el llamado tiempo de extracción estática, que en este caso es de 5 minutos. El tipo de disolvente extractante dependerá de la naturaleza de la muestra, siendo una mezcla de MeOH:H₂O al 50% en el caso de muestras de garbanzos y al 75% en el caso de lentejas. Transcurrido el tiempo de extracción estática, se procede a un lavado por parte del propio sistema con nuevo disolvente extractante y un purgado con N₂. Todas las fracciones de disolvente se recogen en la misma botella recolectora, habiéndose completado en este instante un ciclo de extracción. El método propuesto para la extracción de isoflavonas en legumbres consta de tres ciclos de extracción consecutivos. El volumen final de extracto se enrasa a 25.0 mL.

Los extractos son filtrados con filtros de nylon de 0.45 µm, acoplados a una jeringa de vidrio, antes de su análisis cromatográfico. El análisis de las muestras se lleva a cabo empleando un sistema de cromatografía líquida con columna C18, acoplado a un sistema de detección de barrera de diodos.

En la figura 4.1 se representa de forma esquemática cada uno de los componentes del sistema de extracción ASE 100 utilizado. Se observa una fuente de N₂ que permite alcanzar la presión deseada así como impulsar el

disolvente por los conductos internos. La muestra se sitúa en un horno hermético y el extracto es recogido en una botella recolectora.



Figura 4.1. Componentes del sistema ASE 100.

4.1.3.2. Optimización de las variables que influyen en el sistema cromatográfico

La separación cromatográfica se optimizó para obtener la mejor resolución y eficacia en el menor tiempo posible. En este aspecto, en primer lugar se estudiaron la influencia de la composición de la fase móvil y el caudal de la misma sobre dicha separación cromatográfica.

En este estudio, la separación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna Synergi 4 μ Hydro RP 80 Å (250 x 4.6 mm) de Phenomenex y un volumen de inyección de 20 μ L. La detección de las isoflavonas fue llevada a cabo empleando un sistema de detección de barrera de diodos, DAD.

4.1.3.2.1. Optimización de la fase móvil

Las isoflavonas tienen estructuras semejantes entre sí; sin embargo, la presencia y posición de diversos grupos -OH o grupos éteres les confiere una polaridad diferente (Tabla 1.1, pág.10). En base a esto, podemos asumir que los analitos más polares serán los glucósidos y los más apolares la formononetina y la biochanina-A.

Aunque la separación en régimen isocrático es poco probable debido a esta similitud en las estructuras, se decidió llevar a cabo una serie de ensayos previos empleando distintas mezclas de MeOH:H₂O en presencia de un tampón fórmico : formiato (pH 4.6), tal y como se indicaba en bibliografía.

En estos estudios se observó que los analitos más polares eluyen con el frente de inyección, dándose incluso la posibilidad de no resolverse entre ellos. En la figura 4.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para porcentajes de metanol del 60 y 80%, donde se aprecia este efecto. Por este motivo se decidió continuar el estudio de la fase móvil empleando gradientes de elución.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

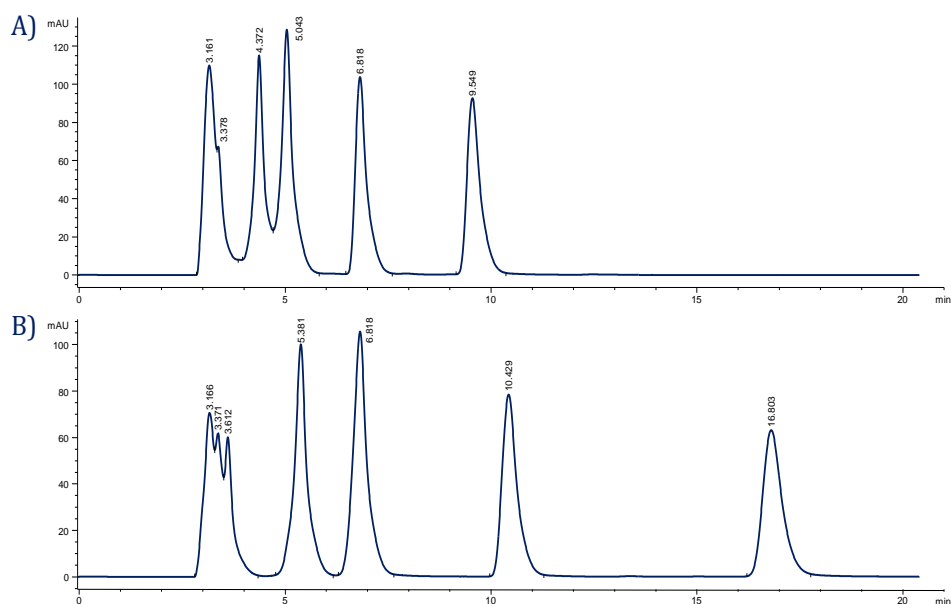


Figura 4.2. Cromatogramas correspondientes a un patrón de 25 ppm bajo un régimen de gradiente isocrático A) Fase móvil MeOH:H₂O (60:40, v/v) B) Fase móvil MeOH:H₂O (80:20, v/v).

Se probaron diversas mezclas MeOH:H₂O y ACN:H₂O como fase móvil, obteniéndose en todos los casos una mejor resolución en el caso de las mezclas con acetonitrilo que con metanol. La presencia de ácido fórmico (2%) en dichas mezclas da lugar a valores de pH inferiores a los pK_{as} de las isoflavonas; estos valores están comprendidos entre 5.3 y 9.81²³⁵. Por ello, las isoflavonas están presentes en forma neutra y se retendrán más fácilmente en la fase inversa, dando lugar a una mejora de la forma de los picos cromatográficos.

La mejor resolución de los picos cromatográficos, eluidos en el menor tiempo y alejados del frente de inyección, viene dada por las condiciones de gradiente de elución mostradas en la tabla 4.1.

²³⁵ G.S.McLeod, M-J-Sherpherd; *Phytochem Anal.* 11 (2000) 322

Tabla 4.1. Gradiente propuesto para la separación cromatográfica, utilizando fase móvil formada por ACN y agua con ácido fórmico al 2 %.

TIEMPO (min)	% ACN
0 – 5	25
5 – 8	25 → 50
8 – 13	50
13 – 20	50 → 80
20 – 23	80
23 – 30	80 → 25

Con objeto de maximizar la separación entre el tiempo muerto y la elución del primer analito se varió el flujo de la fase móvil, de 0.7 a 1.0 mL min⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2, poniendo de manifiesto que el caudal más aconsejado es 0.7 mL min⁻¹.

Tabla 4.2. Influencia del caudal de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos, siendo T_m el tiempo muerto de análisis.

CAUDAL	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)						
	T _m	DIN	GIN	DEN	GEN	FOR	BIO
1.00 mL min ⁻¹	3.7	4.3	7.1	12.9	15.9	19	22
0.80 mL min ⁻¹	4.3	4.9	7.8	12.9	16	19	22
0.70 mL min ⁻¹	4.9	5.7	9	13.9	17.3	20.2	23

En la figura 4.3 se muestra un cromatograma obtenido bajo estas condiciones de caudal y gradiente, manteniendo la temperatura de la columna constante a 25°C.

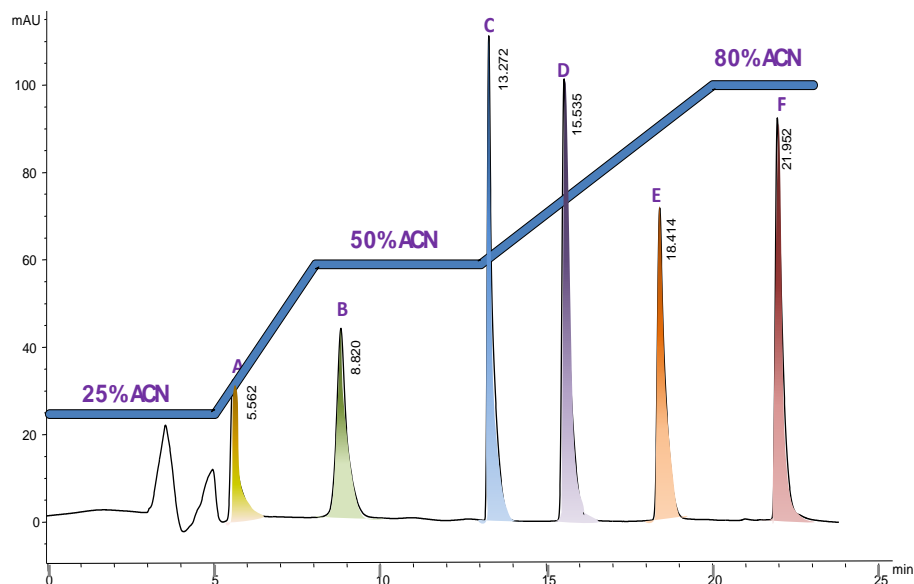


Figura 4.3. Cromatograma obtenido para una disolución patrón en las condiciones optimizadas de fase móvil. A) Daidzina, B) Genistina, C) Daidzeína, D) Genisteína, E) Formononetina y F) Biochanina-A.

4.1.3.2.2. Optimización de la detección mediante un sistema de detección por barrera de diodos, DAD

La detección y cuantificación de las isoflavonas se llevó a cabo de modo espectrofotométrico, empleando un detector de barrera de diodos. La longitud de onda utilizada en todos los casos ha sido de 254.1 nm, puesto que es la longitud de onda de máxima absorción para los analitos. En la figura 4.4 se muestran los espectros obtenidos por el sistema de detección por barrera de diodos para las seis isoflavonas analizadas en este estudio.

Debido a las grandes similitudes entre los diferentes espectros de absorción de los analitos, con el fin de identificarlos en las muestras reales se utilizó un sistema de espectrometría de masas de trampa iónica.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

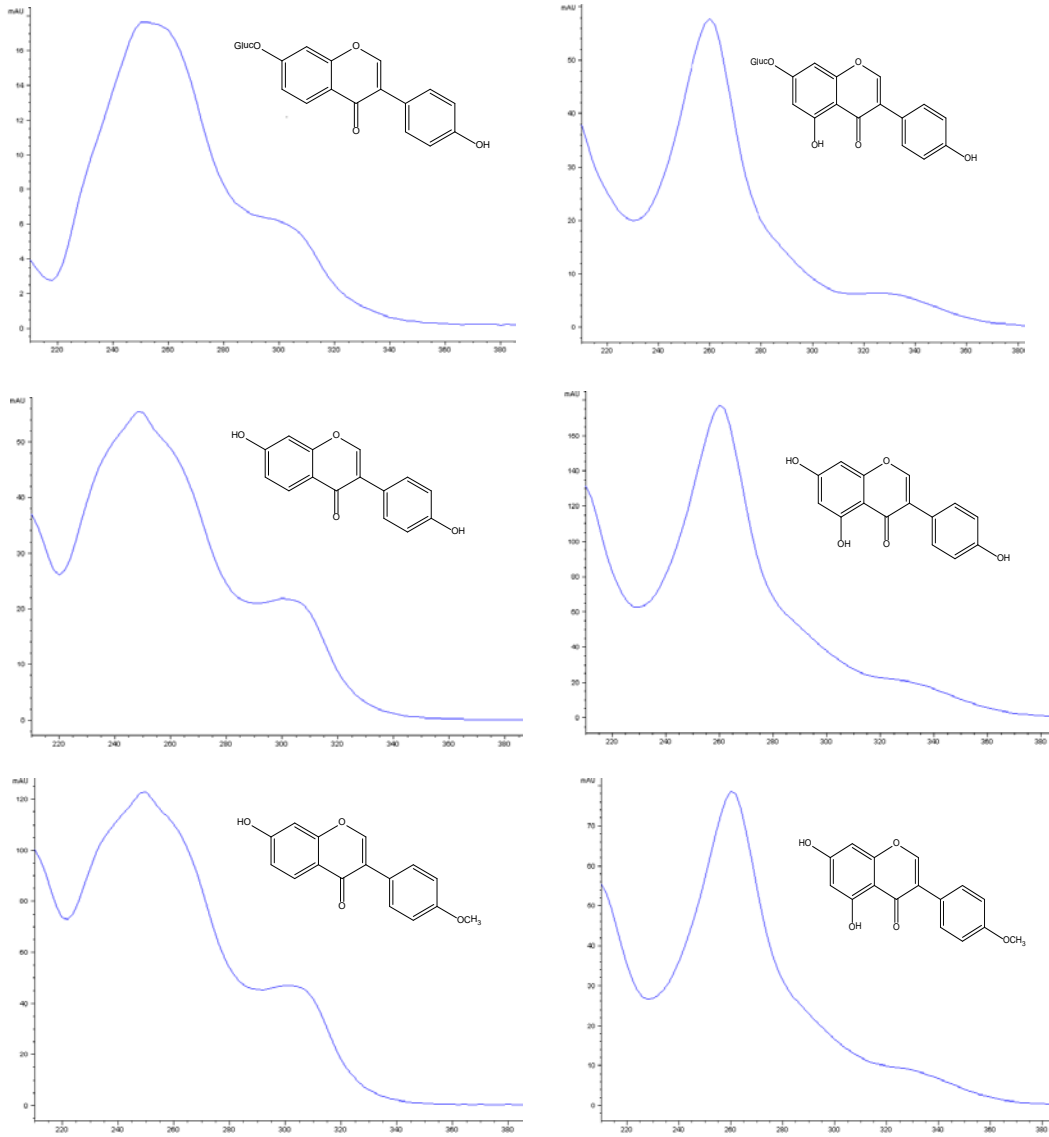


Figura 4.4. Espectros UV correspondientes a las isoflavonas en estudio. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Daidzina, Genistina, Daidzeína, Genisteína, Formononetina y Biochanina-A.

4.1.3.2.3. *Identificación de los analitos en estudio mediante espectrometría en modalidad trampa iónica*

Como ya se mencionó en el apartado anterior, la gran similitud entre los espectros de los analitos en estudio obliga a emplear una técnica de mayor resolución para la identificación de los mismos, la trampa iónica.

Las condiciones de ionización y fragmentación se optimizaron con disoluciones patrón de las isoflavonas.

- ESI: modo positivo
- Voltaje del capilar: 3500 V
- Gas de secado: N₂
- Flujo de gas de secado: 11 mL min⁻¹
- Temperatura de gas de secado: 350 °C
- Presión de nebulización: 60 psi

En el apartado de Apéndices de la presente Memoria, se muestran los espectros de masas (MS) y de fragmentación (MS/MS o MS²) de las isoflavonas estudiadas en este trabajo. Para cada uno de ellos, en la parte izquierda se aprecia la señal obtenida en un barrido completo de masas simple, sin fragmentación, de 60 a 400 u. Se señala en todos los casos el pico de mayor señal, correspondiente al ion molecular, junto con la estructura del ion. En la parte de la derecha, se muestra la señal obtenida en un barrido completo, 60 a 400 u, de iones producto tras producirse la fragmentación, al voltaje óptimo en cada caso, del ion molecular o ion precursor, que previamente ha sido aislado. Se incluye la estructura más probable del fragmento ion producto más abundante.

4.1.3.3. Optimización del tratamiento de muestra (Condiciones de extracción).

En este apartado se describen los estudios llevados a cabo para optimizar la etapa de preparación de la muestra. Se analizan los parámetros

que influyen en la extracción, tales como disolvente extractante, cantidad de muestra, temperatura, tipo de agente dispersante, tiempo de extracción y número de ciclos de extracción. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los factores que más influyen en la eficacia de la extracción son el tipo de disolvente y la cantidad de muestra²³⁰.

4.1.3.3.1. *Influencia del tipo de agente dispersante*

Con objeto de prevenir la compactación de la muestra en el interior de la celda en el momento de la extracción, ésta se mezcla con un agente dispersante para que la extracción se lleve a cabo de modo homogéneo. En bibliografía se pueden encontrar diferentes dispersantes tales como tierra de diatomeas, arena de playa lavada²³¹, fases estacionarias de columnas preparativas, C18, y sulfato sódico^{21,97}.

El agente dispersante más comúnmente utilizado es la tierra de diatomeas o celita, por tratarse de un material silíceo inerte empleado desde la antigüedad como medio filtrante. No obstante, cabe la posibilidad de que esa sílice, al estar activada, interfiera con los analitos captándolos e impidiendo su correcta extracción. Para comprobar este efecto se probaron diferentes agentes dispersantes como tierra de diatomeas, arena, C18 y sulfato sódico.

El método empleado en este estudio comprendía una temperatura de extracción de 90°C, tres ciclos de extracción y como disolvente extractante MeOH al 100%. Los dispersantes testados fueron dopados, cada uno de ellos, con las isoflavonas estudiadas a dos niveles de concentración con el fin de obtener concentraciones de 1.00 y 5.00 mg/L en el extracto final de 25.0 mL.

Los extractos obtenidos fueron inyectados en el sistema cromatográfico y comparadas sus señales analíticas con las obtenidas para un patrón de idéntica concentración, no sometido al proceso de extracción.

En la figura 4.5 se muestra la influencia del agente dispersante sobre el porcentaje de analito extraído, tomando como referencia el patrón no sometido al proceso de extracción. Se observa que los dispersantes utilizados no presentan influencia sobre la extracción de los analitos más

polares, los glucósidos, pero sí sobre las agliconas. Es decir, parece que existe una retención por parte del dispersante sobre determinadas isoflavonas, y ésta se ve más acusada a medida que disminuye la polaridad de las mismas. Los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan tierra de diatomeas y sulfato sódico anhidro como dispersante.

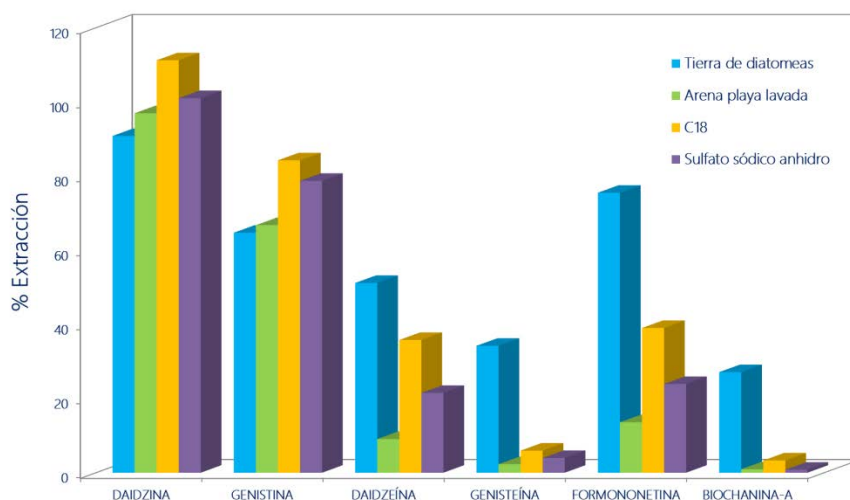


Figura 4.5. Influencia del agente dispersante sobre el porcentaje extraído de isoflavonas. Dispersante dopado con 5.00 mg/L de cada isoflavona. Condiciones de extracción: 100% MeOH, 90°C, 3 ciclos de extracción.

4.1.3.3.2. Influencia del tipo de disolvente extractante

En el sistema ASE™ es posible la utilización de un gran número de disolventes más o menos polares, o mezclas de ellos. El único impedimento es la utilización de disolventes con una temperatura de autoignición entre 40 y 200°C.

El disolvente extractante debe ser capaz de solubilizar al máximo los analitos en estudio, minimizando la co-extracción de otros compuestos interferentes de la matriz, lo que evitaría posteriores etapas de limpieza antes de la inyección en el sistema cromatográfico. Además, hay que tener

en cuenta las pérdidas de analito debido a la adsorción sobre el dispersante en la celda.

Por ello, se probaron distintos disolventes polares tales como acetonitrilo, metanol y etanol así como mezclas de los mismos con agua. Los mejores resultados se obtuvieron cuando las muestras eran tratadas con mezclas MeOH:H₂O. Cuando el extractante es metanol, se produce una menor retención de los analitos por parte del dispersante, por lo que parece aconsejable utilizar éste como extractante.

Se estudió además la influencia que la polaridad de este extractante tiene sobre dicha adsorción. Para ello, la tierra de diatomeas fue dopada con 1.00 mL de disoluciones estándar de isoflavonas (24 µg mL⁻¹ para la genistina y 75 µg mL⁻¹ para el resto de isoflavonas). En todos los casos, los extractos fueron enrasados a 25.0 mL y la extracción fue llevada a cabo empleando una temperatura de 90°C, tres ciclos de extracción y mezclas de MeOH:H₂O (100, 75:25, 50:50, 10:90)

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la señal analítica a medida que disminuye la polaridad del disolvente extractante, dándose los mejores resultados a partir de valores superiores al 75% MeOH (Figura 4.6).

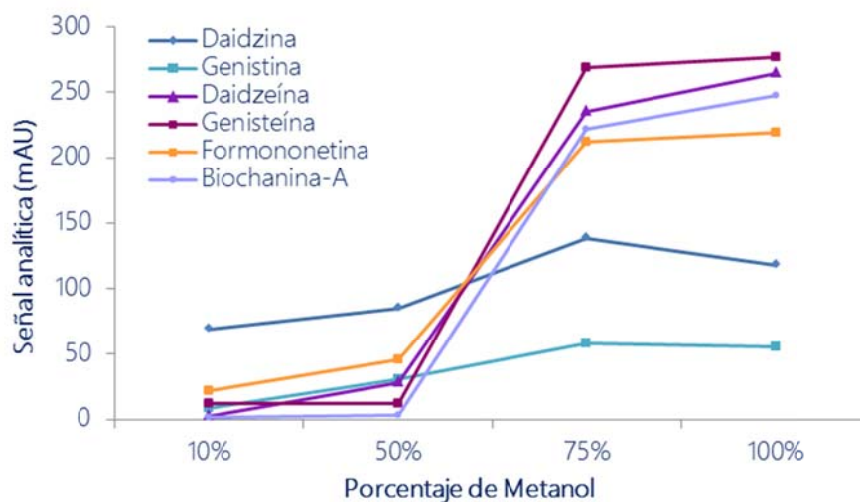


Figura 4.6. Influencia de la polaridad del extractante utilizado sobre la extracción de las isoflavonas.

Con objeto de comprobar la reproducibilidad en la extracción se utilizaron metanol como extractante y tierra de diatomeas y sulfato sódico anhidro como dispersantes. En la figura 4.7 se observa un diagrama de barras en el que se comparan las áreas de los picos cromatográficos de los estándares inyectados en directo y sometidos al proceso de extracción mediante PLE.

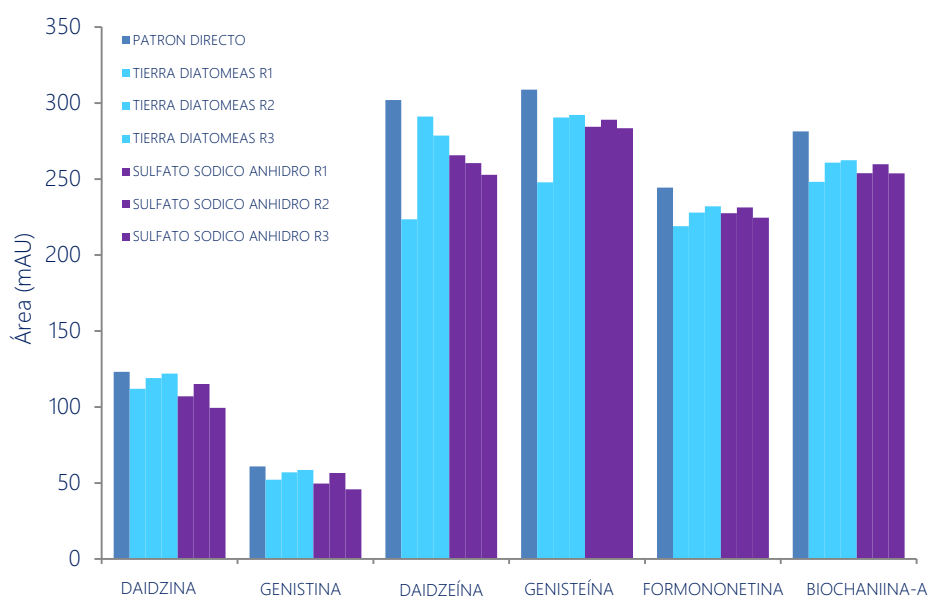


Figura 4.7. Reproducibilidad en la extracción de los analitos utilizando metanol como disolvente extractante.

Las desviaciones estándar varían entre 2.9 – 9.1 % en el caso de la tierra de diatomeas y entre 1.1 – 10.8 % para el sulfato sódico anhidro. De este estudio se puede concluir que la extracción mediante metanol presurizado es reproducible tanto utilizando tierra de diatomeas como sulfato sódico anhidro. No obstante, es preferible utilizar tierra de diatomeas como dispersante debido a que la presencia de humedad en las muestras puede provocar una hidratación del sulfato anhidro, dando lugar a una mala extracción.

4.1.3.3. Influencia de la cantidad de muestra

La cantidad de muestra es una de las variables más determinantes en la extracción y determinación de los analitos. Estrictamente se debería mencionar la relación cantidad de muestra : agente dispersante, ya que la celda, cuyo volumen es de 11 mL, contiene a ambos. Sin embargo, se considera señal analítica frente a cantidad de muestra debido a que el dispersante completa el volumen de la celda y debe de ser inerte desde el punto de vista de la extracción.

Se analizaron muestras de garbanzos y lentejas, en un rango de 1 a 5 gramos, empleando como extractante MeOH:H₂O (75:25, v/v) y un único ciclo de extracción.

Se debe de trabajar en condiciones en las que exista una relación lineal entre señal y cantidad de muestra, y por tanto en condiciones de no saturación. Como se puede observar en la figura 4.8, la señal analítica aumenta paulatinamente con la cantidad de muestra sin llegar a saturación. Debido a que una mayor cantidad de muestra implica extractos con más impurezas, se decide trabajar con cantidades de muestra entre dos y tres gramos.

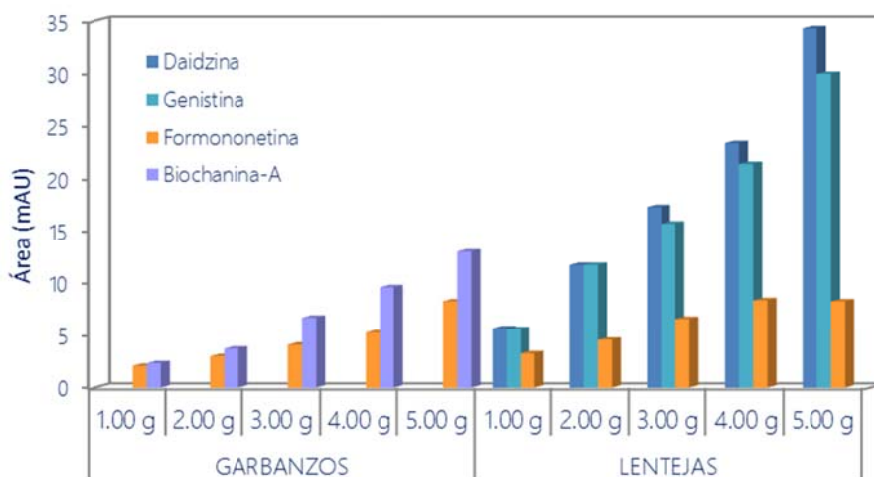


Figura 4.8. Influencia de la cantidad de muestra en el proceso de extracción.

4.1.3.3.4. Influencia del número de ciclos de extracción

En ocasiones, un único ciclo de extracción no es suficiente para extraer los analitos de la matriz de forma cuantitativa y sería necesario añadir nuevas porciones de disolvente durante el proceso de extracción para mejorar con ello la eficacia de la misma. Como es bien sabido, la cantidad de analito extraída aumenta al emplear pequeñas porciones de volumen del disolvente extractante frente a una única extracción con el volumen total del mismo.

Por este motivo se desarrolló un estudio sobre la influencia que ejerce el número de ciclos aplicados sobre la cantidad de analito extraída. Se realizó un estudio sistemático fijando la cantidad de muestra en 2.00 gramos y MeOH al 75 % como disolvente, tomando como variable el número de ciclos desde uno hasta cuatro.

En la figura 4.9 se muestra la influencia del número de ciclos sobre la eficacia de la extracción. Como se puede observar, no se aprecian diferencias significativas en la cantidad de analito extraída al aumentar el número de ciclos de extracción; sin embargo, sí se produce un aumento en la reproducibilidad de los datos analíticos obtenidos al aplicar tres o cuatro ciclos de extracción.

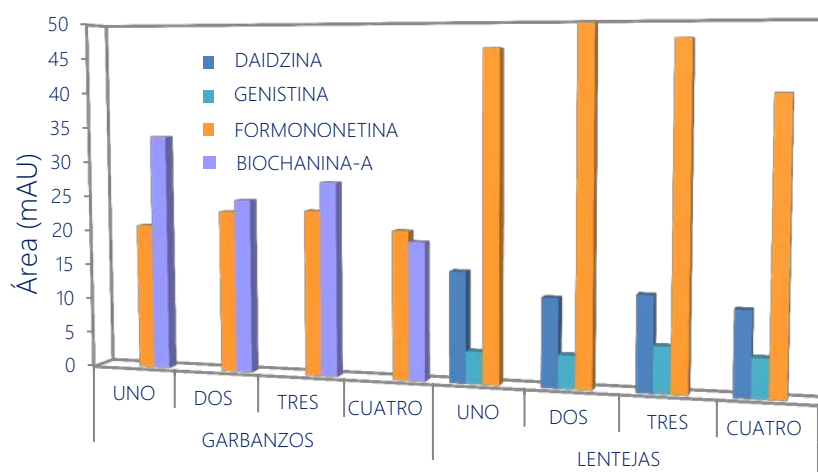


Figura 4.9. Influencia del número de ciclos en la extracción.

Por este motivo se decidió utilizar tres ciclos de extracción, puesto que el tiempo de extracción no se prolonga excesivamente y la reproducibilidad de los datos mejora considerablemente.

4.1.3.3.5. *Influencia de la temperatura*

Como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, presión y temperatura son parámetros que influyen de forma importante en el rendimiento de la extracción. El sistema de extracción utilizado es el ASE 100, que trabaja a una presión fija de 1600 psi (110 atm); por lo tanto, el parámetro experimental a optimizar será únicamente la temperatura.

El margen de temperaturas estudiado se ve condicionado por la estabilidad térmica de los analitos en estudio. Rostagno y cols.²³¹ observaron, en la extracción de isoflavonas en soja, que a temperaturas por encima de 100°C los malonil derivados se degradan en sus correspondientes glucósidos y éstos a su vez en las correspondientes agliconas cuando la temperatura es superior a 150°C.

Teniendo esto en cuenta y con objeto de encontrar la temperatura más adecuada para el proceso de extracción, se analizaron muestras de aproximadamente 3 gramos de lentejas y garbanzos empleando tres ciclos de extracción y MeOH:H₂O (75:25, v/v) como disolvente. Las temperaturas estudiadas estaban comprendidas entre 55 y 110°C. No se probaron temperaturas superiores a 110°C debido a la posible inestabilidad térmica de los analitos. Además, a esta temperatura se obtienen extractos turbios, lo que haría necesaria una etapa posterior de limpieza que aportaría complejidad al método.

En la figura 4.10 se pone de manifiesto, mediante un diagrama de barras, la influencia de la temperatura en la eficacia de la extracción. Como se puede observar, no hay diferencias significativas en el margen de temperatura estudiado. Se decide tomar como temperatura adecuada para el análisis 90°C, puesto que tanto la extracción como la reproducibilidad mejoran sin llegar a obtener extractos turbios. En estas condiciones no es necesaria una etapa de limpieza posterior.

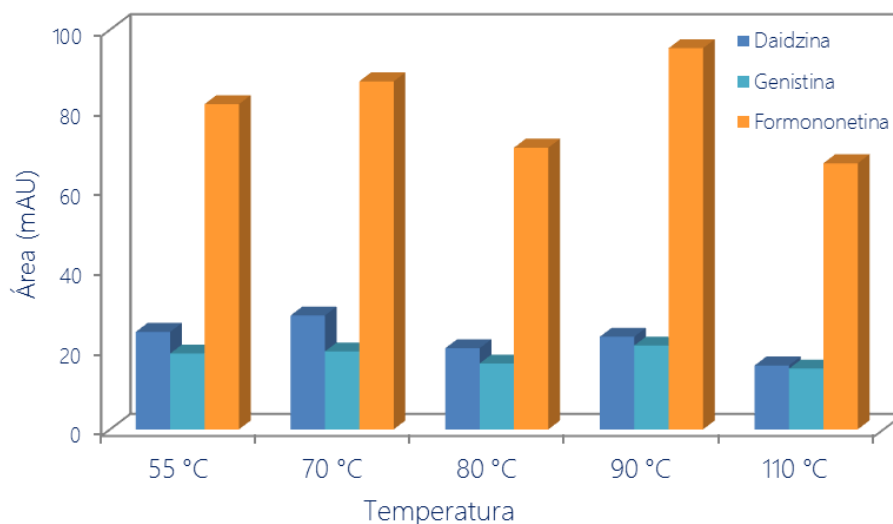


Figura 4.10. Influencia de la temperatura en la extracción de una muestra de lentejas.

4.1.3.4. Aplicación de la metodología propuesta a muestras reales

Las muestras de legumbres analizadas en este trabajo son las de consumo mayoritario en esta región. Los ensayos previos realizados con alubias no aportaron resultados adecuados; por ello, en este capítulo las muestras estudiadas fueron lentejas y garbanzos.

En los estudios llevados a cabo para optimizar las condiciones de extracción, se puso de manifiesto la importancia de la interacción del disolvente extractante y del agente dispersante con los analitos en estudio. Se comprobó que al disminuir la polaridad del disolvente extractante se producía un claro aumento de la señal analítica, patente sobre todo a partir del 75% de disolvente orgánico.

Según este estudio la extracción de los analitos de disoluciones patrón era óptima empleando MeOH al 100%. Sin embargo, en el caso de muestras

reales la eficacia de la extracción se ve favorecida por el empleo de mezclas de MeOH:H₂O o ACN:H₂O. Esta premisa es puesta de manifiesto por diversos autores^{21,101}, que verifican que la extracción de isoflavonas en alimentos procedentes o derivados de la soja se ve influenciada positivamente por el empleo de mezclas acuosas de disolventes orgánicos frente al disolvente orgánico en estado puro. Dicha presencia de agua en el disolvente extractante favorece de manera especial a la extracción de los derivados como los glucósidos, cuya polaridad es mucho mayor.

Teniendo en cuenta que las diferentes muestras objeto de estudio pueden contener distintos tipos de analitos, se estimó oportuno considerar en cada caso el extractante a utilizar para cada tipo de muestra, puesto que la extracción de las isoflavonas puede ser muy diferente.

Se probaron cuatro metodologías de extracción diferentes variando el disolvente extractante. Se realizaron extracciones con metanol al 100%, 75% y 50% sobre muestras secas y extracciones con metanol al 100% sobre muestras humedecidas un 20%.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3. Se observa que, para ambos tipos de muestras, la eficacia de la extracción se ve favorecida por la presencia de agua. Además, ésta es ligeramente mayor cuando el agua está presente en el disolvente extractante frente a cuando se añade a la muestra.

A la vista de estos resultados se eligen como condiciones óptimas la extracción con MeOH:H₂O sobre muestras secas en proporción 50:50 (v/v) para muestras de garbanzos y 75:25 (v/v) para muestras de lentejas. En la figura 4.11 se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando estas condiciones.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Tabla 4.3. Cantidades obtenidas en microgramo por gramo de materia seca para cada una de las isoflavonas empleando las metodologías propuestas para muestras de garbanzos y de lentejas.

	MUESTRAS SECAS			Muestras humedecidas 20%
	MeOH 100% ^a	MeOH 75% ^b	MeOH 50% ^b	MeOH 100% ^a
GARBANZOS				
Formononetina	0.9 ± 0.3	4.7 ± 0.9	4.3 ± 0.6	4.0 ± 0.6
Biochanina-A	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.7	4.2 ± 0.7	3.2 ± 0.3
LENTEJAS				
Daidzina	15 ± 1	13.1 ± 0.8	16 ± 1	10.0 ± 0.7
Genistina	2.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	3.9 ± 0.9	3.8 ± 0.3
Formononetina	7.7 ± 0.3	8.3 ± 0.5	6.0 ± 0.6	6.3 ± 0.7

^aResultados obtenidos para el análisis de cuatro réplicas.

^bResultados obtenidos para el análisis de seis réplicas.

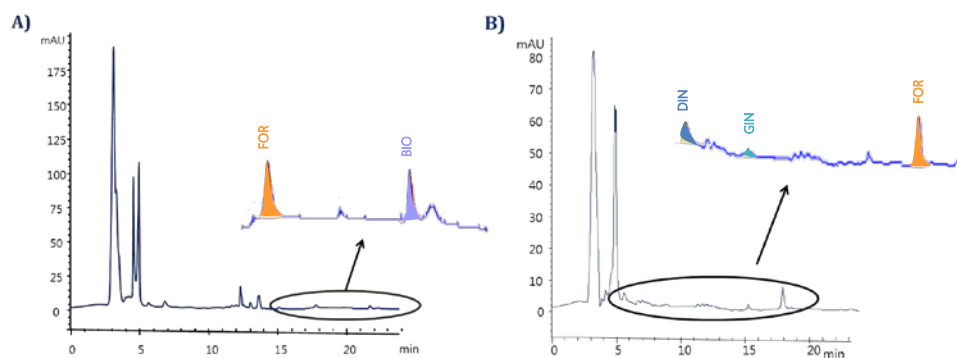


Figura 4.11. Cromatogramas de los extractos de muestras secas de garbanzos y lentejas aplicando PLE utilizando MeOH:H₂O (50:50, v:v) y MeOH:H₂O (75:25, v:v), respectivamente.

En la figura 4.12 se resume la metodología propuesta para la extracción de isoflavonas empleando la técnica de extracción mediante líquidos presurizados.



Figura 4.12. Metodología propuesta en la presente memoria para la extracción de isoflavonas utilizando el sistema ASE™ de Dionex, en muestras de legumbres.

4.1.3.4.1. *Confirmación de los analitos presentes en las muestras*

Como ya se ha mencionado previamente en la Memoria, la confirmación de la presencia de las distintas isoflavonas en las muestras se llevó a cabo empleando como sistema de detección espectrometría de masas en su modalidad de trampa iónica acoplado a cromatografía de líquidos.

Las condiciones experimentales han sido previamente descritas en el apartado 4.1.3 de este mismo capítulo.

Las relaciones m/z del ion precursor y el ion producto $(M+H)^+$ respectivo para cada uno de los analitos encontrados en las muestras son:

- *Daidzina* 417/255
- *Genistina* 433/271
- *Daidzeína* 255/137
- *Genisteína* 271/153
- *Formononetina* 269/254
- *Biochanina-A* 285/270

En la figura 4.13 se recoge el cromatograma (TIC) correspondiente a una muestra de garbanzos (extraída con metanol al 50%) y el espectro de masas de biochanina-A y formononetina

Se corrobora así mismo la especificidad del método, al no encontrarse sustancias propias de los garbanzos o de las lentejas que co-eluyan a los tiempos de retención característicos de las isoflavonas.

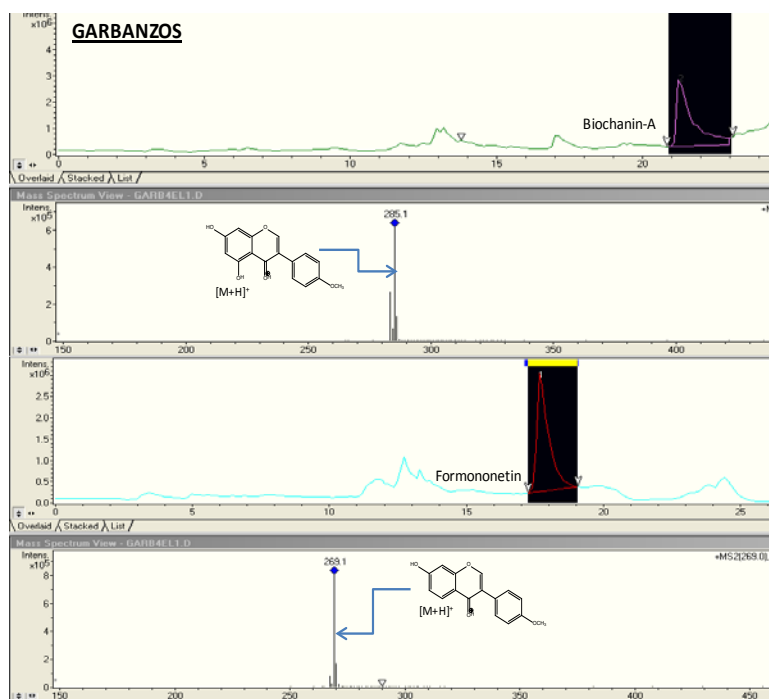


Figura 4.13. Espectro de MS de una muestra de garbanzos.

4.1.3.4.2. Características analíticas y límites de detección

Con objeto de conocer la respuesta cuantitativa de las isoflavonas en estudio, se inyectaron por duplicado diferentes disoluciones que contenían las seis isoflavonas, a seis niveles de concentración, desde $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ hasta 15 mg L^{-1} . La detección espectrofotométrica, como se ha mencionado anteriormente, se lleva a cabo a 254.1 nm .

La variable cuantitativa utilizada ha sido el área del pico cromatográfico, obteniéndose para todos los analitos curvas de calibración con buenos coeficientes de correlación lineal ($R^2 > 0.999$) tal y como se muestra en la tabla 4.4.

El límite de detección es la cantidad mínima de analito detectable con un cierto nivel de confianza y que corresponde a una señal analítica netamente diferenciable de la que produce el ruido de fondo. Uno de los criterios más utilizados en cromatografía líquida para establecer el límite de detección es calcular la cantidad o concentración de soluto que produce una señal analítica equivalente a tres veces la señal del ruido de fondo. Aplicando este criterio se obtienen valores comprendidos entre 0.015 y 0.073 mg L⁻¹, para la genistéina y la daidzina respectivamente.

Tabla 4.4. Características analíticas del método PLE-HPLC-DAD aplicado al análisis de isoflavonas en muestras de legumbres.

	Daidzina	Genistina	Daidzeína	Genisteína	Formononetina	Biochanina -A
Ordenada en el origen (ua)	$(-1.1 \pm 0.1) 10^1$	$(-1.0 \pm 0.8) 10^1$	$(-0.4 \pm 0.4) 10^1$	$(3.2 \pm 0.4) 10^1$	$(-0.1 \pm 0.9) 10^1$	$(1.6 \pm 1.6) 10^1$
Pendiente (ua mg L ⁻¹)	$(2.46 \pm 0.02) 10^1$	$(6.33 \pm 0.05) 10^1$	$(11.3 \pm 0.1) 10^1$	$(11.90 \pm 0.09) 10^1$	$(9.73 \pm 0.04) 10^1$	$(9.59 \pm 0.08) 10^1$
R ²	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999
LOD ^a (mg L ⁻¹)	0.073	0.028	0.016	0.015	0.018	0.019

^a S/N = 3

4.1.3.5. Validación de la metodología propuesta

La validación de la metodología propuesta se llevó a cabo comparando los contenidos de isoflavonas encontrados empleando esta metodología con los obtenidos utilizando un método diferente; concretamente se ha aplicado el Método Oficial de la AOAC 2008.03²³⁶ descrito para la determinación de isoflavonas en soja. Este método tiene un inconveniente y es que está descrito para muestras con contenidos en isoflavonas más altos que los que presentan las legumbres en estudio. En la figura 4.14 se recoge un breve resumen de este procedimiento.

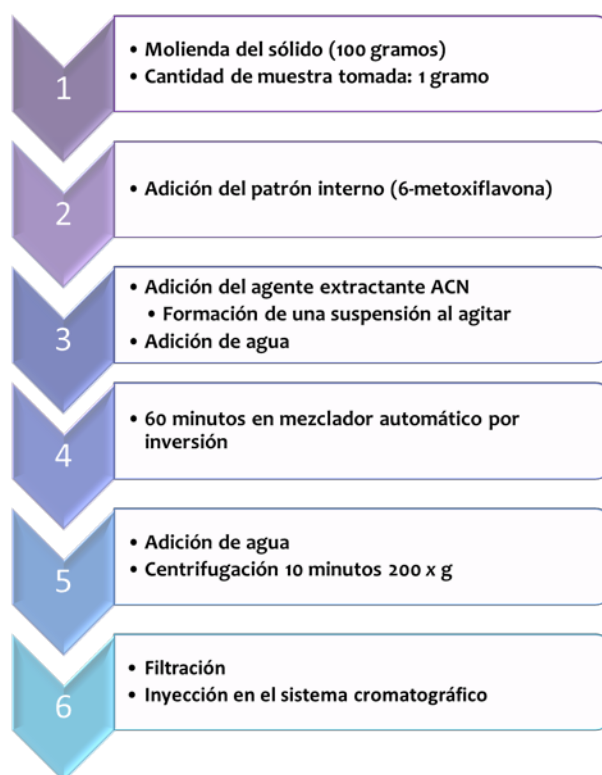


Figura 4.14. Protocolo de extracción de isoflavonas en muestras de soja. Método oficial de la AOAC 2008.03.

²³⁶ M.W. Collison; J. AOAC Int. 9 (3) (2008) 489

Para la aplicación de este método se aconseja que la muestra posea al menos 0.5 mg/g de analito. En nuestro caso, tanto las muestras de garbanzos como las de lentejas no alcanzan esos niveles, aún cuando se consideren las isoflavonas totales. Por ello la cantidad de muestra tomada fue 3.50 g en lugar de 1.00 g.

Otra variación respecto al método oficial es que la cuantificación se ha realizado por comparación directa con las rectas de calibrado, ya que se ha observado que la 6-metoxiflavona, patrón interno recomendado en bibliografía, no es estable; las áreas del pico cromatográfico correspondiente al patrón interno variaban con el tiempo.

En el caso de muestras de garbanzos se obtuvieron resultados no aceptables para asegurar la validación del método. En el caso de muestras de lentejas, mediante la utilización del método oficial en principio no se detectó ninguna isoflavona; sin embargo, si el extractante utilizado era metanol en lugar de acetonitrilo (recomendado en el método oficial) los derivados glucosados, daidzina y genistina, eran detectados.

En la tabla 4.5 se muestran los contenidos de estas isoflavonas encontrados en muestras de lentejas mediante ambos métodos. En el caso de los dos analitos citados se puede considerar que los resultados obtenidos no son significativamente diferentes, tal y como se deduce de los valores de p obtenidos, mayores que 0.05, al aplicar el test-t. Por lo tanto se podría deducir que la metodología queda validada en el caso de muestras de lentejas.

Tabla 4.5. Contenidos encontrados en muestras de lentejas empleando ambos métodos (microgramos/gramo); comparación de ambos métodos mediante un test-t.

	Método AOAC	Método Propuesto	p
	Microgramos/gramo		
Daidzina	14.82 ± 0.82	13.53 ± 1.62	0.306
Genistina	5.06 ± 0.72	3.96 ± 0.30	0.112

Otra forma de validar una metodología analítica es mediante la determinación de parámetros como recuperación, repetibilidad y reproducibilidad.

La recuperación se define como el porcentaje de concentración encontrada de una sustancia después de analizar muestras dopadas siguiendo el método propuesto. Para determinar las recuperaciones del método se aplicó el procedimiento optimizado a muestras de garbanzos y lentejas dopadas con 1.0 mL de una disolución estándar conteniendo 0.96 mg L⁻¹ de genistina y 3.00 mg L⁻¹ del resto de analitos. Las señales analíticas obtenidas en cada caso fueron introducidas en las correspondientes ecuaciones de calibración realizadas utilizando el método de patrón externo. Los porcentajes de recuperación se calcularon como:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{[\text{Muestra dopada}] - [\text{Muestra sin dopar}]}{[\text{Patrón añadido}]} \times 100$$

El estudio se realizó por triplicado, obteniéndose valores de recuperación superiores al 90 % en todos los casos, pudiendo ser considerados por tanto resultados altamente satisfactorios (Tabla 4.6).

La reproducibilidad se calculó como la precisión obtenida en el análisis de seis muestras de garbanzos y de lentejas aplicando la metodología durante cinco días consecutivos. En la tabla 4.6 figuran los valores de los coeficientes de variación obtenidos. En todos los casos los resultados son inferiores al 20%, por lo que se consideran aceptables, teniendo en cuenta la complejidad de la matriz y, que además, los analitos estudiados se encuentran en concentraciones bajas en estas muestras.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Tabla 4.6. Recuperación y reproducibilidad obtenidas en la validación del método propuesto a muestras de garbanzos y lentejas, expresadas como porcentaje (%).

		Daidzina	Genistina	Formononetina	Biochanina-A
Reproducibilidad ^a	Garbanzos			11.7	15.3
	Lentejas	7.1	9.4	7.2	
Recuperación ^b	Garbanzos			109	107
	Lentejas	97	103	99	

^a Expresada como RSD (%) (Reproducibilidad *inter-day* n=5)

^b n=3

4.1.4. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha desarrollado una metodología efectiva, simple y reproducible, basada en la extracción mediante líquidos presurizados seguida de una separación mediante cromatografía líquida acoplada a un sistema de detección espectrofotométrica con red de diodos, para el análisis de isoflavonas en muestras de legumbres.

Es importante destacar el hecho de que ésta ha sido la primera vez que se ha utilizado la técnica de extracción mediante líquidos presurizados para aislar isoflavonas de muestras como las lentejas y garbanzos, con un contenido inferior en estos analitos que otros alimentos como la soja y sus derivados.

Los extractos obtenidos fueron filtrados e inyectados directamente en el sistema cromatográfico sin ninguna etapa de limpieza previa, lo que pone de manifiesto la sencillez del método.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos referidos a precisión y recuperación, dicho método podría ser utilizado en análisis de control de isoflavonas en legumbres, fundamentalmente en el caso de glucósidos.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Anal. Bioanal. Chem. . 404 (2) (2012) 361

Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses

Ma. Milagros Delgado-Zamarreño ·
Lara Pérez-Martín · Myriam Bustamante-Rangel ·
Rita Carabias-Martínez

Received: 12 January 2012 / Revised: 23 February 2012 / Accepted: 28 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract In this work, we describe a rapid and simple analytical method that exploits pressurized liquid extraction (PLE) and liquid chromatography with diode array detection for the determination of isoflavones in samples of Spanish pulses. Confirmation of the analytes present was performed using ion-trap mass spectrometry. To optimize the PLE extraction, variables such as the dispersing agent, type of solvent and sample amount, and the experimental parameters, such as temperature and the number of extraction cycles, were studied. Separation was carried out using a reverse-phase C18 with polar endcapping as the stationary phase and acetonitrile/water with 0.2 % of formic acid, under a gradient regime, as the mobile phase. Optimal extraction of formononetin and biochanin-A from chickpeas with PLE was achieved using Hydromatrix as a dispersant agent, methanol/water (50:50), a temperature of 90 °C, and three cycles. The same optimal conditions—except methanol/water (75:25)—for solvent extraction were obtained for the extraction of daidzin, genistin, and formononetin from lentils. Recoveries ranged from 97 to 110 %, and standard deviations lower than 20 % were obtained. The contents obtained for daidzin in lentils using the proposed method were not significantly different from those obtained using another official method of analysis.

Keywords Isoflavones · Pressurized liquid extraction · Chickpeas · Lentils · Liquid chromatography

Introduction

The nutritional properties of foods are under constant surveillance with a view to controlling their quality. In this regard, pulses are foods with high contents of proteins, carbohydrates, fibre, and other micronutrients such as vitamins. Recently, the importance of bioactive compounds in human health has been confirmed and attracted considerable attention; hence, there is a need to develop new methods for their analysis. Pulses contain this type of compound, among which are isoflavones [1]. Among the legumes, soya [2] has high levels of these substances, and it has been studied in depth as regards its bioactive properties. The consumption of soya is not very high in Spain, unlike other legumes such as chickpeas and lentils, such that it would be of great interest to have data concerning both its nutritional and bioactive properties.

Isoflavones belong to a large group of natural substances present in plants. Their structure is based on a chromane skeleton with phenyl substituents at position C3. The structures vary as a function of the degree of methylation, hydroxylation, and glycosidation [3]. In light of this, the most common forms are daidzein, genistein, and glycitein, and the conjugated forms daidzin, genistin, and glycitin. There are also minor free forms such as formononetin and biochanin-A [4]. Both the presence and amount of isoflavones in plants, fruits, and vegetables may vary, depending on different factors such as variety, the year of harvest, storage, climatic conditions, etc. [5]. Interest in the consumption of isoflavones has increased in recent years owing to their possible influence in the prevention of certain

Published in the special paper collection *Progress on Environmental and Bioanalysis in Spain* with guest editors Alfredo Sanz-Medel and Elena Domínguez.

M. M. Delgado-Zamarreño (✉) · L. Pérez-Martín ·
M. Bustamante-Rangel · R. Carabias-Martínez
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Facultad de Ciencias Químicas,
Plaza de los Caídos s/n,
37008 Salamanca, Spain
e-mail: mdz@usal.es

Published online: 18 March 2012

 Springer

diseases or problems associated with menopause, cardiovascular disease, osteoporosis, and breast, prostate, and colon cancer [6–9].

From the point of view of the analysis of these substances in foods, one of the main problems is the complexity of the matrices and the need to isolate the analytes before their determination. Different authors have studied the sample treatments used for the determination of isoflavones, above all in soya products and derivatives [10, 11]. The isolation of these compounds is carried out using acid hydrolysis and/or alkaline saponification prior to analyte separation and quantification [12–14]. Although the treatment most commonly used is solvent extraction using traditional methodology, in discontinuous mode or with a Soxhlet device [15], currently, the use of stirring or sonication, such as ultrasonic-assisted extraction, is recommended [16–18]. Other authors have used methodologies in which extraction is carried out at high temperature and high pressure, above its critical point, such as supercritical fluid extraction (SFE), or not reaching this supercritical state, as is the case of pressurized liquid extraction (PLE). Different investigators have performed the extraction of isoflavones using SFE extraction from soybean cake [19], soybean flour [20], and soybean meal [21], but PLE is more widely used than SFE for the extraction of isoflavones. PLE has been used to extract isoflavones from soy foods [22] using only one type of extractant or performing two successive extractions with two different-polarity solvents [23]. Some authors have compared PLE and other extraction methods [24]. PLE also has been used for other plant matrices such as *Trifolium* L. species [25]. However, we have not found any references concerning the extraction of isoflavones in pulses, in which the contents of these compounds are lower.

Thus, one of the aims of the present work was to study extraction by pressurized liquids for the isolation of isoflavones in pulses widely consumed in Spain prior to their chromatographic determination via high-performance liquid chromatography LC-DAD. Confirmation of the analytes present was performed using LC-ion-trap MS.

Experimental

Instruments

The LC system used was a Hewlett-Packard Agilent 1100 Series (Waldbronn, Germany) that included a quaternary pump, a degasser, an autosampler, and a diode array detector. Chromatographic separation was achieved under gradient conditions using a Phenomenex (Torrance, CA, USA) Synergi 4 μ Hydro-RP 80A column (250 \times 4.6 mm). Temperature was maintained at 25 °C. The injection volume was 20 μ L. Quantification was performed at 254.1 nm. Agilent

ChemStation software for LC was used for data acquisition and analysis.

The LC/MSD Trap XCT (Waldbronn, Germany) ion-trap mass spectrometer was equipped with an electrospray (ESI) source with a nebuliser spacer. The ESI parameters were 3,500 V as capillary voltage, 11 L min⁻¹ as drying gas flow at a temperature of 350 °C, and 60 psi as the nebuliser pressure. The trap parameters were a maximum accumulation time of 200 ms at an *m/z* ranging from 60 to 400 u. A narrow isolation width of 4 u was selected.

Samples were ground with a Foss (Barcelona, Spain) Knifetec™1095

Extractions were achieved using a Dionex (Germany) ASE™ 100 pressurized liquid extraction system equipped with 11-mL stainless steel extraction cells and 250-mL Dionex bottles for extract collection.

Chemicals and materials

Daidzin CAS RN [552-66-9], genistin CAS RN [529-56-9], daidzein CAS RN [486-66-8], and biochanin-A CAS RN [491-80-5] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and genistein CAS RN [446-72-0] and formononetin CAS RN [485-72-3] were from Fluka (Steinheim, Germany). The organic solvents—HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN)—were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and formic acid was from Fluka (>98 %, Steinheim, Germany). Varian Hydromatrix® and washed sea sand (supplied by Scharlab S.L., Barcelona, Spain) and C18 from Sigma-Aldrich were used. Ultra-high-quality (UHQ) water was purified in an ElgaStat UHQ water purification system (High Wycombe, UK). Samples of chickpea from Fuentesauco (Zamora, Spain) and lentils from la Armuña (Salamanca, Spain) were purchased from local markets.

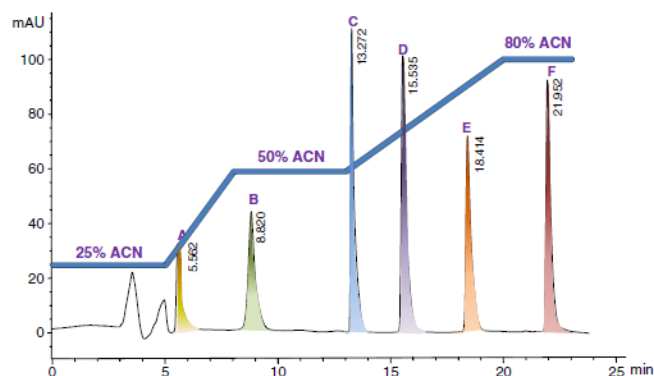
Procedure

The ground samples (2–3 g of legumes) were mixed with the dispersant agent (Hydromatrix) in order to prevent the aggregation of sample particles and were then placed in 11-mL extraction cells. After closure, the cells were placed in the oven of the ASE system. The optimized conditions were as follows: oven temperature, 90 °C; pressure, 110 bars, and three cycles, with a static time of 5 min. The extraction solvent depended on the nature of the sample to be extracted: methanol/water 50:50 and 75:25 for chickpeas and lentils, respectively. After extraction, a volume of clean solvent was pumped into the sample cell, and the solvent was then purged from the cell with nitrogen. The extracts were diluted to 25.0 mL and filtered through 0.45- μ m nylon

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses

Fig. 1 Optimized mobile phase gradient and chromatogram of standard solutions using optimised LC conditions



membranes before their injection (20 μ L) into the chromatographic system. Three replicate extractions and duplicate LC analyses of each extract were carried out for each sample.

Separations were carried out under gradient conditions. The mobile phase was a solution of ACN/H₂O with 0.2 % of formic in a gradient regime. The flow rate was 0.7 mL/min. Column temperature was maintained at 25 °C. Detection was carried out at 254.10 nm for all substances.

Results and discussion

Optimisation of LC method

Because β -glycosides and aglycons have similar structures, an isocratic regime cannot be used. The first study carried out here addressed the optimization of the gradient regime. Different mixtures of MeOH/H₂O and ACN/H₂O were tested as mobile phases, and in nearly all cases, mixtures of acetonitrile afforded better resolution than methanol. In all cases, the presence of formic acid produced a pH lower than the pK_a of isoflavones, and consequently, the isoflavones were not dissociated. The best gradient regime to obtain good resolution was as follows: ACN/0.2 % formic acid in H₂O 75:25 for 5 min, passing to 50:50 in 8 min and holding for 13 min, passing to 80:20 in 20 min and holding for

23 min, and finally passing to 75:25 in 30 min. Under these conditions, all the isoflavones eluted before 25 min (Fig. 1).

The detection of isoflavones was carried out using a UV–vis diode array detector. All analyses were performed at 254.1 nm, the wavelength corresponding to the absorption maximum for most isoflavones. A good linear relationship was observed between peak areas and analyte concentrations (Table 1) in the range of 0.10 to 15 mg/L. The detection and quantification limits are also included.

Optimization of the pressurized liquid extraction of isoflavones

Optimization of the extraction conditions generally involves study of the extraction solvent, the sample amount, temperature, pressure, the extraction time, and the number of extraction cycles. In previous studies addressing PLE extraction for vitamins [26], it was observed that the most important parameters in the extraction yield were the type of extraction solvent and the amount of sample used; the remaining variables had a less marked effect on the extraction process.

Influence of the type of dispersing agent

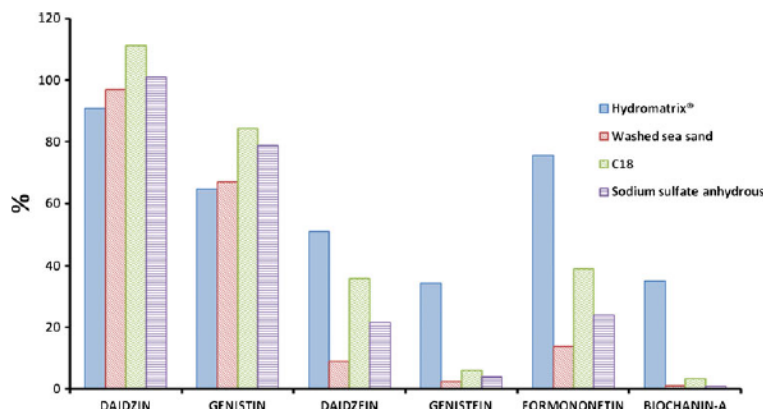
The samples were mixed with dispersant to prevent the aggregation of particles and so that extraction would occur

Table 1 Calibration curves and detection limits: Y (peak area) = $(a \pm S_a) + (b \pm S_b)X$ (in milligrams per litre)

Isoflavone	Intercept	Slope	R^2	LOD ^a (μ g/L)	LOQ ^b (μ g/L)
Daidzin	$(-1.1 \pm 0.1)10^1$	$(2.46 \pm 0.02)10^1$	0.999	73	243
Genistin	$(-1.0 \pm 0.8)10^1$	$(6.33 \pm 0.05)10^1$	0.999	28	93
Daidzein	$(-0.38 \pm 0.4)10^1$	$(11.3 \pm 0.1)10^1$	0.998	16	53
Genistein	$(3.2 \pm 0.4)10^1$	$(11.90 \pm 0.09)10^1$	0.999	15	50
Formononetin	$(-0.1 \pm 0.9)10^1$	$(9.73 \pm 0.04)10^1$	0.9999	18	60
Biochanin-A	$(1.6 \pm 1.6)10^1$	$(9.59 \pm 0.08)10^1$	0.999	19	63

^aLOD and LOQ for a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively

Fig. 2 Influence of the dispersant agent on the percentage of extraction of isoflavones. Dispersants spiked with 5 mg/L each isoflavone, 100 % methanol as extractant, 90 °C, and three cycles of extraction were used



homogeneously. Four dispersants were tested: Washed sea sand, Hydromatrix and anhydrous sodium sulphate, and even C18, in the event of it being required for a cleanup step. The whole method was as follows: at 90°C, three cycles of extraction with 100 % methanol as extractant were applied to each dispersant spiked with analytes at two concentration levels, to finally achieve 1.00 and 5.00 mg/L in 25.0 mL of extract.

The extracts obtained were injected, and the analytical signals were compared with those obtained from the same standard solutions injected directly with no extraction process. As can be seen in Fig. 2, the dispersants tested had no influence on the extraction of compounds with high polarity, such as isoflavone glucosides, but they did influence the extraction of aglycones. Hydromatrix® afforded the best results, and hence, this was chosen as dispersant.

Influence of the extraction solvent

The extraction solvent must solubilise the analytes with minimum co-extraction of other matrix components, and it must be compatible with the chromatographic system. In addition, the polarity of the solvent should be close to that of the analytes. Here, polar solvents, such as acetonitrile, methanol, ethanol, and mixtures of these with water, were tested. The best results were obtained when methanol/water was used, and hence, a more exhaustive study was carried out in order to minimize the adsorption of the isoflavones. Hydromatrix was spiked with 1.00 mL of isoflavone standards (24 µg/mL of genistin and 75 µg/mL for the others). In all cases, the extracts were brought up to 25.0 mL. The extractions were carried out with different methanol/water mixtures (100; 75:25, 50:50, 10:90); a temperature of 90 °C and three cycles were used.

The results showed that when the extractant polarity decreased, the analytical signal increased (Fig. 3). The highest

values were obtained for methanol/water percentages higher than 75:25. Under these conditions, upon studying reproducibility, relative standard deviations of 4.4, 6.0, 4.0, 9.1, 1.9, and 3.0 % were obtained for daidzin, genistin, daidzein, genistein, formononetin, and biochanin-A, respectively.

Optimisation of sample amount, number of cycles, and temperature

In order to apply PLE to pulses, optimization of the amount of sample was performed by weighing amounts of sample, chickpea or lentil, ranging from 1 to 5 g, completing the volume of the cell with Hydromatrix. The extractions were carried out with 75:25 methanol/water as the extraction solvent, using a single extraction cycle. The relationship between the amount of sample and the analytical signal was linear up to 4.0 g. In light of this, sample amounts of 2–3 g were weighed to carry out extraction.

In some cases, a single extraction cycle is not able to extract analytes from the matrix quantitatively, and fresh solvent must

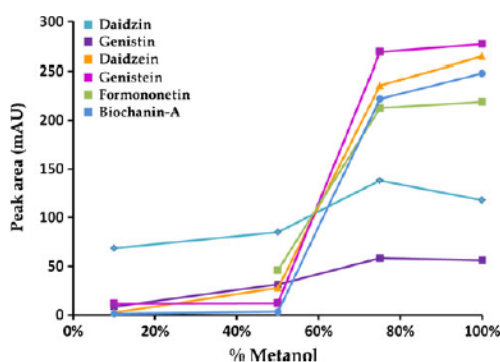


Fig. 3 Influence of extractant polarity on the extraction of isoflavones

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses

Table 2 Amount obtained, in micrograms per gram, of a dry sample of each isoflavone obtained after application of the proposed method in dry and moistened chickpea and lentil samples

	Dry samples			Moistened 20 % samples MeOH 100 % ^a
	MeOH 100 % ^a	MeOH 75 % ^b	MeOH 50 % ^b	
Chickpeas				
Formononetin	0.87±0.3	4.7±0.9	4.3±0.6	4.0±0.6
Biochanin-A	1.2±0.1	1.2±0.7	4.2±0.7	3.2±0.3
Lentils				
Daidzin	15±1	13.1±0.8	15.8±1.4	10.0±0.7
Genistin	2.2±0.3	4.3±0.3	3.9±0.9	3.8±0.3
Formononetin	7.7±0.3	8.3±0.5	6.0±0.6	6.3±0.7

^aResults from four replicate analyses

^bResults from six replicate analyses

be introduced during the extraction process in order to maximize extraction efficiency. In the present work, no significant differences were observed when the number of cycles was increased, although better reproducibility was obtained when three or four cycles were used. As a result, it was decided to use three extraction cycles for all the PLE experiments.

It is well known that the use of solvents at elevated temperatures increases both the capacity of the solvents to solubilise analytes and the diffusion rate. In addition, high temperatures decrease the viscosity of solvents and debilitate strong solute–matrix interactions. A study of the oven temperature was carried out: temperatures of 55, 70, 80, 90, and 110 °C were evaluated at a pressure of 1,600 psi. Temperatures over 110 °C were not tested because cloudy extracts were obtained, probably due to the presence of proteins. The best values were obtained in the 70–90 °C range, and finally, a temperature of 90 °C was chosen.

Determination of isoflavones in pulses

When the PLE method was applied to samples of pulses, chickpeas, and lentils, the extraction of isoflavones using methanol as solvent was lower than when methanol/water mixtures were used. Some authors [10, 27] have reported that the extraction of isoflavones from soy-based foods with methanol/water or acetonitrile/water was higher than when methanol or acetonitrile was used as the extraction solvents, especially for the glycoside forms. A more exhaustive study addressing the presence of water was performed. Extractions of isoflavones from dry and wet (20 % moistened) pulse samples were carried out: for dry samples, methanol and methanol/water, at 75:25 and 50:50, were used as extraction solvents whereas for wet samples, only methanol was used. Table 2 shows the results obtained. For both chickpeas and lentils, the presence of water in the extraction solvent increased the extraction of isoflavones better than water in the samples. The best results were obtained when the solvents were methanol/water, 50:50, and methanol/water, 75:25, for chickpeas and lentils, respectively. Figure 4 shows the chromatogram obtained for each sample. Reproducibility was checked as the precision on different days (inter-day). The relative standard deviation values obtained, for six samples over five consecutive days, were 12.9 and 15.3 % for formononetin and biochanin-A, respectively, in chickpeas, and 7.1, 9.4, and 7.2 % for daidzin, genistin, and formononetin, respectively, in lentils.

Confirmation of the nature of the analytes (formononetin and biochanin-A in chickpeas and daidzin, genistin, and formononetin in lentils) was carried out with a LC/MS–MS ion-trap mass spectrometer using the conditions described in the “Experimental” section. The m/z ($M+H$)⁺ of the precursor ion/product for each isoflavone were: 417/255 (daidzin), 433/271 (genistin), 255/137 (daidzein), 271/153 (genistein), 269/254 (formononetin), and 285/270 (biochanin-A). Moreover, the

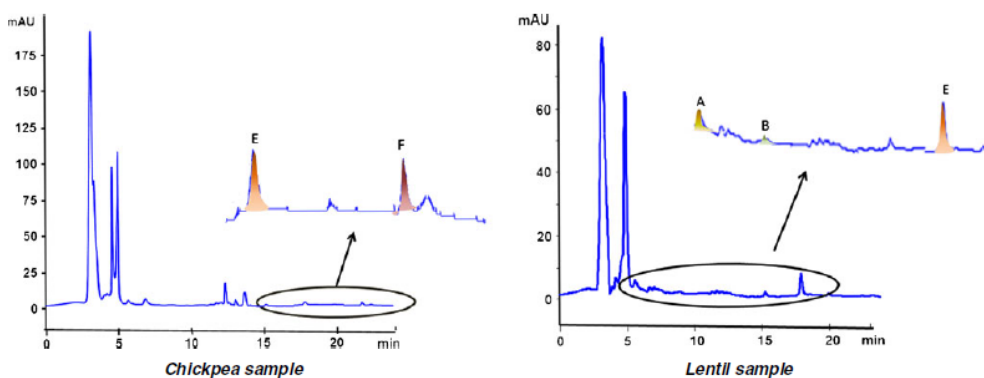


Fig. 4 Chromatograms obtained after application of the method to a sample of chickpeas or lentils. Solvent PLE extraction methanol/water 50:50 (v/v) for chickpeas and methanol/water 75:25 (v/v) for lentils. Analyte identification as in Fig. 1

specificity of the method was checked by the absence of any co-eluted peaks of the other components of the chickpea and lentil matrices at the retention times of isoflavones.

The recovery studies (three replicates) were carried out by spiking 2.7 g of sample with 1 mL of solution containing standards (0.96 mg/L of genistin and 3.00 mg/L for the others). PLE extraction and quantification were applied using the optimized parameters, described in the procedure reported in the "Experimental" section; the recoveries obtained (recovery (in percent)=(sample spiked-sample)/standard injected directly) were 109 and 107 % for formononetin and biochanin-A, respectively, in chickpeas, and 97, 103, and 99 % for daidzin, genistin, and formononetin, respectively, in lentils. These recoveries were considered satisfactory.

In order to validate the proposed method, lentil samples were analysed using this and the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) official method 2008.03 [28] developed for soy-based foods. The AOAC method is recommended for samples with higher contents of isoflavones than those found in pulses; accordingly, only daidzin was quantified. Also, the method was modified slightly: 3.5 g of sample instead of 1.0 g and methanol/water/dimethylsulfoxide instead of acetonitrile/water/dimethylsulfoxide were used. The results obtained for daidzin contents applying both methods were 14.8 ± 0.8 and 13.5 ± 1 for the AOAC method and the proposed method, respectively. Comparison of the results using the *t* test (0.306) indicated that the methods were not significantly different.

Conclusions

An effective, simple, and reproducible method based on pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography with diode array detection has been developed for the analysis of isoflavones in pulses. PLE has been applied for the first time for the isolation of isoflavones from this type of sample, whose contents in these substances are lower than those of soy-based foods. The extracts were filtered and injected directly into the LC system, with no additional cleaning step. With the proposed method, sample preparation is faster and easier than with the official AOAC method. Taking into account that the proposed method was validated and that the precision and recovery values obtained were acceptable, this methodology is suitable for control analyses of isoflavones in chickpeas and lentils.

Acknowledgments The authors acknowledge the financial support of the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2011-24075), and L.P.M. is also grateful to Junta de Castilla-León for an awarded doctoral fellowship.

References

- Rochfort S, Panozzo J (2007) *J Agric Food Chem* 55:7981–7994
- Mazur W (1998) *Bailliere Clin Endoc* 12:729–742
- Gikas E, Alesta A, Economi G, Karamanos A, Tsiropoulos A (2008) *J Liq Chromatogr R T* 31(8):1181–1194
- Luthria DL, Biswas R, Natarajan S (2007) *Food Chem* 105:325–333
- Achoui A, Boye JJ, Belanger D (2005) *Food Res Int* 38:1199–1204
- Anderson JJB, Gamer SC (1997) *Nutrition Today* 32:232–239
- Caragay AB (1992) *Food Technol* 46(4):65–68
- Messina M (1999) *Am J Clin Nutr* 70:574–575
- Klejdus B, Mikelová R, Adam V, Zehnález J, Vacek J, Kizek R, Kubán V (2004) *Anal Chim Acta* 517:1–11
- Rostagno MA, Villares A, Guillamón E, García-Lafuente A, Martínez JA (2009) *J Chromatogr A* 1216:2–29
- Shao S, Duncan AM, Yang R, Marcone MF, Rajcan I, Tsao R (2011) *Food Res Int* 44:2425–2434
- Breinhold P, Mosca L, Linder W (2002) *J Chromatogr B* 777:67–82
- Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M (2005) *J Agr Food Chem* 53:9436–9445
- Kalo P, Kuuranne T (2001) *J Chromatogr A* 935:237–248
- Vacek J, Klejdus B, Lojtková L, Kubá V (2008) *J Sep Sci* 31:2054–2067
- De Rijke E, Zafra-Gómez A, Ariese F, Brinkman UATH, Gooijer C (2001) *J Chromatogr A* 932:55–64
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG (2007) *Anal Chim Acta* 597:265–272
- Chukwumah YV, Walker LT, Verghese M, Bokanga M, Ogutu S, Alphonse J (2007) *J Agr Food Chem* 55:285–290
- Araújo JMA, Silva MV, Chaves JBP (2007) *Food Chem* 105:266–272
- Bajer T, Adam M, Galla L, Ventura K (2007) *J Sep Sci* 30:122–127
- Zuo YB, Zeng AW, Yuangk XG, Yu T (2008) *J Food Eng* 89:384–389
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG (2004) *Anal Chim Acta* 522:169–177
- Klejdus B, Vacek J, Adam V, Zehnález J, Kizek R, Trnkova L, Kubán K (2004) *J Chromatogr B* 806:101–111
- Lee MH, Lin CC (2007) *Food Chem* 105:223–228
- Zgórka G (2009) *Talanta* 79:46–53
- Delgado-Zamarreño MM, Bustamante Rangel M, Sierra Manzano S, Verdugo-Jara M, Carabias-Martínez R (2009) *J Sep Sci* 32:1430–1436
- Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K, Bøecher GR, Trainer D, Holden J (1999) *J Agr Food Chem* 47:2697–2704
- Collison MW (2008) *J AOAC Int* 91(3):489–500

4.2. EXTRACCIÓN EMPLEANDO LA METODOLOGÍA QuEChERS

4.2.1. OBJETIVO

Este capítulo está enfocado en la puesta a punto de una metodología de tratamiento de muestra basada en el método QuEChERS para la extracción de isoflavonas en muestras de legumbres. Esta metodología se ha aplicado fundamentalmente en la extracción de pesticidas en muestras de alimentos, sin embargo su aplicación a sustancias presentes de forma natural en los mismos es más escasa.

Para solucionar la principal desventaja comúnmente asociada al método QuEChERS (baja preconcentración de los compuestos en los extractos), se propone llevar a cabo el análisis posterior mediante cromatografía líquida de alta resolución, utilizando como detección espectrometría de masas en tándem en su modalidad de triple cuadrupolo. Este sistema proporciona una mayor sensibilidad y selectividad que los detectores convencionales, además de asegurar la identificación de los analitos estudiados.

La finalidad de este trabajo es desarrollar una metodología QuEChERS que pueda ser aplicada a la extracción de sustancias ligadas a la matriz como son las isoflavonas. Los estudios desarrollados tendrán en cuenta de manera especial el pH al que se realiza la extracción, así como la etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Esta etapa de limpieza puede ser altamente eficaz en la reducción del contenido de compuestos lipídicos co-extraídos de la matriz, pero existe la posibilidad de retención de parte de los analitos por el sorbente. Teniendo en cuenta la naturaleza no grasa de las muestras y el alto grado de selectividad y sensibilidad del sistema HPLC-MS/MS, se estudiará la posibilidad de analizar directamente los extractos obtenidos tras la etapa de extracción, sin someterlos a la d-SPE. De este modo se pretende que el procedimiento propuesto sea más sencillo, rápido, económico y con una menor posibilidad de introducir errores.

Por otra parte, con el fin de llevar a cabo la determinación conjunta de las isoflavonas en sus diferentes formas (glucosiladas y agliconas), que presentan polaridades muy diferentes, se planteará la extracción en dos

etapas consecutivas, en las que se modificará la polaridad del disolvente extractante.

Debido a la ausencia de materiales certificados, la metodología propuesta se validará estudiando parámetros como recuperación, repetibilidad y reproducibilidad.

Finalmente, se utilizará el método propuesto para analizar muestras comerciales de garbanzos, lentejas y alubias de la región de Castilla y León.

4.2.2. INTRODUCCIÓN

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas de preparación de muestra más consolidadas en los laboratorios de análisis. La versión clásica se ha utilizado durante muchos años, y aún hoy sigue siendo uno de los métodos de rutina más empleados. Es un procedimiento sencillo, que no requiere un equipamiento específico y su coste es pequeño. Sin embargo, el tratamiento de muestra previo es tedioso, presenta tiempos de análisis muy prolongados y utiliza grandes cantidades de disolventes orgánicos, cuyo uso está cada vez más restringido. La tendencia actual consiste en desarrollar versiones miniaturizadas del procedimiento convencional a las que se ha denominado técnicas de microextracción con disolventes (SME).

Como es bien sabido, el fundamento de LLE consiste en la separación de compuestos que tienen solubilidades diferentes en dos líquidos inmiscibles. Generalmente se ha aplicado para la extracción de compuestos orgánicos en agua o matrices acuosas. Como disolvente extractante se utiliza un disolvente orgánico apolar (inmiscible con el agua) de manera que los compuestos no polares, con mayor afinidad por la fase orgánica, se extraen en esta fase. El inconveniente de utilizar disolventes no polares es que la eficacia de la técnica para la extracción de compuestos orgánicos altamente polares, es muy limitada. Sin embargo, el uso de disolventes más polares, parcial o totalmente miscibles con el agua, no es posible, ya que no se consigue una adecuada separación de fases.

Para solucionar este inconveniente y poder ampliar la aplicación de la técnica LLE a la extracción de compuestos polares, se ha utilizado la adición de sales. El procedimiento consiste en añadir una alta concentración de sales sobre la mezcla de agua con un disolvente orgánico miscible o parcialmente miscible, y por la solvatación de los iones de las sales con las moléculas de agua, se consigue la separación de las dos fases miscibles (acuosa/orgánica)²³⁷. Este fenómeno se conoce como separación de fases inducida por sales y el procedimiento de extracción basado en este principio

²³⁷ G.B. Frankforter, L. Cohen; *J. Am. Chem. Soc.* 36 (1914) 1103

se denominó extracción líquido-líquido asistida por sales (*Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction, SALLE*)²³⁸.

La principal desventaja de la técnica SALLE radica en que el extracto orgánico obtenido suele contener muchos compuestos polares co-extraídos de la matriz, que en muchas ocasiones, interfieren en la determinación de los compuestos objeto de estudio. Este hecho hace que, en la mayoría de los casos, sea necesario someter al extracto orgánico a diversas etapas de limpieza antes de llevar a cabo el procedimiento de determinación. Otra posibilidad es la de analizar directamente el extracto, utilizando un detector altamente selectivo.

Las aplicaciones de esta técnica de extracción se han centrado especialmente en el área del análisis de pesticidas. El primer método multiresiduo (*Multiresidue method, MRM*) que se desarrolló para el análisis de pesticidas en matrices alimenticias data de 1963 y es el denominado método Mills²³⁹. La extracción de los compuestos se conseguía con acetonitrilo, y para lograr la separación de fases (acetonitrilo/agua) se utilizaron éter de petróleo y cloruro sódico. También se desarrollaron métodos que utilizaban como disolvente extractante acetona en lugar de acetonitrilo^{240,241}. En todos ellos se utilizaron un disolvente no polar (diclorometano o éter) y cloruro sódico para lograr la separación de fases.

A partir de los años 70, como consecuencia de los problemas para la salud humana y el medio ambiente relacionados con el uso de disolventes clorados, se desarrollaron nuevos métodos basados en SALLE en los que se conseguía la separación de fases simplemente añadiendo sales, es decir, sin necesidad de utilizar disolventes apolares para inducir dicha separación.

Las principales investigaciones se centraron en los sistemas acetona-agua^{242,243}, acetonitrilo-agua^{244,245,246} y acetato de etilo-agua^{247,248}. El

²³⁸ R.E. Majors; *LCGC North America*, Jul 1 (2009)

²³⁹ P.A. Mills, J.H. Onley, R.A. Gaither; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46 (1963) 186

²⁴⁰ M. Luke, J.E. Froberg, H.T. Masumoto; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58 (1975) 1020

²⁴¹ W. Specht, M. Tilkes, J. Fresenius; *Anal. Chem.* 301 (1980) 300

²⁴² M. Luke, I. Cassias, S. Yee; *Lab. Inform. Bull. N°4178*, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 1999 Rockville, MD

²⁴³ F.J. Schenck, P. Callery, P.M. Gannett, J.R. Daft, S.J. Lehotay; *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1177

²⁴⁴ J. Cook, M.P. Beckett, B. Reliford, W. Hammock, M. Engel; *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1419

inconveniente de los procedimientos que emplean acetona como extractante es que ésta es demasiado miscible con el agua para lograr una adecuada separación de fases sin la adición de disolventes apolares. El acetonitrilo es menos miscible con el agua que la acetona, por lo que es posible lograr una separación de fases satisfactoria con la adición de la cantidad adecuada de sales. El acetato de etilo tiene la ventaja de ser lo suficientemente miscible con el agua como para lograr una adecuada penetración en los tejidos vegetales²⁴⁹ y, además, su solubilidad en agua es menor que la de los otros disolventes citados, por lo que la separación de fases se consigue fácilmente con la adición de una sal desecante, capaz de eliminar el posible agua que quede en la fase orgánica.

En el año 2003, Anastassiades y Lehotay²⁵⁰, modificaron la técnica SALLE para adaptarla a las exigencias medioambientales y analíticas vigentes. El nuevo método mantiene la simplicidad y eficacia del procedimiento convencional pero utiliza la menor cantidad posible de muestra, así como una pequeña cantidad de disolventes orgánicos y material básico de laboratorio. La técnica en sus inicios fue diseñada para la extracción de una amplia gama de pesticidas en matrices de frutas y verduras y se le asignó el acrónimo de **QuEChERS** (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe), que hace referencia a sus principales ventajas: rápido, sencillo, barato, eficaz, robusto y seguro. Se trata de un método que combina la extracción / aislamiento de los analitos de la matriz, fundamentándose en una extracción líquido-líquido asistida por sales y una etapa de limpieza del extracto empleando extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE).

En el desarrollo del método se estudiaron diferentes disolventes de extracción. Los disolventes utilizados habitualmente en la extracción de pesticidas de matrices alimentarias son la acetona, el acetato de etilo y el acetonitrilo²⁴⁸. A pesar de que las recuperaciones obtenidas con todos ellos

²⁴⁵ R.S. Sheridan, J.R. Melo; *J. AOAC Int.* 82 (1999) 982

²⁴⁶ S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, J.A. Harman-Fetcho, D.A. Donoghue; *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4589

²⁴⁷ K. Barnerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule; *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98

²⁴⁸ K. Mastovská, S.J. Lehotay; *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259

²⁴⁹ A. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová; *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 54

²⁵⁰ M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenk; *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412

eran altas, se optó por el acetonitrilo ya que presentaba una mayor selectividad en la extracción de los compuestos menos polares, disminuyendo la extracción de analitos interferentes y facilitando la separación de la fase acuosa.

Para evitar el uso de co-disolventes, se estudiaron diferentes combinaciones de sales para inducir la separación de fases. Entre las sales probadas, eligieron el sulfato de magnesio debido a su capacidad de reducir significativamente la fase acuosa, lo que favorece el reparto de los pesticidas en la fase orgánica. La adición de NaCl produce un aumento en la extracción de los componentes más polares. Una adecuada combinación de sales permite controlar la cantidad de agua en la fase orgánica, lo que permite un cierto grado de ajuste en la polaridad de las fases y, por tanto, un control de la selectividad. La proporción más adecuada para lograr altas recuperaciones de los pesticidas más polares y evitar la co-extracción de otros componentes de la matriz es $\text{MgSO}_4:\text{NaCl}$ (4:1, p/p).

Los autores del método propusieron una determinada puesta en contacto de la muestra con el disolvente extractante, la agitación mediante mezclador vórtex. El uso de este tipo de agitación proporciona ventajas como que la extracción se puede llevar a cabo en recipientes cerrados, se evita el uso de disolventes orgánicos de lavado entre muestras consecutivas, ya que se utiliza un tubo (contenedor) para cada extracción, lo que también elimina la posibilidad de transferencia de una muestra a otra, etc.

La siguiente propuesta por parte de los autores fue una simplificación de la etapa de limpieza utilizada tras la extracción. El nuevo procedimiento de limpieza se denominó extracción en fase sólida dispersiva (*dispersive-Solid Phase Extraction*, d-SPE). El proceso consiste en añadir un determinado volumen del extracto orgánico en un vial que contiene una pequeña cantidad de un material adsorbente, generalmente una amina primaria-secundaria (*Primary Secondary Amine*, PSA). La mezcla se agita con un vórtex de manera que, idealmente, los compuestos interferentes de la matriz quedan retenidos en el adsorbente, mientras que los analitos objeto de estudio permanecen en el extracto. El siguiente paso es la eliminación del material adsorbente, mediante filtrado o centrifugación, quedando el extracto orgánico listo para su análisis. Este procedimiento ha demostrado

ser altamente eficaz en la eliminación de gran parte de los compuestos lipídicos co-extraídos de la matriz. Además presenta ventajas frente al proceso de SPE convencional, tales como ser más rápido y sencillo, o requerir menos cantidad de disolventes orgánicos y material.

En la Tabla 4.7 se muestra una comparación entre el proceso convencional de SPE y el de extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE)^{250, 251, 252}.

Tabla 4.7. Comparación del método tradicional de SPE con d-SPE.

	SPE	d-SPE
VENTAJAS	Asegura una mejor limpieza de la muestra	Recuperaciones buenas y reproducibles
		No se requieren pretratamientos de muestra ni material específico, por lo que es más rápido y barato
		Cantidad de muestra y sorbente empleado menor
		Proporciona una mejor interacción con el extracto para la limpieza
DESVENTAJAS	Requiere material específico como cartuchos y colectores de vacío	Únicamente se puede utilizar si el sorbente elimina los interferentes de la matriz y no los analitos
	Requiere gran cantidad de muestra	
	Requiere preacondicionamientos	
	Genera residuos de disolventes	

²⁵¹ S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield; *J. AOAC Int* 88 (2005) 615

²⁵² S.J. Lehotay, K. Mastovska, S.J. Yun; *J. AOAC Int* 88 (2005) 630

En la figura 4.15 se han representado de forma detallada las diferentes etapas del proceso completo (extracción + limpieza) desarrollado inicialmente para la extracción de pesticidas en matrices de frutas y verduras



Figura 4.15. Etapas del procedimiento QuEChERS original.

A partir del procedimiento original han surgido diversas modificaciones dependiendo de las propiedades del analito, la composición de la matriz y las técnicas o equipos disponibles en el laboratorio²⁵³. Una de las principales modificaciones llevadas a cabo es la utilización de diferentes soluciones

²⁵³ S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon; *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548

tamponadas para mejorar la eficacia de la extracción de compuestos con propiedades ácido-base²⁵⁴ y evitar la degradación de determinados pesticidas. Las disoluciones tamponadas más utilizadas son las de acetato^{253,255} y las de citrato^{256,257}. Otra variación importante es la adición de agua sobre muestras secas, con el fin de obtener la humedad adecuada^{258,259}.

En la etapa de limpieza, mediante d-SPE, también se han desarrollado algunas modificaciones relacionadas con el uso de diferentes materiales adsorbentes. En el caso de matrices con alto contenido en grasas, se ha recomendado el uso de C18 junto con el PSA, ya que proporciona una limpieza adicional de los compuestos lipídicos co-extraídos^{260,261}. Por otro lado, el uso de GCB (*Graphitized Carbon Black*) en combinación con el PSA, ha demostrado su eficacia en la eliminación de pigmentos como carotenoides y clorofilas de los extractos²⁶². También se han desarrollado algunas aplicaciones en las que se utiliza el procedimiento de limpieza mediante SPE convencional, en cartuchos como Florisil^{263,264,265}. Otras de las modificaciones propuestas han sido el uso de hielo seco, para separar las

²⁵⁴ S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven; *J. AOAC Int* 88 (2005) 595

²⁵⁵ S.J. Lehotay; *J. AOAC Int* 90 (2007) 485

²⁵⁶ M. Anastassiades, E. Scherbaum, B. Tsdelen, D. Štajnbaher, H. Ohkawa, H. Miyagawa, P.W. Lee (Eds); *Crop Protection Public Health, Environmental Safety*, Wiley – VCH, Weinheim, Germany, 2007 pp 439-458

²⁵⁷ European Standard EN 15662, *European Committee for Standardization*, Brussels, 2008

²⁵⁸ T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee; *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 67

²⁵⁹ U. Koesukwiwat, S.J. Lehotay, K. Mastovska, K.J. Dorweiler, N. Leepipatpiboon; *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5950

²⁶⁰ U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon; *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 10

²⁶¹ P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tsdelen, J. Oliva, A. Barba; *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697

²⁶² K. Mastovska, K.S. Dorweiler, S.J. Lehotay, J.S. Wegscheid, K.A. Szpylka; *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5959

²⁶³ A. Wikowska, M. Biziuk; *Food Chem.* 125 (2011) 803

²⁶⁴ L. Pareja, A.R. Fernández-Alba, V. Cesio, H. Heinzen; *TRAC-Trend Anal. Chem.* 30 (2011) 270

²⁶⁵ F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong; *J. AOAC Int.* 91 (2008) 422

fases sin necesidad de llevar a cabo el *salting-out*²⁶⁶, y la eliminación de la etapa de limpieza²⁶⁷.

El método ha recibido gran aceptación a nivel mundial y ha sido validado en estudios interlaboratorios para numerosos pesticidas en diversas matrices de alimentos^{247,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278}. Recientemente, ha recibido la distinción de Método Oficial de la AOAC Internacional²⁵⁵.

A pesar de que originariamente la metodología QuEChERS surgió como un método específico para el análisis de pesticidas en matrices alimentarias, su eficacia y flexibilidad lo han convertido en una potente herramienta que ha sido utilizada para la determinación de otros compuestos en otro tipo de matrices, tales como la determinación de compuestos farmacéuticos^{279,280,281,282,283}, antibióticos β -lactámicos^{284,285}, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)²⁸⁶ o residuos de drogas y

²⁶⁶ S.W. Lee, J.H. Choi, S.K. Cho, H.A. Yu, A.M. Abd El-Aty, J.H. Shim; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4366

²⁶⁷ C. García-Pinto, M.E. Fernández-Laespada, S. Herrero-Martín, A.M. Casas-Ferreira, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero; *Talanta* 81 (2010) 385

²⁶⁸ F.J. Schenck, J.E. Hobbs; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73 (2004) 24

²⁶⁹ D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis; *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1663

²⁷⁰ C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker; *Food Control* 19 (2008) 906

²⁷¹ J. Hernández-Borges, J. Cabrera-Cabrera, M.A. Rodríguez-Delgado, E.M. Hernández-Suárez, V.G. Saúco; *Food Chem.* 113 (2009) 313

²⁷² C.C. Leandro, R.J. Fussel, B.J. Keely; *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 207

²⁷³ C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussel, B.J. Keely; *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94

²⁷⁴ E. Cieslik, A. Sadowska-Rociek, J.M.M. Ruiz, M. Surma-Zadora; *Food Chem.* 125 (2011) 773

²⁷⁵ T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovská, S.J. Lehotay; *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281

²⁷⁶ S.C. Cunha, J.O. Fernandes, A. Alves, M.B.P.P. Oliveira; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 119

²⁷⁷ S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovská J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira; *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620

²⁷⁸ R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal; *Talanta* 76 (2008) 211

²⁷⁹ F. Plössl, M. Giera, F. Bracher; *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19

²⁸⁰ A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska; *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259

²⁸¹ M.M. Aguilera-Luiz, J.L. Martínez-Vidal, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich; *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10

²⁸² G. Stubbings, T. Bigwood; *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68

²⁸³ B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher; *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196

²⁸⁴ C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay; *Anal. Chem.* 77 (2005) 1473

²⁸⁵ K. Mastovská, A.R. Lightfield; *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 118

²⁸⁶ M.J. Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B.P.P. Oliveira; *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529

medicamentos^{287,288,289,290} en muestras de interés biológico, o la determinación de compuestos xenobióticos²⁹¹ y residuos de medicamentos^{292,293} en matrices de alimentos.

Existen pocas referencias bibliográficas^{294,295,296} acerca de la utilización de dicha metodología para extraer sustancias presentes de forma natural en las diferentes matrices.

En la presente memoria se desarrolla una versión modificada del método QuEChERS, adaptada a muestras de legumbres, para la extracción de isoflavonas, compuestos naturalmente presentes en estas matrices.

²⁸⁷ J.L. Westland, F.L. Dorman; *J. Pharm. Analysis* 3 (6) (2013) 509

²⁸⁸ K. Usui, Y. Hayashizaki, M. Hashiyada, M. Funayama; *Legal Medicine* 14 (6) (2012) 286

²⁸⁹ S. Matsuta, K. Nakanishi, A. Miki, K. Zaitso, N. Shima, T. Kamata, H. Nishioka, M. Katagi, M. Tatsuno, K. Tsuboi, H. Tsuchihashi, K. Suzuki; *Forensic Sci. Int.* 232 (1–3) (2013) 40

²⁹⁰ L. Anzillotti, S. Odoardi, S. Strano-Rossi; *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 99

²⁹¹ E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, M. Mateos-Vivas, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez; *Electrophoresis* 35 (2014) 1677

²⁹² J. Domínguez-Álvarez, M. Mateos-Vivas, D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez; *J. Chromatogr. A* 1278 (2013) 166

²⁹³ Y. Chen, W. Schwack; *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 249

²⁹⁴ A.R. Fontana, R. Bottini; *J. Chromatogr. A* 1342 (2014) 44

²⁹⁵ V.M. Burin, N.E. Ferreira-Lima, C.P. Panceri, M.T. Bordignon-Luiz; *Microchem. J.* 114 (2014) 155

²⁹⁶ M. Bustamante-Rangel, M.M Delgado-Zamarreño, L. Pérez-Martín, R. Carabias-Martínez; *Microchem. J.* 108 (2013) 203

4.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.3.1. Procedimiento analítico

La etapa de pretratamiento de muestra mediante el método QuEChERS propuesto consta de una serie de etapas, optimizadas en el estudio llevado a cabo, y que se describen a continuación.

En un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL con tapón de rosca se deposita la cantidad de muestra adecuada (5 gramos para garbanzos y alubias blancas y 7 gramos para lentejas). La extracción se lleva a cabo en dos etapas. En la primera de ellas se adicionan sobre el sólido 10.0 mL de una mezcla ACN : H₂O (70:30, v/v) y se agita con un vórtex durante un tiempo de 5 minutos. A continuación se añaden 5.0 ml de ACN puro, ocasionando por tanto un cambio en la polaridad del extractante. Esta mezcla se agita de nuevo durante 5 minutos con la ayuda de un sistema vórtex. Tras la extracción, se añade una mezcla de sales que favorezca la separación de las fases. En el caso de garbanzos y alubias blancas la mezcla está formada por 1 g de NaCl, 4 g de MgSO₄ y un tampón citrato constituido por 1 g de citrato de trisodio dihidratado y 0.5 g de hidrogenocitrato de disodio sesquihidratado. En el caso de lentejas únicamente se adiciona la mezcla formada por sulfato de magnesio y cloruro sódico (4:1, p/p). Esta mezcla debe agitarse vigorosamente durante un minuto e inmediatamente después de la adición de las sales para evitar la formación de conglomerados como consecuencia de la hidratación de la sal. Finalmente, el tubo se centrifuga a una velocidad de 5000 rpm durante 5 minutos. Los extractos son filtrados con filtros de PVDF de 0.22 µm de tamaño de poro, antes de su análisis cromatográfico.

En la figura 4.16 se muestra una comparación entre el procedimiento QuEChERS original para muestras secas y la versión modificada propuesta en este trabajo.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

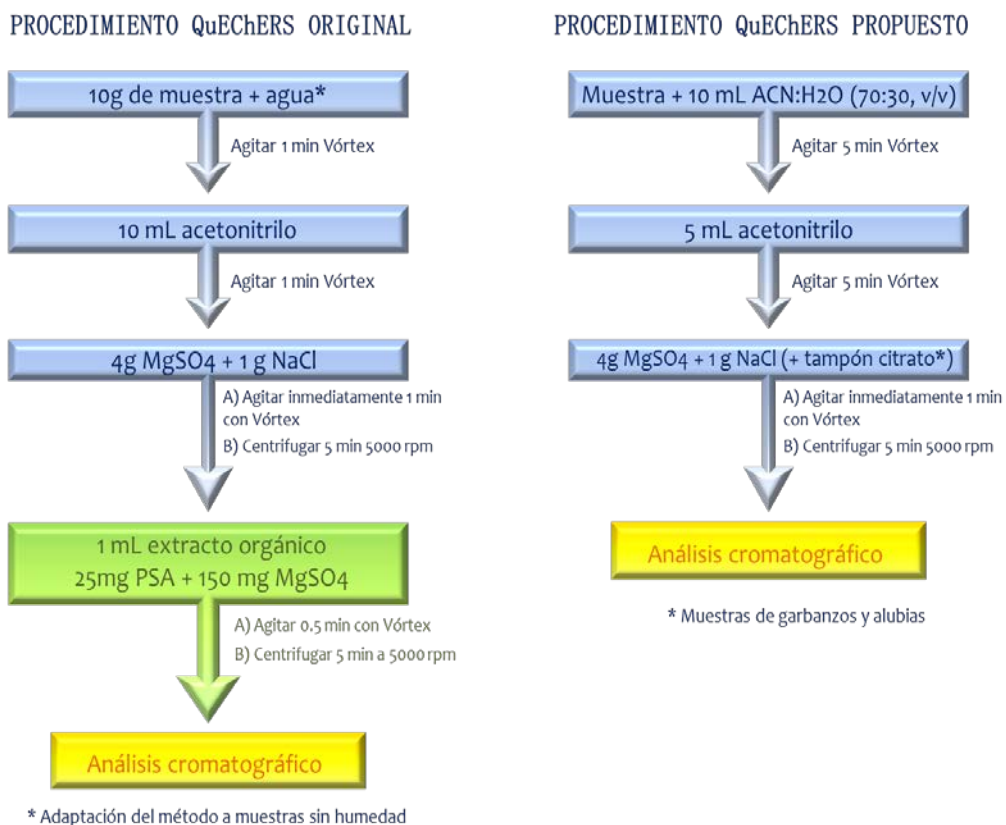


Figura 4.16. Comparación del método propuesto respecto al método QuEChERS original adaptado a muestras de legumbres.

El análisis de las muestras se lleva a cabo empleando un sistema de cromatografía líquida con columna de UHPLC, acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

4.2.3.2. Optimización de las variables que influyen en el sistema cromatográfico

La separación cromatográfica fue optimizada para obtener la mejor resolución y eficacia en el menor tiempo posible.

En este caso, la separación se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm) 1.8 μm de Agilent, empleando un volumen de inyección de 10 μL . La detección, identificación y posterior cuantificación de los analitos se llevó a cabo mediante un sistema de espectrometría de masas de triple cuadrupolo de Agilent.

4.2.3.2.1. Optimización de la fase móvil

En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior (*Capítulo 4.1. Extracción mediante líquidos presurizados*), se decidió utilizar como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua acidificada con ácido fórmico al 1 %, con objeto de que los analitos se encuentren en forma neutra. Tanto el flujo como el gradiente de elución empleados se adaptaron a las condiciones de la nueva columna y del nuevo detector.

En la tabla 4.8 se muestra el gradiente que proporciona la mejor separación de los picos cromatográficos, en el menor tiempo posible y alejados del frente de inyección, utilizando un flujo de fase móvil de 0.5 mL min^{-1} .

En la figura 4.17 se muestra el cromatograma obtenido a 254.10 nm en las condiciones optimizadas para una mezcla patrón de ocho isoflavonas (todos los analitos estudiados), inyectados en metanol a una concentración de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se observa que se alcanza una buena resolución para 4 de las isoflavonas estudiadas en un tiempo inferior a 12 minutos. En el caso de gliciteína y glicitina existe un solapamiento con daidzeína y daidzina respectivamente, pero este problema se resuelve al utilizar posteriormente la detección mediante espectrometría de masas.

Tabla 4.8. Gradiente propuesto para la separación cromatográfica, utilizando fase móvil formada por ACN y agua con ácido fórmico al 1%.

TIEMPO (min)	% ACN
0 – 1.5	10
1.5 – 2.5	10 → 25
2.5 – 3.5	25
3.5 – 7	25 → 50
7 – 8	50 → 80
8 – 10.5	80
10.5 – 12.5	80 → 10

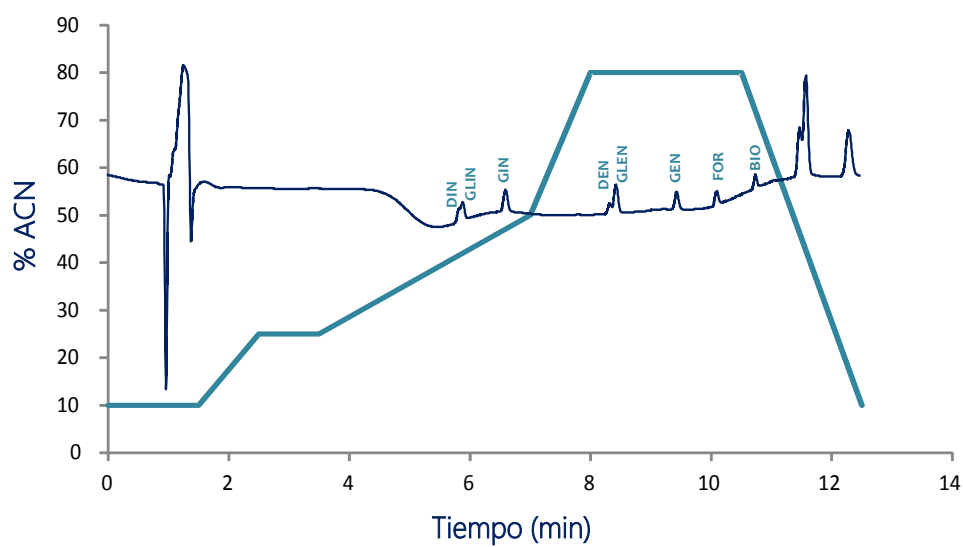


Figura 4.17. Cromatograma correspondiente a una mezcla patrón de $200 \mu\text{gL}^{-1}$ obtenido con las condiciones optimizadas. Detección con barrera de diodos (DAD), 254.10 nm. Inyección $10 \mu\text{L}$.

4.2.3.2.2. Optimización de la detección mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con un analizador de triple cuadrupolo (QqQ)

Los parámetros a optimizar pueden diferenciarse en dos grupos; por una parte los parámetros generales del triple cuadrupolo y, por otra parte, los parámetros dependientes de la naturaleza de cada analito en particular.

- Parámetros generales

Los parámetros que afectan a la fuente de ionización (ESI) están en gran parte ligados a la correcta formación del spray en la misma. Se tomaron como parámetros óptimos los tabulados por el fabricante para un flujo de fase móvil de 0.5 mL min⁻¹. Los parámetros fijados fueron:

Voltaje del capilar: +3500 V
Flujo del gas de secado (N₂): 12 L min⁻¹
Temperatura del gas de secado: 350°C
Presión de nebulización: 35 psi

Otros parámetros generales que deben ser fijados son el tiempo máximo de acumulación y el ancho de ventana de aislamiento. Éstos se fijaron en los valores habituales en espectrometría de masas, el tiempo máximo de acumulación en 200 ms y el ancho de la ventana de aislamiento en 1 u. El modo de adquisición de datos fue el “Seguimiento de Reacción Seleccionada” (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*)

- Parámetros dependientes de cada analito

Además de los parámetros generales es necesario optimizar una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito, y que están principalmente relacionados con la etapa de fragmentación.

- Polaridad del ESI

La fuente de ionización permite trabajar en modo positivo o negativo, lo que conlleva la conducción al analizador de masas de cationes o aniones respectivamente. Las isoflavonas presentan grupos hidroxilo en su estructura, que darían a pensar en una ionización negativa de las moléculas. Sin embargo, al comparar la fragmentación en ambos modos, se observa que las abundancias de los iones producto en el caso de la ionización positiva para todas las isoflavonas son mucho mayores que en el caso de ionización negativa, como se muestra en la tabla 4.9 para tres de los analitos en estudio. Por tanto, se analizaron las isoflavonas en forma positiva, es decir, como moléculas protonadas $[M+H]^+$.

Tabla 4.9. Comparación de los modos de ionización ESI positivo y ESI negativo en las condiciones generales optimizadas.

ISOFLAVONA	MODO	FRAGMENTADOR	ION PRECURSOR	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	ION PRODUCTO	ABUNDANCIA
Daidzina	+	110	417.1	12	255.1	32349
	-	140	415.1	24	253.1	954
Genistina	+	90	433.1	16	271.1	15287
	-	140	431.1	20	269.1	382
Daidzeína	+	150	255.1	28	137	11437
	-	140	253.1	28	208.1	2269

- Fragmentación en el triple cuadrupolo

Para cada analito se seleccionó la molécula protonada $[M+H]^+$ como ion precursor. El equipo optimiza la energía a transmitir al ion precursor para su fragmentación, eligiendo la energía de colisión adecuada para que la sensibilidad de los distintos fragmentos sea lo mayor posible. El ion de fragmentación más abundante se seleccionó como ion producto para la transición de cuantificación y el resto de transiciones se utilizaron para confirmación. En la tabla 4.10 se muestran todas las transiciones optimizadas para cada uno de los analitos en estudio.

Tabla 4.10. Parámetros optimizados para cada analito. Los puntos de identificación (IPs) se obtuvieron de acuerdo a la normativa 2002/657/EC.

ISOFLAVONA	FRAGMENTADOR	ION PRECURSOR	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	ION PRODUCTO	IP
Daidzina	110	417.1	12	255.1	2.5
Genistina	90	433.1	16	271.1	2.5
Glicitina	90	447.1	8 / 40	285.1 / 270.1	4
Daidzeína	150	255.1	28 / 24 / 40	137 / 199.1 / 91	5.5
Gliciteína	150	285.1	24 / 32	270.1 / 242.1	4
Genisteína	150	271.1	28 / 40	153 / 91.1	4
Formononetina	150	269.1	40 / 28	197.1 / 253.1	4
Biochanina-A	150	285.1	24 / 40	152 / 213.1	4

Se observa que para la gran mayoría de los analitos existen dos transiciones, teniendo, por tanto, 4 puntos de identificación.

– Ventanas de detección

El proceso de detección de un analito en el triple cuadrupolo requiere el aislamiento del ion precursor, su fragmentación y el posterior aislamiento del ion producto, lo que conlleva un tiempo no despreciable. Si se prefijan de este modo demasiados analitos existe el riesgo de obtener pocas señales por cada pico cromatográfico, lo que conduce a la obtención de picos de forma muy poco definida imposibilitando la cuantificación. Este problema puede solucionarse trabajando con analizadores de masas ultrarrápidos o utilizando la estrategia de las ventanas prefijadas. Dicha estrategia consiste en prefijar ventanas de tiempo para la detección de cada analito de manera tal que éstos no son rastreados durante todo el tiempo de análisis, sino sólo durante el tiempo de su ventana. Conociendo los tiempos de retención cromatográficos de cada uno de los analitos, se diseñaron dos ventanas de análisis así como una ventana previa y una posterior al análisis para enviar a deshecho la fase móvil con posibles impurezas que podrían

dañar al detector. (Ventana 1: 0 - 5 min, ventana 2: 5 - 7.5 min, ventana 3: 7.5 - 12.5 min y ventana 4: 12.5 - 16min)

En la figura 4.18 se muestran los cromatogramas obtenidos en modo MRM para las ocho isoflavonas estudiadas, representando la transición más abundante de cada analito para su energía de colisión correspondiente.

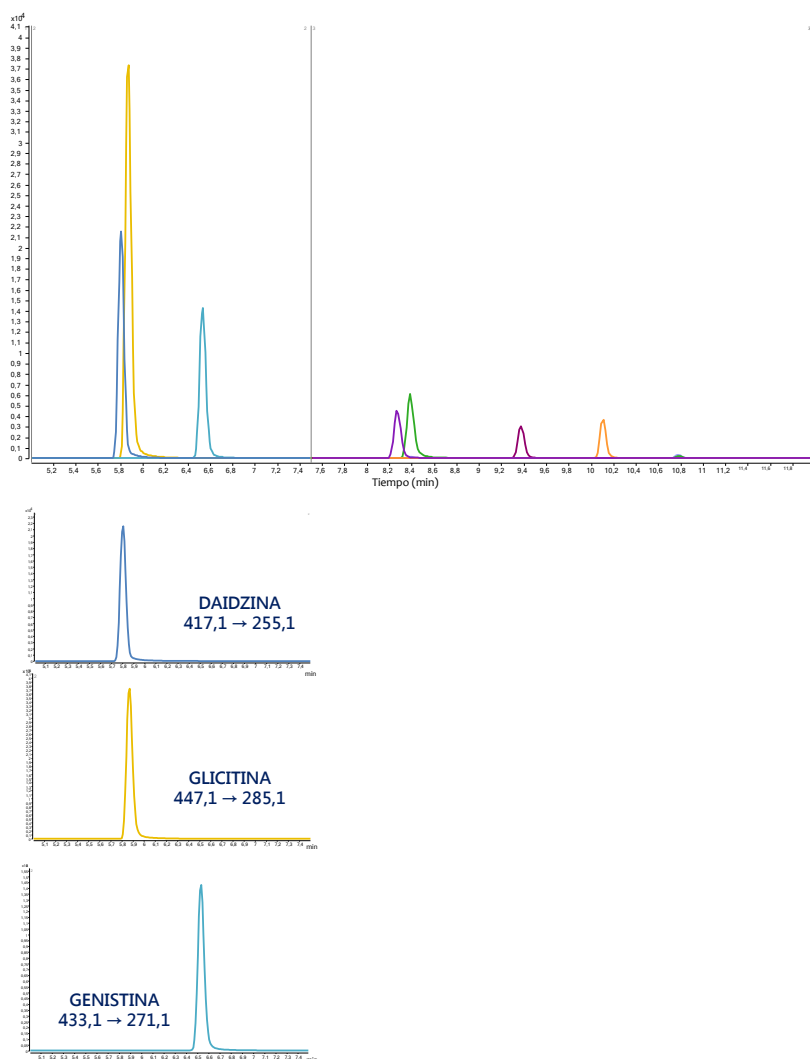


Figura 4.18. Cromatogramas en el modo MRM para un patrón de 8 isoflavonas en una concentración de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

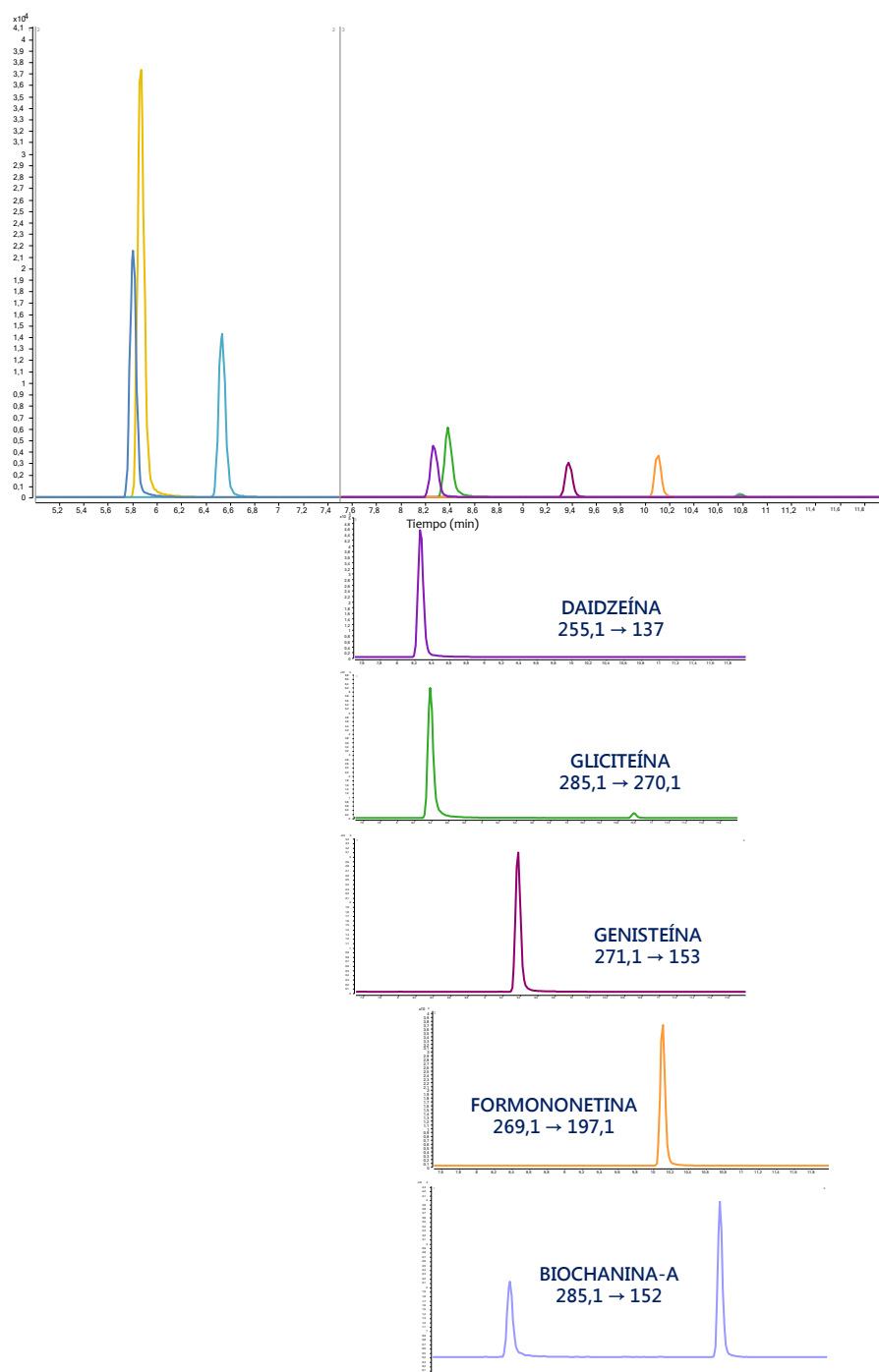


Figura 4.18 (Continuación). Cromatogramas en el modo MRM para un patrón de 8 isoflavonas en una concentración de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.3.3. Optimización del tratamiento de muestra (Condiciones de extracción)

La optimización de los diferentes parámetros involucrados en el proceso de extracción se llevó a cabo empleando los tres tipos de muestra analizados: garbanzos, lentejas y alubias blancas. El procedimiento utilizado en estos estudios fue el descrito en el apartado 4.2.3.1. (*Procedimiento analítico*, pág. 166). Las variables a optimizar fueron: tipo y volumen de extractante, cantidad de muestra, tiempo de extracción, adición de sales y etapa de limpieza.

4.2.3.3.1. Optimización del tipo y volumen de disolvente extractante.

La metodología QuEChERS se diseñó originalmente para muestras con una humedad relativamente alta (~ 75 %). Cuando se aplica a muestras secas, el procedimiento se modifica añadiendo una determinada cantidad de agua a la muestra antes de someterla al proceso de extracción, con el fin de hacer los poros más accesibles al disolvente extractante. Teniendo en cuenta que las legumbres tienen un contenido en agua muy bajo, alrededor del 10%, se decidió llevar a cabo en primer lugar un estudio acerca de la humedad relativa de la muestra.

- *Estudio previo de la humedad de la muestra*

Para llevar a cabo este estudio se realizaron extracciones de los tres tipos de legumbres en estudio, adicionando cantidades de agua para alcanzar 0, 20 y 50 % de humedad, y utilizando como disolventes extractantes acetonitrilo y metanol. La cantidad de muestra empleada fue la indicada en el método QuEChERS original, 5 gramos, así como el resto de etapas en el procedimiento de extracción.

Se observó que los extractos obtenidos al tratar muestras humedecidas eran más turbios que los correspondientes a las muestras secas. Además, al inyectar los extractos en el sistema cromatográfico, se observó que la cantidad de analitos extraída de las muestras humedecidas era menor, y los cromatogramas obtenidos no presentaban una buena resolución. Por tanto, se decidió tratar las muestras directamente con el disolvente extractante sin añadir previamente agua.

- *Estudio del tipo de extractante*

Con el fin de encontrar el disolvente más adecuado para llevar a cabo la extracción de las isoflavonas de las muestras de legumbres, se realizó un estudio empleando mezclas de acetonitrilo, metanol y etanol con agua en diferentes proporciones y a dos niveles de cantidad de muestra (3 y 5 gramos). Los mejores resultados se obtuvieron para las extracciones realizadas con mezclas acetonitrilo:agua y etanol:agua; los extractos obtenidos utilizando mezclas metanol:agua presentaban turbidez.

En la figura 4.19 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en la extracción de muestras de garbanzos y lentejas utilizando las mezclas que aportaban los mejores resultados en diferentes proporciones. Se observa que el empleo de mezclas etanol:agua favorece la extracción de las isoflavonas más polares (glucósidos), mientras que los mejores resultados para las agliconas se obtienen con mezclas acetonitrilo : agua.

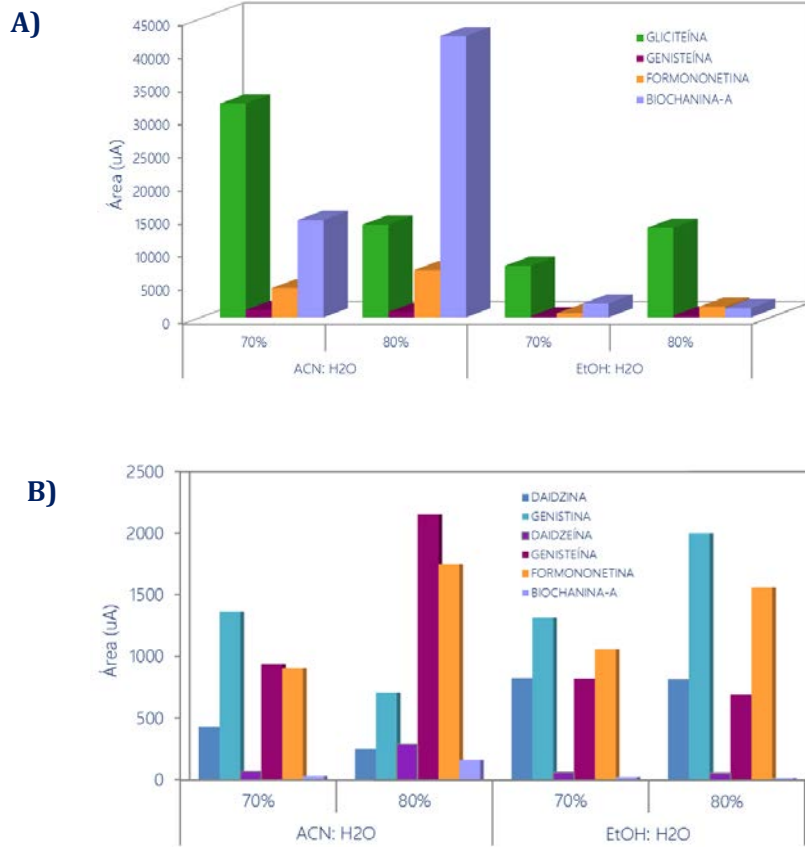


Figura 4.19. Influencia del tipo de extractante en la extracción de A) Garbanzos y B) Lentejas.

- Estudio del volumen de extractante

De forma simultánea al estudio del tipo de disolvente se decidió optimizar el volumen del disolvente extractante. El estudio se llevó a cabo con acetonitrilo y etanol mezclados con agua en proporciones 80:20 v/v y 70:30 v/v, ya que son los que habían producido los mejores resultados en el estudio anterior. Los volúmenes testados fueron 10.0 mL, el indicado por la metodología QuEChERS, y 15.0 mL.

En la figura 4.20 se muestra la relación de áreas para los ensayos con ACN:H₂O (80:20 v/v) en función del volumen de extractante empleado. Un volumen mayor de disolvente favorece la extracción debido a una mayor y mejor puesta en contacto entre muestra y disolvente. No se emplearon volúmenes mayores porque se producía un gran efecto de dilución de los extractos.

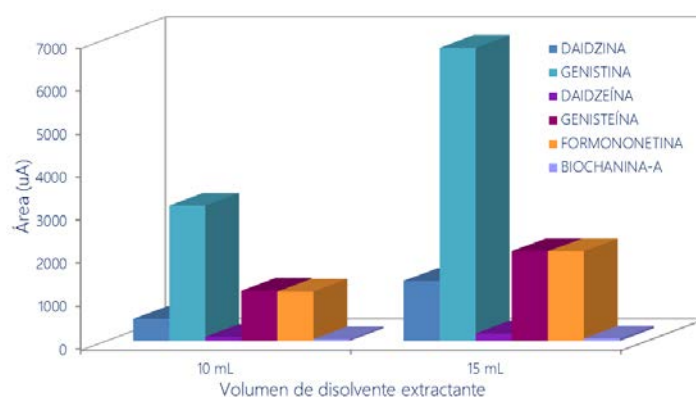


Figura 4.20. Influencia del volumen de extractante (ACN:H₂O 80:20, v/v) en la extracción de lentejas.

• Modificación de la metodología QuEChERS. Extracción de los analitos en dos etapas consecutivas

Los analitos en estudio presentan polaridades muy diferentes, por lo que la eficacia de la extracción varía mucho de unos a otros dependiendo del disolvente utilizado. Por este motivo, se evaluó la posibilidad llevar a cabo el proceso de extracción en dos etapas consecutivas, variando la polaridad del disolvente, con el fin de conseguir extraer la mayor cantidad de analitos tanto polares como apolares.

Se realizaron estudios previos para comparar la eficacia de la extracción empleando dos etapas consecutivas aumentando o disminuyendo la polaridad del extractante. Se observó una mayor eficacia en el proceso al extraer en primer lugar los analitos más polares y a continuación,

disminuyendo la polaridad del extractante por adición de acetonitrilo, extraer los analitos más apolares en una segunda etapa.

Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluaron 3 métodos para llevar a cabo la extracción en dos etapas disminuyendo la polaridad del extractante:

1) Método 1: Extracción inicial con 10 ml de ACN:H₂O (70:30, v/v) durante 5 minutos, seguida de extracción durante otros 5 minutos con 5 mL de ACN 100%. El porcentaje final de agua en el extractante es un 20%.

2) Método 2: Extracción inicial con 8 ml de ACN:H₂O (60:20, v/v) durante 5 minutos, seguida de extracción durante otros 5 minutos con 7 mL de ACN 100%. El porcentaje final de agua en el extractante es un 12%.

3) Método 3: Extracción inicial con 9 ml de ACN:H₂O (60:30, v/v) durante 5 minutos, seguida de extracción durante otros 5 minutos con 5 mL de ACN 100%. El porcentaje final de agua en el disolvente extractante es un 20%.

En la figura 4.21 se muestran los resultados obtenidos para las extracciones realizadas siguiendo los métodos 1, 2 y 3. Tanto para el método 1 como para el método 3 la concentración final de agua en el disolvente extractante es del 20%, coincidiendo con las condiciones que resultaban más adecuadas en la extracción en una etapa. A la vista de estos resultados, se eligió el método 1, que además implicaba la utilización de un volumen total de disolvente de 15 mL.

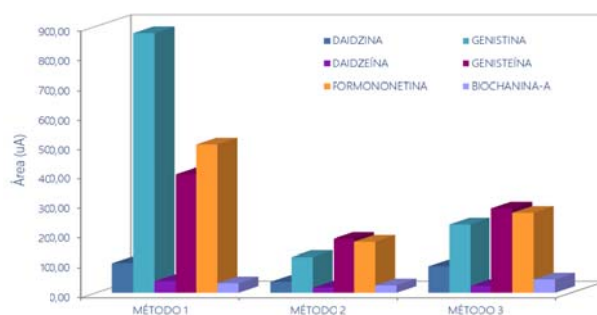


Figura 4.21. Comparación de los tres métodos de extracción propuestos empleando dos etapas. Muestras de lentejas.

En la figura 4.22 se comparan las señales analíticas obtenidas para los tres tipos de muestras, realizando la extracción en una sola etapa utilizando como disolvente extractante ACN:H₂O (80:20, v/v), y en dos etapas disminuyendo la polaridad del disolvente extractante según el método 1. Se observa que la extracción es mucho más eficaz en los tres casos cuando se lleva a cabo en dos etapas consecutivas.

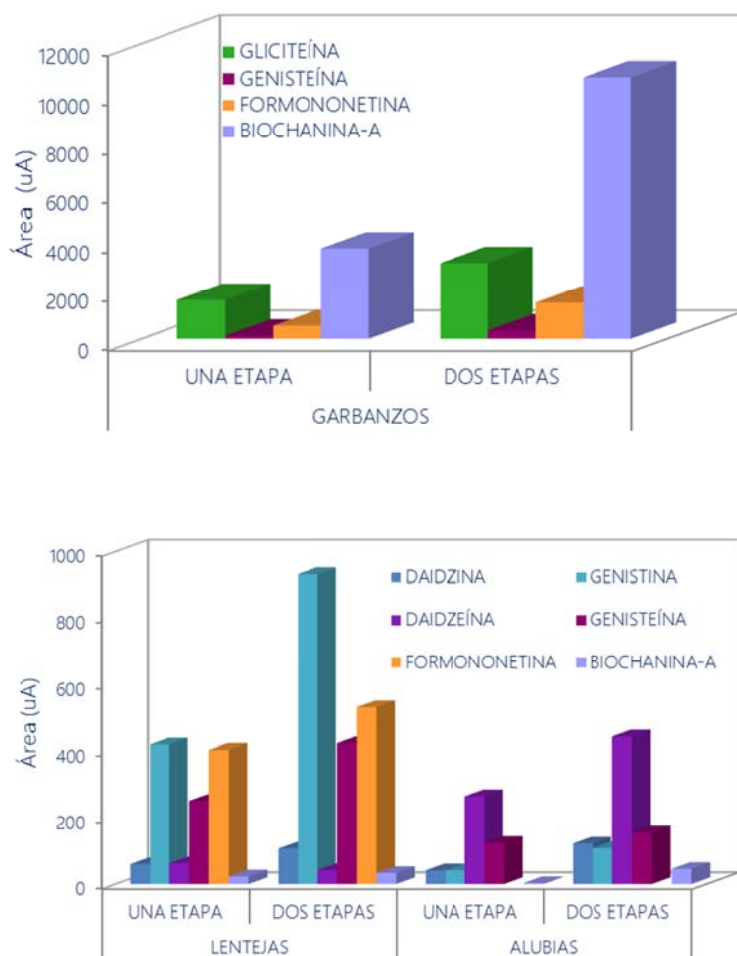


Figura 4.22. Comparación de las señales analíticas utilizando una o dos etapas de extracción para los diferentes tipos de muestras analizadas.

Por tanto, la extracción de los analitos de las muestras de legumbres se llevó a cabo en dos etapas siguiendo la metodología descrita en el método 1: en primer lugar se añaden sobre la muestra 10 mL de ACN : H₂O (70:30, v/v) y se agita durante 5 minutos y a continuación se adicionan 5 mL de ACN, agitando nuevamente la mezcla durante otros 5 minutos.

La utilización de dos etapas de extracción consecutivas permite conseguir un aumento en la eficacia de la extracción para todos los analitos con mayor y menor polaridad.

4.2.3.3.2. Optimización de la cantidad de muestra

La cantidad de muestra es una variable que influye en el proceso de extracción, por lo que debe ser optimizada. Con objeto de determinar la cantidad de muestra más adecuada para la extracción, se analizaron los tres tipos de muestras -garbanzos, lentejas y alubias- a diferentes niveles de concentración: 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 gramos. Las extracciones se llevaron a cabo con la muestra seca.

En la figura 4.23 se muestran los resultados obtenidos en este estudio. Mientras que en garbanzos y alubias se observa una ligera saturación al aumentar la cantidad de muestra, este efecto no ocurre en el caso de las muestras de lentejas. No obstante, los perfiles cromatográficos se mantienen en todos los casos. Por tanto, la cantidad de muestra escogida finalmente para garbanzos y alubias fue de 5.0 gramos, mientras que en el caso de lentejas se escogió una cantidad de muestra mayor, 7.0 gramos.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

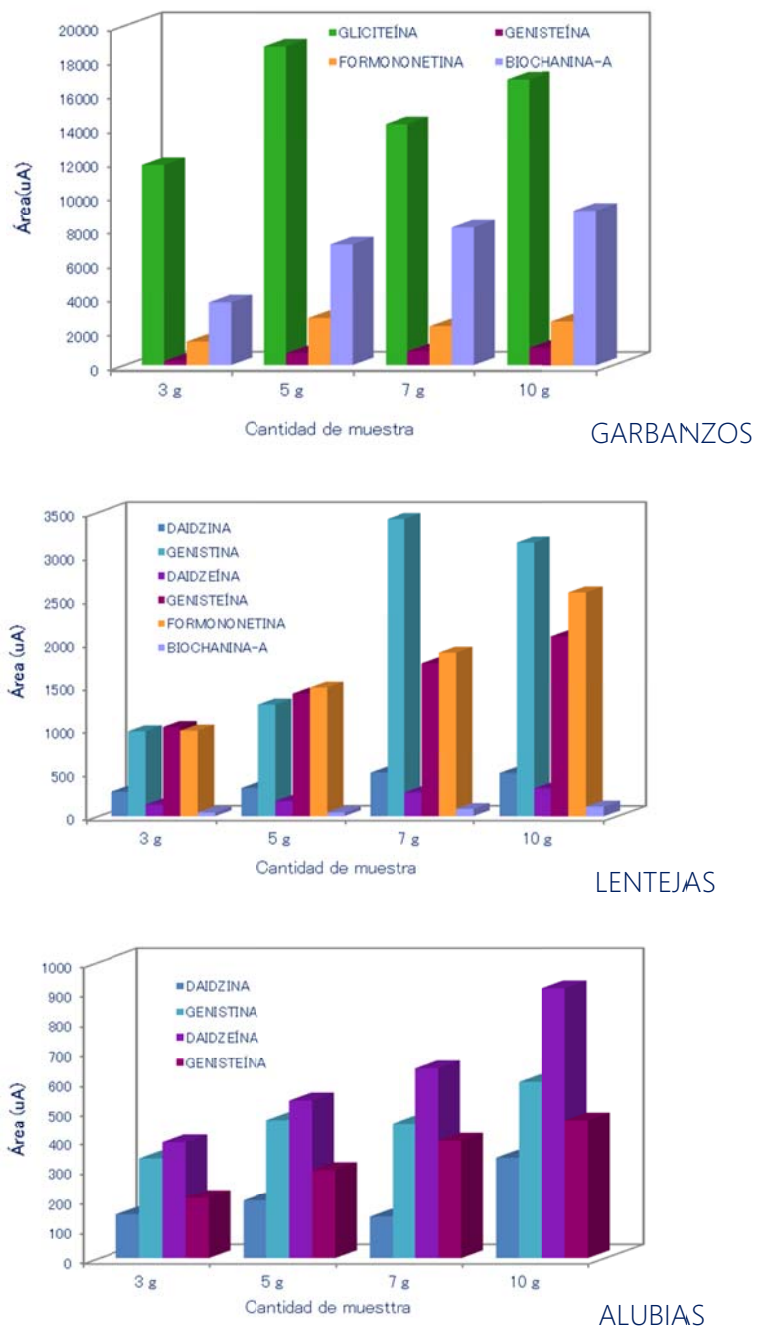


Figura 4.23. Influencia de la cantidad de muestra sobre la señal analítica.

4.2.3.3. Optimización del tiempo de extracción

La metodología QuEChERS propone una extracción en un tiempo aproximado de un minuto. Debido a que las isoflavonas son compuestos presentes de forma natural en las muestras analizadas, pueden encontrarse íntimamente unidas a los componentes de la matriz. Además, su contenido en las legumbres estudiadas es muy bajo. Por ello, se trató de incrementar la eficacia de la extracción aumentando el tiempo de contacto entre muestra y disolvente.

Estos estudios se realizaron empleando la cantidad de muestra y disolventes optimizados con anterioridad. Se analizaron los tres tipos de muestras en estudio utilizando tiempos de extracción en un rango de 1 hasta 15 minutos.

Al aumentar el tiempo de extracción, también lo hace la eficacia de la misma, como se muestra en la figura 4.24; sin embargo la reproducibilidad disminuye. Por este motivo hay que llegar a una situación de compromiso entre reproducibilidad y eficacia de la extracción. Se toman como condiciones óptimas 5 minutos de agitación para cada etapa (10 minutos en total), ya que se consiguen buenos resultados sin alargar demasiado el tiempo de análisis.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

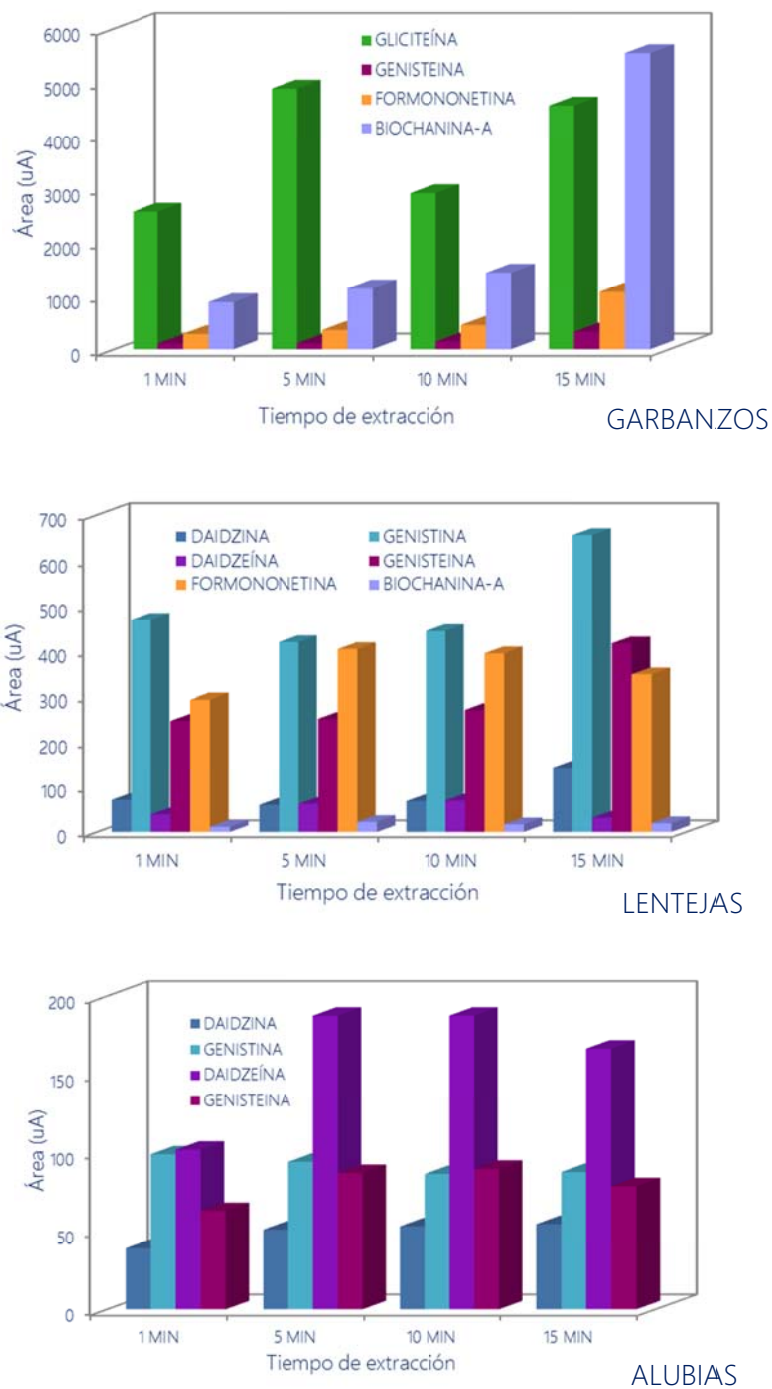


Figura 4.24. Influencia del tiempo de extracción en la señal analítica.

4.2.3.3.4. *Optimización de la adición de sales y la etapa de limpieza*

La metodología QuEChERS se fundamenta en una extracción líquido-líquido asistida por una mezcla de sales para inducir la separación de fases. Las sales utilizadas en el procedimiento original propuesto por Anastassiades fueron una mezcla de MgSO_4 y NaCl en proporción 4:1 (p/p). El MgSO_4 se añadía en una cantidad que excedía su saturación en el volumen de agua utilizado, con el fin de reducir significativamente la fase acuosa y favorecer el reparto de los analitos más polares en la fase orgánica. La adición de NaCl permitía controlar la polaridad y, por tanto, la cantidad de interferentes en el extracto, lo que mejora la selectividad del método. En este trabajo se ha comprobado que esta mezcla de sales es adecuada para inducir la separación de fases y permite la obtención de extractos limpios. Por tanto, tras llevar a cabo las dos etapas del proceso de extracción, se añadió una mezcla de MgSO_4 y NaCl (4:1, p/p).

Una de las modificaciones sugeridas por varios autores, respecto al método QuEChERS original, es la adición de diferentes soluciones tamponadas, principalmente acetato y citrato, para mejorar la eficacia de la extracción de compuestos con propiedades ácido-base y evitar la degradación de determinados compuestos. Teniendo en cuenta que las isoflavonas son compuestos con características ácido-base y considerando sus valores de pK_a se consideró que la adición de un tampón citrato, que proporciona un pH alrededor de 5, podría ser adecuada para obtener una extracción cuantitativa de los analitos en forma neutra.

Para comprobar este efecto, se adicionó una mezcla de $\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{Na}_2\text{HCit}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (1:0.5, p/p) en el momento de la adición de la mezcla de MgSO_4 : NaCl a cada uno de los tipos de muestra en estudio y se agitó vigorosamente durante un minuto.

El análisis de los resultados obtenidos pone de manifiesto un comportamiento diferente en función del tipo de matriz, como se muestra en la figura 4.25. En el caso de garbanzos y alubias, la extracción de los analitos, en concreto de las agliconas, se ve favorecida por la presencia del tampón citrato. Sin embargo, en el caso de las lentejas la señal analítica

disminuye al adicionar dicho tampón; esto podría ser debido a un aumento en la extracción de proteínas debido a que su contenido en las matrices de lentejas es algo mayor. Por este motivo, en el caso de las muestras de lentejas la mezcla de sales añadida para inducir la separación de fases estaba constituida por 5 g de MgSO₄ y NaCl en proporción 4:1 (p/p), mientras que para garbanzos y alubias la mezcla de sales contenía además 1.5 g de Na₃Cit.·2H₂O: Na₂HCit.·1.5H₂O (1:0.5, p/p).

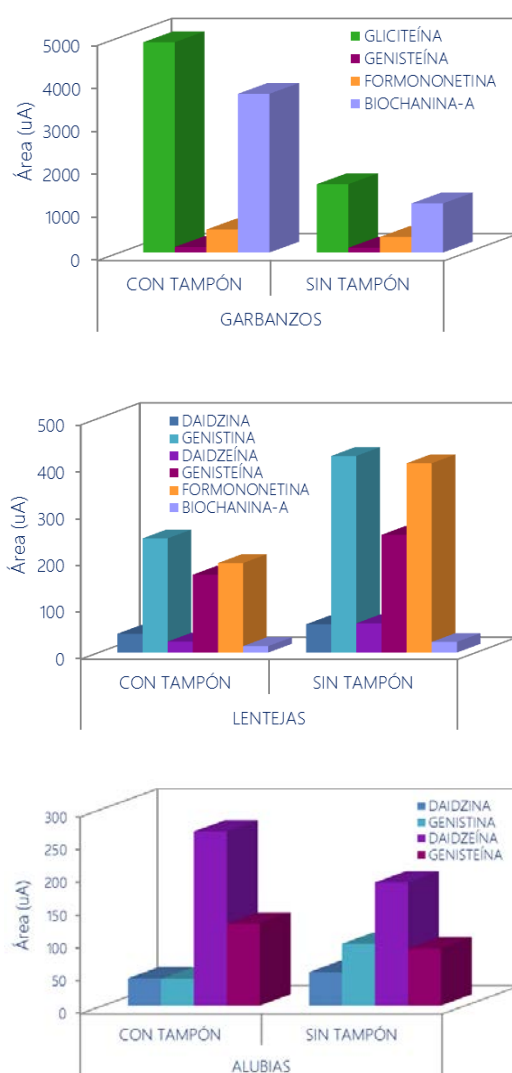


Figura 4.25. Influencia de la adición del tampón citrato.

Una vez obtenido el extracto, éste se somete a una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Generalmente, este tipo de limpieza se lleva a cabo empleando sulfato de magnesio junto con PSA, que permite eliminar ácidos grasos, ácidos orgánicos, pigmentos polares y azúcares. También se han utilizado otros sorbentes como C18, que elimina sustancias no polares, como lípidos, o negro de grafito (GCB, *Graphitized Carbon Black*) que elimina pigmentos, polifenoles o esteroides.

A pesar de que las muestras a analizar presentan un contenido bajo en grasas, para llevar a cabo la optimización de la etapa de limpieza se probaron PSA y C18 como sorbentes. El procedimiento seguido fue el indicado en la figura 4.26. Una vez realizada la extracción y la separación de fases, se tomaron tres alícuotas diferentes del extracto. Una de ellas se filtró e inyectó directamente en el sistema cromatográfico, sin etapa de limpieza previa. Las otras dos alícuotas se sometieron a la etapa de limpieza, una de ellas con PSA y la otra con C18.

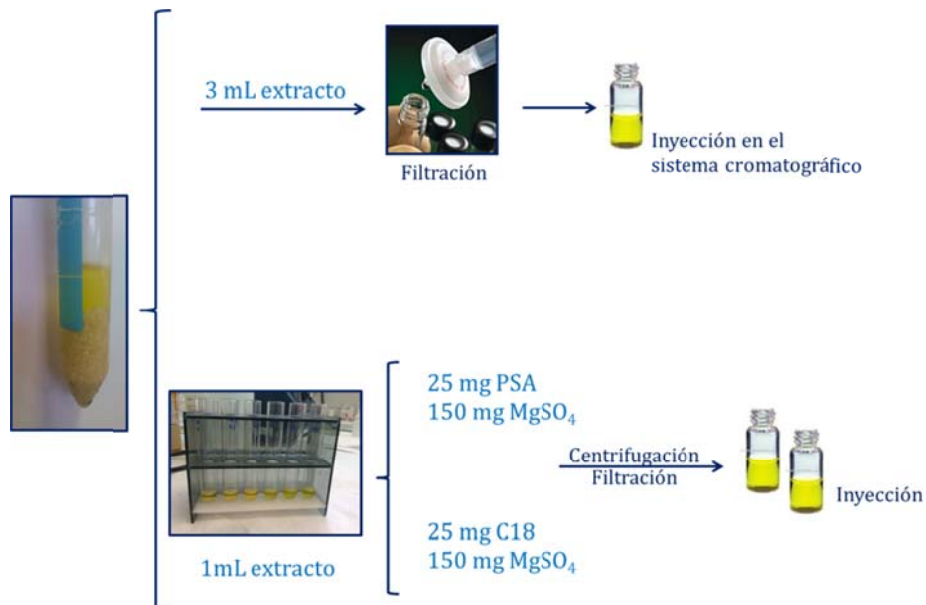


Figura 4.26. Procedimiento seguido en el estudio de la etapa de limpieza llevada a cabo mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE).

La figura 4.27 muestra los cromatogramas obtenidos para las tres alícuotas en el caso de muestras de garbanzos. Se observa que el cromatograma obtenido para la limpieza con PSA presenta menos interferentes, pero también se observa una pérdida en la señal de los analitos más polares (concretamente genisteína y gliciteína) con respecto a las otras dos alícuotas. Los cromatogramas obtenidos para los extractos sin limpieza y para los extractos con limpieza empleando C18 presentan diferencias insignificantes, como era de esperar, debido a que este tipo de muestras presentan un bajo contenido en lípidos.

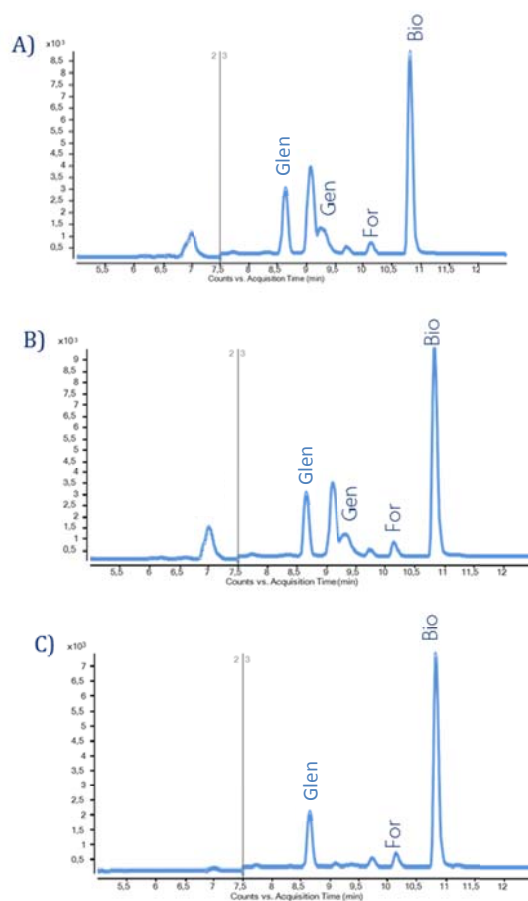


Figura 4.27. Cromatogramas obtenidos para la extracción de una muestra de garbanzos: A) Sin etapa de limpieza, B) d-SPE con C18 y C) d-SPE con PSA.

En la figura 4.28 se representan las señales analíticas obtenidas para las tres alícuotas de muestras de garbanzos, donde se observa este mismo comportamiento.

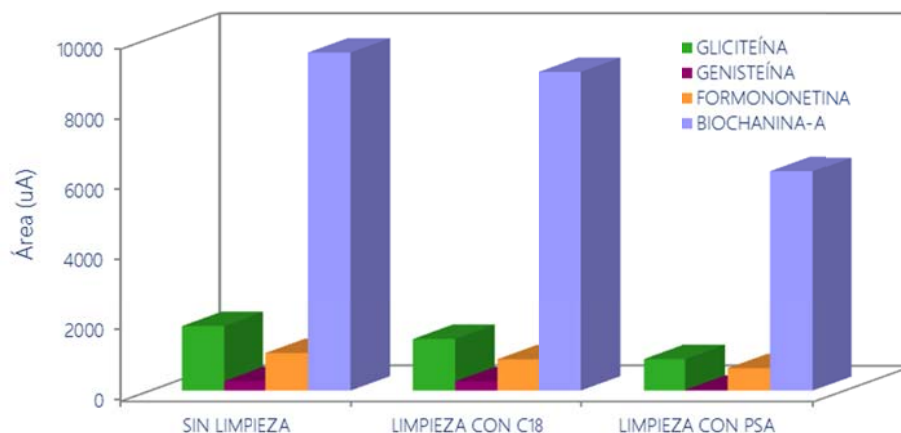


Figura 4.28. Influencia de la etapa de limpieza en la señal analítica para la extracción de una muestra de garbanzos.

Este efecto se aprecia de igual modo en muestras de lentejas y alubias, por lo que se consideró que la etapa de limpieza es un paso innecesario en el tratamiento de la muestra previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

Una vez optimizados todos los parámetros que afectan al proceso de extracción, se validó la metodología QuEChERS propuesta mediante los parámetros de calibración habituales para probar su aplicabilidad a muestras de garbanzos, lentejas y alubias.

4.2.3.4. Características analíticas y validación del método

Con objeto de conocer la respuesta cuantitativa de las isoflavonas en estudio se inyectaron, por triplicado, diferentes disoluciones que contenían las 8 isoflavonas a distintos niveles de concentración. En el caso de la biochanina-A, el rango de concentraciones variaba de 0.1 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, de 0.1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para daidzeína y gliciteína, y de 0.1 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de analitos. Estos niveles de concentración fueron escogidos en función de los contenidos esperados en las muestras reales.

La variable cuantitativa utilizada fue el área del pico cromatográfico, obteniéndose para todos los analitos curvas de calibración con buenos coeficientes de correlación lineal ($R^2 > 0.998$), tal y como se muestra en la tabla 4.12.

El límite de detección (LOD) se calculó como la concentración de soluto que producía una señal analítica equivalente a tres veces la señal del ruido de fondo. Los límites de detección variaban desde 0.71 $\mu\text{g L}^{-1}$, para la formononetina, hasta 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la glicitina.

Se evaluó también el límite de detección para la metodología propuesta (MLOD), aplicada a la determinación de isoflavonas en muestras de legumbres. Para ello se consideraron, como blancos, matrices reales que no contenían determinados analitos o con contenido muy bajo. Los valores obtenidos se adjuntan en la tabla 4.12.

La validación de una metodología analítica se puede llevar a cabo aplicando dicha metodología a muestras con contenido certificado, o bien analizar muestras utilizando dos métodos diferentes, el propuesto y otro método oficial. La legislación también permite validar un método mediante la determinación de parámetros como repetibilidad, reproducibilidad y recuperación.

Para el estudio de la reproducibilidad se aplicó el procedimiento a distintas muestras de los tres tipos en estudio en días diferentes (reproducibilidad inter-day). En la tabla 4.12 se muestran los coeficientes de variación obtenidos al llevar a cabo la cuantificación de los analitos en los tres tipos de

muestra utilizando el método de patrón externo. Teniendo en cuenta la complejidad de las muestras y que la concentración de alguno de los analitos en estudio se encuentra a niveles traza, los valores obtenidos se consideran aceptables al ser inferiores o próximos al 20%. Se encuentran valores que abarcan desde el 9.8% para la gliciteína en el caso de los garbanzos, hasta un 25.8% para la daidzina en el caso de las alubias.

El estudio de la recuperación se llevó a cabo por triplicado, dopando las muestras de legumbres, antes de su tratamiento, con las isoflavonas en concentraciones próximas a los contenidos presentes en las muestras. Cuando el analito no se encontraba naturalmente presente en una muestra, el nivel de concentración añadido fue de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Las recuperaciones se calcularon como:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Conc. muestra dopada} - \text{Conc. muestra sin dopar}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

Los valores obtenidos para cada uno de los analitos en los distintos tipos de muestra son los indicados en la tabla 4.12. Estos valores son satisfactorios en todos los casos, abarcando un rango desde 72% hasta 119%.

Tabla 4.12. Características analíticas del método QuEChERS-LC-MS/MS aplicado al análisis de isoflavonas en muestras de legumbres.

VALIDACIÓN	DAIDZINA	GLICITINA	GENISTINA	DAIDZEINA	GLICITEINA	GENISTEINA	FORMONONETINA	BIOCHANINA-A
Ordenada en el origen (uA)	203 ± 54	1197 ± 92	55 ± 31	49 ± 62	604 ± 399	28 ± 13	581 ± 60	25 ± 64
Pendiente (uA µg L ⁻¹)	145 ± 2	180 ± 4	188 ± 1	28 ± 1	129 ± 8	33.3 ± 0.6	74 ± 3	13.0 ± 0.3
R ²	0.9992	0.9985	0.9999	0.9957	0.9892	0.9992	0.9957	0.9988
LOD ^a (µg L ⁻¹)	0.97	1.5	1.2	1.0	0.91	0.97	0.71	1.1
MLOD ^{a,b} (µg / 100g)	0.40	1.8	0.30	1.6	1.2	1.1	1.5	0.8
Garbanzos								
Reproducibilidad	21		23	10	10	20	17	26
	26		7	22	13			
Alubias								
Recuperación	107 ± 8 ^c	96 ± 11 ^c	85 ± 15 ^c	84 ± 13 ^c	75 ± 13	104 ± 20	75 ± 12	97 ± 13
	113 ± 13	95 ± 11 ^c	103 ± 17	107 ± 13	119 ± 15 ^c	77 ± 12	75 ± 12	75 ± 14
	100 ± 11	112 ± 7 ^c	104 ± 7	110 ± 7	109 ± 4 ^c	96 ± 14	101 ± 14 ^c	97 ± 13 ^c

^a S/N = 3

^b MLOD : Límite de detección del método

^c Recuperación de las isoflavonas no cuantificadas en las muestras

4.2.3.4.1. *Estudio del efecto de matriz*

Debido a la forma de llevar a cabo las determinaciones cuantitativas, utilizando una fuente de iones ESI, podría tener lugar el efecto de matriz conocido como supresión iónica. Este fenómeno tiene lugar al coeluir determinados compuestos de la matriz junto a los analitos en estudio pudiendo inhibir su ionización. El efecto de matriz se evaluó comparando las pendientes de los calibrados obtenidos mediante adición estándar (dopando muestras reales con patrones de los analitos en estudio) con las respectivas pendientes de los calibrados obtenidos por inyección directa de las disoluciones de los patrones en matriz acuosa. Para ello, se aplicó un test t-Student para cada una de las muestras y cada uno de los analitos. El valor de p para todos los casos fue igual o superior a 0.05; es decir, las pendientes obtenidas con ambos métodos no eran significativamente diferentes, por lo que puede decirse que no existe efecto de matriz.

4.2.3.4.2. *Estudio de la cuantificación mediante patrón interno*

Con objeto de mejorar la precisión del método, se decidió estudiar la posibilidad de utilizar el método del patrón interno para llevar a cabo la cuantificación. El patrón interno debe ser una sustancia con características físico-químicas similares a los analitos de interés pero que no esté presente en la muestra original. En la tabla 4.13 se muestran los analitos que fueron testados como posibles patrones internos. Dichos analitos se sometieron a un estudio de fragmentación para comprobar si podían ser detectados de forma inequívoca en las condiciones de trabajo. Los parámetros optimizados se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Parámetros de fragmentación optimizados para cada uno de los patrones internos en estudio.

PATRÓN INTERNO	FRAGMENTADOR	ION PRECURSOR	ENERGÍA COLISIÓN (eV)	ION PRODUCTO
Apigenina	150	271.1	32	153.2
6-Metoxiflavona	150	253.1	28	210.3
2,2,5,7,8-Pentametil-6-cromanol	90	221.2	8	165.1
4,4'-Dimetoxichalcona	-	-	-	-
7,8-Dimetoxiflavona	124	283.1	28	239.1
3',4'-Dimetoxiflavona	140	283.1	28	267.1

El patrón interno escogido fue la 3',4'-Dimetoxiflavona debido a que en las condiciones de trabajo presentaba una buena fragmentación, así como una separación del resto de picos cromatográficos.

La concentración de patrón interno adicionada ha de ser comparable a las concentraciones de los analitos en las muestras, por lo que se adicionaron 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 3',4'-dimetoxiflavona a las disoluciones acuosas de las isoflavonas patrón.

La variable cuantitativa utilizada fue la relación de áreas de cada uno de los picos cromatográficos con la del pico cromatográfico obtenido para el patrón interno. Las curvas de calibración obtenidas para todos los analitos presentan buenos coeficientes de correlación lineal ($R^2 > 0.995$).

4.2.3.5. Aplicación del método a muestras reales

Con objeto de confirmar la aplicabilidad de la metodología propuesta se analizaron, por triplicado, muestras comerciales de garbanzos, lentejas y alubias procedentes de la región de Castilla y León. Las etapas de la metodología optimizada se reflejan en la figura 4.29.

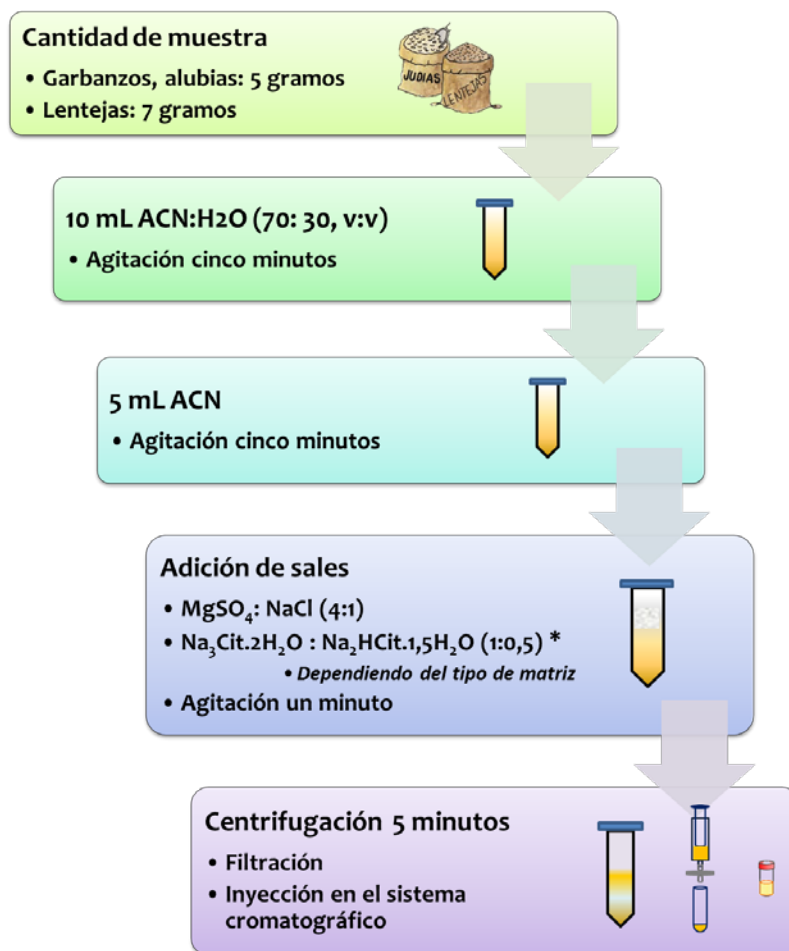


Figura 4.29. Esquema de la metodología propuesta.

La cuantificación de las isoflavonas se llevó a cabo utilizando los métodos de patrón interno y de patrón externo. Los contenidos encontrados para cada tipo de legumbre, en $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de muestra seca, se muestran en la tabla 4.14.

Se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos aplicando el test *t-Student*, observándose que no había diferencias significativas entre las mismas a un nivel de significación de 0.05. Se concluye que la cuantificación puede ser llevada a cabo tanto con patrón interno como con patrón externo.

Tal y como se muestra en la tabla 4.14, los mayores contenidos en isoflavonas fueron los obtenidos para las muestras de garbanzos. En este caso, los analitos mayoritarios son biochanina-A y gliciteína, mientras que para las lentejas es la genisteína y para las alubias la daidzeína.

Los límites de detección obtenidos por la metodología QuEChERS-LC-MS/MS son comparables a los encontrados en bibliografía para fitoestrógenos libres y conjugados en legumbres empleando LC-MS/MS²⁹⁷ e incluso mejores que los obtenidos por otros grupos de investigación²⁹⁸, teniendo en cuenta que, en este caso, el tratamiento de muestra previo utilizado es más sencillo y rápido que el expuesto por estos autores.

Tabla 4.14. Contenidos de isoflavonas ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ muestra seca \pm RSD) en legumbres empleando cuantificación mediante patrón externo y patrón interno.

	GARBANZOS			LENTEJAS			ALUBIAS		
	ES	IS	p^a	ES	IS	p^a	ES	IS	p^a
Daidzina	-	-	-	1.8 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	0.2	0.5 \pm 0.2	-	-
Glicitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Genistina	-	-	-	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.8	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.7
Daidzeína	-	-	-	2.5 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3	0.6	2.6 \pm 0.3	2.1 \pm 0.4	0.2
Gliciteína	18 \pm 3	18 \pm 3	0.7	-	-	-	-	-	-
Genisteína	3.1 \pm 0.4	3.0 \pm 0.5	0.7	10.3 \pm 0.5	9.3 \pm 0.5	0.1	1.4 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	0.3
Formononetina	4 \pm 1	3 \pm 1	0.6	2 \pm 1	1.5 \pm 1	0.3	-	-	-
Biochanina-A	474 \pm 13	369 \pm 79	0.1	1.1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2	0.3	-	-	-

ES: Cuantificación mediante patrón externo

IS: Cuantificación mediante patrón interno

^a Valor de p obtenido al emplear el test *t-Student*

²⁹⁷ N. Konar, E.S. Poyrazoglu, K. Denir, N. Artik; *Journal of Food Composition and Analysis* 58 (2010) 7510

²⁹⁸ M.L. Antonelli, A. Faberi, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganá; *Talanta* 66 (2005) 1025

4.2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se propone una versión modificada de la metodología QuEChERS para la extracción de isoflavonas presentes de forma natural en muestras de legumbres.

El método propuesto consta de una extracción en dos etapas; una primera extracción con un extractante más polar, seguida de una segunda extracción en la que disminuye su polaridad; esto permite un aumento en la eficacia de la extracción de los distintos tipos de isoflavonas, glucósidos y agliconas, de las muestras de alubias, garbanzos y lentejas.

El procedimiento desarrollado permite, además, eliminar la etapa final de limpieza, por lo que el método es rápido, sencillo y fácil de aplicar en muestras de matrices tan complejas como los alimentos.

La metodología propuesta combina el tratamiento de muestra mediante QuEChERS con el análisis posterior mediante LC-MS/MS, permitiendo determinar las isoflavonas en su estado natural, libre o conjugado, en las legumbres. El método es preciso, selectivo y rápido.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Talanta . 100 (2012) 320



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry

M.M. Delgado-Zamarreño*, L. Pérez-Martín, M. Bustamante-Rangel, R. Carabias-Martínez

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2012
Received in revised form
24 July 2012
Accepted 27 July 2012
Available online 16 August 2012

Keywords:

Isoflavone
Legume
QuEChERS
Liquid Chromatography–Mass
Spectrometry

ABSTRACT

This paper reports the development of an analytical method for the determination of isoflavones in legumes using LC–MS/MS. A modified approach of the QuEChERS methodology was used to extract the analytes from the food samples. The proposed method includes a two-step extraction process and allows the determination of isoflavones in pulses without the need of a clean-up step. Use of this methodology for the extraction of natural occurring substances provides advantages such as simplicity and ease of use, especially taking into account the complexity of food matrices. The method was applied successfully for the determination of eight isoflavones, including aglycones and glucosides, in legumes of Spanish origin (chickpeas, lentils and beans from the region of Castilla y León). The target compounds were the glucosides daidzin, glycitin and genistin, and the aglycones daidzein, glycitein, genistein, formononetin, and biochanin A. The detection limits were in the 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ range for formononetin and glycitin respectively. Recoveries ranged from 72% to 119%, and standard deviations lower than 25% were obtained for the inter-day precision. The method described is precise, selective and not time-consuming.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Isoflavones are a subgroup of phytoestrogens, which are natural plant substances with structures similar to 17- β -estradiol. The plant family most abundant in phytoestrogens is the *Leguminosae*. Soybeans are one of the richest sources of isoflavones in foods; they are also found in red clover, germs of alfalfa, and linseed, as well as in extracts of red wine [1,2].

Isoflavones have the ability to bind to estrogen receptors, depending on the degree of methylation or glycosylation of the hydroxyl groups [3]. Recent studies have shown the possibility of a duality in the estrogenic activity of these substances. Both agonist and antagonist activities that have been described are related with the amount of endogenous estrogens [4].

This group of substances has recently come into the limelight owing to increasing information about their positive effects in a variety of biological activities, such as the treatment of menopausal symptoms [5,6], as an alternative to hormone-replacement therapy (HRT), for cardiovascular disease [7,8], diabetes and obesity [9,10], for osteoporosis [11,12], and even for cancer (e.g., prostate [13] and endometrial cancer [14]). In this regard, the

isoflavones with the highest clinical activity are daidzein, genistein and glycitein. These substances arise through both the hydrolysis of biologically inactive forms of glucoconjugates, and through the metabolism of biochanin A and formononetin. In the present work, these substances were analyzed, together with their glycosylated forms (daidzin, genistin and glycitin).

In food analysis, one of the fundamental problems arising from the complexity of the matrices is analyte extraction prior to chromatographic determination. In the determination of bioactive compounds in foods, sample treatment is a critical step and sometimes limits the development of analytical methodologies. In this case, sample treatment is a critical stage because isoflavones are relatively unstable compounds; glucoside esters tend to decrease with time, while the concentration of glycosides and aglycones increases [15].

The first study addressing the extraction of isoflavones was carried out by Eldridge in 1982 [16]. Usually, alkaline or acid hydrolysis with subsequent extraction of the analytes from the unsaponifiable fraction have been used. The most frequent techniques used for extraction include Soxhlet extraction, ultrasonic-assisted extraction (UAE), microwave assisted extraction (MAE), pressurized liquid extraction (PLE) or supercritical fluid extraction (SFE) [15,17,18].

In 2003, Anastassiades et al. [19] developed a new method for the extraction of a broad range of pesticide residues from fruits

* Corresponding author. Tel./fax: +34 923 294483.

E-mail address: mdz@usal.es (M.M. Delgado-Zamarreño).

and vegetables (QuEChERS acronym of quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) in contrast to the traditional methodology with multiple stages and the use of large amounts of sample. The method consisted of an initial extraction with acetonitrile followed by partitioning with magnesium sulphate, either alone or in combination with other salts, generally NaCl. After extraction, a clean-up step was performed using dispersive solid-phase extraction (d-SPE). This methodology has been modified, depending on the properties of the analyte, the matrix composition, and the techniques and equipment available in the laboratory [20]. The main changes include the addition of acetate [21,22] or citrate [23,24] buffers to avoid the degradation of certain pesticides, and the addition of water to dry samples to obtain the necessary moisture [25–27]. In the following clean-up step, d-SPE has been modified through the use of graphitized carbon black (GCB), C18 sorbent, or Florisil cartridges [28,29]. Other modifications proposed have been the use of dry ice to separate phases without the need for salting-out [30], and elimination of the clean-up step [31].

The QuEChERS method has mainly been applied for the determination of polar, middle polar and non-polar pesticide residues in food matrices [28]. Other compounds, such as antibiotics [32,33] and other veterinary drugs [34–36], steroids [37], and mycotoxins [38–42] have been also determined. To our knowledge, the use of this methodology for the extraction of naturally occurring substances is practically non-existent and the extraction of isoflavones in pulses has not been proposed.

Here we propose a procedure based on the QuEChERS methodology for the extraction of analytes, of different polarities, naturally present in samples, taking into account the advantage of the ease of application of this methodology to complex matrices such as food. One of the main advances provided by the proposed method is related to the elimination of the dispersive SPE step after extraction. Besides, in view of the different polarities of the analytes studied, a two-step extraction process was considered. The samples analyzed were legumes of Spanish origin (chickpeas, lentils and beans from the region of Castilla y León). In order to avoid the disadvantages of the QuEChERS methodology, in which sometimes preconcentration of compounds in the extracts is required, separation by liquid chromatography and detection by mass spectrometry with a triple quadrupole was used. This system has higher sensitivity as well as improved security of identification.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The isoflavones studied, Daidzin (CAS RN 552-66-9), Glycitin (CAS RN 40246-10-4), Genistin (CAS RN 529-59-9), Daidzein (CAS RN 486-66-8), Glycitein (CAS RN 40957-83-3), Genistein (CAS RN 446-72-0), Formononetin (CAS RN 485-72-3), and Biochanin-A (CAS RN 491-80-5), were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The internal standard, 3',4'-Dimethoxyflavone, was obtained from Extrasynthese (Genacy Cedex, France).

The organic solvents—acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and ethanol (EtOH)—were of HPLC grade and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (>98%) was from Fluka (Steinheim, Germany). Anhydrous magnesium sulfate, sodium chloride and trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Disodium hydrogencitrate sesquihydrate ($\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$) was from Sigma-Aldrich. Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Spain) water purification system. All other chemicals used were of analytical reagent grade.

2.2. Samples

The analyzed samples were legumes coming from Castilla y León (Spain): chickpeas from Fuentesauco (Zamora), and lentils and white beans from La Armuña (Salamanca). The samples were ground with a Knifotec™ 1905 from Foss (Barcelona, Spain) before analysis. Sample preparation, as is indicated in Section 2.4, was carried out using a Vortex ZX Classic Velp Scientifica (Milan, Italy). The extracts were filtered through 0.22 μm PVDF Syringe filters (Scharlau).

2.3. Instrumentation

LC analyses were performed on a HP 1200 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, and a six-port valve. The analytical column was a $50 \times 4.6 \text{ mm}^2$ Zorbax Eclipse XDB-C18 with 1.8 μm particles (Agilent). The mobile phase consisted of an acetonitrile (solvent A) and 0.01% aqueous formic acid (solvent B) gradient, at a flow rate of 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The gradient elution was as follows: 0–1.5 min, 10% A; 1.5–2.5 min, 10–25% A; 2.5–3.5 min, 25% A; 3.5–7 min, 25–50% A; 7–8 min, 50–80% A; 8–10 min, 80% A; 10–12 min, 80–10% A. The analytical column was thermostated at 25 °C, and the injection volume was 10 μL .

Detection was carried out on a Triple Quad LC/MS 6410 (Agilent) equipped with an electrospray (ESI) source. ESI-MS spectra were acquired in positive-ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The conditions of the MS analysis were as follows: the electrospray capillary voltage was 3500 V and the nebulizer pressure was 35 psi. Nitrogen was used as a drying gas at the flow rate of 12 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ at a temperature of 350 °C. The whole system was controlled by an Agilent Mass Hunter software, version B.04.01.

2.4. Sample preparation (QuEChERS methodology)

For sample treatment with the QuEChERS method, 5.0 to 7.0 g (depending on the kind of legume) of ground samples were taken in a 50 mL plastic centrifuge tube with screw cap. Extraction was carried out in two steps: firstly, 10 mL of ACN:H₂O (70:30, v/v) was added and the mixture was shaken for 5 min with a Vortex device; then, 5 mL of ACN was added and the mixture was shaken again for another 5 min. Following this, a mixture of 4 g of magnesium sulfate and 1 g of sodium chloride was added. The tube was immediately shaken vigorously for 1 min to prevent the formation of MgSO₄ conglomerates and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Finally, the extract was filtered through a 0.22 μm PVDF syringe filter before injection into the chromatographic system.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of LC-MS

3.1.1. Optimization of chromatographic variables

Isoflavones have acidic-basic characteristics, with pK_a values ranging from 9.74 to 9.81 [43]. Accordingly, the mobile phase was acidified with 0.01% aqueous formic acid to prevent the deprotonation of analytes and to improve the shape of the chromatographic peaks. Mixtures of methanol–aqueous formic acid and acetonitrile–aqueous formic acid as mobile phases were compared in order to obtain the best chromatographic behavior. It was observed that the acetonitrile–aqueous formic acid gradient produced the best results.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

322

M.M. Delgado-Zamarreño et al. / Talanta 100 (2012) 320–328

Different types of gradient were tested to achieve the separation of the chromatographic peaks as well as their separation from the injection front, which is very useful in real samples. The optimized gradient was: 0–1.5 min, 10% A; 1.5–2.5 min, 10–25% A; 2.5–3.5 min, 25% A; 3.5–7 min, 25–50% A; 7–8 min, 50–80% A; 8–10 min, 80% A, 10–12 min, 80–10% A. The mobile phase consisted of an acetonitrile (solvent A) and 0.01% aqueous formic acid (solvent B). Fig. 1 shows the optimized gradient next to the TIC of a standard solution of the eight isoflavones studied.

3.1.2. Optimization of the mass spectrometry conditions

MS spectra were studied in both positive and negative modes. The positive mode was employed because it afforded the highest sensitivity. For the optimization of the MS conditions, the fragmentor voltage and collision energy were optimized by injection of the individual standard isoflavone solution directly into the mass spectrometer, using the optimum conditions for fragmentation.

The optimization of the precursor ion and product ions was carried out by direct injection of the individual standard isoflavone solution into the mass spectrometer. The Fragmentor voltage and collision energy were also optimized. These optimized parameters are shown in Table 1. The most abundant product ion was used as an identification point; the rest of the product ions were used for confirmatory analysis. The P.I. are also shown in Table 1.

3.2. Optimization of sample treatment (extraction conditions)

Optimization of the parameters involved in the extraction process was carried out using the three kinds of legume studied:

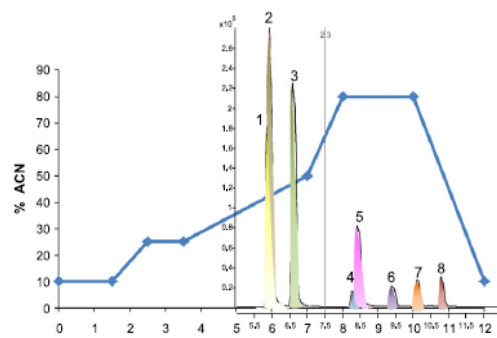


Fig. 1. Optimized elution gradient and TIC of standard solutions of daidzin (1), glycitin (2), genistin (3), daidzein (4), glycitein (5), genistein (6), formononetin (7) and biochanin A (8).

Table 1
LC-MS/MS conditions for the analysis of isoflavones

Compound	Fragmentor (V)	Precursor ion (m/z)	Collision energy (V)	Product ions (m/z)	I.P. ^a
Daidzin	110	417.1	12	255.1	2.5
Glycitin	90	447.1	8/40	285.1/270.1	4
Genistin	90	433.1	16	271.1	2.5
Daidzein	150	255.1	28/24/40	137/199.1 /91	5.5
Glycitein	150	285.1	24/32	270/242	4
Genistein	150	271.1	28/40	153/91.1	4
Formononetin	150	269.1	40/28	197.1/253	4
Biochanin A	150	285.1	24/40	152/213	4

^a Identification points (IPs) according to Commission Decision 2002/657/EC.

chickpeas, lentils and white beans. The extraction method used for these experiments was as follows: the ground legume sample was mixed with the extraction solvent and the mixture was shaken for 5 min with a Vortex device. Then, a combination of magnesium sulfate and sodium chloride (4 g:1 g) was added and the mixture was shaken before centrifugation. The filtered extract was injected directly into the chromatographic system. The parameters studied were the type and volume of extraction solvent, the sample amount, the extraction time, salting-out, and clean-up.

3.2.1. Optimization of the type and volume of extraction solvent

In order to optimize the extraction conditions, different solvents—acetonitrile, methanol, ethanol and water—and mixtures thereof at different proportions were investigated at two levels of sample concentration (3 and 5 g of chickpeas and lentils). It was found that for most of the isoflavones the best results were obtained when the extraction solvent was 80% acetonitrile. In this study, different extraction efficiencies were also observed, depending on the polarity of the analytes, and those of the extraction solvent. In view of the different polarities of the analytes studied, a two-step extraction process was considered. The aim of this approach was to extract the more polar analytes first and then, by decreasing the polarity of the extraction solvent, to extract the less polar analytes. The most efficient approach to achieve the extraction of the analytes was to begin with ACN:H₂O (70:30, v/v), then adding 100% acetonitrile, achieving a final proportion of ACN:H₂O (80:20, v/v), considered optimum in the previous study. Fig. 2 shows the analytical signals obtained for the samples when the extraction was carried out using ACN:H₂O (80:20, v/v) (one-step) and a two-step extraction, decreasing the polarity of solvent.

Study of the extraction solvent volume revealed that extraction with a volume of solvent higher than that proposed in the original QuEChERS methodology improved the extraction yields. Thus, a total volume of 15 mL was chosen: first, 10 mL of ACN:H₂O (70:30, v/v) were added to the sample and the mixture was shaken for 5 min with a vortex device. Subsequently, 5 mL of 100% acetonitrile was added and the mixture was shaken again for another 5 min.

3.2.2. Optimization of sample amount and extraction time

In order to determine the most suitable sample amount to achieve extraction, extracts of the three types of samples studied—chickpeas, lentils and beans—were analyzed at four concentration levels: 3, 5, 7 and 10 g of dry solid sample. Fig. 3 shows the behavior of the different types of sample versus the extraction process. Whereas chickpeas and white beans reached saturation in the extraction, in lentils this behavior was not observed. It is important to point that the profiles of chromatographic peaks are kept for all cases. In light of this, a sample amount of 5 g was chosen to carry out the extraction of chickpeas and white beans and 7 g was chosen for lentils.

The QuEChERS methodology allowed analyte extraction in about 1 min. Taking into account that the isoflavones were present in their natural form in the samples analyzed and that their concentration was very low, we tested whether the increase in the extraction time might increase the efficiency of extraction. An experiment to determine the optimal conditions for the extraction of the isoflavones was conducted using a vortex device. The extractions were carried out using times ranging from 1 to 15 min. When the extraction time increased, a rise in the analytical signal was observed, but reproducibility decreased. Accordingly, an extraction time of 5 min was chosen as a compromise between the extraction yields and reproducibility (Fig. 4).

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

M.M. Delgado-Zamarreño et al. / Talanta 100 (2012) 320–328

323

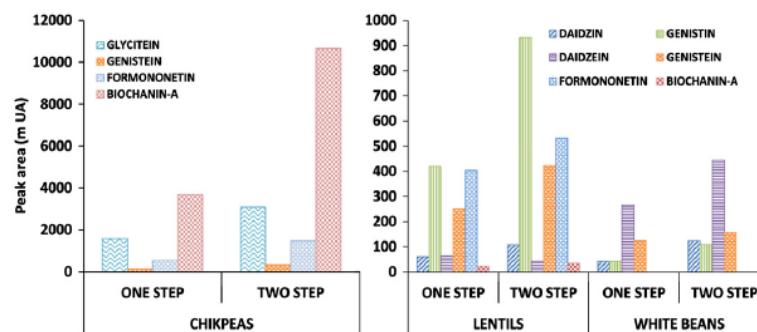


Fig. 2. Comparison of the analytical signals using one or two steps in the extraction process.

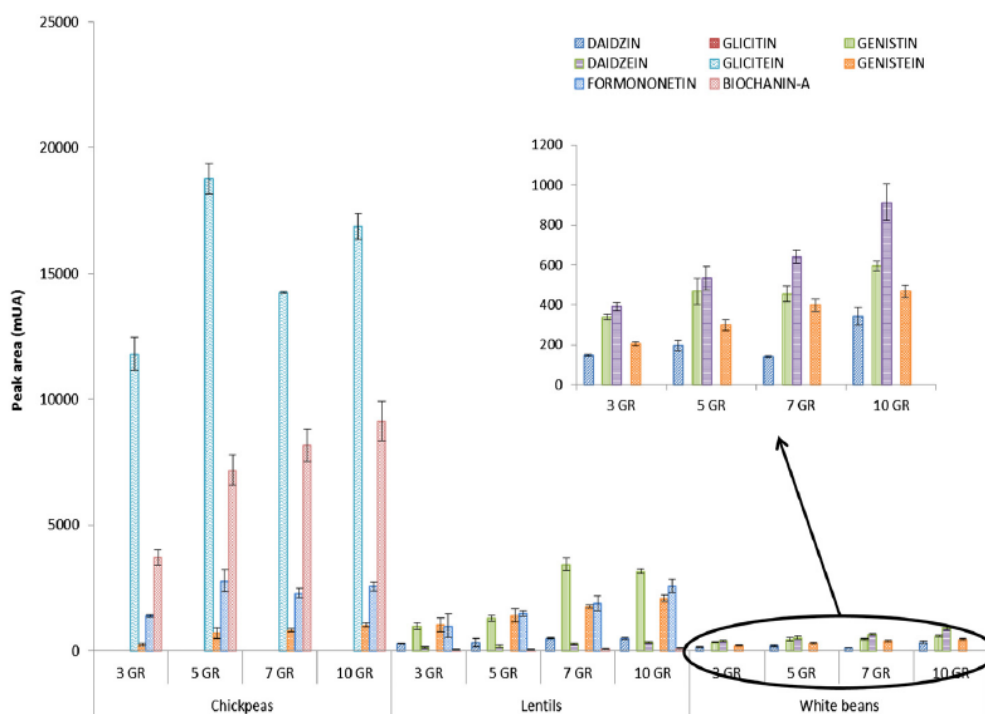


Fig. 3. Influence of sample amount on the analytical signal.

3.2.3. Optimization of salt addition and clean-up

In the QuEChERS methodology, phase separation was induced by the addition of various salts—avoiding the use of potentially toxic and expensive co-solvents. The salt most used is $MgSO_4$, which reduces the volume of the aqueous phase and facilitates the partitioning of polar analytes into the organic phase [28]. By varying the amount of NaCl added to the sample during partitioning with $MgSO_4$, it is possible to control the polarity range of the method and thus the amount of interferents in the extract. To

avoid the presence of interferents in the extracts, the best option was to use a mixture of 4 g $MgSO_4$ and 1 g NaCl.

The original QuEChERS method has previously been modified by the addition of acetate or citrate buffers to prevent the degradation of certain pesticides. By buffering with citrate salts (1 g of $Na_3Cit \cdot 2H_2O$ and 0.5 g of $Na_2HCit \cdot 1.5H_2O$) the pH value was maintained at 5–5.5. In our case, taking into account the pK_a of the isoflavones studied, the addition of citrate buffer provided a pH-value that could be adequate for the quantitative extraction of

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QueChERS

324

M.M. Delgado-Zamarreño et al. / Talanta 100 (2012) 320–328

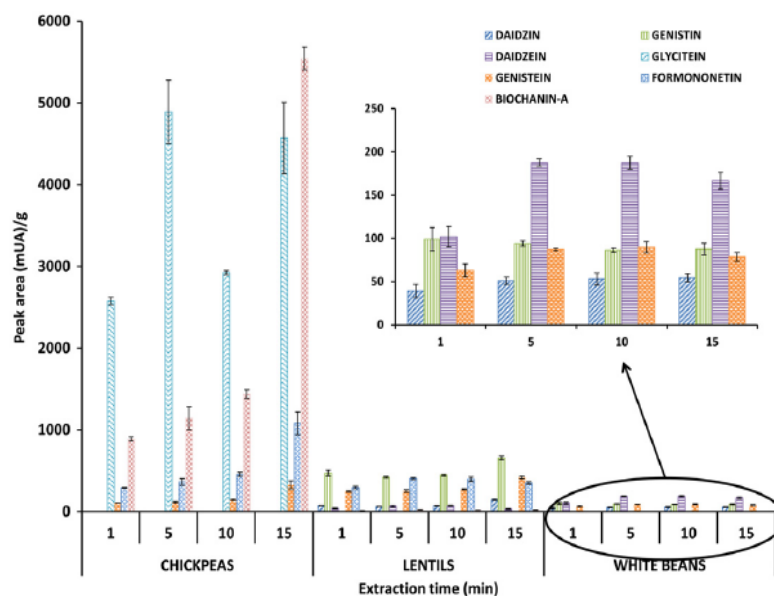


Fig. 4. Influence of extraction time on the extraction efficiency.

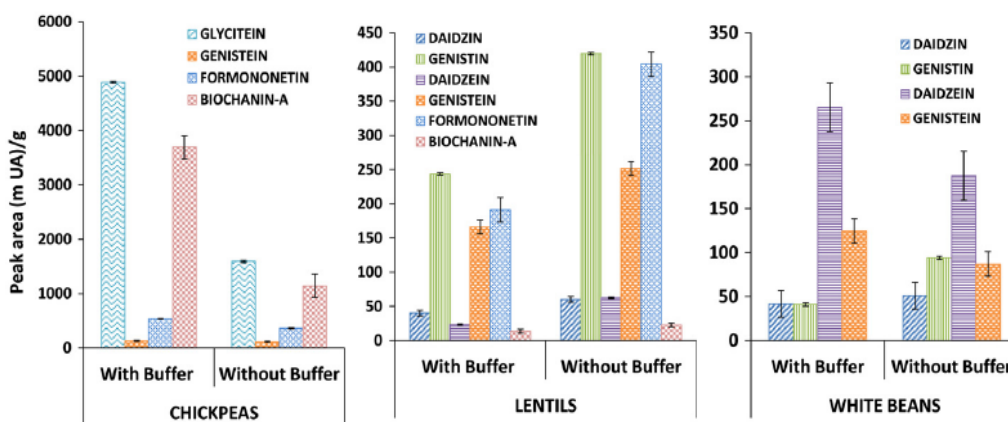


Fig. 5. Influence of the addition of citrate buffer.

protonated analytes, as well as the protection of alkaline groups. In order to find the best extraction conditions, 1 g of $\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.5 g of $\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ was added and the samples were shaken vigorously. Analysis of the results pointed to two types of behavior: in the case of the samples of chickpeas and white beans, analyte extraction was improved in the presence of citrate buffer, especially in the case of aglycones. This could be due to a higher presence of protonable amino acids in these matrices. However, in the case of the lentils, the addition of citrate buffer produced a decrease in the signal (Fig. 5). Therefore, for the chickpeas and white beans salting-out was achieved using the buffered method, whereas in the case of the lentils citrate no buffer was added.

Finally, a study was made of the clean-up step, using d-SPE with PSA or C18. In both cases it was found that neither the resolution of the chromatograms nor recovery was improved. Fig. 5 shows the behavior observed for the chickpea samples, without d-SPE (Fig. 6A) and when C18 (Fig. 6B), and PSA (Fig. 6C) were added for extract clean-up. The differences between A and B were insignificant, as expected, because this kind of sample contains relatively low amounts of lipids. However, when d-SPE was carried out with PSA, less interference was observed in the chromatogram, but the signal corresponding to the more polar analytes (such as genistin) or intermediate-polarity analytes (genistein) disappeared. Similar results were observed for white

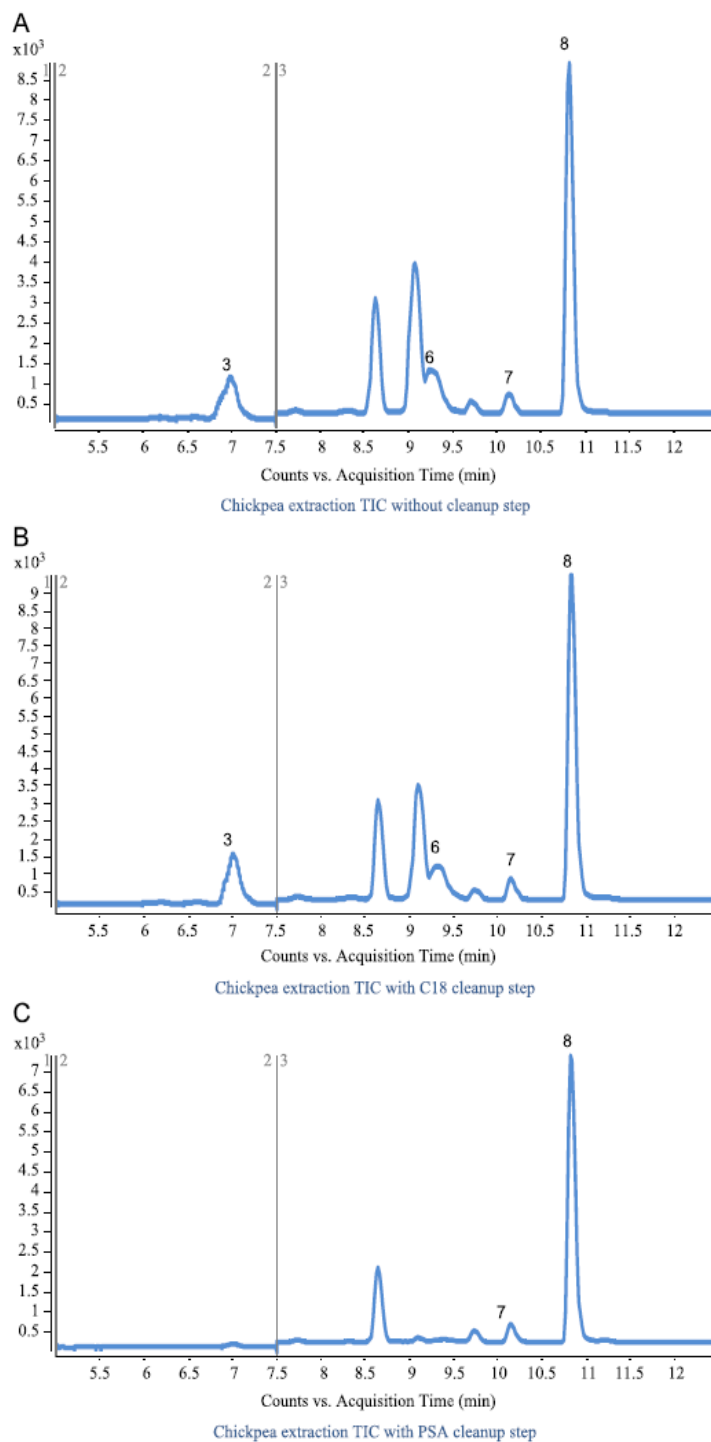


Fig. 6. Study of the clean-up step in the extraction of chickpeas samples: (A) without d-SPE, (B) d-SPE with C18, and (C) d-SPE with PSA.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QuEChERS

326

M.M. Delgado-Zamarreño et al. / Talanta 100 (2012) 320–328

Table 2
Analytical Characteristics of the QuEChERS–LC–MS/MS method applied to the analysis of isoflavones in legumes samples

Validation		Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin A
<i>Calibration parameters</i>	Intercept (ua)	203 ± 54	1197 ± 92	55 ± 31	49 ± 62	604 ± 399	28 ± 13	581 ± 60	25 ± 64
	Slope (ua µg L ⁻¹)	145 ± 2	180 ± 4	188 ± 1	28 ± 1	129 ± 8	33.3 ± 0.6	74 ± 3	13 ± 0.3
	R ²	0.9992	0.9985	0.9999	0.9957	0.9892	0.9992	0.9957	0.9988
	LOD ^a (µg L ⁻¹)	0.97	1.5	1.2	1.03	0.91	0.97	0.71	1.1
	MLOD ^{a,b} (µg/100 g)	0.40	1.8	0.30	1.6	1.2	1.1	1.5	0.8
<i>Reproducibility as RSD %</i>	Chickpeas	–	–	–	–	9.8	19.2	15.8	17.3
	Lentils	21.1	–	22.9	10.1	–	20.3	16.7	25.7
	White beans	25.8	–	6.9	21.6	–	12.5	–	–
<i>Recovery</i>	Chickpeas	107 ± 8 ^c	96 ± 11	85 ± 15 ^c	84 ± 13 ^c	75 ± 13	104 ± 20	75 ± 12	97 ± 13
	Lentils	113 ± 13	95 ± 11 ^c	103 ± 17	107 ± 13	119 ± 15 ^c	77 ± 12	72 ± 12	75 ± 14
	White beans	100 ± 11	112 ± 7 ^c	104 ± 7	110 ± 7	109 ± 4 ^c	96 ± 14	101 ± 14 ^c	97 ± 13 ^c

^a S/N=3

^b MLOD: Limit of detection of method

^c Recovery of isoflavones not quantified in the samples.

beans and lentils. In light of this, the clean-up step was not necessary to increase the recovery of isoflavones from legumes. It should be noted that the time taken for the treatment of all samples was less than 20 min.

3.3. Method validation

3.3.1. Calibration curves and detection limits

Linearity was tested by the injection of standard mixtures of the eight isoflavones studied, in triplicate, at concentration levels ranging from 0.1 to 500 µg L⁻¹ for biochanin A; from 0.1 to 100 µg L⁻¹ daidzein and glycitein, and from 0.1 to 40 µg L⁻¹ for the rest. These ranges were chosen taking into account the expected levels in the matrices studied. Calibration curves based on the peak area versus the standard concentration were obtained and good correlation coefficients ($R^2 > 0.998$) were obtained for all compounds (Table 2).

Detection limits, calculated on the basis of a signal-to-noise ratio (S/N) of 3, were between 0.71 µg L⁻¹ for formononetin and 1.5 µg L⁻¹ for glycitin. The method detection limits (MLOD) were also evaluated, considering a sample blank without isoflavone, in some cases, or low-level real matrix sample in others (Table 2).

Quantitative determinations, using ESI as an ion source, may be affected by ion suppression, which mainly occurs due to the co-elution of matrix compounds with the analytes. The matrix effect was evaluated by comparison of the response of the target compounds in spiked legumes samples (standard addition calibration) and in aqueous standards calibration. The slopes of the standard addition and calibration with aqueous standards were compared for each analyte in the samples of legumes using Student's *t*-test. In all cases *p* values > 0.05 were found, suggesting that there were no significant differences between the two methods. It is therefore possible to conclude that there was no matrix effect.

In order to increase the precision of method, calibration curves based on the internal standard (IS) method were also obtained. Several analytes were tested—apigenin, 4,4'-dimethoxychalcone, 7,8-dimethoxyflavone and 3',4'-dimethoxyflavone. The latter was chosen as an IS because under the working conditions it was separated from the rest of analytes and it was ionized in the MS system. The concentration of the IS was also studied taking into account the analyte concentration obtained using the external standard quantification method. 10 mg L⁻¹ of 3',4'-dimethoxyflavone was added to standard mixtures of the isoflavones at the same concentration levels described above. The calibration curves based on the ratio between the peak areas of each standard and

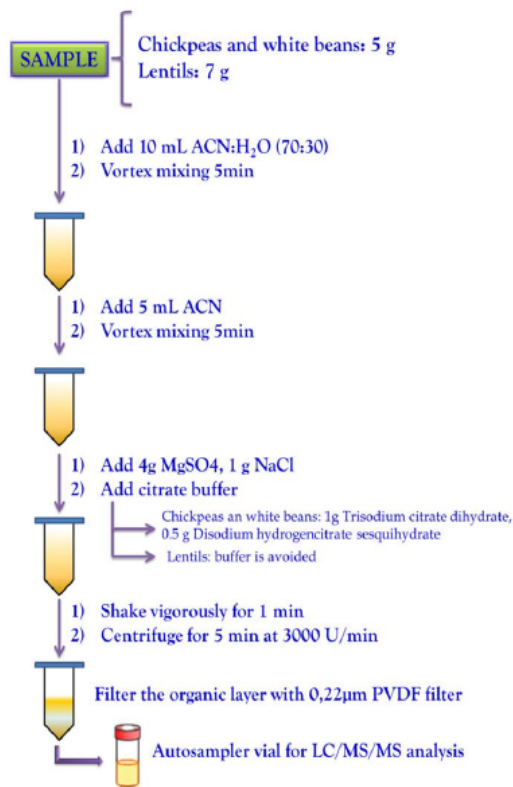


Fig. 7. Scheme of the proposed method.

the internal standard versus the standard concentration showed good correlation coefficients ($R^2 > 0.995$) for all compounds.

In the absence of certified or standard materials, the method was validated by measuring the percentage of recovery after the addition of known amounts of standard to the samples: chickpeas, lentils and white beans. Recovery studies performed in

Table 3
Isoflavone contents ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ dry sample \pm RSD) of legume samples using the external standard method (ES method) and the internal standard method (IS method)

Isoflavone	Chickpeas			Lentils			White beans		
	ES	IS	p^a	ES	IS	p^a	ES	IS	p^a
Daidzin	–	–	–	1.77 \pm 0.33	1.3 \pm 0.3	0.186	0.52 \pm 0.23	–	–
Glycitin	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Genistin	–	–	–	0.33 \pm 0.15	0.3 \pm 0.15	0.822	0.32 \pm 0.15	0.27 \pm 0.15	0.71
Daidzein	–	–	–	2.50 \pm 0.30	2.1 \pm 0.4	0.57	2.63 \pm 0.3	2.13 \pm 0.45	0.208
Glycitein	18 \pm 3	18 \pm 3	0.658	–	–	–	–	–	–
Genistein	3.1 \pm 0.4	3 \pm 0.5	0.707	10.3 \pm 0.5	9.3 \pm 0.5	0.092	1.35 \pm 0.35	1.02 \pm 0.3	0.303
Formononetin	4 \pm 1	3 \pm 1	0.584	2.3 \pm 1	1.5 \pm 1	0.339	–	–	–
Biochanin A	474 \pm 16	369 \pm 79	0.109	1.1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2	0.329	–	–	–

^a p -value obtained in Student's t -test

triplicate were carried out by spiking samples of legumes, before sample treatment, with the eight isoflavones studied at concentration levels close to those present in the original samples. When isoflavone was not naturally present in the samples the fortification level was $5\ \mu\text{g}\ \text{L}^{-1}$. Recovery % = (spiked sample–sample)/amount added directly injected. Values obtained are shown in the Table 2. In all cases the recovery values were satisfactory, ranging from 72% to 119%.

Reproducibility was checked as the precision on different days (inter-day). The relative standard deviation (RSD) values obtained for eight samples over consecutive six days ranged between 25.8% for daidzin in white beans and 9.8% for glycitein in chickpeas. These are highly very acceptable values for these types of kind of complex sample.

3.4. Applicability of the optimized method

In order to verify the applicability of the proposed method (Fig. 7), commercial samples of chickpeas, lentils and white beans from Castilla y León were analyzed in triplicate. Quantification of the isoflavones was performed using the external standard and the internal standard methods. The results obtained from the analysis of the three kinds of legume sample in $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of dry sample are shown in Table 3. As may be seen the highest contents of isoflavones were found in chickpeas. Biochanin A and glycitein were major isoflavones in chickpeas, genistein in lentils, and daidzein in white beans.

Comparison of the results obtained with the external standard and the internal standard methods was achieved using Student's t -test. There were no significant differences between the results obtained with either quantification method (at a level of significance of 0.05) and it was possible to perform the quantification using the internal standard or external standard methods.

On comparing the proposed QuEChERS–LC–MS/MS method with others reported in the literature, which analyze free and conjugated phytoestrogens in legumes and also use LC–MS/MS, it may be concluded that the limits of detection obtained with the proposed method are similar to those reported by Konar et al. [44] and even better than those obtained with the other method proposed by Antonelli and colleagues [45]. From point of view of sample treatment, in this case QuEChERS extraction is simpler and less time-consuming than the extractions used by these authors.

4. Conclusions

In this work a modified QuEChERS approach was applied for the extraction of analytes naturally present in food samples. The proposed method includes a two-step extraction process and allows the determination of isoflavones in pulses without the need of a

clean-up step. The extraction method is simple and easy to use, making it very suitable for complex matrices such as foods. The method developed was applied to determination of isoflavones in legumes of Spanish origin (chickpeas, lentils and beans, from the region of Castilla y León). The proposed method included extraction of the analytes using the QuEChERS methodology, followed by LC–MS/MS. This methodology permits determination of free and conjugated isoflavones in their natural form in pulses. The proposed method is precise, selective and not time-consuming.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2011-24075) and L.P.M. is also grateful to Regional Government of Castilla-León and European Social Fund for a doctoral fellowship.

References

- [1] L. Piššáková, I. Riečanský, F. Jagla, *Physiol. Res.* 59 (2010) 651–664.
- [2] W. Mazur, *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* 12 (1998) 729–742.
- [3] L.A. Fitzpatrick, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 32 (2003) 233–252.
- [4] C.E. Wood, T.C. Register, A.A. Franke, M.S. Anthony, J.M. Cliner, *Cancer Res.* 66 (2006) 1241–1249.
- [5] A. Cassidy, P. Albertazzi, I.L. Nielsen, W. Hall, G. Williamson, I. Tetens, S. Atkins, H. Cross, Y. Manios, A. Wolk, C. Steiner, F. Branca, *Proc. Nutr. Soc.* 65 (2006) 76–92.
- [6] B.J. Trock, L. Hilakivi-Clarke, R. Clarke, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 459–471.
- [7] G. Rimbach, C. Boesch-Saadatmandi, J. Frank, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, W.L. Hall, P.D. Weinberg, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 1308–1319.
- [8] A. Cano, M.A. García-Pérez, J.J. Tarín, *Maturitas* 67 (2010) 219–226.
- [9] A.A. Ali, M.T. Velasquez, C.T. Hansen, A.I. Mohamed, S.J. Bhatena, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 583–590.
- [10] A.A. Ali, M.T. Velasquez, C.T. Hansen, A.I. Mohamed, S.J. Bhatena, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 693–699.
- [11] C. Morris, J. Thorpe, L. Ambrosio, M. Santin, *J. Nutr.* 136 (2006) 1166–1170.
- [12] B.H. Arjmandi, B.J. Smith, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 130–137.
- [13] M. Raschke, K. Wahala, L. Beatrice, *J. Nutr.* 96 (2006) 426–434.
- [14] G.E. Hale, C.L. Hughes, J.M. Cline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3–15.
- [15] M.A. Rostagno, A. Villares, E. Guillamón, A. García-Lafuente, J.A. Martínez, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2–29.
- [16] A.C. Eldridge, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 353–355.
- [17] D.L. Luthria, S.S. Natarajan, *Planta Medica* 75 (2009) 704–710.
- [18] J. Vacek, B. Klejdus, L. Lojková, V. Kubán, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2054–2067.
- [19] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [20] S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepitapiboon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548–2560.
- [21] S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615–629.
- [22] S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485–520.
- [23] M. Anastassiades, E. Scherbaum, B. Tassdelen, D. Štajnbaher, in: H. Ohkawa, H. Miyagawa, P.W. Lee (Eds.), *Crop Protection Public Health, Environmental Safety*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007, pp. 439–458.
- [24] European Standard EN 15662, European Committee for Standardization, Brussels, 2008.
- [25] T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee, *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 67–74.
- [26] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaw, N. Leepitapiboon, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 10–20.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: METODOLOGÍA QueChERS

328

M.M. Deigado-Zamarreño et al. / Talanta 100 (2012) 320–328

- [27] U. Koesukwiwat, S.J. Lehotay, K. Mastovska, K.J. Dorweiler, N. Leepipatpiboon, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5950–5958.
- [28] A. Wilkowska, M. Bizuk, *Food Chem.* 125 (2011) 803–812.
- [29] L. Pareja, A.R. Fernández-Alba, V. Cesio, H. Heinzen, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 270–291.
- [30] S.W. Lee, J.H. Choi, S.K. Cho, H.A. Yu, A.M. Abd El-Aty, J.H. Shim, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4366–4377.
- [31] C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, S. Herrero Martín, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385–391.
- [32] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1893–1901.
- [33] M. Lombardo-Aguei, L. Gamiz-Gracia, C. Cruces-Blanco, A.M. García-Campaña, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4966–4971.
- [34] G. Stubbings, T. Digwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68–78.
- [35] J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich, M.M. Aguilera-Luiz, R. Romero González, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2777–2790.
- [36] M. Villar-Pulido, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, N. Ramos Martos, A. Molina-Díaz, *Talanta* 85 (2011) 1419–1427.
- [37] N. Klinsunthorn, A. Petsom, T. Nhujak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2011) 1175–1178.
- [38] I. Sospedra, J. Blesa, J.M. Soriano, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1437–1440.
- [39] M. Zachariassova, O. Lacina, A. Malachova, M. Kostelanska, J. Poustka, M. Godula, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 51–61.
- [40] A. Desmarchelier, J.M. Oberson, P. Tella, E. Gremaud, W. Seefelder, P. Mottier, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 7510–7519.
- [41] A. Garrido Frenich, R. Romero-Gonzalez, M.L. Gómez-Pérez, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4349–4356.
- [42] A.Y. Sirhan, G.H. Tan, R.C.S. Wong, *Food Control* 22 (2011) 1807–1813.
- [43] G.S. McLeod, M.J. Shepherd, *Phytochem. Anal.* 11 (2000) 322–326.
- [44] N. Konar, E.S. Poyrazoglu, K. Demir, N. Artik, *J. Food Compos. Anal.* 58 (2010) 7510–7519.
- [45] M.L. Antonelli, A. Faberi, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganà, *Talanta* 66 (2005) 1025–1033.

4.3. ESTUDIO DE LA PUESTA EN CONTACTO ENTRE
MUESTRA Y DISOLVENTE EN LA METODOLOGÍA
QuEChERS

4.3.1. OBJETIVO

En el capítulo anterior se ha desarrollado una metodología QuEChERS, unida a cromatografía líquida con detección de masas en tándem, que proporciona un método de análisis rápido, sencillo y efectivo que ofrece buenos resultados en la determinación de isoflavonas. Por ese motivo, se tomará dicha metodología como punto de partida para llevar a cabo el estudio del presente capítulo.

Uno de los factores que puede afectar al rendimiento de la extracción es la forma de contacto entre muestra y extractante. Este apartado está dirigido al estudio de esta puesta en contacto en el aislamiento de isoflavonas de una matriz alimentaria. El objetivo es encontrar el sistema de agitación que permita lograr un mejor contacto entre muestra y extractante, y así obtener un mejor rendimiento en la extracción.

Con este fin se analizarán los tres tipos de legumbres estudiados (garbanzos, lentejas y alubias) utilizando métodos convencionales de extracción con disolventes, empleando diferentes modos de agitación, y extracción asistida mediante ultrasonidos. Los sistemas de agitación empleados para llevar a cabo la extracción convencional serán un vórtex, un agitador magnético acoplado a un baño termostático y una bandeja termostataada con agitación; para la extracción empleando ultrasonidos se utilizarán un baño de ultrasonidos termostatado y una sonda de ultrasonidos.

Para comparar los distintos métodos, se inyectarán los extractos obtenidos en un sistema de cromatografía líquida acoplada a un sistema de detección de espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo.

Para seleccionar la metodología de puesta en contacto más adecuada para cada tipo de muestra, se compararán tanto los parámetros de validación obtenidos con cada una de ellas (repetibilidad, reproducibilidad y recuperación) como los contenidos encontrados en las distintas muestras.

4.3.2. INTRODUCCIÓN

La extracción de isoflavonas de muestras de alimentos se lleva a cabo generalmente mediante extracción con disolventes orgánicos. Los disolventes más empleados son metanol^{299,300,301}, etanol^{151,302,303} y acetonitrilo^{102,103,304}, puros o mezclados con agua en diferentes proporciones. La extracción se lleva a cabo tanto a temperatura ambiente como a temperatura elevada, empleando diferentes modos de agitación, en presencia o no de medio ácido^{305,306}. En la tabla 4.15 se muestra un resumen de las técnicas de extracción convencionales más empleadas en el análisis de isoflavonas en alimentos. Como puede apreciarse, este tipo de extracción se ve influenciado por una gran cantidad de factores como la naturaleza del disolvente, la temperatura, la duración de la extracción, o la forma de poner en contacto la muestra y el disolvente.

El contacto entre la muestra y el extractante es uno de los puntos claves en la extracción de cualquier analito. El disolvente utilizado debe ser capaz de interactuar con los puntos de permeabilidad de la muestra y así poder introducirse en la matriz y extraer los analitos. Dicha capacidad de permeabilidad de la muestra no depende únicamente de las propiedades fisico-químicas del disolvente extractante, véase por ejemplo la polaridad, sino también del modo de poner en contacto la muestra y el extractante. Por tanto, el modo de agitación es una variable decisiva en la etapa de extracción.

²⁹⁹ B. Eisen, Y. Ungar, E. Shimoni; *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2212

³⁰⁰ K.D.R. Setchell, S.J. Cole, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4146

³⁰¹ H.S. Tsai, L.J. Huang, Y.H. Lai, J.C. Chang, R.S. Lee, R.Y.Y. Chiou; *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7712

³⁰² E.J. Zhang, K.M. Ng, K.Q. Luo; *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6940

³⁰³ S.Y. Cho, Y.N. Lee, H.J. Park; *Food Chem.* 117 (2009) 312

³⁰⁴ P.A. Murphy, K. Barua, C.C. Hauck; *J. Chromatogr. B* 777 (2002) 129

³⁰⁵ S.J. Lee, J.K. Ahn, S.H. Kim, J.T. Kim, S.J. Han, M.Y. Jung, I.M. Chung; *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3382

³⁰⁶ S.J. Lee, W. Yan, J. K. Ahn, I.M. Chung; *Field Crops Res.* 81 (2003) 181

Tabla 4.15. Revisión bibliográfica de las técnicas convencionales de extracción de isoflavonas en matrices alimentarias.

MUESTRA	TIPO DE AGITACIÓN	DISOLVENTE		TIEMPO Y		REFERENCIA
		EXTRACTANTE	EXTRACTANTE	TEMPERATURA	TEMPERATURA	
Leche de soja	Batido	MeOH		2 h, t ^a ambiente		299
Derivados de soja	Reflujo	80%MeOH		1h		300
Legumbre de soja	Inmersión por agitación manual cada 5 minutos	80%MeOH		30 min, 70°C		301
Legumbre de soja	Agitación (Stirring)	96% EtOH		8 h, 80°C		302
Brotos de soja	Reflujo en torre vertical	80-90% EtOH		100 min, 90°C		303
Bebidas de soja	Mezclador por inmersión	EtOH		30 min, t ^a ambiente		151
Suplementos en leche y zumo	Vórtex	20% ACN		1 min + 15 min ↓ t ^a ambiente		307
Derivados de soja y suplementos alimenticios	Rotor	60% ACN		2 h, t ^a ambiente		102
Derivados de soja	Agitación(Stirring)	58% ACN		2 h, t ^a ambiente		304
Legumbre de soja	Agitación(Stirring)	58% ACN		2 h, t ^a ambiente		103
Legumbre de soja	Agitación(Stirring)	0.1 M HCl ; ACN		2 h, t ^a ambiente		305
Legumbre de soja	Agitación(Stirring)	0.1 M HCl ;80 % ACN		2 h, t ^a ambiente		306

³⁰⁷ A. Zafra-Gómez, A. Garballo, L.E. García-Ayuso, J.C. Morales; *Food Chem.* 123 (2010) 872

Los procedimientos de preparación de muestra basados en extracción con disolventes son laboriosos, tediosos, con tiempos de extracción elevados y conllevan el empleo de grandes cantidades de disolventes orgánicos. En la actualidad se intenta utilizar métodos que eviten estos inconvenientes y proporcionen mayor eficacia, selectividad y facilidad para ser automatizados. Estos métodos incluyen la extracción con fluidos presurizados (PLE), extracción mediante fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por microondas (MAE) o extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Sin embargo, estas técnicas requieren un equipamiento más caro y complejo que el requerido para las extracciones convencionales.

La UAE es considerada por algunos autores como una modalidad de extracción con disolventes, donde la única variante es que el uso de ultrasonidos potencia el contacto entre muestra y disolvente. Esta técnica destaca por su simpleza y su elevada eficacia. La eficacia en este tipo de extracciones es debida al fenómeno de cavitación que tiene lugar en el disolvente al paso de la onda de ultrasonidos. Las burbujas se comprimen por el uso de ultrasonidos, dando lugar a un aumento de presión y temperatura que ocasiona la ruptura de la burbuja. Con ello se genera una onda de choque que atraviesa el disolvente favoreciendo así la mezcla³⁰⁸. Además, los ultrasonidos ejercen un efecto mecánico que produce un aumento en la superficie de contacto entre el disolvente y la matriz de la muestra, ya que permiten una mayor penetración del disolvente en dicha matriz.

Algunos autores han comprobado que la eficacia de la extracción de isoflavonas en soja aumenta considerablemente cuando se emplean ultrasonidos, respecto al método tradicional de extracción con disolventes con agitación mecánica¹¹⁹. Esta técnica presenta además la ventaja de permitir la extracción de los analitos a temperatura ambiente frente a metodologías que implican una elevada temperatura de extracción que puede afectar a la funcionalidad de la sustancia extraída. Este es el caso de la extracción asistida por microondas que, a pesar de ello, presenta una mayor eficiencia que los ultrasonidos en la extracción de flavonoides³⁰⁹.

³⁰⁸ L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J.P. Lorimer, T.J. Manson; *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 299

³⁰⁹ M. Gao, C. Liu; *World J. Microb. and Biot.* 21 (2005) 1461

En el capítulo anterior se propuso una versión modificada de la metodología QuEChERS para la extracción de ocho tipos diferentes de isoflavonas, agliconas y glucósidos, presentes de forma natural en matrices de alimentos tales como las legumbres. La metodología propuesta presentaba claras ventajas en cuanto a simplicidad, sencillez y rapidez. En ese caso, para poner en contacto la muestra y extractante se utilizó el vórtex, que es el sistema de agitación utilizado en la metodología QuEChERS. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al realizar modificaciones en la puesta en contacto entre muestra y extractante.

4.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.3.1. Tratamiento de muestra

La etapa de tratamiento de muestra mediante el método QuEChERS fue descrita en el capítulo anterior de la memoria, por lo que a continuación se describe de forma resumida.

Se deposita la cantidad de muestra optimizada en un tubo de centrifuga con tapón de rosca y se adicionan 10 mL de una mezcla de ACN : H₂O (70:30, v:v), agitando con el sistema correspondiente a cada estudio durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 5 mL de ACN puro y se agita nuevamente durante otros 5 minutos. Se añade la mezcla de sales para favorecer la separación de fases en los casos en que sea necesario, consistente en una mezcla MgSO₄ : NaCl (4:1, p / p) acompañada en el caso de garbanzos y alubias por una mezcla Na₃Cit.2H₂O : Na₂HCit.1.5H₂O (1:0.5, p/p), agitando vigorosamente durante 1 minuto. Finalmente, el tubo se centrifuga a una velocidad de 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se filtra a través de filtros de PVDF de 0.22 µm con jeringa de vidrio y está listo para ser inyectado en el sistema cromatográfico.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las descritas en el capítulo anterior, empleando en este caso un volumen de inyección de 2 µL.

4.3.3.2. Estudio de la puesta en contacto de la muestra y el disolvente

Para el estudio de la puesta en contacto entre la muestra y el disolvente se emplearon los tres tipos de muestra en estudio (garbanzos, lentejas y alubias), aplicando el método de extracción descrito en el apartado 4.3.3.1. *Tratamiento de muestra*. Para llevar a cabo la agitación se utilizaron tanto métodos convencionales de agitación, como extracción asistida mediante ultrasonidos (UAE).

Los sistemas de agitación empleados fueron: un vórtex, un agitador magnético acoplado a un baño termostático y una bandeja termostatada con agitación, para llevar a cabo la extracción convencional con disolventes; y un baño de ultrasonidos termostatado y una sonda de ultrasonidos para la UAE.

Los parámetros que más influyen en el proceso de extracción son la naturaleza del disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción así como la forma de poner en contacto la muestra y el disolvente. En el caso de las isoflavonas de soja, una variable muy citada por diferentes autores es la humedad de la muestra; sin embargo, en el caso de las muestras analizadas en el presente trabajo no se ha apreciado la influencia de ésta. En el capítulo anterior se realizó un estudio exhaustivo tanto del disolvente extractante como del tiempo de extracción aplicando la metodología QuEChERS, por lo que estas variables se mantienen constantes en este capítulo.

La temperatura es una variable crítica, ya que temperaturas elevadas provocan un aumento en la eficacia de la extracción, pero también pueden ocasionar la degradación de los analitos de interés. Una revisión bibliográfica, así como algunos ensayos previos, pusieron de manifiesto que una temperatura adecuada para llevar a cabo la extracción de isoflavonas es 60°C, por lo que se eligió ésta en los casos en los que el sistema de agitación permite la termostatación; en el resto de los casos la extracción se realiza a temperatura ambiente.

La cantidad de muestra, aunque ya se ha estudiado en el capítulo anterior, se ha optimizado para cada tipo de agitación, ya que puede afectar de forma importante a la puesta en contacto entre muestra y disolvente. Así, cantidades grandes de muestra pueden hacer que algunos tipos de agitación no sean capaces de conseguir un contacto total de la muestra con el disolvente. Asimismo, se estudió la influencia de la adición de tampón citrato con objeto de comprobar si el control de pH era o no necesario.

A continuación se describen los estudios realizados y los resultados obtenidos con cada uno de los sistemas de agitación. Los estudios correspondientes al sistema vórtex se detallaron en el capítulo anterior, por lo que no se precisan ahora, sólo se utilizarán en la comparación de resultados.

4.3.3.2.1. Agitación mediante métodos convencionales

El método convencional para la extracción de isoflavonas fue desarrollado por Griffith y Collison¹⁰² y modificado por Murphy y cols.³⁰⁴ empleando un agitador magnético. Los sistemas de agitación empleados en el presente trabajo para llevar a cabo este tipo de extracción fueron un agitador magnético acoplado a un baño termostático y una bandeja termostatada con agitación, además del sistema vórtex ya empleado en el capítulo anterior. Con los sistemas que permiten termostatación, las extracciones se llevaron a cabo a 60 °C.

- Agitador magnético acoplado a un baño termostático

El sistema de agitación utilizado es el indicado en la figura 3.3. IC (pág.94). Sobre un agitador magnético se coloca una celda de doble boca conectada al sistema de termostatación por dos gomas de caucho. En el interior de la celda se introduce el tubo de centrifuga donde se han depositado previamente la muestra, el disolvente y el imán agitador. La temperatura es comprobada tanto en el baño como en el interior de la celda para asegurar una temperatura constante.

- Bandeja termostatada con agitación

El sistema empleado es el que se muestra en la figura 3.3. IB (pág.94). Se trata de un equipo que permite una agitación horizontal de los tubos mientras que éstos se encuentran termostatados a una temperatura de 60 ° C. El principal inconveniente de este sistema es que la agitación no es muy vigorosa, a diferencia de vórtex y agitación magnética. Como ventaja cabe destacar que permite la agitación de hasta doce muestras a la vez.

4.3.3.2.2. *Agitación asistida por ultrasonidos*

Las extracciones llevadas a cabo con ultrasonidos utilizan sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender el analito de interés del material en estudio. El empleo de ultrasonidos produce un aumento en la eficacia de extracción debido a la combinación de dos efectos: el fenómeno de cavitación y el efecto mecánico que potencia la penetración del disolvente en la matriz. En esta Memoria se utilizaron un baño de ultrasonidos y una sonda de ultrasonidos.

- *Baño de ultrasonidos conectado a un baño termostático*

El sistema de agitación propuesto en este caso es el mostrado en la figura 3.3. IIA (pág.94). Consta de un baño de ultrasonidos conectado mediante dos gomas de caucho a un termostato de inmersión programado para alcanzar una temperatura de 60°C. El circuito de agua que fluye del termostato al baño de ultrasonidos es cerrado.

- *Sonda de ultrasonidos*

Este sistema es el indicado en la figura 3.3. IIB (pág.94). Actualmente, en las extracciones basadas en ultrasonidos, se han comenzado a utilizar este tipo de sondas que constan de una micropunta de unos 2 mm que se coloca en el interior de la muestra, lo que aumenta la eficacia de la extracción.

El fenómeno de cavitación tiene lugar al introducir la sonda en el interior del tubo con la muestra y el disolvente extractante. La agitación es rápida, eficaz y homogénea.

Debido a la naturaleza de las muestras y a la facilidad que presentan las mismas para formar aglomerados, se decidió adaptar la velocidad de la sonda a dicha situación. Así pues, se utilizaron unos 14 W para la extracción,

una velocidad que no supone un daño para la integridad de la muestra pero que evita la formación de dichos cúmulos de materia.

Se debe señalar dentro de las características de las diferentes formas de agitación, que en algunos casos la extracción se lleva a cabo de forma individual mientras que en otros la extracción se puede llevar a cabo varias muestras a la vez; este hecho puede ser importante cuando se consideran análisis de rutina.

4.3.3.2.3. *Estudio de la cantidad de muestra*

En el capítulo anterior ya se indica que, dependiendo de la matriz, la cantidad más adecuada de muestra es 5 gramos en el caso de garbanzos y alubias y 7 gramos en el caso de lentejas; estas cantidades son las óptimas cuando se utiliza agitación mediante vórtex.

Para estudiar la influencia de este parámetro sobre la eficacia de la extracción empleando los distintos sistemas de agitación, se ha variado la cantidad de muestra desde 2 hasta 10 gramos para garbanzos, lentejas y alubias. En las figuras 4.30, 4.31 y 4.32 se muestra la representación de los contenidos obtenidos para la isoflavona mayoritaria y el total de isoflavonas, de cada legumbre, en función de los sistemas de agitación utilizados, para dos cantidades de muestra.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

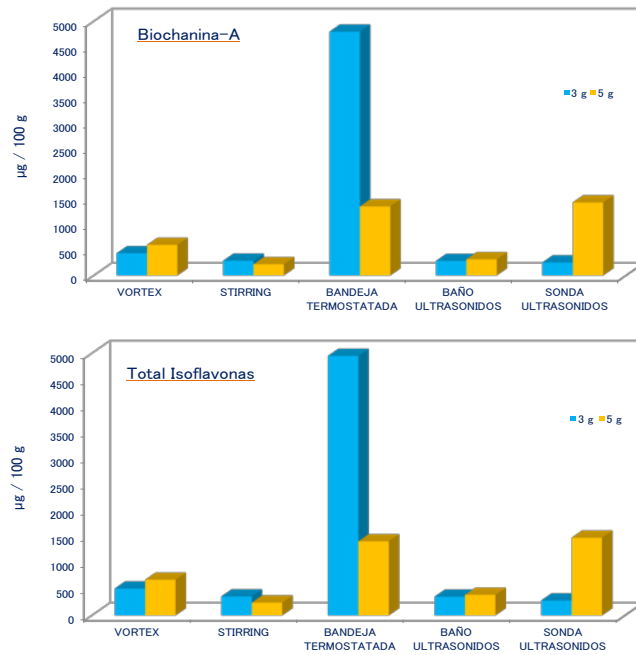


Figura 4.30. Influencia de la cantidad de muestra en la extracción. Muestras de garbanzos.

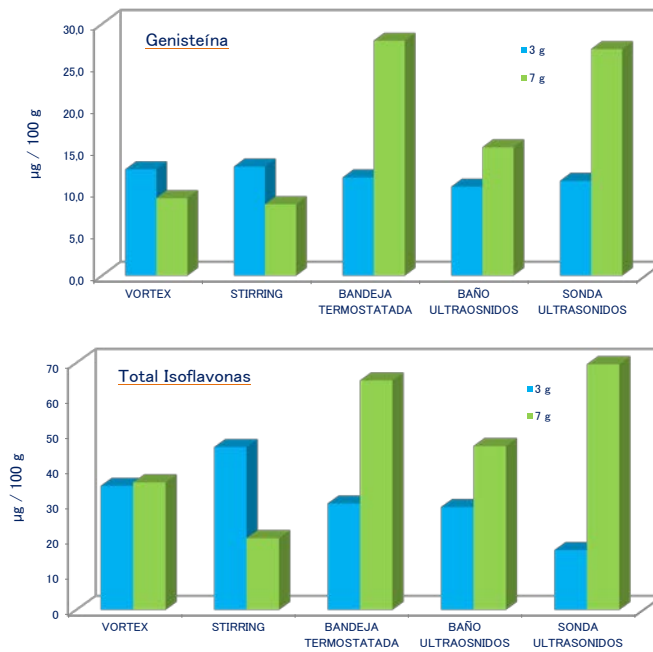


Figura 4.31. Influencia de la cantidad de muestra en la extracción. Muestras de lentejas.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

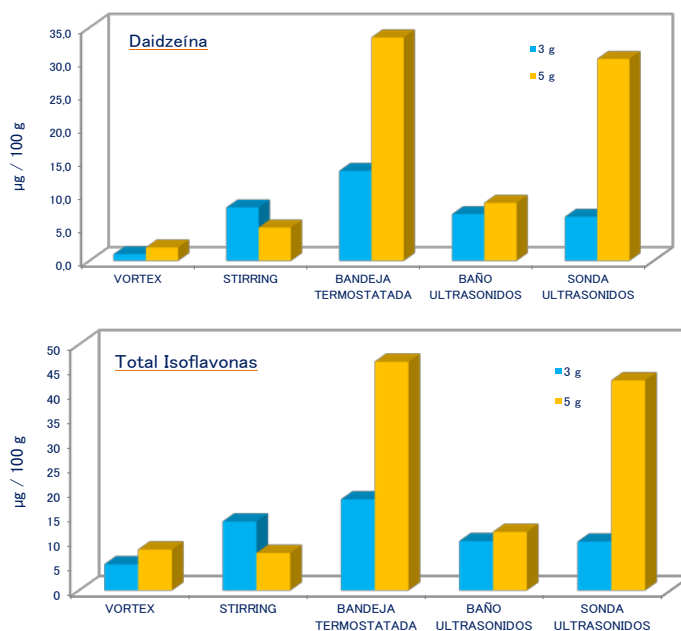


Figura 4.32. Influencia de la cantidad de muestra en la extracción. Muestras de alubias.

Se observa un comportamiento diferente, en cuanto a eficacia en la extracción frente al aumento de la cantidad de muestra, en función del sistema de agitación empleado.

Del estudio de los resultados se deduce que cuando se utiliza agitador magnético la eficacia de la extracción disminuye al aumentar la cantidad de muestra. Es lógico pensar que cantidades de muestra menores podrían favorecer el movimiento del imán en el interior del tubo, permitiendo un mejor contacto entre la muestra y el disolvente, y logrando así una mayor eficacia de extracción. Este comportamiento se observa para los tres tipos de muestra.

En el caso de lentejas y alubias, la eficacia de la extracción aumenta con la cantidad de muestra cuando el sistema de agitación empleado es vórtex o bandeja termostatada. En estos casos, la agitación se produce de forma

externa, por el movimiento de toda la masa de sólido simultáneamente. Si el disolvente es capaz de penetrar bien en los poros de la matriz, la eficacia de la extracción aumenta al hacerlo la cantidad de muestra.

En el caso de garbanzos ocurre lo contrario cuando se emplea la bandeja termostatada; este hecho puede ser debido a la morfología de las muestras. Al añadir el disolvente de extracción sobre las muestras de garbanzos triturados, se observaba un apelmazamiento de las mismas, mayor cuanto mayor es la cantidad de muestra. Los aglomerados formados son duros e impiden el paso adecuado del disolvente en su interior, por lo que la eficacia de la extracción se ve desfavorecida. Por ello, cuando se utiliza la bandeja termostatada para la agitación de muestras de garbanzos, la eficacia aumenta cuando la cantidad de muestra disminuye. Este efecto no se observa, al menos de forma importante, en el caso de lentejas y alubias.

En cuanto a los dos sistemas de agitación que utilizan ultrasonidos, el comportamiento observado para los tres tipos de muestra es el mismo, a mayor cantidad de muestra mayor eficacia en la extracción. Además, en los tres casos, se obtiene mayor rendimiento cuando se emplea la sonda.

Esto puede deberse a que, mientras que al emplear el baño termostatado se favorece la eficacia de la extracción por efecto de la temperatura, en el caso de la sonda de ultrasonidos ésta se ve favorecida por el aumento de fenómenos de cavitación al poner en contacto dicha sonda con la muestra. La agitación con la sonda de ultrasonidos es más vigorosa que en el caso del baño, por lo que no se forman cúmulos de materia que no puedan ser atravesados por el disolvente extractante.

En la figura 4.36 se resumen las condiciones optimizadas para cada sistema de agitación y tipo de muestra.

4.3.3.2.4. *Estudio de la presencia de tampón*

Como se ha mencionado al principio del capítulo, otro parámetro estudiado fue la influencia que tiene la presencia o no de tampón citrato. Se realizaron extracciones de los tres tipos de matrices con y sin tampón citrato, en las cantidades descritas anteriormente.

En las figuras 4.33, 4.34 y 4.35 se puede observar la variación del contenido encontrado, para la isoflavona mayoritaria y el total de isoflavonas, al utilizar las diferentes metodologías de agitación para los tres tipos de muestras.

Del estudio de los resultados se puede afirmar que en el caso de garbanzos y alubias se obtienen mejores resultados en presencia de tampón, excepto cuando se utiliza el agitador magnético. En el caso de las muestras de lentejas se obtienen mejores resultados en todos los casos cuando la extracción se lleva a cabo en ausencia de citrato. Un resumen de estas conclusiones se recoge en la figura 4.36.

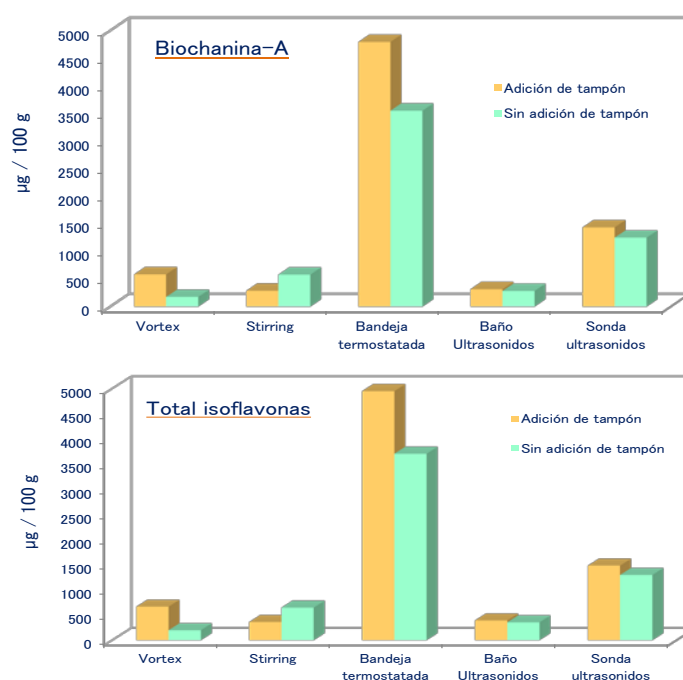


Figura 4.33. Influencia de la presencia de tampón en la extracción de isoflavonas en muestras de garbanzos.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

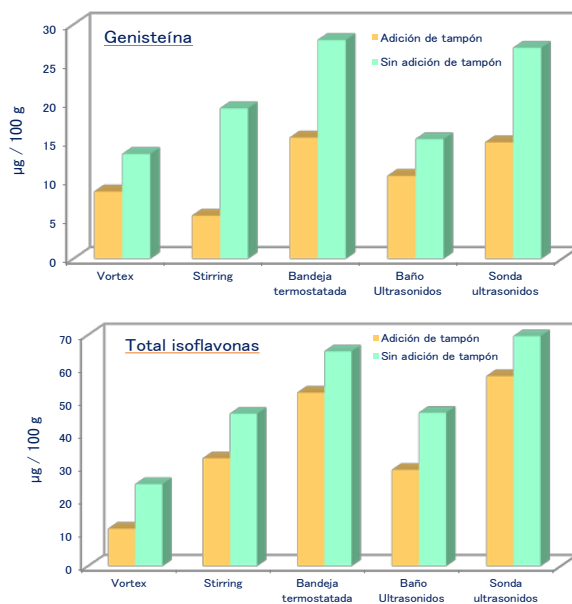


Figura 4.34. Influencia de la presencia de tampón en la extracción de isoflavonas en muestras de lentejas.

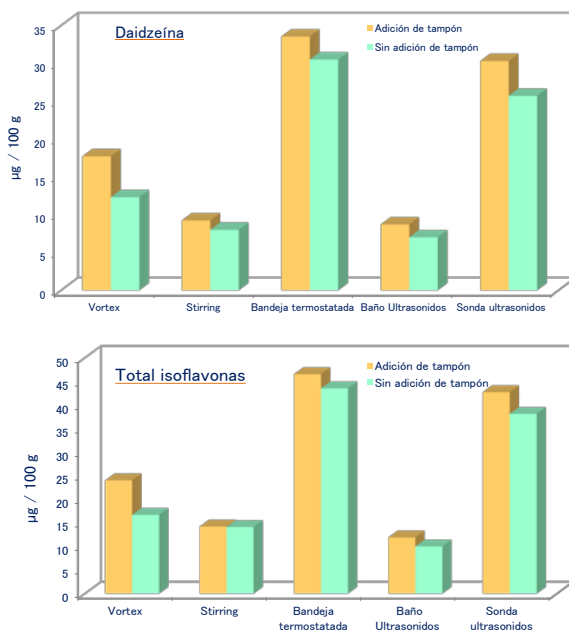


Figura 4.35. Influencia de la presencia de tampón en la extracción de isoflavonas en muestras de alubias.

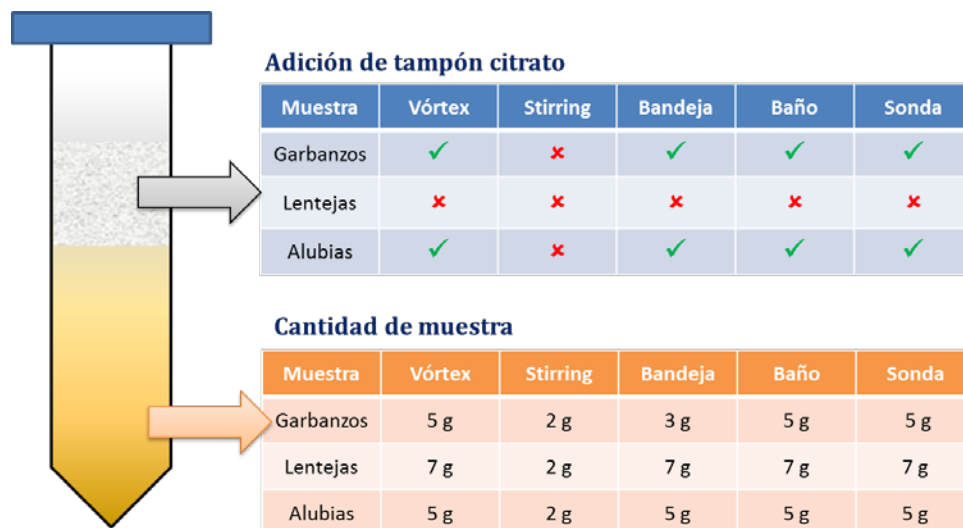


Figura 4.36. Resumen de la cantidad de muestra así como de la utilización del tampón citrato para cada una de las metodologías propuestas.

4.3.3.2.5. Reproducibilidad y recuperación

Con objeto de seleccionar la metodología más apropiada para cada tipo de muestra, se llevó a cabo un estudio de la repetibilidad, reproducibilidad y recuperación obtenidas empleando cada uno de los sistemas de puesta en contacto entre muestra y disolvente.

En la tabla 4.16 se muestran los valores de los coeficientes de variación obtenidos para los de los tres tipos de muestras con los cinco sistemas de agitación. El estudio de repetibilidad se llevó a cabo por inyección de 4 muestras en el mismo día, mientras que el de reproducibilidad se obtuvo inyectando ocho muestras diferentes a lo largo de dos meses.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Tabla 4.16. Reproducibilidad *inter* e *intra-day* de las diferentes metodologías propuestas (Coeficientes de variación expresados en %).

			DIN	GLIN	GIN	DEN	GLEN	GEN	FOR	BIO
Reproducibilidad <i>intra-day</i>	GARBANZOS	Vórtex					7.5	5.4	7.1	6.2
		Stirring			5.7		1.7	9.4	11	5.6
		Bandeja			4.4		4.5	4.6	3.3	2.7
		Baño			9.7		11	7.7	15	9.1
		Sonda			1.9		5.2	11	4.7	4.7
	LENTEJAS	Vórtex	16		13	10		15	15	16
		Stirring	3.5		15	9.3	6.9	5.9	13	15
		Bandeja	10		4.3	4.6	9.5	9.2	3.5	12
		Baño	8.1		13	12	11	11	14	10
		Sonda	2.2		3.4	4.7	6.0	1.2	3.9	5.5
	ALUBIAS	Vórtex	5.6		15	9.5		6.2		
		Stirring	3.5		7.2	4.9		16		
Bandeja		8.6		3.9	2.1		4.6			
Baño		2.9		12	3.6		3.2			
Sonda		9.2		4.7	6.6		3.8			
Reproducibilidad <i>inter-day</i>	GARBANZOS	Vórtex					9.8	19	16	17.3
		Stirring			12		1.8	19	5.6	12
		Bandeja			17		6.8	17	20	19
		Baño			25		26	24	11	19
		Sonda			20		7.4	13	23	13
	LENTEJAS	Vórtex	21		23	10		20	17	26
		Stirring	28		20	9.9	15	8.1	12	26
		Bandeja	19		18	30	39	32	17	27
		Baño	8		12	23	17	12	13	15
		Sonda	14		14	20	12	10	19	13
	ALUBIAS	Vórtex	26		6.9	22		12		
		Stirring	12		13	8.2		15		
		Bandeja	15		11	15		13		
		Baño	29		15	16		22		
		Sonda	19		15	16		8.3		

Como era de esperar, se obtienen valores muy diferentes para dichos coeficientes; en el caso de la repetibilidad o precisión *intra-day* tenemos un margen de valores que abarca desde el 2.1% hasta un 16%, mientras que en el caso de la reproducibilidad *inter-day* podemos encontrar valores en un margen mayor, 1.8 – 39%. Se debe de señalar que los valores superiores al 20% se refieren a los analitos presentes en las muestras a niveles cercanos a sus límites de detección; excepto en el caso de la genisteína en muestras de lentejas y utilizando bandeja termostatada.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Según el criterio de “*Commission Decision 2002 / 657 EC*”, para que un valor sea considerado aceptable, éste tiene que ser menor del 22%. A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que para los garbanzos los mejores resultados se obtienen con vórtex, agitación magnética o bandeja; para lentejas sólo sería adecuado el empleo de sonda, mientras que para alubias se obtienen resultados adecuados con agitación magnética, bandeja y sonda.

También se determinaron las recuperaciones con cada uno de los métodos de agitación, adicionando sobre cada uno de los tipos de muestra una cantidad conocida de disolución patrón, conteniendo a cada analito en una cantidad próxima a la presente en las muestras. Cuando el analito a determinar no se encontraba presente de forma natural en la muestra, se adicionó una cantidad de 5 µg L⁻¹. El dopaje de las muestras se realizó de forma previa a la extracción. Los valores de las recuperaciones se determinaron por triplicado, obteniéndose valores comprendidos entre 70 - 120% para la mayoría de los casos (tabla 4.20), valores considerados satisfactorios según la “*Commission Decision 2002 / 657 EC*”. Los valores fuera de este margen suponen que la metodología propuesta no sería adecuada para ese tipo de muestra. Así, se podría decir que en el caso de lentejas no sería adecuada la agitación mediante baño de ultrasonidos.

Tabla 4.17. Recuperaciones en % obtenidas para cada uno de los sistemas de agitación propuestos en las distintas matrices a analizar.

		DIN	GLIN	GIN	DEN	GLEN	GEN	FOR	BIO
GARBANZOS	Vórtex	107	96	85	84	75	104	63	97
	Stirring	85	91	85	81	94	74	100	89
	Bandeja	82	96	82	88	113	78	70	80
	Baño	73	80	67	72	102	82	107	105
	Sonda	70	82	80	75	97	81	94	89
LENTEJAS	Vórtex	81	87	91	101	75	77	74	75
	Stirring	80	98	88	93	92	88	97	105
	Bandeja	83	102	72	95	109	99	106	116
	Baño	56	62	65	85	81	60	78	20
	Sonda	71	86	74	81	102	83	97	120
ALUBIAS	Vórtex	85	99	91	107	109	84	88	87
	Stirring	89	99	73	83	95	61	98	80
	Bandeja	90	92	78	108	96	95	84	75
	Baño	76	84	65	101	89	82	97	87
	Sonda	71	81	72	105	97	92	78	118

4.3.3.3. Análisis de las muestras

Con objeto de confirmar la aplicabilidad de las metodologías, se analizaron muestras comerciales de garbanzos, lentejas y alubias procedentes de la región de Castilla y León por triplicado, aplicando los cinco tipos de agitación propuestos en las condiciones más adecuadas para cada uno de los sistemas de agitación.

En la figura 4.37 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras utilizando el sistema de agitación más adecuado en cada caso.

Los resultados obtenidos en cuanto a contenidos de los analitos en garbanzos, lentejas y alubias se encuentran recogidos en la tabla 4.18. La cuantificación se ha llevado a cabo mediante patrón externo. Para evitar posibles fluctuaciones en la señal, el calibrado con patrón externo fue inyectado simultáneamente a la determinación de las muestras.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

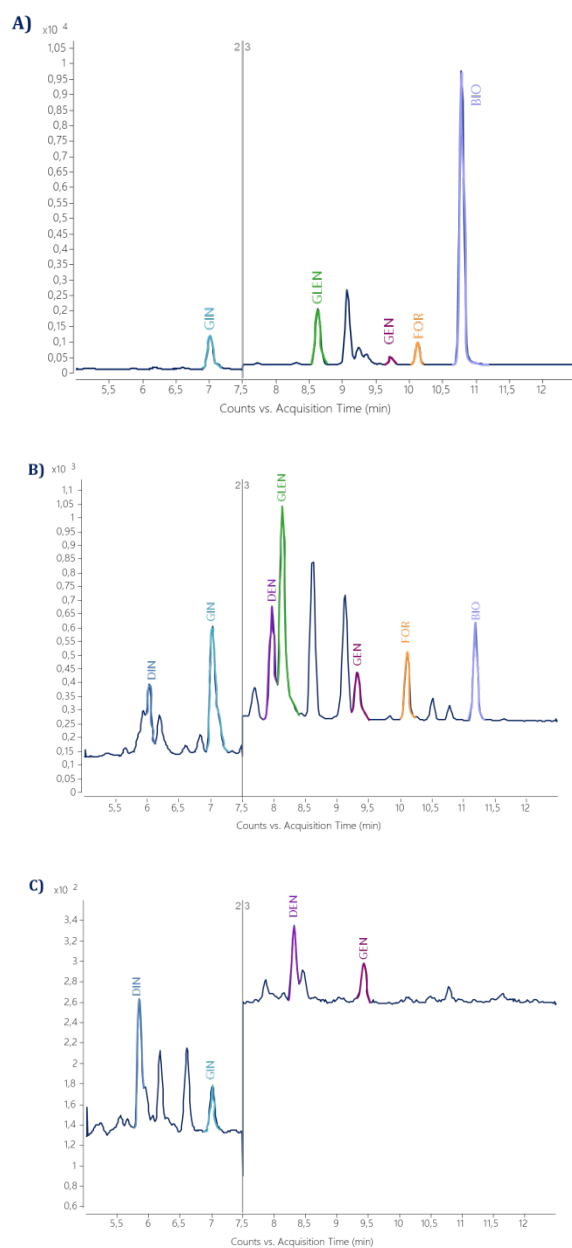


Figura 4.37. Cromatogramas obtenidos para las muestras de A) garbanzos y C) alubias, empleando como sistema de agitación la bandeja termostatada; y de B) lentejas, empleando como sistema de agitación la sonda de ultrasonidos.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Tabla 4.18. Contenido total de isoflavonas presentes ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ de materia seca) en las legumbres analizadas según el sistema de puesta en contacto empleado.

		DIN	GLIN	GIN	DEN	GLEN	GEN	FOR	BIO
<i>GARBANZOS</i>	Vórtex	n.d	n.d	n.d	n.d	18 \pm 3	3.1 \pm 0.4	4 \pm 1	474 \pm 16
	Stirring	n.d	n.d	1.23 \pm 0.05	n.d	55.5 \pm 0.5	5.5 \pm 0.5	10 \pm 1	581 \pm 13
	Bandeja	n.d	n.d	1.9 \pm 0.1	n.d	9.8 \pm 0.2	47 \pm 3	98 \pm 2	4794 \pm 171
	Baño	n.d	n.d	0.23 \pm 0.03	n.d	60 \pm 4	5.9 \pm 0.3	9.3 \pm 0.6	317 \pm 8
	Sonda	n.d	n.d	1.56 \pm 0.06	n.d	10.7 \pm 0.6	8.1 \pm 0.6	26 \pm 1	1436 \pm 81
<i>LENTEJAS</i>	Vórtex	1.8 \pm 0.3	n.d	0.33 \pm 0.15	2.5 \pm 0.3	n.d	10.3 \pm 0.5	2.3 \pm 1	1.1 \pm 0.4
	Stirring	2.9 \pm 0.1	n.d	0.45 \pm 0.01	2.0 \pm 0.4	2.8 \pm 0.2	14 \pm 1	8.8 \pm 0.5	18 \pm 3
	Bandeja	1.47 \pm 0.06	n.d	0.44 \pm 0.04	2.9 \pm 0.4	4.1 \pm 0.1	28 \pm 1	13 \pm 0.6	18 \pm 1
	Baño	0.8 \pm 0.2	n.d	0.38 \pm 0.03	4.4 \pm 0.3	17.9 \pm 2.4	15.3 \pm 0.3	5.7 \pm 0.6	2.0 \pm 0.3
	Sonda	1.32 \pm 0.06	n.d	0.51 \pm 0.04	3.2 \pm 0.4	4.4 \pm 0.8	27 \pm 1	15.2 \pm 0.6	18 \pm 1
<i>ALUBIAS</i>	Vórtex	0.5 \pm 0.2	n.d	0.3 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3	n.d	1.4 \pm 0.4	n.d	n.d
	Stirring	2.3 \pm 0.5	n.d	1.45 \pm 0.05	8.0 \pm 0.5	n.d	2.3 \pm 0.4	n.d	n.d
	Bandeja	2.2 \pm 0.3	n.d	2.1 \pm 0.1	34 \pm 2	n.d	8 \pm 5	n.d	n.d
	Baño	0.7 \pm 0.2	n.d	0.37 \pm 0.03	8.7 \pm 0.3	n.d	2.1 \pm 0.3	n.d	n.d
	Sonda	2.1 \pm 0.3	n.d	1.79 \pm 0.03	30 \pm 2	n.d	7.8 \pm 0.3	n.d	n.d

A la vista de los resultados obtenidos, tanto en la validación como en la evaluación del contenido en isoflavonas de las diferentes muestras, se proponen como formas más adecuadas de poner en contacto la muestra y el disolvente, empleando la metodología QuEChERS desarrollada, la bandeja termostatada y la sonda de ultrasonidos. Los mejores resultados obtenidos con estos sistemas pueden ser debidos a que la agitación que tiene lugar utilizando estos sistemas es más homogénea y simultánea que para el resto, alcanzando dichas metodologías todos los puntos de la matriz. Con el empleo del vórtex o el baño de ultrasonidos, las muestras se compactaban, impidiendo con ello el contacto entre muestra y extractante de forma eficaz. La agitación magnética se descartó debido a su peor reproducibilidad, achacable al movimiento del imán en el interior del recipiente.

En el caso de la extracción de muestras de lentejas se observa que el sistema de agitación más apropiado es la sonda de ultrasonidos; la bandeja empleada presenta en este caso una mala reproducibilidad, tal y como se mostró en la tabla 4.16. Sin embargo en el caso de garbanzos y alubias es adecuado utilizar la bandeja termostatada, con la ventaja de que este sistema permite tratar hasta doce muestras a la vez.

4.3.4. CONCLUSIONES

El presente capítulo recoge un estudio comparativo de diferentes modos de poner en contacto la muestra y el disolvente en la extracción de isoflavonas en muestras de legumbres, con objeto de conseguir una extracción rápida y efectiva de dichos analitos, presentes de forma natural en las muestras analizadas.

Se han evaluado diferentes modos de agitación aplicando la metodología basada en la extracción QuEChERS. Se han observado diferentes comportamientos en función del tipo de muestra dependiendo de los distintos modos de puesta en contacto entre muestra y disolvente, encontrándose que no todos son adecuados para las diferentes muestras.

Tras comparar tanto los contenidos encontrados como los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad y recuperación para los diferentes sistemas aplicados a las distintas muestras, se concluye que los modos más adecuados de poner en contacto la muestra con el extractante en la metodología propuesta son la bandeja incubadora y la sonda de ultrasonidos.

Para el caso de las muestras de garbanzos y alubias, ambas metodologías ofrecen resultados adecuados. Se propone en estos casos el empleo de la bandeja termostatada, ya que proporciona una elevada eficacia de extracción y, además, permite llevar a cabo la extracción simultánea de 12 muestras, lo que redundaría en la disminución del tiempo de análisis cuando tiene que llevarse a cabo la extracción de numerosas muestras. Esta es una ventaja importante a la hora de proponer una metodología aplicable en análisis de rutina. Para las muestras de lentejas, sin embargo, presenta mejores resultados la utilización de la sonda de ultrasonidos.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Phytochem. Anal 25 (2013) 170

Comparative Study of the Methodology Used in the Extraction of Isoflavones from Legumes Applying a Modified QuEChERS Approach

Myriam Bustamante-Rangel, Lara Pérez-Martín and M. Milagros Delgado-Zamarreño*

ABSTRACT:

Introduction – Isoflavones are phytochemicals of great interest because of their association with a large variety of positive effects on human health. The major sources of isoflavones in the diet are plants of the Leguminosae family, especially soybeans, although many other legumes more widely consumed in the Mediterranean diet have also been reported to contain these compounds. In previous work we extracted isoflavones from samples using a modified QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) methodology.

Objective – To compare different methods for placing the sample and the solvent in contact to optimise the extraction of isoflavones from legumes (chickpeas, lentils and white beans) using a modified QuEChERS methodology.

Method – Five different approaches to sample agitation were tested: vortex agitation, thermostatted stirring agitation and thermostatted tray shaking, and a thermostatted ultrasound bath and an ultrasound probe. To evaluate the different methodologies a modified QuEChERS approach was used as the extraction method. The separation and quantification of isoflavones was carried out using liquid chromatography–triple quadrupole/mass spectrometry (LC–MS/MS).

Results – The best methods were found upon using a thermostatted shaking tray for the extraction of chickpeas and white beans and the ultrasound probe for lentil samples. These methods were chosen based on the highest amount of analytes obtained as well as the best recovery values.

Conclusion – Determination of isoflavones in foods may be affected by the different methods used to place the sample and the solvent in contact in the extraction step. The main advantages of the proposed extraction procedures are their simplicity, speed, reliability and low cost. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Agitation system; liquid chromatography–mass spectrometry; QuEChERS; isoflavone; legume

Introduction

Isoflavones are phytochemicals of great interest because of their association with a large variety of positive effects on human health, in particular the prevention of hormone-dependent cancers, cardiovascular disease, osteoporosis, adverse menopausal manifestations and age-related cognitive decline (Pilišáková *et al.*, 2010).

The major sources of isoflavones in the diet are plants of the Leguminosae family, especially soybeans, alfalfa and red clover, although many other legumes have also been reported to contain these compounds. In plants, isoflavones mainly occur as glucosylated, which are biologically inactive and are hydrolysed in the human gut to their aglycones (with biological activity) (Mazur *et al.*, 1998).

The analytical determination of isoflavones is usually carried out using liquid chromatography (Peñalvo *et al.*, 2004; Zafrá-Gómez *et al.*, 2010; Konar *et al.*, 2012) or capillary electrophoresis (Xiao *et al.*, 2011; Bustamante-Rangel *et al.*, 2012), although other techniques such as gas chromatography (Magiera *et al.*, 2011) and immunoanalysis (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003) have also been used.

The preparation of samples of food matrices generally involves multiple steps such as drying, homogenisation, sieving, extraction, pre-concentration and derivatisation (Rostagno *et al.*, 2009). Furthermore, this step may alter the composition

of isoflavone mixtures (free or derivatives). When the aim is to determine the total isoflavone content, regardless of the chemical structure, the sample treatment usually involves hydrolysis. Three main strategies for performing the hydrolysis of isoflavones have been reported in the literature: acid (Konar *et al.*, 2012; Toro-Funes *et al.*, 2012), basic (AOAC, 2005; Delmonte *et al.*, 2006) and enzymatic (Shao *et al.*, 2011; Fiechter *et al.*, 2013) hydrolysis. Usually, the extraction of isoflavones from foods is achieved by extraction with organic solvents such as pure or aqueous methanol (MeOH) (Eisen *et al.*, 2003; Setchell and Cole, 2003; Tsai *et al.*, 2007), ethanol (EtOH) (Cho *et al.*, 2009) or acetonitrile (ACN) (Griffith and Collison, 2001; Lin and Giusti, 2005) at room (RT) or elevated temperature, using different modes of agitation and with or without the presence of acid (Lee *et al.*, 2003; Lin and Giusti, 2005) (Table 1).

* Correspondence to: M. Milagros Delgado-Zamarreño, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain.
E-mail: mdz@usal.es

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Table 1. Conventional methods for the solvent extraction of isoflavones from foods

Sample	Agitation mode	Extraction solvent	Extraction time and temperature	Reference
Soy milk	Shaking	Methanol	2 h at RT	Eisen <i>et al.</i> , 2003
Soy foods (soy protein isolates and milks)	Refluxing	80% Methanol	1 h	Setchell <i>et al.</i> , 2003
Soybean	Inversion by hand	80% Methanol	30 min at 70 °C	Tsai <i>et al.</i> , 2007
Soybean sprout cotyledon	Reflux in a vertical mixer	80–90% Ethanol	100 min at 90 °C	Cho <i>et al.</i> , 2009
Soy drink	Inversion mixer	Ethanol	30 min at RT	Bustamante-Rangel <i>et al.</i> , 2012
Supplemented milk and juice	Vortex	20% Acetonitrile	1 min + 15 min precipitation at RT	Zafra-Gómez <i>et al.</i> , 2010
Soy foods and nutritional supplements	Rotary mixer	60% Acetonitrile	2 h at RT	Griffith <i>et al.</i> , 2001
Soy foods	Stirring	58% Acetonitrile	2 h at RT	Murphy <i>et al.</i> , 2002
Soybean	Stirring	58% Acetonitrile	2 h at RT	Lin <i>et al.</i> , 2005
Soybean	Stirring	Acetonitrile 0.1 M HCl	2 h at RT	Lee <i>et al.</i> , 2003

Currently, new methods are being developed to extract isoflavones from food matrices, including ultrasound-assisted extraction (Rostagno *et al.*, 2007b; Sun *et al.*, 2011), microwave-assisted extraction (Rostagno *et al.*, 2007a; Teñigar *et al.*, 2010), pressurised liquid extraction (Zgórka, 2009; Delgado-Zamarreño *et al.*, 2012a) and supercritical fluid extraction (Zuo *et al.*, 2008; Klejdus *et al.*, 2010). These methodologies reduce sample manipulation, the extraction time (about 10 to 60 min) and solvent consumption, but require more expensive and complex equipment than conventional solvent extraction techniques.

In previous work we extracted isoflavones from both liquid (Bustamante-Rangel *et al.*, 2012) and solid (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2012b) samples using solvent extraction, either alone or with the addition of salts, using a modified QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) methodology. This latter approach was applied to the extraction of eight isoflavones, including aglycones and glucosides, from legume samples. The use of this methodology for the extraction of naturally occurring substances provides advantages such as speed (extraction time was about 10 min), simplicity and ease of use.

The aim of this study was to compare different methods for placing the sample and the solvent in contact in the extraction of isoflavones from legumes. To this end, three different kinds of legume samples (chickpeas, lentils and white beans) were analysed using conventional solvent extraction methods and ultrasound-assisted extraction. For this purpose, five different approaches for sample agitation were tested: vortex agitation, thermostatted stirring agitation and thermostatted tray shaking, and a thermostatted ultrasound bath and an ultrasound probe. To evaluate the different methods of placing the sample and solvent in contact, a modified QuEChERS approach was used in all cases because it provided greater efficacy in the extraction of such analytes in this kind of matrix. Considering the best extraction procedure for each type of legume, the methodologies developed were validated for the analysis of isoflavones in legumes using LC–MS/MS.

The importance of assessing these analytes in this kind of sample lies not only in health benefits but also in the novelty of the matrix, because the legumes tested here are more widely consumed in Europe than are soybeans.

Experimental

Chemicals

Isoflavone standards: daidzin (Di, CAS RN 552-66-9, ≥ 95%), glycitin (Gli, CAS RN 40246-10-4, analytical standard), genistin (Gi, CAS RN 529-59-9, ≥ 95%), daidzein (De, CAS RN 486-66-8, ≥ 98%), glycitein (Gle, CAS RN 40957-83-3, ≥ 97%), genistein (Ge, CAS RN 446-72-0, ≥ 98%), formononetin (For, CAS RN 485-72-3, ≥ 98%) and biochanin-A (Bio, CAS RN 491-80-5, analytical standard) were purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). This company also supplied formic acid (> 98%). The HPLC grade acetonitrile was supplied by Merck (Darmstadt, Hesse, Germany). Anhydrous magnesium sulphate, sodium chloride and trisodium citrate dihydrate (Na₃Cit.2H₂O) were from Scharlau (Barcelona, Cataluña, Spain). Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (Na₂HCit.1.5H₂O) was from Sigma-Aldrich. Ultrahigh-quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noain, Navarra, Spain) water purification system. All other chemicals used were of analytical reagent grade.

Samples

The samples analysed were legumes from the Region of Castilla y León (Spain): chickpeas were from the town of Fuentesauco (Zamora), and lentils and white beans were from the La Armuña district (Salamanca). The samples were ground with a Knifetec™ 1905 from Foss (Barcelona, Spain) and were stored in a cool (4 °C), dry place in closed containers.

Instrumentation

The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) system consisted of an Agilent Technologies (Waldbronn, Baden-Württemberg, Germany) 1200 Series chromatograph equipped with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, a six-port valve, a diode-array detector (DAD) and a 6410 LC–MS triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer. The analytical column was a 50 × 4.6 mm Zorbax

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Influence of Different Methods used for Extracting Isoflavones

Phytochemical Analysis

Eclipse XDB-C18 with 1.8 mm particles (Agilent). The whole system was controlled by Agilent Mass Hunter software, Version B.04.01.

Extraction of isoflavones was carried out with the QuEChERS methodology using different systems for placing the sample in contact with the extraction solvent. The systems used were a Vortex ZX Classic Velp Scientifica (Milan, Lombardia, Italy) for vortex agitation. A Jenway 100 magnetic stirrer connected to an SBS immersion thermostat and a VWR thermostatted shaking tray (Radnor, PA, USA) were used for stirring methodologies, a Bandelin Electronic ultrasound bath (Berlin, Germany) coupled to the immersion thermostat and a Misonix Microson Ultrasonic Cell Disruptor probe (Farmingdale, NY, USA) were employed for the ultrasound-assisted approach.

Sample preparation

Extraction based on the QuEChERS methodology was optimised in a previous work (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2012b). The optimised QuEChERS method was applied to ground samples of the three types of legumes studied. Solvent extraction was carried out in two steps: first, 10 mL of acetonitrile:water (70:30, v/v) was added and the mixture was shaken for 5 min. Then, 5 mL of acetonitrile was added and the mixture was shaken for an additional 5 min, in both cases using each of the proposed agitation systems. Following this, 4 g of magnesium sulphate and 1 g of sodium chloride were added, with or without further addition of citrate buffer, depending on the type of legume and the agitation method, and the mixture was shaken vigorously for 1 min and centrifuged at 3000 rpm (1.000 g) for 5 min. The upper layer was filtered through a 0.22 µm PVDF syringe filter before injection into the chromatographic system.

The LC-MS/MS conditions

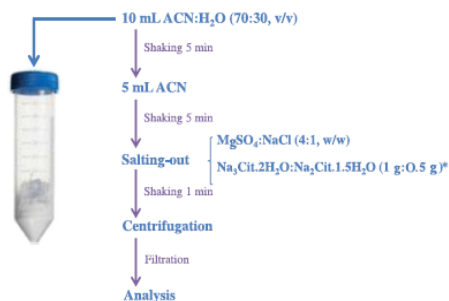
In a previous work chromatographic separation and MS/MS detection were optimised (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2012b). The mobile phase consisted of an acetonitrile (solvent A) and 0.01% aqueous formic acid (solvent B) gradient at a flow rate of 0.5 mL/min. The elution gradient was as follows: 0–1.5 min, 10% A; 1.5–2.5 min, 10–25% A; 2.5–3.5 min, 25% A; 3.5–7 min, 25–50% A; 7–8 min, 50–80% A; 8–10 min, 80% A; 10–12 min, 80–10% A. The analytical column was thermostatted at 25 °C and the injection volume was 2 mL. The QqQ mass spectrometer was equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. The electrospray capillary voltage was set at 3500 V; the nebuliser pressure was set at 35 psi and nitrogen was used as the drying gas at 12 L/min and 350 °C. ESI/MS spectra were acquired in positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Results and discussion

Optimisation of extraction procedures

Optimisation of the parameters involved in the extraction of isoflavones from legumes was conducted using three types of vegetables: chickpeas, lentils and white beans. The different methods tested of placing the sample and solvent in contact were vortex agitation, thermostatted stirring agitation and thermostatted tray shaking, and ultrasound-assisted extraction using an ultrasound bath or an ultrasound probe.

In all cases, extraction was carried out following the procedure described in above and schematised in Fig. 1. Extraction was performed in two steps owing to the difference in the polarity of the isoflavones studied. The decrease in the polarity of the extraction solvent permits the quantitative extraction of both the polar and less-polar analytes. It should be noted that no subsequent cleaning step was required because it was not necessary to remove interferences and the peak shapes were not improved.



*Depending on the kind of sample

Figure 1. Schematic diagram of the extraction procedure.

Vortex agitation

The modified QuEChERS method developed previously (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2012b) was followed for sample treatment using vortex agitation. Phase separation in the QuEChERS methodology is induced by the addition of different salts. Generally, magnesium sulphate, which reduces the volume of the aqueous phase and enhances the distribution of polar analytes in the organic phase, and sodium chloride, which helps to control the polarity range and interfering substances in the extract, are used. The amount of these salts was optimised at a ratio of 4 g magnesium sulphate to 1 g sodium chloride and this was used in all later studies. The addition of citrate buffer in order to achieve quantitative extraction of the isoflavones was also studied. In the case of chickpeas and white beans, the extraction of major analytes was significantly improved by adding citrate buffer at a ratio of Na₃Cit.2H₂O:Na₂H₂CO₃:water (1 g:0.5 g). In the case of lentils, the addition of citrate buffer produced a decrease in the signal.

Mix-stirring methodologies

A conventional method for the extraction of isoflavones was developed by Griffith and Collison (2001) and was modified by Murphy *et al.* (2002) using mix-stirring. Rostagno (Rostagno *et al.*, 2009) reported that the efficiency of the extraction of isoflavones from foods was higher in the presence of a certain amount of water and a slight increase in temperature. It should be noted that the temperature chosen must be sufficient to increase the extraction efficiency without causing degradation of the target compounds. Two mix-stirring approaches were tested: thermostatted stirring agitation and thermostatted tray shaking.

Thermostatted stirring agitation. This methodology was carried out using a magnetic stirrer and an immersion thermostat. Bibliographic and experimental studies addressing the analysis of isoflavones and their temperature stability led us to choose a working temperature of 60 °C for the thermostat bath. Under these conditions, extraction was enhanced without causing degradation of the compounds studied.

The main parameters for optimising this system were the addition or not of citrate buffer, which could facilitate the extraction, and the amount of sample.

To explore the first possibility, several samples of each type of legume were analysed with and without the addition of buffer. It

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

was observed that in all cases the addition of citrate did not enhance the extraction of analytes using this methodology.

The amount of sample is an important parameter when performing extraction. In our case it was known that a sample amount of 5–7 g, depending on the type of matrix, was optimal for achieving an efficient extraction with the QuEChERS method. To achieve better contact between the sample and the solvent, smaller amounts of sample were tested. It was found that smaller amounts of sample favoured the movement of the stirrer inside the tube containing the sample, facilitating contact with the extraction solvent and thereby increasing extraction efficiency. As can be seen in Fig. 2A, an increase in the analytical signal was achieved for lower sample amounts; this behaviour was observed for all three types of matrices.

This method, although effective, is slow when performing several replicas because it can only carry out the extraction of one sample at a time. For this reason, a thermostatted shaking tray, which allows the simultaneous extraction of 12 samples at once and also ensures a constant temperature, was tested.

Thermostatted tray shaking. The device used to carry out this methodology was a VWR thermostatted shaking tray. The temperature was set at 60 °C, and the extractions were accomplished using the salting-out step. The influence of sample amount was examined for the three types of matrix studied. As shown in Fig. 2B, the influence of the amount of sample differed for the various types of matrix. Greater amounts of sample favoured extraction in the case of lentils and white beans, while the opposite was seen in the case of chickpeas.

The difference between the behaviour observed with both stirring methodologies was because in the first case a magnetic stirrer was introduced into the sample; on increasing the amount of sample, the movement of the stirrer was hindered. However, on using the shaking tray no device was introduced into the sample and agitation occurred throughout the sample simultaneously. In the case of chickpeas, extraction efficiency decreased with the increase in the amount of sample. This may be because the ground chickpea powder had a grainy appearance, thicker than that of the lentils or white beans. Thus, the movement of the powder is hindered when the amount of sample is increased, worsening the extraction yield.

Ultrasound-assisted extraction

Ultrasound-assisted extraction (UAE) uses high frequency sounds in order to detach the target compound under study from the matrix. Thus, the solute passes rapidly from the solid to the solvent phase. The commercial ultrasound devices most commonly used are ultrasound baths and ultrasound probes.

Thermostatted ultrasound bath. An ultrasound bath is the most economical way to accomplish UAE. To carry out this methodology, the ultrasound bath was coupled to an immersion thermostat. As in the case of the stirring methodologies, the bath temperature was thermostatted at 60 °C.

Some authors (Rostagno *et al.*, 2009) have reported that the extraction efficiency of isoflavones in soy is increased by the action of ultrasound in comparison with the traditional stirring method using methanol, ethanol or acetonitrile at room temperature. In order to check this improvement in the extraction of samples with lower isoflavone contents, such as legumes, extractions were performed on the three types of matrix.

As stated previously, the parameters affecting the extraction process were the addition of citrate buffer and the amount of sample. Using this methodology, the addition of citrate buffer enhanced the extraction of analytes for chickpeas and white beans, as in vortex agitation.

To find the most appropriate amount of sample to perform ultrasound-assisted extraction, the three types of legume under study were extracted by weighing sample amounts lower than those used in the conventional QuEChERS methodology. As shown in Fig. 3A, extraction efficiency increased with the amount of sample. As in the case of tray shaking, extraction was enhanced by an increase in the sample amount because the agitation of the sample matrix occurred simultaneously throughout the tube.

In view of the good results provided by the ultrasound bath for the extraction of isoflavones from these matrices using the salting-out step, the use of an ultrasound probe was tested.

Ultrasound probe. Currently, ultrasound probes containing a microtip to facilitate the cavitation phenomenon have begun to be used for ultrasound-assisted extraction. This device provides an increase in extraction efficiency. Extractions of different sample amounts of the three types of legume were achieved using the salting-out step. The results obtained for lentil samples are

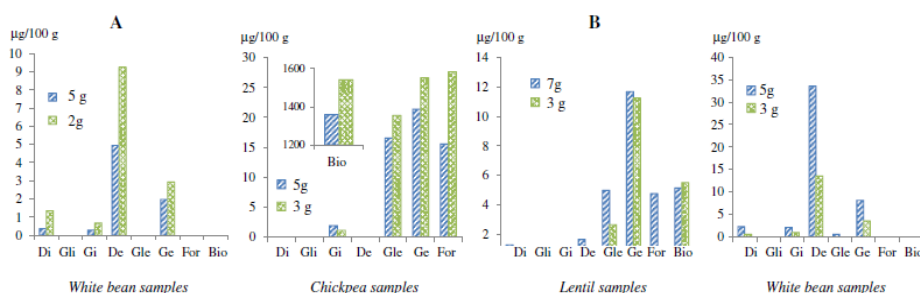


Figure 2. Influence of sample amount on the isoflavone content extracted with mix-stirring methodologies: (A) thermostatted stirring agitation; (B) thermostatted tray shaking; Di, daidzin; Gli, glycitin; Gi, genistin; De, daidzein; Gle, glycitein; Ge, genistein; For, formonetin; Bio, biochanin-A.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Influence of Different Methods used for Extracting Isoflavones

Phytochemical
Analysis

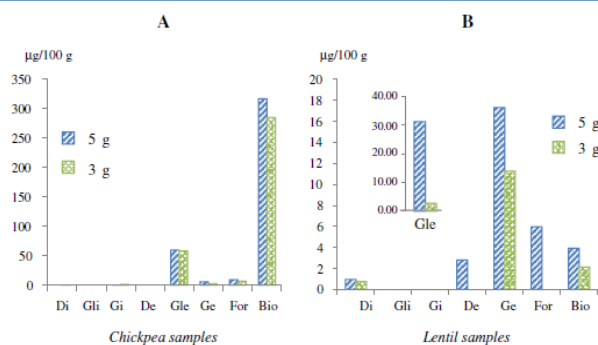


Figure 3. Influence of sample amount on the isoflavone content extracted with ultrasound-assisted extraction-based methodologies: (A) ultrasound bath; (B) ultrasound probe; Di, daidzin; Gli, glycitin; Gi, genistin; De, daidzein; Gle, glycitein; Ge, genistein; For, formonnetin; Bio, biochanin-A.

shown in Fig. 3B. As can be seen, on increasing the sample amount the analytical signal was enhanced. This shows that the movement of the sample occurs simultaneously throughout the matrix, and accordingly an increase in the amount of sample will increase the extraction yield.

Method validation

Linearity, detection limit and quantification limit. Linearity was evaluated by injection of standard mixtures of the target isoflavones, in triplicate, at concentration levels ranging from 0.1 to 1000 mg/L for biochanin A, and from 0.1 to 200 mg/L for the other isoflavones. These ranges were chosen taking into account the expected levels in the samples analysed. The results for the regression equations, the correlation coefficients of the calibration curves, and the detection and quantification limits (LOD, $S/N=3$; LOQ, $S/N=10$) for the analytes under optimised conditions are summarised in Table 2. As can be seen, good linear correlation coefficients ($R^2 > 0.992$) were found between the peak area (y) and the concentration of isoflavones (x). The LODs and LOQs were in the range of 0.12–0.47 mg/L and 0.41–1.56 mg/L, respectively, showing the excellent sensitivity of the method.

	Intercept $a \pm s_a$	Slope $b \pm s_b$	R^2	LOD ^a	LOQ ^b
Daidzin	726 ± 562	338 ± 6	0.999	0.36	1.19
Glycitin	3037 ± 826	531 ± 9	0.999	0.12	0.41
Genistin	35 ± 1106	462 ± 11	0.999	0.36	1.19
Daidzein	114 ± 134	51 ± 1	0.998	0.22	0.75
Glycitein	1828 ± 1006	373 ± 22	0.992	0.43	1.43
Genistein	24 ± 244	68 ± 3	0.997	0.21	0.7
Formononetin	1433 ± 432	123 ± 4	0.997	0.47	1.56
Biochanin-A	149 ± 227	17.6 ± 0.5	0.998	0.33	1.09

^amg/L; $S/N=3$.
^bmg/L; $S/N=10$.

Application of the methodologies to real samples and comparison of the methods. In order to check the applicability of the proposed methodologies for the extraction of isoflavones, samples of chickpeas, lentils and white beans from the Region of Castilla y León (Spain) were analysed in quadruplicate.

The extractions were carried out considering the previously optimised parameters summarised in Table 3. Quantifications were performed using the external standards method. The results obtained for the analysis of each of the three types of pulse according to each method tested are shown in Table 4. As can be seen, considerable variability was observed.

For the three types of legume, the highest contents of most of the analytes were obtained using thermostatted tray shaking or the ultrasound probe. This may be because the agitation induced by these methodologies is achieved homogeneously and simultaneously at all points in the matrix. When vortex agitation or the ultrasound bath was used the samples became compacted; this hindered contact between the extraction

Method	Pulse	Sample amount (g)	Addition of citrate buffer
Vortex	Chickpeas	5	Yes
	Lentils	7	No
	White beans	5	Yes
Thermostated stirring	Chickpeas	2	No
	Lentils	2	No
	White beans	2	No
Thermostated tray	Chickpeas	3	Yes
	Lentils	7	No
	White beans	5	Yes
Ultrasound bath	Chickpeas	5	Yes
	Lentils	7	No
	White beans	5	Yes
Ultrasound probe	Chickpeas	5	Yes
	Lentils	7	No
	White beans	5	Yes

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Table 4. Isoflavone content (mg/100 g) in pulse samples depending on the type of extraction method

	Di	Gi	De	Gle	Ge	For	Bio
Chickpeas	Vortex			18±3	3.1±0.4	4±1	474±16
	Thermostatted stirring			55.5±5	5.5±0.5	98±1	581±13
	Thermostatted tray	1.23±0.05		9.77±0.2	46.67±2.5	98±2	4794±171
	Ultrasound bath	1.92±0.1		5.9±0.3	5.9±0.3	9.3±0.6	317±8
Lentils	Ultrasound probe	1.56±0.06		10.7±0.6	8.1±0.6	26±0.9	1436±81
	Vortex	1.77±0.33	2.5±0.3		10.3±0.5	2.3±1	1.1±0.4
	Thermostatted stirring	2.87±0.1	0.45±0.01	2±0.4	2.82±0.2	1.4±1	8.8±0.5
	Thermostatted tray	1.47±0.06	0.44±0.04	2.9±0.4	4.1±0.1	28±1	18±3
White beans	Ultrasound bath	0.77±0.24	0.38±0.03	4.4±0.3	17.85±2.4	13±0.6	18±1
	Ultrasound probe	1.32±0.06	0.51±0.04	3.2±0.4	4.4±0.8	5.7±0.6	2.03±0.3
	Vortex	0.52±0.23	0.32±0.15	2.63±0.3	27±1	15.2±0.6	18±1
	Thermostatted stirring	2.3±0.45	1.45±0.05	8±0.5	1.35±0.35		
Daidizín; Gi, genisteín; De, daidzín; Gle, glycysetín; Ge, genisteín; For, formoneteín; Bio, biochanin-A.	Thermostatted tray	2.24±0.27	2.05±0.12	33.53±2.1	2.3±0.45		
	Ultrasound bath	0.74±0.24	0.37±0.03	8.7±0.3	8.1±4.8		
	Ultrasound probe	2.12±0.27	1.79±0.03	30.3±1.8	2.06±0.27		

solvent and the matrix. Agitation by stirring also provided good results, especially for chickpeas. However, this methodology was discarded because it provided lower reproducibility, probably because the movement of the stirrer would be hampered in matrices that compact easily. Use of the thermostatted tray shaker was suitable because agitation does not occur only in a particular part of the sample – as in the case of stirring – and therefore extraction could not be affected by the movement of the stirrer. Use of the ultrasound probe provided good extraction yields due to its greater potency with respect to the bath.

Recovery, repeatability (intraday precision) and reproducibility (interday precision). In order to select the most appropriate procedure for each type of matrix, recovery and precision studies were performed using the methods considered most suitable.

Recovery was determined by the addition of a known amount of standard to samples of chickpeas, lentils and white beans. The amount of each isoflavone added was close to those present in the original samples. When isoflavones were not naturally present in the sample the fortification level was 5 mg/L. The samples were spiked before sample treatment using each of the above-cited methodologies and were analysed in triplicate. The recoveries obtained for each analyte, matrix and method are shown in Table 5. Recoveries were in the 70–120% range, which was satisfactory and in accordance with the values stipulated in Commission Decision 2002/657/EC.

The analytical precision of the data from the intraday (four times per day) and interday (eight samples over two months) determinations was measured in real samples of the three legume types. The results are shown in Table 5 for each analyte, matrix and method. The RSD values were lower than 12% for intraday precision, which can be considered acceptable for this type of methodology. The RSD values for interday precision ranged from 7 to 39%. Taking into account that RSD values should be lower than 22% to fulfil the criteria of CD 2002/657/EC, the method chosen for chickpeas and white beans was the thermostatted shaking tray. This methodology provided satisfactory results as regards both recovery and precision; moreover, it allowed the simultaneous extraction of up to 12 samples. In the case of lentil samples, the most appropriate method was the ultrasound probe because the reproducibility obtained with the thermostatted shaking tray was lower. Lentil powder was more finely ground than that of the other pulses and hence became more compacted when added to the extraction solvent. This may be because lentils have a lower fat content than chickpeas and white beans and the movement of the tray did not always provide optimum contact between the sample and the extraction solvent, while the ultrasound probe was more successful in this sense. Figure 4 shows the chromatograms corresponding to each kind of sample.

Summary

In the present work a comparative study of five different agitation techniques for the extraction of isoflavones from legume samples was made, including vortex agitation, ultrasound probe and stirring agitation, thermostatted tray shaking and the use of an ultrasound bath with temperature control. These methodologies were evaluated using a modified QuEChERS approach as the extraction method. The separation and quantification of isoflavones were carried out using LC-MS/MS. The main advantages of the proposed extraction procedures were their

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

Table 5. Recovery, repeatability and reproducibility of the most suitable methodologies for each kind of sample										
Study	Pulse	Method	Di	Gli	Gi	De	Gle	Ge	For	Bio
Recovery (%)	Chickpeas	Thermostatted tray	82	96	82	88	113	78	70	80
		Ultrasound probe	70	82	80	75	97	81	94	89
	Lentils	Thermostatted tray	83	102	72	95	109	99	106	116
		Ultrasound probe	71	86	74	81	101	83	97	120
	White beans	Thermostatted tray	90	92	78	108	96	95	84	75
		Ultrasound probe	71	81	72	105	97	92	78	118
Intraday precision (RSD %)	Chickpeas	Thermostatted tray			4.4		4.5	4.6	3.3	2.7
		Ultrasound probe			1.9		5.2	11	4.7	4.7
	Lentils	Thermostatted tray	10		4.3	4.6	9.5	9.2	3.5	12
		Ultrasound probe	2.2		3.4	4.7	6.0	1.2	3.9	5.5
	White beans	Thermostatted tray	8.6		3.9	2.1		4.6		
		Ultrasound probe	9.2		4.7	6.6		3.8		
Interday precision (RSD %)	Chickpeas	Thermostatted tray			17		6.8	17	20	19
		Ultrasound probe			20		7.4	13	23	13
	Lentils	Thermostatted tray	19		18	30	39	32	17	27
		Ultrasound probe	14		14	20	12	10	19	13
	White beans	Thermostatted tray	15		11	15		13		
		Ultrasound probe	19		15	16		8.3		

Di, daidzin; Gi, genistin; De, daidzein; Gle, glycitein; Ge, genistein; For, formonnetin; Bio, biochanin-A.

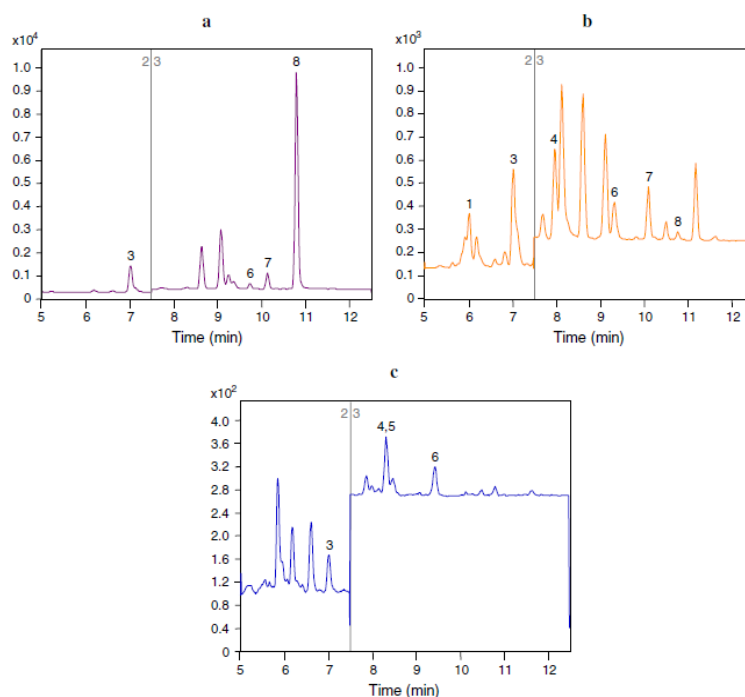


Figure 4. Total ion chromatograms (TIC) obtained using QuEChERS with LC-MS/MS analysis of legume samples: (a) chickpeas, (b) lentils and (c) beans. Numbered peaks are: (1) daidzin, (2) glycitin, (3) genistin, (4) daidzein, (5) glycitein, (6) genistein, (7) formonnetin and (8) biochanin-A.

IV. EXTRACCIÓN DE ISOFLAVONAS: PUESTA EN CONTACTO MUESTRA-DISOLVENTE

simplicity, speed, reliability and low cost. Optimal extraction conditions were attained using the thermostatted shaking tray or ultrasound probe as the contact method between the matrix and solvent. We propose the use of a thermostatted shaking tray for the extraction of chickpeas and white beans, whereas for lentil samples the best method would be the ultrasound probe. These methods were chosen based on the highest amount of analytes obtained as well as the best recovery values. The importance of the agitation mode in the extraction of analytes should be noted.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2011–24075) and L.P.M. is also grateful to the Regional Government of Castilla y León and the European Social Fund for a doctoral fellowship.

References

- AOAC. 2005. *Official Method 2001.10*. In *Official Methods of Analysis*, 18th edn. AOAC International: Gaithersburg, MD.
- Bennetau-Pelissero C, Arnal-Schnebel B, Lamothe V, Sauvart P, Sagne JL, Verbruggen MA, Mathey J, Lavialle O. 2003. ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem* **82**: 645–658.
- Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, Carabias-Martínez R, Domínguez-Álvarez J. 2012. Analysis of isoflavones in soy drink by capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **709**: 113–119.
- Cho SY, Lee YN, Park HJ. 2009. Optimization of ethanol extraction and further purification of isoflavones from soybean sprout cotyledon. *Food Chem* **117**: 312–317.
- Delgado-Zamarreño MM, Perez-Martin L, Bustamante-Rangel M, Carabias-Martínez R. 2012a. Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses. *Anal Bioanal Chem* **404**: 361–366.
- Delgado-Zamarreño MM, Pérez-Martín L, Bustamante-Rangel M, Carabias-Martínez R. 2012b. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **100**: 320–328.
- Delmonte P, Perry J, Rader JJ. 2006. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *J Chromatogr A* **1107**: 59–69.
- Eisen B, Ungar Y, Shimoni E. 2003. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *J Agric Food Chem* **51**: 2212–2215.
- Fiechter G, Opacak I, Raba B, Mayer HK. 2013. A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of total isoflavone aglycones after enzymatic hydrolysis: Application to analyze isoflavone levels in soybean cultivars. *Food Res Int* **50**: 586–592.
- Griffith AP, Collison MW. 2001. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* **913**: 397–413.
- Klejdus B, Lojková L, Plaza M, Šnoblóvá M, Štěrbová D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1217**: 7956–7965.
- Konar N, Sinan Poyrazoğlu E, Demir K, Artık N. 2012. Determination of conjugated and free isoflavones in some legumes by LC–MS/MS. *J Food Compos Anal* **25**: 173–178.
- Lee SJ, Ahn JK, Kim SH, Kim JT, Han SJ, Jung MY, Chung IM. 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *J Agric Food Chem* **51**: 3382–3389.
- Lin F, Giusti MM. 2005. Effects of solvent polarity and acidity on the extraction efficiency of isoflavones from soybeans (Glycine max). *J Agric Food Chem* **53**: 3795–3800.
- Magiera S, Uhlischmied C, Rainer M, Huck ChW, Baranowska I, Bonn GK. 2011. GC–MS method for the simultaneous determination of b-blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine. *J Pharm Biomed Anal* **56**: 93–102.
- Mazur WM, Duke JA, Wähälä K, Rasku S, Aldercreutz H. 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *Nutr Biochem* **9**: 193–200.
- Murphy PA, Barua K, Hauck CC. 2002. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J Chromatogr B* **777**: 129–138.
- Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H. 2004. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem* **87**: 297–305.
- Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F. 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* **59**: 651–664.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2007a. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Anal Chim Acta* **588**: 274–282.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2007b. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Anal Chim Acta* **597**: 265–272.
- Rostagno MA, Villares A, Guillamón E, García-Lafuente A, Martínez JA. 2009. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr A* **1216**: 2–29.
- Setchell KR, Cole SJ. 2003. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labelling. *J Agric Food Chem* **51**: 4146–4155.
- Shao S, Duncan AM, Yang R, Marcone MF, Rajcan I, Tsao R. 2011. Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products. *Food Res Int* **44**: 2425–2434.
- Sun Y, Liu Z, Wang J. 2011. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. *Sep Purif Technol* **78**: 49–54.
- Toro-Funes N, Odrizola-Serrano I, Bosch-Fusté J, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 2012. Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. *Food Chem* **135**: 2832–2838.
- Terigar BG, Balasubramanian S, Bolder D, Xu Z, Lima M, Sablov CM. 2010. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresour Technol* **101**: 2466–2471.
- Tsai HS, Huang LJ, Lai YH, Chang JC, Lee RS, Chiou RYY. 2007. Solvent effects on extraction and HPLC analysis of soybean isoflavones and variations, of isoflavone compositions as affected by crop season. *J Agric Food Chem* **55**: 7712–7715.
- Xiao M, Ye J, Tang X, Huang Y. 2011. Determination of soybean isoflavones in soybean meal and fermented soybean meal by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). *Food Chem* **126**: 1488–1492.
- Zafra-Gómez A, Garballo A, García-Ayuso LE, Morales JC. 2010. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. *Food Chem* **123**: 872–877.
- Zgórka G. 2009. Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium L.* species. *Talanta* **79**: 46–53.
- Zuo YB, Zeng AW, Yuan XG, Yu KT. 2008. Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide. *J Food Eng* **89**: 384–389.

4.4. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS EN LEGUMBRES MEDIANTE CE-MS

4.4.1. OBJETIVO

En este capítulo se describe el desarrollo de un método para la cuantificación de isoflavonas en muestras de legumbres utilizando electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas con ionización mediante electrospray (CE-ESI-MS). Los resultados obtenidos utilizando esta técnica de separación se compararán con los previamente obtenidos mediante cromatografía líquida.

El mayor inconveniente que presenta CE es su baja sensibilidad, lo que en ocasiones limita su aplicación en el análisis de componentes presentes a bajas concentraciones, como es el caso que nos ocupa. En estos casos, el punto crítico del análisis es la preparación de la muestra.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos al aplicar la metodología QuEChERS previa a la separación de isoflavonas mediante LC, se utilizó este método de extracción también para llevar a cabo la preparación antes de su análisis mediante CE. Dicha metodología permite simplificar el proceso y reducir el tiempo de preparación de la muestra. Los parámetros correspondientes a la etapa de preparación de la muestra aplicados en este capítulo son los previamente optimizados para LC.

4.4.2. INTRODUCCIÓN

En el análisis de alimentos, la electroforesis capilar es una alternativa viable a técnicas de separación más tradicionales como LC o GC. Además, el acoplamiento CE-MS presenta características muy atractivas al combinar el alto poder de separación de CE con la selectividad y el poder de identificación de MS.

Como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente en esta Memoria, los métodos analíticos para la determinación de fitoestrógenos se basan principalmente en separaciones cromatográficas. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha sido la técnica más comúnmente empleada debido a sus ventajas de resolución, selectividad y sensibilidad. De igual modo es común el empleo de HPLC en fase reversa con fases móviles de metanol o acetonitrilo y agua con pequeñas cantidades de ácido como modificador en la separación de isoflavonas.

Se han desarrollado diversas técnicas de electroforesis capilar para determinar isoflavonas entre ellas se encuentran electroforesis capilar zonal (CZE), cromatografía electrocinética micelar capilar (MEKC) y electrocromatografía capilar (CEC). Debido a que la mayoría de estos compuestos presentan grupos hidroxilo y una naturaleza ligeramente ácida, de forma general se emplea un tampón bórico/borato, a pH alcalino, para asegurar que los analitos se encuentren como aniones durante la separación electroforética mediante CZE¹⁶³. La detección empleada generalmente es ultravioleta³¹⁰ o electroquímica³¹¹; sin embargo, existen muy pocas referencias del análisis de isoflavonas mediante electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas.

Aramendia y cols.³¹² separaron e identificaron varios patrones de isoflavonas utilizando CE-ESI-MS en modo negativo, mientras que García-Villalba y cols.³¹³ emplearon CE-TOF para comparar perfiles metabolómicos de legumbres convencionales y modificadas genéticamente. En ambos casos, la

³¹⁰ G. Dinelli, I. Aloisio, A. Bonetti, I. Marotti, A. Cifuentes; *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 604

³¹¹ Z. Chen, J. Zhang, G. Chen; *J. Chromatogr. B* 863 (2008) 101

³¹² M.A. Aramendia, I. García, F. Lafont, J.M. Marinas; *J. Chromatogr. A* 707 (1995) 327

³¹³ R. García-Villalba, C. León, G. Dinelli, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutierrez, V. García-Cañas, A. Cifuentes; *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 164

separación fue llevada a cabo a pH 9 - 9.5, estando los analitos en forma aniónica, la detección fue realizada también en modo negativo. En ninguna de las dos referencias se muestran datos acerca de la cuantificación de las correspondientes isoflavonas.

Uno de los principales inconvenientes de la electroforesis capilar es su pobre límite de detección, consecuencia del pequeño diámetro interno del capilar de separación. Una manera sencilla de incrementar la sensibilidad de la electroforesis capilar es el empleo de la técnica denominada “*Sample-Stacking*”³¹⁴. Este método focaliza y preconcentra los analitos utilizando diferentes propiedades, tales como conductividad, pH, fuerza iónica, viscosidad, etc., entre el tampón de separación y la matriz de la muestra³¹⁵. Este “apilamiento” surge de la circulación de los iones de la muestra a través del límite que separa la región que contiene la muestra del resto del capilar que contiene el BGE³¹⁶. La región que contiene la muestra presenta una conductividad inferior a la región del electrolito. Al aplicar el voltaje, el campo eléctrico es mayor en la zona de la muestra, por lo que los analitos migran a una velocidad mayor en esta zona. Los analitos se mueven rápidamente hacia la frontera entre las dos regiones y tiene lugar la preconcentración.

Otra dificultad surge en el acoplamiento CE-MS, principalmente cuando se lleva a cabo la separación electroforética de aniones en modo negativo, es decir, la inyección de la muestra tiene lugar en el cátodo y el ánodo es el extremo de salida, donde tiene lugar la detección. El problema que se presenta se debe a que en CE-ESI-MS no existe vial de salida, por lo que la dirección del flujo electroosmótico hacia el cátodo genera un hueco en el extremo de salida del capilar, lo que puede ocasionar inestabilidad y caídas de la corriente. Para evitarlo, algunos autores han propuesto trabajar con capilares recubiertos de cationes para invertir el EOF³¹⁷. Cuando la separación electroforética se realiza en modo positivo, es decir, la inyección tiene lugar en el ánodo y la detección en el cátodo, se han propuesto

³¹⁴ R.L. Chien, Khaledi MG (ed) *High Performance Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, Inc, New York, pp 449-479

³¹⁵ P. Brutz-McKibbin, D.D.Y. Chen; *Anal. Chem.* 72 (2000) 1242

³¹⁶ J.P. Quirino, S. Terabe; *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 119

³¹⁷ T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka; *Anal. Chem.* 74 (2002) 2233

estrategias como aplicar presión a la entrada del capilar³¹⁸, con objeto de evitar las caídas de corriente. Este procedimiento presenta el inconveniente de disminuir la eficacia de la separación, debido a la aplicación de presión durante la misma. En otros casos, se detiene la separación electroforética a la mitad del análisis y se aplica presión durante los últimos minutos³¹⁹, o se aplica presión durante la electroforesis para favorecer la llegada del EOF hacia el cátodo, suprimiendo la presión del gas de nebulización durante la inyección de la muestra³²⁰. A pesar de las distintas estrategias propuestas³²¹, la determinación de aniones mediante CE-ESI-MS sigue siendo problemática y genera frecuentes caídas de corriente.

Nuestro grupo de investigación ha observado que, en la determinación de aniones³²², la separación electroforética inicialmente es satisfactoria; sin embargo, cuando tiene lugar la llegada del EOF al detector, es frecuente que se produzcan caídas de corriente. Además, se observa una falta de resolución en la separación electroforética, la cual es necesario compensar haciendo uso de la detección mediante MS. Una forma sencilla de eliminar esta problemática es la aplicación de una estrategia basada en la programación de la presión del gas de nebulización (PNP) durante todo el análisis^{151,323,324}. Consiste en suspender la aplicación de la presión del gas de nebulización durante la inyección de la muestra, aplicar un valor mínimo (1psi) durante una parte de la separación electroforética y aplicar la presión óptima para la detección una vez que los analitos llegan al detector de masas. La utilización de esta estrategia consigue evitar las frecuentes caídas de corriente observadas en el análisis de aniones y, además, permite mejorar

³¹⁸ T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, K. Matsuda, M. Tomita, T. Nishioka; *Anal. Chem.* 74 (2002) 6224

³¹⁹ K. Harada, E. Fukusaki, A. Kobayashi; *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2006) 403

³²⁰ T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu, M. Tomita; *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 125

³²¹ T. Soga, K. Igarashi, Ch. Ito, K. Mizobuchi, H.P. Zimmermann, M. Tomita; *Anal. Chem.* 81 (2009) 6165

³²² E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, D. Diego García-Gómez, R. Carabias-Martínez; *Electrophoresis* 31 (2010) 2279

³²³ J. Domínguez-Álvarez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Hernández-Méndez, R. Carabias-Martínez; *Anal. Chem.* 83 (2011) 2834

³²⁴ J. Domínguez-Álvarez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Hernández-Méndez, R. Carabias-Martínez; *Electrophoresis* 33 (2012) 2374

la eficacia de la separación, ya que no se requiere la aplicación de presión para asistir la separación electroforética.

4.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.3.1. Procedimiento analítico

La extracción de los analitos fue llevada a cabo mediante la metodología descrita en el apartado anterior de la Memoria, capítulo 4.3 (pág. 211). En dicho capítulo se ha puesto de manifiesto la importancia de la puesta en contacto entre el extractante y la muestra en el aislamiento de isoflavonas de las muestras de legumbres. En los estudios realizados las conclusiones fueron que la bandeja agitadora termostatada y la sonda de ultrasonidos son los sistemas de agitación más apropiados para la extracción utilizando la metodología QuEChERS. Por ello, en este capítulo se utilizaron ambos sistemas para llevar a cabo el tratamiento de las muestras previo a la separación mediante electroforesis capilar.

El procedimiento de preparación de muestra es el siguiente: la cantidad de muestra optimizada en función del tipo de matriz - 3, 5 y 7 gramos para garbanzos, alubias y lentejas, respectivamente - se extrae en dos etapas sucesivas empleando primero ACN:H₂O (70:30, v:v) y a continuación se añade ACN puro hasta que la mezcla alcanza una composición 80:20 (v:v). La agitación en ambas etapas, y para los tres tipos de muestra, se lleva a cabo utilizando los dos sistemas optimizados: bandeja termostatada y sonda de ultrasonidos, manteniendo la agitación durante 5 minutos en cada etapa. Posteriormente, se añade una mezcla de MgSO₄ y NaCl (4:1, p:p) junto con el tampón citrato, en el caso de garbanzos y alubias, y se agita vigorosamente durante 1 minuto, antes de centrifugar los extractos. Como se ha comentado anteriormente, no se requiere una etapa de limpieza, por lo que la capa superior del extracto, una vez filtrada, está lista para ser analizada. Antes de inyectar los extractos en el sistema electroforético se lleva a cabo la dilución de los mismos con agua en proporción 1:2 (v:v).

Los extractos diluidos se introducen en el sistema electroforético bajo las condiciones de estudio optimizadas. Los capilares nuevos se acondicionan antes de su uso lavándolos de forma secuencial con hidróxido sódico 1.0 M, agua de calidad ultrapura y el BGE, durante 10 minutos en cada caso. Entre análisis consecutivos, el capilar es lavado con el tampón de separación

durante 2 minutos para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

4.4.3.2. Optimización de la separación electroforética

En un trabajo anterior realizado por el equipo de investigación se llevó a cabo la separación y cuantificación de isoflavonas en bebidas de soja mediante electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas¹⁵¹. Debido a ello, los parámetros correspondientes a la separación y detección se tomaron como referencia para llevar a cabo el presente estudio.

La separación electroforética se optimizó previamente al acoplamiento con MS, es decir, utilizando un sistema CE-UV/Vis (DAD). En este estudio se utilizaron capilares de 75 μm de diámetro interno y una longitud total de 57 cm, 50 cm al detector. Se estudiaron el pH y la fuerza iónica del medio de separación (BGE), el voltaje de separación y el tiempo de inyección.

Las principales limitaciones para que el método optimizado sea compatible posteriormente con MS son la necesidad de que el electrolito de fondo sea volátil y que la intensidad de corriente no supere los 50 μA . Además, es deseable que el pH sea alto y que los analitos estén presentes como aniones para favorecer tanto la separación como la posterior detección.

Entre los diferentes electrolitos compatibles con el sistema de electroforesis capilar acoplado a espectrometría de masas, se decidió utilizar un tampón acuoso de acetato amónico. La concentración de acetato se estudió en el rango entre 10 y 50 mM, comprobándose que al aumentar dicha concentración el tiempo de migración de los analitos se prolonga, sin embargo, la resolución no presenta una mejora significativa. Se eligió una concentración del tampón de separación de 15 mM ya que proporciona buenos picos electroforéticos, tiempos de migración cortos, valores de resolución aceptables y una baja intensidad de corriente. Además, esta concentración baja de tampón previene la acumulación de excedentes de sales en la entrada del detector MS.

El pH del tampón de separación afecta a la resolución de los compuestos, de tal forma que valores elevados, por encima del pK_a de los analitos en estudio, aumentan la separación y mejoran la desprotonación de las moléculas permitiendo que lleguen al ESI en forma aniónica. La influencia del pH del medio de separación fue estudiada mediante la adición de amoníaco, en un rango de pH entre 9.5 y 11.5. El valor de pH adecuado para llevar a cabo la separación electroforética fue 11.0.

La presencia de disolventes orgánicos en el medio de separación puede tener un efecto importante en la resolución de los picos electroforéticos, además de modificar la velocidad del flujo electroosmótico debido, entre otros efectos, a su influencia en la viscosidad del medio de separación; ésto producirá variaciones en los tiempos de migración de los compuestos. Teniendo en cuenta que los extractos obtenidos de las muestras de legumbres tienen un elevado contenido en disolvente orgánico (80 %), se realizó un estudio variando el porcentaje de éste entre un 10-100%. Se comprobó que cuando se inyectaba una disolución patrón de las isoflavonas en metanol puro, los picos electroforéticos, principalmente los correspondientes a los glucósidos, eran anchos y asimétricos. Sin embargo, la dilución de la disolución patrón con agua mejoraba la forma del pico electroforético cuando la concentración de metanol era menor que un 10 – 15 %. Debido a esto, las disoluciones patrón se prepararon por dilución de las disoluciones madre en agua con una relación final de MeOH:H₂O 1:10 (v:v).

El voltaje de separación influye tanto en el tiempo de migración de los analitos como en la intensidad de la corriente. Valores elevados del voltaje de separación conllevan una elevada intensidad de corriente, mientras que voltajes menores dan lugar a tiempos de migración mayores. El voltaje de separación adecuado fue de 25 kV.

Teniendo en cuenta el bajo nivel de concentración de las isoflavonas en las muestras de legumbres estudiadas y el hecho de que las muestras deben ser diluidas antes de su inyección en el sistema electroforético, se estudió la posibilidad de utilizar técnicas de preconcentración on-line. El modo más sencillo de llevar a cabo la preconcentración on-line, aumentando la eficacia de la separación y la sensibilidad analítica, es el conocido como “*Sample-Stacking*”. Puede llevarse a cabo utilizando las modalidades de inyección

hidrodinámica y electrocinética, por lo que ambas se probaron para la preconcentración de las isoflavonas. El método que proporcionó los mejores resultados fue el denominado Stacking en modo normal³²⁵ (*Normal Stacking Mode, NSM*); la muestra se disuelve en una matriz de baja conductividad (en nuestro caso agua) y se inyecta la disolución resultante en modo hidrodinámico. La preconcentración se produce debido a un cambio brusco en la velocidad electroforética entre la matriz de baja conductividad y el BGE, al aplicar el potencial para iniciar la separación.

La modalidad NSM permite aplicar tiempos de inyección de hasta 60 segundos sin ocasionar pérdidas de resolución ni de eficiencia. En la figura 4.38 se muestra la influencia del tiempo de inyección en la señal analítica para las diferentes isoflavonas utilizando inyección hidrodinámica aplicando una presión de 50 mbar. Como puede verse, se adquieren valores constantes a partir de 50 segundos.

Se eligió un tiempo de inyección de 60 segundos debido a que se obtienen señales analíticas altas y adecuada resolución entre los picos electroforéticos.

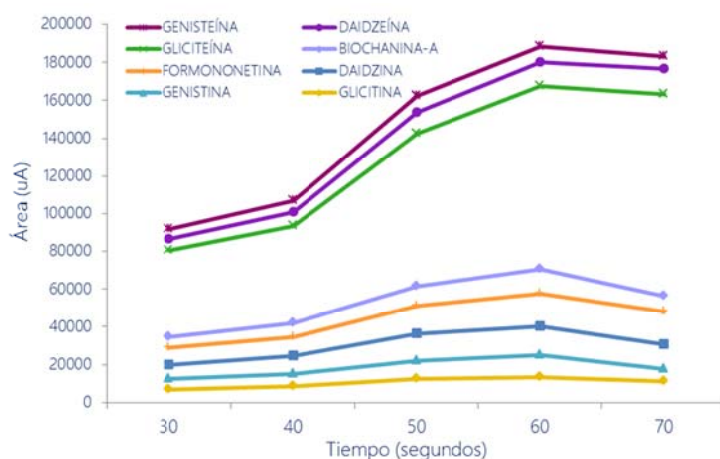


Figura 4.38. Influencia del tiempo de inyección sobre el área del pico electroforético.

³²⁵ Z. Malá, L. Krivánková, P. Gebauer, P. Bocek; *Electrophoresis* 28 (2007) 243

4.4.3.3. Optimización del acoplamiento CE-ESI-MS

Una vez optimizada la separación electroforética, se estudiaron aquellos factores que afectan al acoplamiento CE-ESI-MS. Para ello se emplearon capilares de 50 μm de diámetro interno y 87.5 cm de longitud, 21 cm hasta el detector UV, ya que se comprobó que la disminución del diámetro interno mejoraba la estabilidad y la resolución de las señales.

El equipo de MS utilizado en este trabajo tiene un analizador de cuadrupolo sencillo, conectado a una fuente de ionización de electrospray. La interfaz con el equipo de electroforesis capilar es de tipo “líquido adicional o envolvente”, es decir, consta de un dispositivo coaxial por donde circula un líquido adicional responsable de cerrar el circuito eléctrico y, a su vez, de favorecer el proceso de electronebulización.

La relación entre el flujo y la composición del líquido adicional tiene una gran influencia sobre la eficacia de la ionización de los analitos en MS y la estabilidad del spray. Se evaluaron como líquidos adicionales diferentes mezclas de isopropanol y metanol con agua, así como distintos flujos en un rango de 0.7 – 1.0 mL min^{-1} .

La forma habitual de introducir especies en el MS, que han sido previamente separadas en forma aniónica en CZE, sería la ionización en modo negativo. Sin embargo, la fuente de ionización por electrospray es más efectiva en modo positivo que en modo negativo, a pesar de que los analitos estén en forma aniónica³²⁶. Son varios los autores que han propuesto el uso de la modalidad de ionización positiva en la fuente del electrospray^{327,328} para la detección de aniones.

En este trabajo se estudiaron ambas modalidades, positiva y negativa, con el fin de comprobar cuál de ellas proporcionaba las mejores señales analíticas. Los mejores resultados se obtuvieron en modo positivo, utilizando como

³²⁶ R.J. Soukup-Hein, J.W. Remsburg, P.K. Dasgupta, D.W. Armstrong; *Anal. Chem.* 79 (2007) 7346

³²⁷ P. Bedná, B.Papou-Ková, L. Müller, P. Barták, J. Stávek, P. Pavlou, k. Lemr; *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1291

³²⁸ A. Segura-Carretero, M.A. Puertas-Mejía, S. Cortacero-Ramírez, R. Beltrán, C. Alonso-Villaverde, J. Joven, G. Dinelli, A. Fernández-Gutiérrez; *Electrophoresis* 29 (2008) 2852

líquido adicional una mezcla isopropanol:agua (1:1, v/v) a un flujo de 1.0 mL min⁻¹.

La presión de nebulización ejerce una gran influencia en el tiempo de análisis, así como en la resolución. La adición de un gas nebulizador, combinado con un elevado voltaje, es necesaria para favorecer la evaporación del disolvente. Sin embargo, el gas podría tener un efecto de aspiración que afecta a la calidad de la separación debido a un flujo de presión inducida^{323,329}. Con objeto de minimizar la entrada de aire en el capilar, evitando así las caídas de corriente, se utilizó la estrategia basada en la programación de la presión del gas de nebulización (PNP) durante la inyección y la separación electroforética. Como se ha comentado anteriormente, la estrategia PNP consiste en suspender la aplicación de la presión de nebulización durante la inyección de la muestra, aplicar el valor mínimo permitido por el equipo instrumental (1 psi) durante una parte de la separación electroforética y, finalmente, aplicar la presión optimizada para llevar a cabo la separación un minuto antes de que los analitos lleguen a la interfaz del ESI. Esta estrategia ha sido utilizada para separación y determinación de isoflavonas en bebidas de soja¹⁵¹, por lo que se han tomado los resultados obtenidos en este artículo como punto de partida para la determinación que se pretende en el estudio presentado en esta Memoria.

Con objeto de optimizar la presión de nebulización aplicada cuando los analitos llegan al detector de MS, se estudió el efecto de dicha presión sobre la resolución de las señales electroforéticas, encontrándose que los mejores resultados se obtienen cuando se aplica una presión de 5 psi.

Parámetros tales como el voltaje del capilar o la temperatura y el flujo del gas de secado no presentan una influencia significativa en el tiempo de migración ni en la resolución. Sin embargo, se observaron señales ligeramente mayores para valores de 3500 V, 6 L min⁻¹ y 350 °C para el voltaje del capilar, el flujo y la temperatura del gas de secado, respectivamente.

³²⁹ J.C. Severs, R.D. Smith; R.B Cole (Ed) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. Wiley, New York, 1997 pp 343

En la figura 4.39 se muestra el electroferograma de ion total (TIE) de una muestra patrón de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ inyectada en las condiciones optimizadas. Como se puede observar en el electroferograma existe una co-migración de los analitos 1: glicitina y 2: genistina además de 4: formononetina y 5: biochanina-A; sin embargo, se pueden determinar debido a que en el detector se separan como iones con relaciones m/z diferentes.

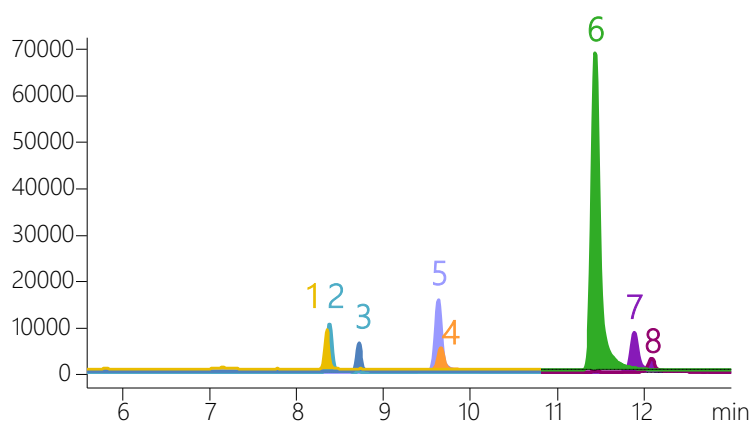


Figura 4.39. TIE de una solución patrón de isoflavonas de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. 1) Glicitina , 2) Genistina, 3) Daidzina, 4) Formononetina, 5) Biochanina-A, 6) Gliciteína, 7) Daidzeína, 8) Genisteína.

4.4.3.4. Características analíticas y validación del método

La metodología basada en CE propuesta para el análisis de isoflavonas en muestras de legumbres fue validada mediante la determinación de la linealidad, los límites de detección, la precisión y la recuperación.

El método de cuantificación empleado en este caso ha sido el del patrón interno, debido a la falta de reproducibilidad de las señales analíticas. Algunas de las sustancias utilizadas como patrón interno en el análisis de

isoflavonas son 2-metoxiflavona, dihidroxibenzaldehído o apigenina. El patrón interno elegido fue la apigenina, una flavona análoga a la isoflavona genisteína, ya que, aunque presenta una relación m/z igual a la genisteína, en las condiciones de trabajo migra separada del resto de analitos. La linealidad se estudió en un rango de 10-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 10$). En la tabla 4.19 se muestran los resultados obtenidos; como puede verse, existe una buena linealidad ($R^2 > 0.998$) entre la relación de las áreas de los picos (isoflavona/patrón interno) y la concentración.

Tabla 4.19. Características analíticas del método CE-MS.

Isoflavona	Ordenada en el origen (10^{-2})	Pendiente (10^{-3})	R^2	LOD ^a	RSD ^b (%)	RSD ^c (%)
Glicitina	-1 ± 1	4.46 ± 0.04	0.998	1.1	4.2	5.8
Genistina	-5 ± 9	3.55 ± 0.03	0.998	1.7	3.8	4.7
Daidzina	-1 ± 1	4.99 ± 0.04	0.999	1.8	3.2	6.8
Formononetina	-1 ± 1	5.49 ± 0.04	0.998	0.7	6.0	9.0
Biochanina-A	1.2 ± 0.8	3.08 ± 0.02	0.999	1.2	6.9	9.6
Gliciteína	2 ± 4	3.00 ± 0.02	0.999	0.20	4.5	8.8
Daidzeína	-2.1 ± 0.5	4.34 ± 0.02	0.999	1.0	3.7	5.5
Genisteína	-2.7 ± 0.9	3.78 ± 0.03	0.998	1.4	2.8	5.8

^a Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$) $S/N = 3$.

^b Precisión *intra-day*, calculada mediante la inyección de una disolución patrón de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ cuatro veces durante un mismo día.

^c Precisión *inter-day*, calculada mediante la inyección de una disolución patrón de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante cuatro días diferentes.

Los límites de detección se calcularon como la concentración de soluto que produce una señal analítica equivalente a tres veces la señal del ruido de fondo ($S/N = 3$). Los límites de detección varían para el método de CE desde 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la gliciteína hasta 1.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la daidzina. Estos resultados no son muy diferentes de los obtenidos utilizando cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS), que se encuentran entre 0.71 a 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para formononetina y gliciteína respectivamente.

La repetibilidad fue evaluada mediante el estudio de la precisión *intra-day*, inyectando 4 veces durante el mismo día una solución patrón de concentración conocida, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. La reproducibilidad se estudió mediante

la inyección de dicha solución en cuatro días diferentes. Las desviaciones estándar relativas (RSD) varían entre 2.8 y 6.9% en el caso de la repetibilidad, y entre 4.7 y 9.6% en el caso de la reproducibilidad (Tabla 4.19).

Tal y como se ha indicado a lo largo de la Memoria, no se dispone de materiales certificados y esta ausencia hace necesario determinar la exactitud del método a través del estudio de la recuperación. Para ello, muestras de garbanzos, lentejas y alubias se doparon con soluciones estándar de isoflavonas a niveles de concentración similares a los presentes en las muestras. Los extractos obtenidos, tanto de muestras dopadas como sin dopar, fueron analizados por triplicado obteniéndose recuperaciones en el margen de 80% al 120%.

Comparando estas características analíticas con las correspondientes a los estudios llevados a cabo utilizando LC-MS/MS (Capítulo 4.2, Sección 4.2.3.4, *pág.*190), se puede concluir que los resultados con ambas metodologías son similares, por lo que ambas metodologías pueden considerarse adecuadas para el análisis de isoflavonas en muestras de legumbres.

4.4.3.5. Análisis de isoflavonas en legumbres mediante QuEChERS-CE-ESI-MS

El tratamiento de muestra se lleva a cabo, utilizando extracción mediante QuEChERS, como se indica en el procedimiento analítico al comienzo de este capítulo. Los extractos obtenidos tras la aplicación de la metodología QuEChERS contienen un elevado porcentaje de disolvente orgánico (80% ACN). Estos extractos no pueden ser inyectados directamente en el sistema electroforético debido a la baja estabilidad que presenta el capilar en esas condiciones, en las que está presente tan alta cantidad de disolvente orgánico.

Con objeto de encontrar la cantidad máxima de acetonitrilo que puede ser inyectada en el sistema CE-MS, se diluyeron los extractos obtenidos tras la extracción mediante QuEChERS en proporciones en un rango de relaciones de muestra:agua desde 1:10 a 6:10, correspondientes a porcentajes de ACN entre 8 y 48 %, respectivamente.

En la figura 4.40 se muestra el efecto de la dilución de la muestra sobre la señal analítica. Para las muestras de garbanzos la dilución óptima corresponde a una relación 5:10, mientras que en lentejas y alubias parece que existe un aumento de las áreas del pico electroforético en la relación 6:10. Sin embargo, se observó que porcentajes de ACN por encima del 40% ocasionaban picos anchos y disminuía la reproducibilidad. Debido a esto, los extractos fueron diluidos en una relación 5:10, o lo que es lo mismo 1:2, dando lugar a un porcentaje de ACN del 40%.

La matriz, una vez diluida, presenta baja conductividad, lo que es adecuado para una preconcentración mediante “*Normal Stacking Mode*” (NSM). Como se ha indicado anteriormente, el tiempo de inyección optimizado es de 60 segundos.

Aplicando las condiciones optimizadas en estos estudios se analizaron muestras de alubias, garbanzos y lentejas utilizando los dos modos seleccionados de puesta en contacto de muestra y disolvente (bandeja agitadora termostatada y sonda de ultrasonidos). En la figura 4.41 se muestran los electroferogramas obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

IV. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

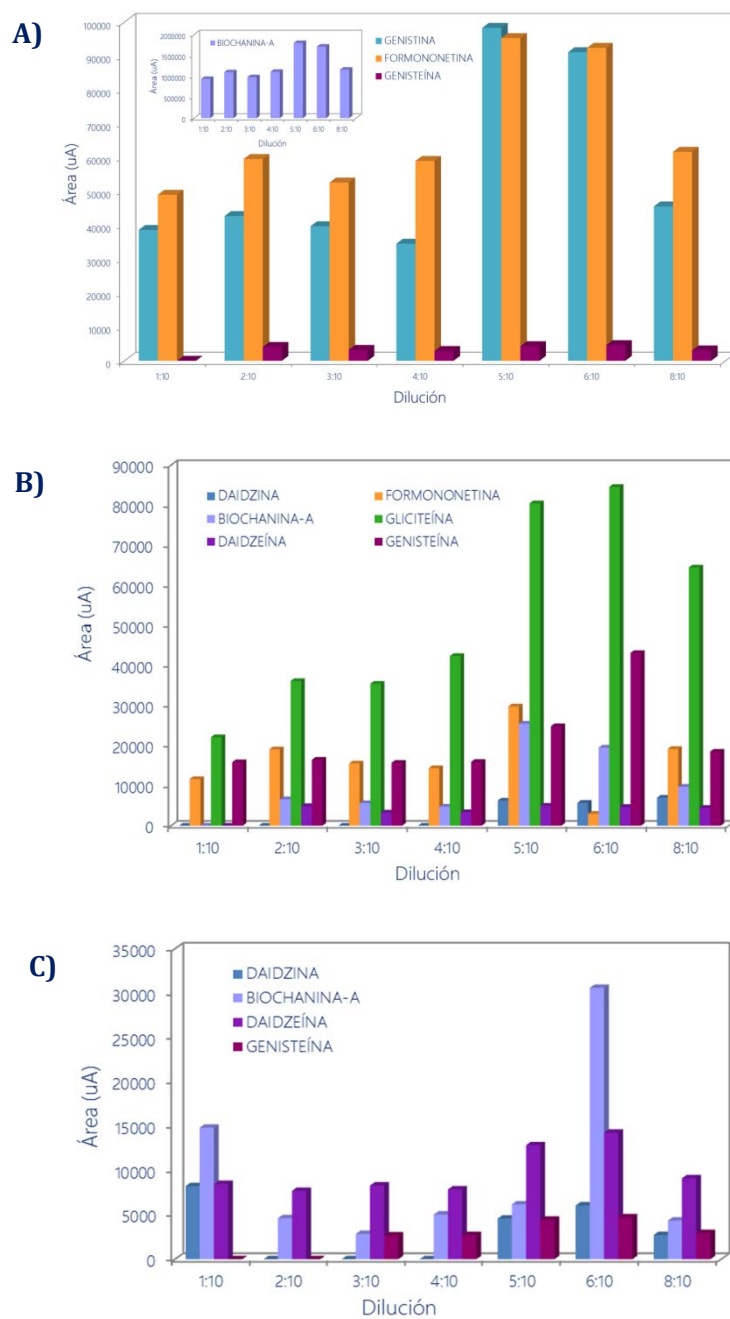


Figura 4.40. Influencia de la dilución de la muestra sobre la señal analítica. A) Garbanzos, B) Lentejas, C) Alubias.

IV. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

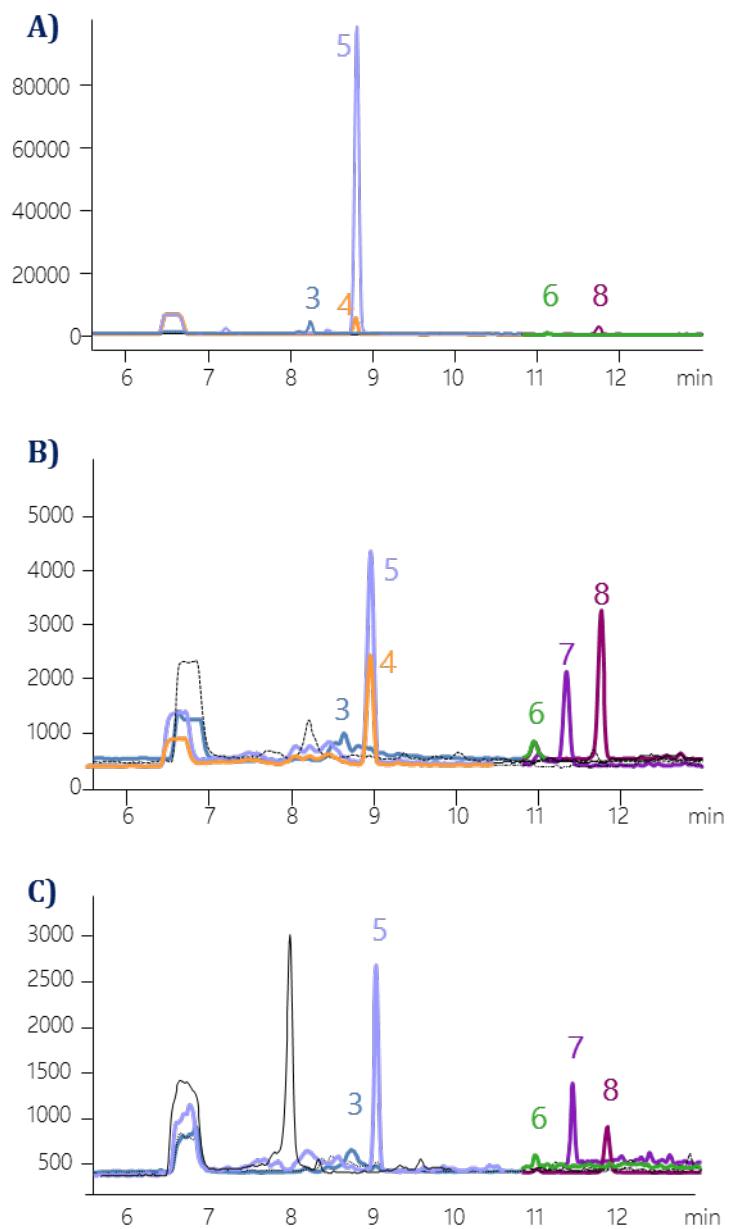


Figura 4.41. Electroferogramas correspondientes a una muestra de A) Garbanzos, B) Lentejas y C) Alubias en las condiciones de trabajo indicadas. Orden de migración: 1) Glicitina, 2) Genistina, 3) Daidzina, 4) Formononetina, 5) Biochanina-A, 6) Gliciteína, 7) Daidzeína, 8) Genisteína.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del patrón interno utilizando apigenina. En la tabla 4.20 se muestran los contenidos encontrados para cada una de las matrices en unidades de $\mu\text{g} / 100\text{g}$.

Tabla 4.20. Contenido de isoflavonas ($\mu\text{g} / 100\text{g} \pm \text{RSD}$) en legumbres (n=3) analizadas mediante QuEChERS-CE-ESI-MS.

ANALITO	GARBANZOS		LENTEJAS		ALUBIAS	
	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda
DIN	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.6	0.91 ± 0.5	0.98 ± 0.5	2.2 ± 0.6	3.2 ± 0.8
FOR	28 ± 2	10.5 ± 0.3	5.0 ± 0.6	6.5 ± 0.4	nd	nd
BIO	1360 ± 80	742 ± 24	4.9 ± 0.6	5.4 ± 0.6	5 ± 1	5 ± 1
GLEN	0.35 ± 0.04	nd	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
DEN	nd	nd	3.2 ± 0.7	2.8 ± 0.3	6.2 ± 0.1	6.6 ± 0.2
GEN	6.2 ± 0.3	nd	5.8 ± 0.6	10.0 ± 0.7	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.2

Cabe señalar que los contenidos de glicitina encontrados para los tres tipos de muestra se encuentran por debajo del límite de cuantificación. Por otra parte, la genistina no puede ser determinada mediante electroforesis capilar debido a la co-migración con un compuesto desconocido y no separado en el detector de masas. Por este motivo, los analitos glicitina y genistina no están incluidos en la tabla 4.20.

La precisión *intra-day* se evaluó analizando cuatro muestras de cada tipo en el mismo día, mientras que para el estudio de la precisión *inter-day* se sometieron al análisis completo cuatro muestras de cada tipo en cuatro días diferentes. Las desviaciones estándar relativas son inferiores al 10 % para la precisión *intra-day* e inferiores al 16 % para la precisión *inter-day*. A la vista de estos resultados, se puede concluir que la metodología propuesta es válida para la determinación de isoflavonas en muestras de legumbres.

4.4.3.5.1. Comparación del análisis de isoflavonas mediante QuEChERS-LC-MS/MS y QuEChERS-CE-MS

Con objeto de comparar las dos formas de determinación propuestas se llevó a cabo el análisis de las muestras de garbanzos, lentejas y alubias, analizadas en este capítulo mediante CE-MS, utilizando LC-MS/MS. Para ello, los extractos obtenidos tras la aplicación de la metodología QuEChERS fueron inyectados directamente en el sistema cromatográfico. En la figura 4.42 se muestra el TIC de una disolución patrón de las isoflavonas en estudio, poniendo de manifiesto un orden de elución de los analitos lógicamente diferente al orden de migración observado en los análisis mediante electroforesis capilar.

En la figura 4.43 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras en estudio, mostrándose los contenidos obtenidos para cada uno de los analitos en la tabla 4.21. Cabe señalar que en este caso la cuantificación se llevó a cabo mediante patrón externo. Con objeto de controlar las posibles fluctuaciones del detector, las disoluciones patrón se deben de inyectar al mismo tiempo que las muestras.

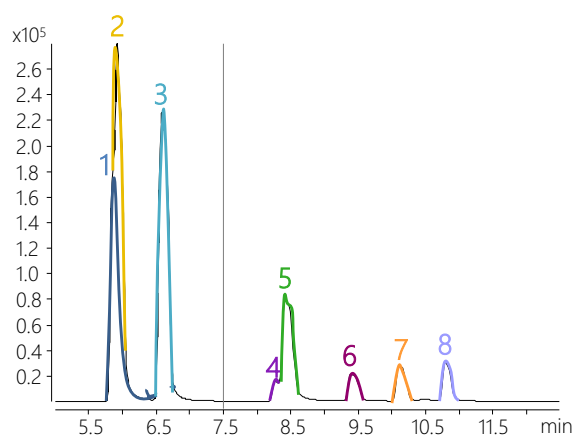


Figura 4.42. TIC de una disolución patrón de isoflavonas. 1) Daidzina, 2) Glicitina, 3) Genistina, 4) Daidzeína, 5) Gliciteína, 6) Genisteína, 7) Formononetina, 8) Biochanina-A.

IV. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

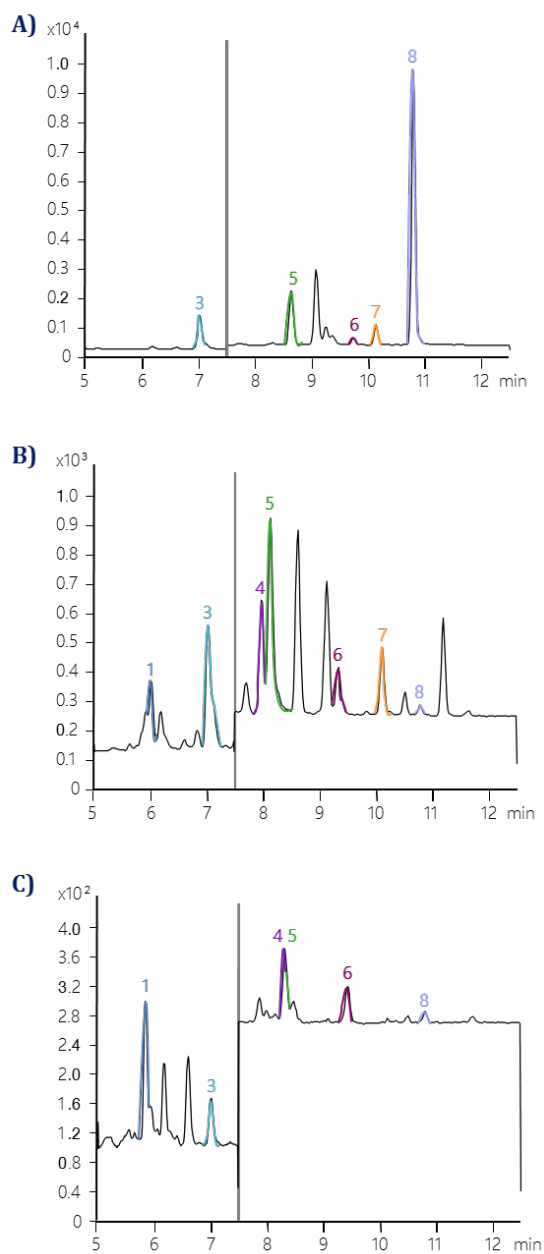


Figura 4.43. Cromatogramas correspondientes a una muestra de A) Garbanzos, B) Lentejas y C) Alubias en las condiciones de análisis indicadas. Orden de elución: 1) Daidzina, 2) Glicitina, 3) Genistina, 4) Daidzeína, 5) Gliciteína, 6) Genisteína, 7) Formononetina, 8) Biochanina-A.

IV. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

Tabla 4.21. Contenido de isoflavonas ($\mu\text{g} / 100\text{g} \pm \text{RSD}$) en legumbres ($n = 3$) analizadas mediante QuEChERS-LC-MS/MS.

ANALITO	GARBANZOS		LENTEJAS		ALUBIAS	
	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda
DIN	nd	nd	1.5 ± 0.6	0.7 ± 0.06	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
GIN	0.33 ± 0.02	0.49 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.12 ± 0.02	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.1
DEN	nd	nd	2.9 ± 0.4	3.1 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.2 ± 0.7
GLEN	6.3 ± 0.6	10.7 ± 0.6	4.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.13 ± 0.04	0.19 ± 0.02
GEN	13.8 ± 0.7	8.1 ± 0.6	14 ± 1	13 ± 1	6.0 ± 0.7	8.0 ± 0.3
FOR	29 ± 2	11.8 ± 0.7	5.4 ± 0.5	6.6 ± 0.3	nd	nd
BIO	1371 ± 32	679 ± 35	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.8	5 ± 1	9 ± 2

Los resultados obtenidos por ambas metodologías (LC-MS/MS y CE-ESI-MS) fueron comparados empleando un test *t de Student* a un nivel de confianza del 95 %. Valores de $p > 0.05$ indican que la hipótesis nula es aceptada, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambas metodologías. En la tabla 4.22 se muestran los valores de p obtenidos para cada uno de los analitos.

Tabla 4.22. Valores de p obtenidos con un nivel de significación superior al 95% para las metodologías propuestas.

ANALITO	GARBANZOS		LENTEJAS		ALUBIAS	
	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda	Bandeja	Sonda
DIN	-	-	0.282	0.407	0.065	0.027
FOR	0.584	0.06	0.44	0.752	-	-
BIO	0.839	0.082	0.110	0.081	1	0.053
GLEN	0.0004	-	3.04 E-05	0.308	0.005	0.006
GEN	0.0004	-	0.0012	0.024	0.127	0.0005
DEN	-	-	0.565	0.198	0.103	0.411

A la vista de estos resultados se puede concluir que las metodologías propuestas aportan contenidos significativamente iguales, exceptuando los analitos gliciteína y genisteína. Una posible explicación a este hecho es que, en la metodología basada en CE, la cuantificación de los analitos gliciteína y biochanina-A se lleva a cabo utilizando la misma relación m/z . Ambos analitos se pueden cuantificar debido a su diferente tiempo de migración, sin embargo, la señal procedente de la biochanina-A puede inhibir ligeramente la señal del analito gliciteína, debido a su mayor contenido en las muestras. Esta inhibición puede ser la causante de que se encuentren contenidos menores de gliciteína utilizando la metodología CE-ESI-MS. En la metodología LC-MS/MS, la señal correspondiente al analito gliciteína, viene dada por el seguimiento de un ion fragmentado, por lo que no tiene lugar la inhibición por parte de la biochanina-A. En el caso del analito genisteína, en general, se observan contenidos mayores al analizar los extractos mediante LC-MS/MS.

4.4.4. CONCLUSIONES

El presente capítulo de la Memoria recoge el desarrollo de un método sencillo y sensible para determinar isoflavonas en muestras de legumbres mediante electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas.

El método propuesto ha sido aplicado con éxito en el análisis de isoflavonas en diferentes tipos de legumbres. Los analitos se separaron como aniones en el capilar y fueron detectados en una modalidad de ionización positiva. La aplicación de una presión de nebulización programada a lo largo de los análisis permite, además de mejorar la separación de los analitos, prevenir las caídas de corriente.

El mayor inconveniente de la electroforesis capilar, su baja sensibilidad, fue resuelto de forma eficaz mediante la dilución de los extractos obtenidos en agua, siendo éstos inyectados de forma hidrodinámica y utilizando la preconcentración mediante “*Stacking*”.

El método propuesto fue validado por calibración interna mediante parámetros tales como linealidad, LOD, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, R^2 o RSD. El contenido de isoflavonas encontrado en cada una de las muestras fue comparado con los obtenidos mediante cromatografía líquida. Los resultados no muestran diferencias significativas entre las metodologías, siendo ambas similares en cuestión de precisión, recuperación y límites de detección, salvo en el caso de algún analito.

En vista de los resultados obtenidos, la metodología que incluye electroforesis capilar es recomendable para la determinación de agliconas, sin embargo, la metodología LC-MS/MS proporciona mejores resultados tanto para glucósidos como agliconas.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Current Anal. Chem. 11 (2015) 117

Determination of Isoflavones in Legumes by QuEChERS-Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry

Lara Pérez-Martín, Myriam Bustamante-Rangel and María Milagros Delgado-Zamarreño*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, University of Salamanca, Plaza de los caídos s/n, 37008 Salamanca, Spain

Abstract: In this study, a capillary electrophoresis-mass spectrometry method was applied to the determination of isoflavones in samples with low content in these analytes, such as legumes. Sample stacking was used to enhance the sensitivity of the technique. Extraction of the analytes was carried out by a modified approach of QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) methodology, in which the extracts were injected directly into electrophoretic system coupled with mass spectrometry detector. The developed method was validated and applied for the determination of isoflavone aglycones and glycosides in legume samples. The values of the validation parameters and the isoflavone contents found were compared with those obtained by LC-MS/MS. Both methods provided similar results and were comparable in terms of recovery (in the 80-120% range), precision (lower than 10 %) and limits of detection (ranging from 0.20 to 1.8 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Keywords: CE-ESI-MS, LC-ESI-MS/MS, Isoflavone, legume, QuEChERS.

1. INTRODUCTION

Isoflavones are compounds of the family of flavonoids whose chemical structure is similar to that of estradiol and are also considered as phytoestrogen due to their oestrogenic activity. They have been associated with several beneficial health effects, such as the prevention of cancer [1, 2], cardiovascular disease [3, 4], osteoporosis [5, 6], as well as for the relief of menopausal symptoms [7, 8].

Isoflavones are found primarily in the Leguminosae family, being more abundant in soybeans, alfalfa and red clover; other legumes also contain these components, to a lesser proportion [9]. In vegetables, isoflavones are found mainly as biologically inactive glucoconjugates and are hydrolyzed in the intestine to their biologically active form, aglycon. [10].

Quantitative analysis of isoflavones is generally accomplished with liquid chromatography or capillary electrophoresis. Recently, several reviews have been published, including current trends in sample preparation [11], separation, identification and determination methods [11, 12] for the analysis of isoflavones from foods. The most widely used analytical technique for the separation of isoflavones is reversed phase liquid chromatography using C18 columns; mixtures acidified water: methanol and acidified water:acetonitrile are the most common mobile phases. Extraction of isoflavones from food samples is usually carried out by solvent extraction, Soxhlet extraction, solid-phase extraction, accelerated solvent extraction, ultrasound-assisted extraction, etc. Some of these methods are tedious, expensive

and time-consuming. In previous works, we isolated isoflavones from soy-based foods and legume samples [14, 15] using a simple approach of the QuEChERS methodology developed by Anastassiades and co-workers [16]. This extraction method affords advantages in the analysis of naturally present components in the samples, since it is simple, rapid (extraction time ~ 10 min) and easy to use. This approach was successfully applied to the isolation of aglycones and glycoside isoflavones from chickpeas, lentils and beans. These samples show much lower isoflavone content than soy or soy-based products. In that work, the separation and determination of isoflavones were accomplished using ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry.

The objective of this work was to evaluate the use of capillary electrophoresis in the determination of isoflavones in samples with low contents of these compounds, such as legumes. One of the major disadvantages of CE is its poor detection limit, which results from the small inner diameter of the separation column. An easy way to enhance CE sensitivity is to use the sample-stacking technique [17]. This method focuses on preconcentration analytes using different properties such as differences in conductivity, pH, ionic strength, viscosity, etc., between the background electrolyte (BGE) and the sample matrix [18]. The sample stacking phenomenon arises from the movement of ions through the separation limit between the zone containing the sample and the zone containing BGE [19]. The background zone has higher conductivity than the sample ions zone. When voltage is applied, the electric field is higher in the area of the sample, which makes the analytes migrate at a considerably higher speed in this segment. This causes the analytes to move rapidly towards the border between the two areas and preconcentration occurs.

*Address correspondence to this author at the Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, University of Salamanca, Plaza de los caídos s/n, 37008 Salamanca, Spain; Tel/Fax: 34 923 294483; E-mail: mdz@usal.es

The objective of this study was to compare the L7C and CE techniques for the determination of isoflavones in pulse samples. Thus, both methods were applied for the analysis of three different kinds of legumes (chickpeas, lentils and white beans). One of them was a previously reported method using LC-MS/MS [15] and the other was the CE-MS method, which has been developed and validated in this work. Analyte extraction and sample clean-up were carried out using a modified QuEChERS approach which offers high extraction efficiency for the studied analytes in this type of matrix. Linearity, LOD, precision, accuracy and their applicability in real legume samples were compared.

The use of CE has the advantage of a lower consumption of organic solvents and high resolution capabilities. It is necessary to take into account that the sensitivity of capillary electrophoresis is less than that of LC-MS / MS. In a previous work [14] soy based foods were analyzed using CE-MS. However, soy based foods contain higher levels of isoflavones than the test samples: 10 to 20 times compared to chickpea, and up to 100 times in the case of lentils. Moreover, the matrices are different.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and Chemicals

The isoflavone standards (glycitin, daidzin, genistin, formononetin, biochanin A, glycitein, daidzein and genistein) and the internal standard apigenin, as well as disodium hydrogencitrate sesquihydrate ($\text{Na}_2\text{HCit}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$), were supplied by Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). HPLC-grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (>98%) was supplied by Fluka (Steinheim, Germany). Other salts employed (MgSO_4 , NaCl and $\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultra-high quality (UHQ) water was supplied by a Wasserlab (Spain) water purification system. Stock solutions of isoflavones were prepared in methanol and preserved at -18°C .

The samples used were commercially available pulses from the Castilla y León Region (Spain).

2.2. Apparatus

CE-MS System

Electrophoretic separations were performed using a Hewlett-Packard HP^{3D} Capillary Electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) endowed of a diode array detector (DAD); wavelength was set at 254 nm. MS was achieved with an Agilent LC/MSD SL (Agilent technologies) single quadrupole mass spectrometer. CE-DAD and CE-MS data were analyzed using Agilent HP ChemStation software, version B.02.01 SR1. CE-MS coupling was performed using an Agilent coaxial sheath-liquid sprayer (Agilent technologies). The sheath liquid (isopropanol/water (1:1, v/v)) was dispensed by an Agilent 1100 series pump, with a 1:100 flow-split ratio. The ESI conditions were as follows: capillary voltage, 3500 V; drying gas flow, 6 L min^{-1} ; drying gas temperature, 350°C . In a previous work [20] we have proved that the resolution and stability of the signals were improved when a programmed nebulizing gas pressure

(PNP) was applied. Thus, no nebulizing gas pressure was applied during injection; separation was performed at a low pressure of 1 psi, and detection was carried out at a pressure of 4 psi, considered to be optimal for the ionization of analytes. Detection was performed in positive-ion mode. Analyte quantification was carried out using the extracted ion electropherograms for the protonated molecules; the ions monitored were: m/z 447 for Gli, 417 for Di, 433 for Gi, 269 for For, 285 for Bio and Gle, 255 for De, and 271 for Ge and IS, respectively. Although there was coincidence on m/z of extracted ions their migration times were different and it was possible the quantification.

Fused-silica capillaries (50 μm id, 87.5-cm total length) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), were supplied by Composite Metal Services Ltd (West Yorkshire, UK), and were used throughout the work. Conditioning of the new capillaries was accomplished by washing with 1.0 M sodium hydroxide, UHQ water, and the background electrolyte (BGE) for 10 min each. Between consecutive analyses, the capillary was washed for 2 min with the BGE.

Hydrodynamic injections were carried out at 50 mbar for 60 s. A potential of 25 kV was applied during analysis, and the temperature of the capillary was kept at 25°C . The BGE consisted of 15 mM aqueous ammonium acetate at pH 11.0

LC-MS/MS System

LC analyses were carried out on an Agilent HP 1200 Series chromatograph consisting of a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, and a six-port valve. Separation was performed on a $50 \times 4.6\text{ mm}$ Zorbax Eclipse XDB-C18 column (Agilent) with 1.8- μm particles. Acetonitrile (solvent A) and 0.01% aqueous formic acid (solvent B) at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} was used as the mobile phase, using the following gradient: 0 to 10%A in 1.5 min, 10 to 25% A in the next min, and kept for 1 min; 25 to 50 % A in the following 3.5 min; 50 to 80 % in 1 min, and kept for 2 min, and finally 80 to 10 % A in 2 min. Column temperature was maintained at 25°C ; the injection volume was 2 μL . Detection was performed using a Triple Quad LC/MS 6410 (Agilent) equipped with an electrospray (ESI) source. Quantification was achieved using positive-ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. MS conditions were the same as used in a previous work [15]. The ions monitored m/z (Precursor/Products ions) were: 447.1/255.1 for Gli, 417.1/285.1/270.1 for Di, 433.1/271.1 for Gi, 269.1/197.1/253 for For, 285.1 /152/213 for Bio, 285.1/270/242 for Gle, 255.1/137/199.1/91 for De, and 271.1/ 153/91.1 for Ge.

2.3. Sample Preparation

Samples were ground with a KnifetecTM 1905 supplied by Foss (Barcelona, Spain), before extraction.

Extraction was carried out following the QuEChERS methodology optimized in a previous work.¹⁵ An appropriate amount of sample – 3g for chickpea and bean samples and 7 g for lentils- was extracted in two steps: first, using 10 mL of 70 % aqueous ACN for 5 min, and then using 5 mL of pure ACN again for 5 min. In all cases, agitation was performed using two different systems to place the sample and the solvent in contact: a VWR thermostatted shaking tray (Radnor,

Pennsylvania, USA), and a Microson Misonix Ultrasonic Cell Disruptor probe (Farmingdale, NY, USA). After extraction, a mixture of $\text{MgSO}_4 \cdot \text{NaCl}$ (4:1, w/w) together with a citrate buffer (in the extraction of chickpeas and beans) were added, and the mixture was shaken vigorously for 1 min and centrifuged at 3000 rpm during 5 min. No additional cleaning step was required. The upper layer was filtered through $0.22 \mu\text{m}$ PVDF syringe filters (Scharlau). The extract obtained was directly injected into the chromatographic system, or diluted with water at a 1:2 (v/v) ratio for injection into CE system.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Method Validation

The CE proposed method for the analysis of isoflavones in legume samples, as well as, the LC method, were validated by means of linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy, using the conditions described in the experimental section.

For the CE method, linearity was studied in the 10 to $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ range ($n=10$). The results showed good linearity ($R^2 > 0.998$) between peak area ratios (isoflavone/internal standard) and concentration (Table 1). For the LC method, the calibration curves were tested at concentration levels ranging from 0.1 to $500 \mu\text{g L}^{-1}$ for biochanin A; from 0.1 to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for daidzein and glycitein, and from 0.1 to $40 \mu\text{g L}^{-1}$ for the rest of the isoflavones. Calibration curves based on the external standard quantification also showed good correlation coefficients ($R^2 > 0.998$).

Detection limits were calculated on the basis of a signal-to-noise ratio (S/N) of 3. The LOD for the CE method ranged from $0.20 \mu\text{g L}^{-1}$ for glycitein to $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ for daidzein (Table 1). The LOD for the LC method (ranging between 0.71 and $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for formononetin and glycitin respectively) were similar to those obtained with the CE method.

Repeatability was evaluated by determination of the intra-day precision; a standard solution of the eight isoflavones at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ was analyzed in quadruplicate on the same day. The relative standard (RSD) deviations ranged from 2.8 to

6.9 % for the CE method, and from 1.0 to 4.6 % for the LC method. Reproducibility was calculated over four different days, by applying both methods to a standard solution at 100mg L^{-1} . The relative standard deviations (RSD) for the inter-day assays ranged from 4.7 to 9.6 % for the CE method, and from 3.0 to 7.5 % for the LC method.

Since no certified reference material was available commercially, a recovery study with spiked samples was necessary. Samples of the three kinds of legume in study were spiked with standard isoflavones at concentration levels close to those expected in the matrices. The samples were analysed in triplicate using the QuEChERS-CE-MS and the QuEChERS-LC-MS/MS methods, applying the two modes of placing the sample and the solvent in contact. In all cases, recoveries were in the 80-120% range.

3.2. Analysis of Isoflavones in Legume Samples

In a previous study we found that the isolation of isoflavones from pulse samples depends to a large extent on how the sample and the extractant are placed in contact. To corroborate this, samples of the three types of legume studied here were analyzed using the two methodologies that provided the best results in that study: with a thermostatted shaking tray and with an ultrasonic probe. In all cases, extractions were performed using the modified QuEChERS approach described in Section 2.2. This method provided high extraction efficiency for these analytes in this type of matrix. The extracts obtained were analyzed using capillary electrophoresis and liquid chromatography in order to compare both results.

3.2.1. Analysis of Isoflavones by QuEChERS-CE-MS

The extracts obtained after applying the QuEChERS methodology contained a high percentage of organic solvent (80 % ACN). These extracts cannot be injected directly into the CE system owing to the low stability of the capillary under these conditions. A study was therefore conducted to optimize the maximum amount of sample to be injected. Thus, the extracts were diluted at ratios ranging from 1:10 to 6:10 (ACN percentages from 8 to 48%). It was observed that

Table 1. Analytical characteristics of the CE-MS method.

Isoflavone	Intercept \pm RSD	Slope \pm RSD	R^2	LOD ^a	RSD ^b	RSD ^c
Gli	$(-1 \pm 1) 10^{-2}$	$(4.46 \pm 0.04) 10^{-3}$	0.9982	1.1	4.2 %	5.8 %
Di	$(-1 \pm 1) 10^{-2}$	$(4.99 \pm 0.04) 10^{-3}$	0.9985	1.8	3.2 %	6.8 %
Gi	$(-5 \pm 9) 10^{-3}$	$(3.55 \pm 0.03) 10^{-3}$	0.9983	1.7	3.8 %	4.7 %
For	$(-1 \pm 1) 10^{-2}$	$(5.49 \pm 0.04) 10^{-3}$	0.9983	0.7	6.0 %	9.0 %
Bio	$(1.2 \pm 0.8) 10^{-2}$	$(3.08 \pm 0.02) 10^{-3}$	0.9987	1.2	6.9 %	9.6 %
Gle	$(2 \pm 4) 10^{-2}$	$(3.00 \pm 0.02) 10^{-2}$	0.9985	0.20	4.5 %	8.8 %
De	$(-2.1 \pm 0.5) 10^{-2}$	$(4.34 \pm 0.02) 10^{-3}$	0.9996	1.0	3.7 %	5.5 %
Ge	$(-2.7 \pm 0.9) 10^{-2}$	$(3.78 \pm 0.03) 10^{-3}$	0.9981	1.4	2.8 %	5.8 %

^aLimit of Detection ($\mu\text{g L}^{-1}$): S/N=3.

^bIntra-day precision, calculated by analysing a standard solution containing $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of each isoflavone four times on the same day.

^cInter-day precision, calculated by analysing a standard solution containing $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of each isoflavone on four different days.

IV. DETERMINACIÓN DE ISOFLAVONAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

120 *Current Analytical Chemistry*, 2015, Vol. 11, No. 2

Pérez-Martín et al.

for percentages above 40% peak width increased and reproducibility decreased. Accordingly, the extracts were diluted at a ratio of 1:2, obtaining a final ACN percentage of 40 %.

Taking into account the low content of isoflavones present in these pulses and the fact that the samples had to be diluted, we addressed the possibility of using on-line preconcentration techniques. The simplest way to perform the on-line concentration of diluted samples, enhancing separation efficiency and analytical sensitivity, is sample stacking. Sample stacking can be performed in the hydrodynamic and electrokinetic injection modes and here both modes were tested for the preconcentration of isoflavones under the working conditions described above. The method that provided the best results was the normal stacking mode (NSM) [21]. This is accomplished by dissolving the sample in a low-conductivity matrix (in our case water) and then injecting the resulting sample solution hydrodynamically. Preconcentration occurs due to the abrupt change in electrophoretic velocity between the low-conductivity matrix and the BGE. Polarity switching was also tested, obtaining poorer results. In NSM, injection times up to 60 seconds could be applied without causing any loss of resolution and efficiency. The (Fig. 1) shows the influence of injection time on analytical signal which reaches constant values since 50 seconds, injection time of 60 s was chosen.

Applying the optimized conditions in these previous studies (sample dilution 1:2 with UHQ, the presence of

40% ACN, and an injection time of 60 s), samples of beans, chickpeas and lentils were analyzed using the two above modes for placing the sample and solvent in contact. The contents found ($\mu\text{g}/100\text{g} \pm \text{RSD}$) are shown in Table 2. Fig. (2) shows the extracted ion electropherograms obtained for a standard solution of the isoflavones studied at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ and for samples of the three legumes analyzed.

It should be noted that the contents of glycitin found for all three sample types were below the limit of quantification. Genistin could not be determined using the CE method due to the co-migration of an unknown compound. In light of this, the data for glycitin and genistin are not included in Table 2.

To evaluate the precision of the proposed method, samples of chickpeas, lentils and beans were subjected to the entire analytical procedure, using the two modes of placing the sample and the solvent in contact, in quadruplicate on the same day (intra-day precision) and on four different days (inter-day precision) respectively. The RSDs were lower than 10 % for the intra-day precision and lower than 16 % for the inter-day precision.

3.2.2. Analysis of Isoflavones by QuEChERS-LC-MS/MS

The extracts corresponding to the three types of samples, obtained after applying the QuEChERS methodology using the two different modes of agitation, were injected

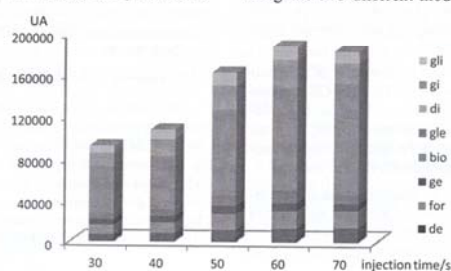


Fig. (1). Influence of injection time on area of electrophoretic peak. Analyte identification: gli: glycitin, gi: genistin, di: daidzin, for: formononetin, bio: biochanin A, gle: glycitein, de: daidzein, ge:genistein.

Table 2. Isoflavone contents ($\mu\text{g}/100\text{g} \pm \text{RSD}$) of legumes (n=3) according to the CE method.

Isoflavone	Chickpeas		Lentils		Beans	
	Shaking tray	US probe	Shaking tray	US probe	Shaking tray	US probe
De	nd	nd	3.2 ± 0.7	2.8 ± 0.3	6.2 ± 0.1	6.6 ± 0.2
For	28 ± 2	10.5 ± 0.3	5.0 ± 0.6	6.5 ± 0.4	nd	nd
Ge	6.2 ± 0.3	nd	5.8 ± 0.6	10.0 ± 0.7	4.8 ± 0.7	4.5 ± 0.2
Bio	1360 ± 80	742 ± 24	4.9 ± 0.6	5.4 ± 0.6	5 ± 1	5 ± 1
Gle	0.35 ± 0.04	nd	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
Di	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.6	0.91 ± 0.5	0.98 ± 0.5	2.2 ± 0.6	3.2 ± 0.8

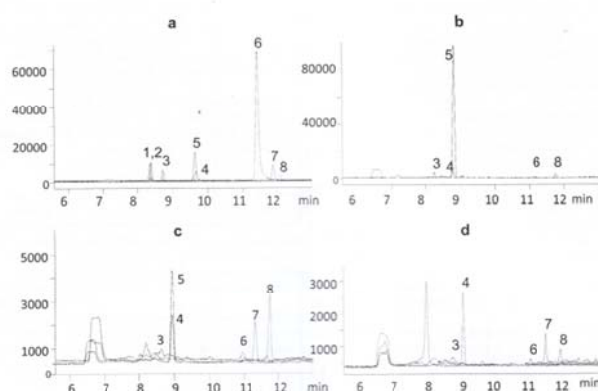


Fig. (2). Extracted ion electropherograms for CE-ESI-MS analysis of a standard solution of the isoflavones studied at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (a), and samples of the three legumes analyzed: chickpeas (b), lentils (c) and beans (d). Conditions as in text. Analyte identification: glycitin (1), genistin (2), daidzin (3), formononetin (4), biochanin A (5), glycitein (6), daidzein (7), genistein (8).

directly into the LC-MS/MS system. The contents found for the LC method are shown in Table 3. Fig. (3) shows the total ion chromatograms obtained for a standard solution of isoflavones studied and for samples of the three legumes analyzed.

The precision of the LC method was also evaluated by injection of the three kinds of matrices studied (chickpeas, lentils and beans) subjected to the entire analytical procedure, using the two modes of placing the sample and the solvent in contact. The RSDs were lower than 10 % for the intra-day precision ($n=4$) and lower than 20 % for the inter-day precision ($n=4$).

3.2.3. Comparison of the CE and LC Methods

A t-test was used to verify whether there were statistically significant differences between the results obtained

with the two methods. The level of significance was determined; when this value was greater than 0.05, which was chosen as the minimum level of significance, the null hypothesis was accepted: there were no significant differences among the results obtained by the two methods. These values were greater than 0.05, except for genistein in chickpeas and lentils, and glycitein in all cases.

A possible explanation for the observed differences between both methodologies for glycitein is that on using CE-ESI-MS method, the m/z ratios corresponding to glycitein and biochanin A coincided. Although it is possible to determine these compounds separately because they migrate at different speeds, it was observed that biochanin A may inhibit the ionization of glycitein. Owing to this, very low contents of this analyte were obtained.

Table 3. Isoflavone contents ($\mu\text{g}/100\text{g} \pm \text{RSD}$) of legumes ($n=3$) according to the LC method.

	Chickpeas		Lentils		Beans	
	Shaking tray	US probe	Shaking tray	US probe	Shaking tray	US probe
De	nd	nd	2.9 ± 0.4	3.1 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.2 ± 0.7
For	29 ± 2	11.8 ± 0.7	5.4 ± 0.5	6.6 ± 0.3	nd	nd
Ge	13.8 ± 0.7	8.1 ± 0.6	14 ± 1	13 ± 1	6.0 ± 0.7	8.0 ± 0.3
Bio	1371 ± 32	679 ± 35	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.8	5 ± 1	9 ± 2
Gle	6.3 ± 0.6	10.7 ± 0.6	4.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.13 ± 0.04	0.19 ± 0.02
Di	nd	nd	1.5 ± 0.6	0.70 ± 0.06	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Gi	0.33 ± 0.02	0.49 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.1

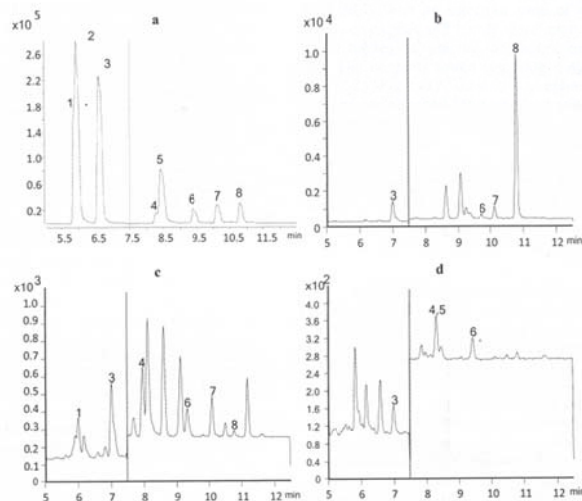


Fig. (3). Total ion chromatograms for LC-ESI-MS/MS analysis of a standard solution of the isoflavones studied at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (a), and samples of the three legumes analyzed: chickpeas (b), lentils (c) and beans (d). Conditions as in text. Analyte identification: 1, daidzin; 2, glycitein; 3, genistein; 4, daidzein; 5, glicitein; 6, genistein; 7, formononetin; 8, biochanin A.

4. CONCLUSION

A simple and sensitive capillary electrophoresis method with mass spectrometry detection for the determination of isoflavones in legume samples has been developed. The drawback of the low sensitivity of CE was resolved successfully by diluting the extracts in water and by injecting the resulting sample solution hydrodynamically, *i.e.* applying the normal stacking mode. The extraction of the analytes and sample clean-up were carried out with a previously developed modified QuEChERS approach. The proposed method was validated, and was then applied to the analysis of isoflavones in several legume samples. The values of the validation parameters and the isoflavone contents found were compared with those obtained by liquid chromatography. Both methods provided similar results and are comparable in terms of recovery, precision and limits of detection.

In view of these results it can be concluded that both methods provide similar results for the analysis of aglycones -except glycitein-; however, LC provided the best results for isoflavone glycoside analysis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has not conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ

2011-24075) and L.P.M. is also grateful to the Regional Government of Castilla-León and the European Social Fund for a doctoral fellowship.

REFERENCES

- [1] Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Otani, T.; Inoue, M.; Tsugane, S. Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **2007**, *16*, 538-545.
- [2] Wu, A.H.; Yu, M.C.; Tseng, C.C.; Pike, M.C. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Brit. J. Cancer*, **2008**, *98*, 9-14.
- [3] Rimbach, G.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J.; Fuchs, D.; Wenzel, U.; Daniel, H.; Hall, W.L.; Weinberg P.D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—a molecular perspective. *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, *46*, 1308-1319.
- [4] Cano, A.; Garcia-Pérez, M.A.; Tarín, J.J. Isoflavones and cardiovascular disease. *Maturitas*, **2010**, *67*, 219-226.
- [5] Taku, K.; Melby, M.K.; Nishi, N.; Omori, T.; Kurzer, M.S. Soy isoflavones for osteoporosis: An evidence-based approach. *Maturitas*, **2011**, *70*, 333-338.
- [6] Juma, S.S.; Ezzat-Zadeh, Z.; Khalil, D.A.; Hooshmand, S.; Akhter, M.; Arjmandi, B.H. Soy protein with or without isoflavones failed to preserve bone density in gonadal hormone-deficient male rat model of osteoporosis. *Nutr. Res.*, **2012**, *32*, 694-700.
- [7] Levis, S.; Strickman-Stein, N.; Doerge, D. R.; Krischer, J. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study—a clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. *Contemp. Clin. Trials*, **2010**, *31*, 293-302.
- [8] Jou, H.J.; Wu, S.C.; Chang, F.W.; Ling, P.Y.; Chu, K.S.; Wu, W.H. Effect of intestinal production of equol on menopausal symptoms in women treated with soy isoflavones. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **2008**, *102*, 44-49.

Determination of Isoflavones in Legumes by QuEChERS-Capillary

- [9] Mazur, W.M., Duke, J.A., Wähälä, K., Rasku, S., Aldercreutz, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *Nutr. Biochem.*, **1998**, *9*, 193-200.
- [10] Alves, R.C., Almeida, I.M.C., Casal, S., Oliveira, M.B.P.P. Method development and validation for isoflavones quantification in coffee. *Food Chem.*, **2010**, *122*, 914-919.
- [11] Rostagno, M.A.; Villares, A.; Guillamón, E.; García-Lafuente, A.; Martínez, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 2-29.
- [12] Vacek, J.; Klejduš, B.; Lojková, L.; Kuban, V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 2054-2067.
- [13] Valls, J.; Millán, S.; Martí, M.P.; Borrás, E.; Arola, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 7143-7172.
- [14] Bustamante-Rangel, M.; Delgado-Zamarreño, M.M.; Pérez-Martín, L.; Carabias-Martínez, R. QuEChERS method for the extraction of isoflavones from soy-based foods before determination by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Microchem. J.*, **2013**, *108*, 203-209.
- [15] Delgado-Zamarreño, M.M.; Pérez-Martín, L.; Bustamante-Rangel, M.; Carabias-Martínez, R. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by

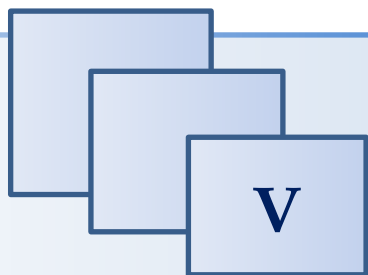
Current Analytical Chemistry, 2015, Vol. 11, No. 2 123

- ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, **2012**, *100*, 320-328.
- [16] Anastassiades, M.; Lehota, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, **2003**, *86*, 412-431.
- [17] Chien R. Sample introduction and stacking. In: *High Performance Capillary Electrophoresis* Khaledi, M.G.; Ed.; John Wiley & Sons, Inc., New York **1998**; pp.449-479
- [18] Britz-McKibbin, P.; Chen, D.Y. Selective focusing of catecholamines and weakly acidic analytes in capillary electrophoresis using a dynamic pH junction. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 1242-1252.
- [19] Quirino, J.P.; Terabe, S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *902*, 119-135.
- [20] Bustamante-Rangel, M.; Delgado-Zamarreño, M.M.; Carabias-Martínez, R.; Domínguez-Álvarez, J. Analysis of isoflavones in soy drink by capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *709*, 113-119.
- [21] Malá, Z.; Krivánková, L.; Gebauer, P.; Bocek, P. Contemporary sample stacking in CE: A sophisticated tool based on simple principles. *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 243-253.

Received: October 22, 2014

Revised: December 22, 2014

Accepted: December 24, 2014



CLASIFICACIÓN DE
LEGUMBRES EN FUNCIÓN
DE SU CONTENIDO EN
ISOFLAVONAS

5.1. OBJETIVO

El objetivo general de este capítulo ha sido, en primer lugar, comprobar de que la metodología analítica desarrollada, QuEChERS-LC-MS/MS, es adecuada para llevar a cabo análisis de rutina de legumbres de amplio consumo (garbanzos, lentejas y alubias). Por otra parte, se ha estudiado la posibilidad de utilizar los resultados obtenidos en el análisis de estas muestras para llevar a cabo una clasificación de las diferentes variedades de estas legumbres en base a su contenido en isoflavonas, empleando diferentes técnicas de análisis multivariante. Con ello se podrán establecer relaciones acerca del origen y variedad de las muestras que puedan dar lugar a un método exhaustivo de control de calidad para muestras que presenten Denominación de Origen Protegida (DOP) o bien Indicación Geográfica Protegida (IGP).

Entre los objetivos concretos del análisis multivariante, se encuentran:

- Resumir y visualizar el contenido de la matriz de datos.
- Clasificar y, por lo tanto, discriminar sobre la pertenencia o no a una determinada clase de cada uno de los individuos.
- Encontrar relaciones cuantitativas entre las variables.

5.2. INTRODUCCIÓN

Debido al impacto de las isoflavonas en la salud humana, el desarrollo de una metodología apropiada de extracción, separación, purificación, identificación y cuantificación para su determinación en muestras biológicas o alimenticias es extremadamente importante. Como ya se ha dicho a lo largo de esta Memoria, la metodología más ampliamente utilizada en el análisis de estos compuestos es la cromatografía líquida. Los datos obtenidos al combinar la separación cromatográfica con una detección mediante espectrometría de masas son datos tridimensionales (tiempo de retención, masa y abundancia). Los métodos quimiométricos de análisis multivariante nos permiten extraer la información útil de todo el conjunto de las variables medidas en una experiencia. Los objetivos principales del análisis multivariante se dirigen al agrupamiento y clasificación de objetos, así como al modelado de las relaciones entre diferentes datos analíticos.

Existen diferentes revisiones bibliográficas en el campo de la “Fitoquímica” que ponen de manifiesto el interés en estudios sobre aceites vegetales, concretamente aceites de oliva³³⁰, enfocados a su clasificación mediante técnicas de análisis multivariante^{331,332,333,334} o redes neuronales³³⁵. La mayoría de estos estudios se centran en la composición de dichos aceites en esteroides para llevar a cabo una clasificación y/o caracterización de las muestras.

En el caso de los analitos en estudio, las isoflavonas, se encuentran pocas referencias bibliográficas acerca de la clasificación de muestras en base a su contenido, siendo la matriz en estudio algún tipo de derivado de la soja, ya

³³⁰ G. Moghaddam, Y.V. Heyden, Z. Rabier, N. Sadeghi, M.R. Oveisi, B. Jannat, V. Araghi, S. Hassani, M. Behzad, M. Hajimahmoodi; *J. Food Compos. Anal.* 28 (2012) 54

³³¹ M.R. Alves, S.C. Cunha, J.S. Amaral, J.A. Pereira, M.B. Oliveira; *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 166

³³² F. Longobardi, A. Ventrella, C. Napoli, E. Humpfer, B. Schütz, H. Schäfer, M.G. Kontominas, A. Sacco; *Food Chem.* 130 (2012) 177

³³³ M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso, A. Méndez, J.L. LLiberia, J.M. Herrero- Martínez; *Food Res. Int.* 44 (2011) 103

³³⁴ G. Fang, J.Y. Goh, M. Tay, H.F. Lau, S.F.Y. Li; *Food Chem.* 138 (2013) 1461

³³⁵ S. Rezzi, D.E. Axelson, K. Héberger, F. Reniero, C. Mariani, C. Guillou; *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 13

sea alimenticio³³⁶ o farmacéutico³³⁷, sin emplear en este último caso ningún tipo de técnica de análisis multivariante.

Hay que tener en cuenta, además, que el procesado del alimento, las condiciones de almacenamiento e incluso diferentes factores ambientales o intrínsecos a la planta, pueden afectar de forma pronunciada tanto a su composición como a su bioactividad. En el caso concreto de las isoflavonas, su contenido en legumbres se ve fuertemente influenciado por el genotipo^{307, 338,339}, las labores agrícolas^{301, 340}, los factores climáticos³⁴¹, el tipo de suelo^{342,343} e incluso por las condiciones posteriores de procesado^{344,345} o el tiempo de recolección³⁴⁶.

En este capítulo se han analizado muestras de garbanzos, lentejas y alubias, presentes en el mercado, utilizando la metodología analítica desarrollada en capítulos anteriores. Ello nos ha servido para comprobar la aplicabilidad de dicha metodología en análisis de rutina. Además, los datos obtenidos se utilizarán para estudiar si es posible la clasificación de los distintos tipos de legumbres en función de sus contenidos en isoflavonas. Para este último objetivo se han utilizado técnicas de reconocimiento de patrones tanto no supervisadas como supervisadas; las técnicas empleadas han sido el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de agrupamientos jerárquico (HCA) y el análisis discriminante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

³³⁶ D. Shen, Q. Wu, W.J. Sciarappa, J.E. Simon; *Food Chem.* 130 (2012) 1003

³³⁷ G. Fiechter, B. Raba, A. Jungmayr, H.K. Mayer; *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 72

³³⁸ V. Kumar, A. Rani, A.K. Dixit, D. Pratap, D. Bhatnagar; *Food Res. Int.* 43 (2010) 323

³³⁹ S.J. Lee, P. Seguin, J.J. Kim, H.I. Moond, H.M. Ro, E.H. Kim, S.H. Seo, E.Y. Kang, J.K. Ahn, I.M. Chung; *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 160

³⁴⁰ T. Vamerali, G. Barion, M. Hewidy, G. Mosca; *Eur. J. Agron.* 41 (2012) 1

³⁴¹ M.J. Morrison, E.R. Cober, M.F. Saleem, N.B. McLaughlin, J. Frégeau-Reid, B.L. Ma, L. Woodrow; *Field Crops Res.* 117 (2010) 113

³⁴² G. Barion, M. Hewidy, G. Mosca, T. Vamerali; *Eur. J. Agron.* 33 (2010) 63

³⁴³ Z.Y. Guo, C.H. Kong, J.G. Wang, Y.F. Wang; *Soil Biol. Biochem.* 43 (2011) 2257

³⁴⁴ I.M. Chung, S.H. Seo, J.K. Ahn, S.H. Kim; *Food Chem.* 127 (2011) 960

³⁴⁵ C.J.C. Jackson, J.P. Dini, C. Lavandier, H.P.V. Rupasinghe, H. Faulkner, V. Poysa, D. Buzzell, S. DeGrandis; *Process Biochem.* 37 (2002) 1117

³⁴⁶ M.L.L. Ribeiro, J.M.G. Mandarino, M.C. Carrao-Panizzi, M.C.N. de Oliveira, C.B.H. Campo, A.L. Nepomuceno, E.I. Ida; *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 19

5.2.1. Métodos de reconocimiento de pautas

Los métodos de reconocimiento de pautas tienen como objetivo agrupar o clasificar muestras según las características de las mismas. Existen dos tipos de métodos: supervisados y no supervisados.

La finalidad de los métodos no supervisados es encontrar relaciones entre las muestras sin tener un conocimiento previo respecto a la pertenencia a un determinado grupo. Entre estos métodos se encuentran el análisis de componentes principales, y el análisis de agrupamientos.

Los métodos supervisados tienen como objetivo utilizar una serie de objetos, cuya pertenencia a un grupo es conocida (conjunto de entrenamiento), para encontrar una regla que permita asignar un nuevo objeto de grupo desconocido al grupo correcto. Los pasos a seguir son: 1) crear el modelo con el conjunto de entrenamiento; 2) validar el modelo, es decir, comprobar su capacidad predictiva, y 3) predicción del conjunto desconocido de muestras. Dentro de estos métodos se encuentra el análisis discriminante lineal.

5.2.1.1. *Análisis de componentes principales (PCA)*

En esencia, se trata de un proceso matemático que pretende reducir la complejidad de los datos, identificar la tendencia inherente en un conjunto de medidas experimentales y clasificar las muestras en función de sus similitudes y diferencias, sin un conocimiento “a priori” del tipo de muestra; es decir, no se conoce, o se ignora deliberadamente, la existencia de categorías.

El análisis de componentes principales es una técnica para reducir la cantidad de datos cuando existe una correlación, pero no es una técnica útil cuando las variables no están correlacionadas.

Básicamente la matriz de datos (X) se constituye por N filas (muestras) y K variables (cada una de las propiedades que medimos en cada individuo, en nuestro caso, cada una de las isoflavonas en estudio). El análisis de componentes principales intenta encontrar tendencias inherentes en los

datos reduciendo la dimensionalidad, de manera que la matriz de datos se comprime sin apenas perder información. Para ello, el PCA genera unas nuevas variables (componentes principales, PCs), ortogonales entre sí, que sean combinaciones lineales de las variables originales y que no estén correlacionadas entre sí. La primera componente principal sigue la dirección de máxima variabilidad de los datos. Posteriormente se genera una segunda componente principal que pasa por el centro de gravedad, es ortogonal a la primera y sigue la dirección de máxima variabilidad remanente, y así sucesivamente. Por consiguiente, cuando haya correlación significativa el número de componentes principales será mucho menor que el número de variables originales.

Esta técnica involucra la transformación matemática de la matriz de datos original (X) mediante la ecuación³⁴⁷:

$$X = TP + E$$

En esta expresión T es la matriz de las puntuaciones o valores (scores) de cada muestra en las nuevas variables, P es la matriz de los pesos o coeficientes (loadings) de las variables originales para generar las nuevas variables, y E es una matriz residual.

Una vez calculados las puntuaciones y los pesos, existen diferentes formas de representarlos gráficamente: mediante representaciones en una dimensión, donde se representa en forma de gráfico de barras cada puntuación frente al número de muestras; en dos dimensiones, donde se representan los valores de los scores de una variable frente a los de otra, generalmente PC_2 frente a PC_1 , o en tres dimensiones, con una componente principal en cada eje. Estas representaciones permiten reconocer grupos de objetos similares y diferencias entre distintos grupos.

³⁴⁷ R. G. Brereton; *Chemometrics for pattern recognition*. Wiley, Chichester 2009

5.2.1.2. *Análisis de agrupamientos*

Es un método para dividir un conjunto de objetos en una serie de clases de manera que los objetos similares se encuentren en la misma clase. Como en el análisis de componentes principales los grupos no se suelen conocer antes de realizar el análisis matemático y no se realiza ningún supuesto sobre la distribución de las variables³⁴⁸.

Los métodos de análisis de agrupamientos se dividen en dos tipos: métodos jerárquicos y no jerárquicos. En los métodos jerárquicos no se especifica el número de grupos que se van a formar, sino que se eligen a posteriori en función del resultado obtenido. En los métodos no jerárquicos se fija el número de grupos en los que se quiere subdividir el conjunto de datos.

En estos análisis se obtiene una representación en forma de árbol, denominada dendograma, en la cual los objetos se agrupan en función de sus similitudes (o las similitudes entre sus variables). Existen diferentes criterios para determinar la similitud, basados en correlaciones (de Pearson o de otro tipo) o distancias (Euclídea, de Mahalanobis,...)³⁴⁹.

El método comienza calculando las distancias o correlaciones entre todos los pares de objetos; a continuación se generan los agrupamientos. Para ello, en primer lugar se buscan los objetos más próximos y se unen para formar un agrupamiento. El siguiente paso consiste en sustituir el grupo ya formado por un punto que lo represente, para lo cual se pueden aplicar diferentes métodos. A continuación se recalculan las distancias entre el nuevo grupo formado y todos los demás objetos, buscando de nuevo el valor más pequeño. Se continúan agrupando los datos de manera similar hasta que todos los objetos se unan. El aspecto del dendograma obtenido es el de un árbol que se bifurca desde un tronco común hasta alcanzar tantas ramas como objetos se pretende agrupar o clasificar. El tronco común está constituido por el conjunto de todos los objetos, y constituye el grupo de mayor rango o jerarquía. El tronco se bifurca hasta alcanzar los objetos

³⁴⁸ J.N. Miller, J.C. Miller; *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Editorial Pearson Educación SA Madrid 2002

³⁴⁹ G. Ramis Ramos, C. García Álvarez-Coque; *Quimiometría*, Editorial Síntesis SA. Madrid 2001

aislados, que presentan la jerarquía más baja. Los objetos quedan ordenados entonces jerárquicamente.

5.2.2.3. *Análisis discriminante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)*

El análisis discriminante (DA) es un método de reconocimiento de pautas supervisado. El punto de partida del análisis discriminante es encontrar una función discriminante (Y) que sea combinación lineal (LDA) o cuadrática (QDA) de las variables originales, de manera que la nueva función refleje la diferencia entre los grupos tanto como sea posible: los objetos en el mismo grupo tendrán valores similares de Y, y los objetos en grupos diferentes tendrán valores muy diferentes de Y. Como consecuencia, la función discriminante proporciona un medio de discriminación entre los dos grupos. Tras determinar la función discriminante, se pueden establecer fronteras explícitas que separan las regiones del espacio que pertenecen a cada categoría.

Una limitación del análisis discriminante lineal es que está sujeto a la restricción de que el número de variables no debe exceder al número de objetos. La solución a este problema consiste en aplicar métodos como el de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes o predictoras, X (en nuestro caso las medidas experimentales) y las variables dependientes o respuesta, Y (en nuestro caso las clases). A las variables predictoras que muestran una alta correlación con las variables respuesta se les asigna un peso extra dado porque serán más efectivas en la predicción. De esta forma se eligen combinaciones lineales de las variables predictoras que estén altamente correlacionadas con las variables respuesta y a su vez expliquen la variación en las propias variables predictoras.

PLS-DA es una técnica de análisis supervisada que se basa en la regresión por mínimos cuadrados parciales. Las variables independientes (X) son las medidas experimentales, mientras que la variable dependiente (Y) es una variable categórica, definida por el analista, que expresa la pertenencia o no

a una clase concreta. En PLS-DA, después de llevar a cabo una reducción de la dimensión de la matriz de datos mediante PLS, se aplica DA para clasificar los objetos a partir del resultado de la regresión obtenida con el modelo PLS.

De forma similar al PCA, PLS-DA genera una serie de direcciones (ejes) de máxima covariabilidad, de forma que cada individuo presenta una puntuación (score) en cada uno de esos nuevos ejes. Estos nuevos ejes en realidad son nuevas variables, combinación lineal de las de partida. Cada una de las nuevas variables se puede expresar como combinación lineal de las antiguas en forma de pesos (loadings). Por tanto, esta técnica permite la obtención de gráficos en los que los individuos aparecen o no agrupados en función de su similitud.

· Validación

Los modelos de análisis multivariante obtenidos deben de tener la capacidad de hacer predicciones relacionadas con muestras independientes. El análisis por PLS-DA es capaz de proporcionar modelos robustos, con capacidad predictiva que permite encontrar las diferencias entre clases. La validación de los modelos es esencial para comprobar si son fiables las conclusiones obtenidas basándonos en la información proporcionada por el modelo.

El primer paso es la valoración de los parámetros de R^2 , varianza total explicada por el modelo, y Q^2 , capacidad predictiva del modelo. Una vez generado el modelo, estos valores informan sobre su calidad y, por tanto, sobre la conveniencia de utilizar o no el modelo para el análisis estadístico.

En el desarrollo de esta Memoria se empleó el software SIMCA P+ ³⁵⁰ para el tratamiento de datos. Este software se caracteriza por permitir llevar a cabo un tipo de validación automática de los modelos supervisados que se fundamenta en el proceso de “scrambling”. La idea de esta validación es comparar los valores de R^2 y Q^2 del modelo inicial con los valores de los modelos generados al permutar aleatoriamente, unas 100 veces, las observaciones de la matriz de las variables dependientes (Matriz Y) mientras

³⁵⁰ Simca 13. MKS Umetrics AB, Tvistevagen 48, BOX 7960 SE-907 19 Umea Sweden.

que las variables independientes permanecen intactas (Matriz X). El objetivo es demostrar que el hecho de que el modelo sea bueno, de acuerdo a los parámetros R^2 y Q^2 , no es cuestión de azar.

Para que la validación sea correcta, los modelos, tras las permutaciones, deben presentar valores de R^2 y Q^2 inferiores a los del modelo original y la línea de regresión que une los valores de Q^2 debe de cortar en el eje Y por debajo de 0,05. En caso contrario, el modelo a validar no es bueno y la validación sería considerada negativa³⁵¹.

³⁵¹ *Multi and megavariable data analysis part 1: basic principles and applications*, Vol 1, 2nd, Ed.Umetrics

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Procedimiento analítico

En los capítulos 4.2 y 4.3 de la presente Memoria se han presentado el desarrollo de una metodología basada en el método QuEChERS para la extracción de isoflavonas en muestras de legumbres, así como la optimización del sistema de agitación más apropiado, en función de la naturaleza de la muestra en estudio. Las condiciones optimizadas obtenidas en estos estudios se han tomado como punto de partida para llevar a cabo la extracción de 20 tipos diferentes de muestras de cada una de las legumbres en estudio, disponibles en el mercado.

Una vez obtenidos los extractos, éstos fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los parámetros de separación y detección empleados fueron los optimizados anteriormente y ya descritos.

La estimación del contenido de isoflavonas en las muestras se llevó a cabo mediante calibración externa. Los puntos de calibración fueron inyectados en el momento de inyección de las muestras para evitar posibles fluctuaciones de la señal debido al electrospray.

Todas las muestras analizadas pertenecen a la familia *Leguminosae*, concretamente a la subfamilia *Fabaceae*. En la figura 5.1 se observan los diferentes tipos comerciales de muestras analizadas.



Figura 5.1. A) Garbanzos, B) Lentejas y C) Alubias analizadas mediante la metodología QuEChERS-LC-MS/MS optimizada.

5.3.2. Evaluación de los datos

Los garbanzos españoles dedicados a la alimentación humana son, en su gran mayoría, ecotipos procedentes de la variedad *macrocarpum* de la especie *Cicer arietinum*. La variación morfológica y su coloración vienen acentuadas por las diferencias del medio y las condiciones climatológicas en cada cosecha.

Los ecotipos españoles, prácticamente en su totalidad, pertenecen al tipo *Kabuli*. Son fruto de la selección realizada por el agricultor que ha tenido en cuenta sobre todo el tamaño del grano, aunque también ha considerado la rugosidad y el color del mismo. Los únicos ecotipos aceptados como tales son: Blanco Lechoso (BL), Castellano (CS), Pedrosillano (PD), Venoso Andaluz y Chamad. Los ecotipos analizados en esta Memoria fueron los tres primeros.

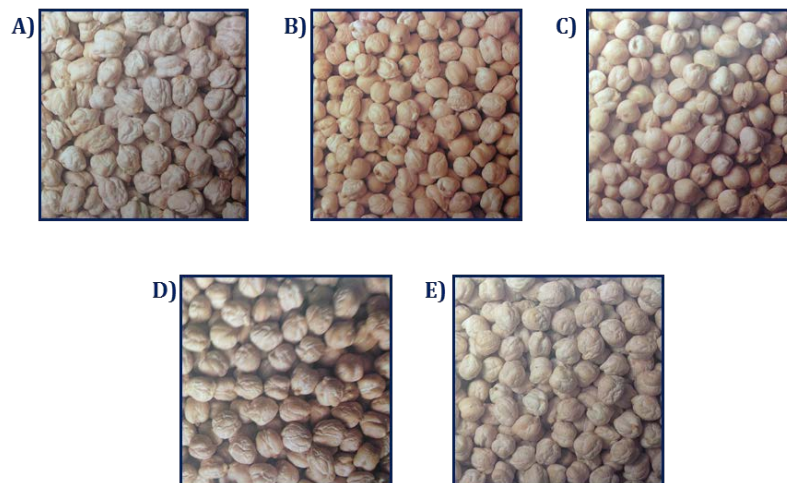


Figura 5.2. Diferentes ecotipos de garbanzos. A) Blanco Lechoso, B) Castellano, C) Pedrosillano, D) Venoso Andaluz, E) Chamad.

Se han analizado 20 muestras de garbanzos de 9 casas comerciales diferentes procedentes de Andalucía y Castilla y León. Cabe destacar que dos de las muestras han sido comercializadas en España, pero son de origen mexicano. Las muestras analizadas se recogen en el Capítulo 3 de la

presente Memoria. Las muestras denominadas comercialmente como “Fuentesauco” (Fm, Fch, Ftg) y “Pico Pardo” (Ppa, Ppv), así como “Maragato” (M) y “Gordo”, todas ellas proceden de la región de Castilla y León, y podrían ser consideradas del ecotipo “Pedrosillano” (PD).

En la tabla 5.1 se recogen los contenidos de isoflavonas, en unidades de $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca, en las muestras de garbanzos estudiadas.

Tabla 5.1. Contenido de isoflavonas ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca) en muestras de garbanzos. (Información detallada de las muestras en el Capítulo 3.4. de la presente Memoria; pág.99).

	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Formononetina	Biochanina-A
Fm	nd	nd	1.9 ± 0.4	nd	9,8 ± 0,5	47 ± 1	98 ± 3	4794 ± 246
Fch	nd	nd	1.0 ± 0.1	0.45 ± 0.07	nd	37 ± 1	42 ± 1	847 ± 42
Ftg	nd	nd	0.5 ± 0.1	nd	nd	23 ± 0,7	15 ± 1	460 ± 44
Psc	nd	nd	0.9 ± 0.2	nd	nd	12 ± 4	33 ± 2	1266 ± 71
Pbo	nd	nd	0.9 ± 0.1	0.28 ± 0.05	nd	21.2 ± 0.5	44 ± 1	845 ± 42
Pa	nd	nd	0.45 ± 0.02	nd	nd	7.3 ± 0.2	14.2 ± 0.4	434 ± 98
Pm	nd	nd	0.4 ± 0.1	nd	nd	16.5 ± 0.5	28 ± 1	694 ± 41
Prg	nd	nd	0.8 ± 0.1	nd	nd	14.8 ± 0.5	18 ± 1	455 ± 39
Ppa	nd	nd	0.4 ± 0.1	nd	nd	10.8 ± 0.5	19 ± 1	369 ± 39
Ppv	nd	nd	0.4 ± 0.1	nd	nd	12 ± 1	30.5 ± 0.5	518 ± 27
Lc	0.78 ± 0.04	0.58 ± 0.02	1.1 ± 0.2	5.8 ± 0.5	0,41	32 ± 1	190 ± 2	1092 ± 39
La	nd	nd	0.70 ± 0.02	nd	nd	9.0 ± 0.3	31.5 ± 0.4	704 ± 98
Lci	nd	0.01 ± 0.02	0.6 ± 0.1	0.50 ± 0.05	nd	25.2 ± 0.5	77 ± 1	1151 ± 46
M	nd	nd	2.9 ± 0.2	nd	nd	33 ± 4	83 ± 2	1031 ± 46
Gs	nd	nd	0.4 ± 0.1	nd	nd	23.5 ± 0.5	36 ± 1	828 ± 42
Cv	nd	nd	0.8 ± 0.1	nd	nd	18.3 ± 0.5	31 ± 1	815 ± 42
Cci	nd	0.03 ± 0.02	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0,1	nd	56 ± 1	97 ± 1	1798 ± 58
Ec	nd	0.02 ± 0.02	1.1 ± 0.1	0.43 ± 0.05	nd	14.0 ± 0.5	52 ± 1	504 ± 39
Mxa	nd	nd	0.9 ± 0.1	0.33 ± 0.05	nd	51 ± 1	76 ± 1	1447 ± 51
Mxh	nd	0.21 ± 0.03	0.6 ± 0.2	nd	nd	49 ± 2	88 ± 2	1040 ± 43

Las lentejas más ampliamente cultivadas en España pertenecen a la especie *Lens culinaris* Medicus, debido a su alto valor alimenticio y su aporte de nitrógeno al suelo. Se encuentran poblaciones de semillas procedentes de tres variedades fundamentales:

-*Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris*: conocida vulgarmente como lentejón o lenteja de la reina. Se comercializa bajo el nombre de “Rubia Castellana” (CA). La lenteja llamada comercialmente “Rubia de la Armuña” (AR), es una diferenciación de la “Rubia Castellana”, aunque podría considerarse perteneciente a la variedad vulgaris.

-*Lens culinaris* Medicus var. *variabilis*: denominada lenteja parda o pardina y generalmente comercializada como “Pardina”(PA), “Pardiña”, “Franciscana” o “Francesa”.

-*Lens culinaris* Medicus var. *dupuyensis*: generalmente denominada lenteja verde. Los ecotipos comercializados bajo el nombre de “Verdina” (VE) pertenecen a dicha variedad.

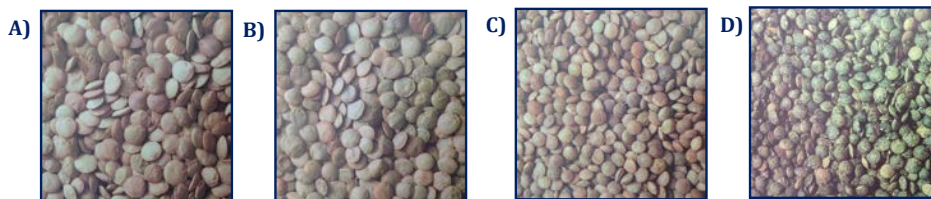


Figura 5.3. Diferentes variedades de lentejas. A) Rubia Castellana, B) Rubia de la Armuña, C) Pardina, D) Verdina.

Se han analizado 20 muestras diferentes de lentejas, de las 3 variedades expuestas, procedentes de 8 casas comerciales diferentes de la región de Castilla y León. Algunas muestras presentan origen americano y canadiense a pesar de haber sido comercializadas en España.

En la tabla 5.2 se muestran los contenidos de isoflavonas en unidades de $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca, en las muestras de lentejas estudiadas.

Tabla 5.2. Contenido de isoflavonas ($\mu\text{g}/100$ g de materia seca) en muestras de lentejas. (Información detallada de las muestras en el Capítulo 3.4. de la presente Memoria; pág.100).

	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Formononetina	Biochanina-A
Al	1.32 ± 0.06	0.79 ± 0.01	0.51 ± 0.04	3.2 ± 0.4	4.4 ± 0.8	27 ± 1	15.2 ± 0.6	18 ± 1
Ald	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.12 ± 0.04	<i>nd</i>	5.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	<i>nd</i>
Ach	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3 ± 0.2	<i>nd</i>	1.2 ± 0.4
Li	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.4 ± 0.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Ps	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.6 ± 0.9	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Pl	0.17 ± 0.02	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.3 ± 0.1	<i>nd</i>	3.9 ± 0.9	0.9 ± 0.2	3 ± 0.2
Pv	0.43 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.25 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	7.0 ± 0.4	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.9
Pci	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.9 ± 0.2	<i>nd</i>	0.8 ± 0.4
Pba	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.09 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.9 ± 0.2	0.22 ± 0.02	1.0 ± 0.4
Pa	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.4 ± 0.2	0.18 ± 0.02	1.1 ± 0.4
Ph	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.6 ± 0.4	<i>nd</i>	1.8 ± 0.9
Ca	<i>nd</i>	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.0 ± 0.2	1.17 ± 0.06	1.9 ± 0.4
Cv	0.086 ± 0.006	0.1 ± 0.01	0.18 ± 0.01	2.52 ± 0.09	<i>nd</i>	10.4 ± 0.4	4.64 ± 0.09	2.3 ± 0.4
Cci	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.28 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.6 ± 0.2	0.82 ± 0.06	3.1 ± 0.4
Vv	0.25 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	32.3 ± 0.9	8.4 ± 0.2	4.6 ± 0.9
Ea	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.4 ± 0.2	0.31 ± 0.06	<i>nd</i>
Rh	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.5 ± 0.2	0.38 ± 0.06	0.9 ± 0.4
Ec	<i>nd</i>	0.15 ± 0.004	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	7.4 ± 0.2	0.87 ± 0.06	1.1 ± 0.4
Lh	0.15 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.1	1.9 ± 0.9
Lp	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.19 ± 0.02	0.28 ± 0.06	<i>nd</i>	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	<i>nd</i>

Las alubias cultivadas en España pertenecen a las especies *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus multiflorus*, *Phaseolus lunatus* y *Vigna sinensis*.

Las muestras analizadas en esta Memoria pertenecen a las especies *Phaseolus multiflorus* y *Phaseolus vulgaris*, incluyendo además dos subespecies diferentes de esta última, *P. vulgaris* Savi *volúbilis* y *P. vulgaris* Savi *nanus*.

-*Phaseolus vulgaris* Savi *volúbilis*: incluye todas las formas de enrame con los tallos ligeramente volubles o rastreros. Incluye las variedades comercializadas bajo el nombre de “Granja Fabada” (FA), “Larga Selecta”, “Cuarentena”, “Largas Vega”, “Gallega de Carballo”, “Plancheta” (PL), “Ganchet”, “Pinet”, “Caparrón”, “Canela de León”, “Amarilla Peón”, “Tolosana”, “Negrita”(NE) y “Morada Redonda”. En esta Memoria

únicamente fueron analizadas alubias de las variedades denominadas “Granja Fabada”, “Plancheta” y “Negrita”.

-*Phaseolus vulgaris* Savi *nanus*: comprende todas las formas enanas de tallo erguido. Incluye las variedades comercializadas bajo el nombre de “Blanca Riñón” (RI), “Blanca Redonda” (RE), “Troncón” y “Morada larga”. De esta subespecie únicamente se analizaron las alubias de las variedades denominadas “Blanca Riñón” y “Blanca Redonda”.

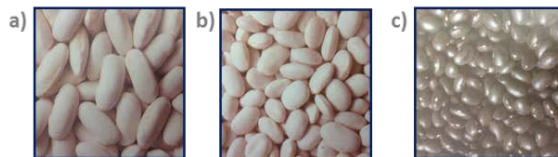
-*Phaseolus multiflorus*: esta especie es comercialmente conocida como “Judión” (J).

Phaseolus vulgaris

Phaseolus vulgaris *Nanus*



Phaseolus vulgaris *Volúbilis*



Phaseolus multiflorus

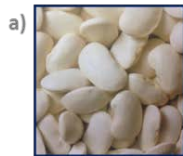


Figura 5.4. Muestras de alubias analizadas. Subespecie *Phaseolus vulgaris* *nanus* a) “Blanca Riñón”, b) “Blanca Redonda”. Subespecie *Phaseolus vulgaris* *volúbilis* a) “Granja Fabada”, b) “Plancheta”, c) “Negrita”. Especie *Phaseolus multiflorus* a) “Judía de España o Judión”.

Se analizaron 20 muestras diferentes de alubias, comprendiendo las dos especies mencionadas, así como las dos subespecies de *Phaseolus vulgaris*. Las muestras procedían de 12 casas comerciales diferentes de la región de Castilla y León y Asturias.

En la tabla 5.3 se presentan los contenidos de isoflavonas, en unidades de $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca, en las muestras de alubias estudiadas.

Tabla 5.3. Contenido de isoflavonas ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca) en muestras de alubias. (Información detallada de las muestras en el Capítulo 3.4. de la presente Memoria; pág.101).

	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína	Formononetina	Biochanina-A
Rar	1.2 ± 0.1	0.17 ± 0.01	2.3 ± 0.3	7.6 ± 0.3	0.13 ± 0.06	6.2 ± 0.2	0.38 ± 0.01	6 ± 1
Rvg	nd	nd	0.3 ± 0.1	2.5 ± 0.3	0.26 ± 0.06	1.9 ± 0.9	nd	3.0 ± 0.3
Rd	0.18 ± 0.01	nd	0.21 ± 0.01	3.6 ± 0.1	0.09 ± 0.02	1.7 ± 0.2	nd	2.4 ± 0.6
Rla	0.3 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.01	2.3 ± 0.1	0.12 ± 0.02	2.2 ± 0.2	nd	2.6 ± 0.6
RI	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.36 ± 0.02	2.73 ± 0.06	0.27 ± 0.02	2.4 ± 0.2	nd	13 ± 2
RI	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.54 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.4 ± 0.2	nd	12 ± 2
Rvb	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.5 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.4 ± 0.2	nd	10 ± 2
Rrg	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	2.25 ± 0.06	0.33 ± 0.02	1.9 ± 0.2	nd	8 ± 2
Ra	0.09 ± 0.01	nd	0.1 ± 0.01	1.24 ± 0.03	0.09 ± 0.01	1.0 ± 0.2	nd	6 ± 1
Rh	0.38 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.38 ± 0.01	3.8 ± 0.3	0.13 ± 0.03	2.5 ± 0.6	nd	27 ± 1
Fp	0.08 ± 0.01	nd	0.06 ± 0.01	3.5 ± 0.2	0.63 ± 0.09	2.01 ± 0.1	nd	2.2 ± 0.6
Fci	nd	nd	0.07 ± 0.01	1.6 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.7 ± 0.2	nd	4 ± 1
Fa	0.09 ± 0.01	nd	nd	2.81 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.7 ± 0.2	nd	3 ± 1
Fv	0.09 ± 0.01	nd	0.1 ± 0.01	5.2 ± 0.1	0.15 ± 0.01	4.4 ± 0.3	nd	2 ± 1
Jb	0.4 ± 0.03	nd	1.6 ± 0.1	6.5 ± 0.3	0.25 ± 0.03	6.7 ± 1.2	nd	4.4 ± 0.3
Jv	1.36 ± 0.06	nd	1.2 ± 0.1	7.4 ± 0.1	0.09 ± 0.02	9.5 ± 0.3	nd	1.7 ± 0.6
Gh	1.69 ± 0.06	nd	1.4 ± 0.1	17.4 ± 0.2	0.11 ± 0.02	18.2 ± 0.3	nd	4.7 ± 0.6
Pv	nd	nd	nd	1.1 ± 0.03	nd	2.9 ± 0.2	nd	2 ± 1
Rv	0.18 ± 0.01	0.51 ± 0.06	0.12 ± 0.01	1.3 ± 0.1	0.42 ± 0.06	0.7 ± 0.1	nd	1.9 ± 0.6
NI	2.7 ± 0.1	0.23 ± 0.02	2.8 ± 0.1	6.0 ± 0.3	nd	3.9 ± 0.6	nd	7 ± 1

Los datos obtenidos presentan una gran variabilidad en función del tipo de legumbre analizada. Se observa que el analito mayoritario en el caso de las muestras de garbanzos es la biochanina-A, seguida por formononetina y genisteína; todas ellas agliconas. En el caso de las muestras de lentejas, los analitos mayoritarios son formononetina, genisteína y biochanina-A, en este orden; mientras que para las muestras de alubias, las isoflavonas presentes de forma mayoritaria son genisteína, daidzeína y biochanina-A. En cualquier caso, los analitos mayoritarios son agliconas, encontrándose los glucósidos en una concentración más baja.

La variabilidad presente en los contenidos de isoflavonas se manifiesta no sólo en diferentes tipos de legumbres, sino que es patente en las diferentes variedades de una misma especie. Se observan a simple vista diferencias

tanto en el tipo de analito como en la concentración en la que se encuentran en las muestras.

5.3.3. Análisis estadístico

El objetivo del análisis multivariante que se lleva a cabo a partir de los datos es resumir y visualizar la información obtenida, de modo que ésta pueda ser clasificada y así encontrar las diferentes relaciones cuantitativas existentes entre las variables. La matriz de datos se ha ordenado de tal forma que cada fila recoge los datos de un mismo tipo de muestra y cada columna los de un mismo analito en estudio.

Antes de realizar el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo un pretratamiento de los mismos, empleando la técnica de escalado. El escalado asigna numéricamente una serie de pesos a cada variable para que al minimizar los errores de las proyecciones de cada objeto sobre las componentes tengan el mismo valor estadístico. Existen diversos métodos de escalado, siendo los más utilizados el escalado mediante centrado, el autoescalado y el escalado de tipo Pareto. Debido a la naturaleza de los datos, el escalado empleado en este estudio ha sido el de tipo Pareto. En este tipo de escalado, a cada valor de la variable se le resta la media y se divide entre la raíz cuadrada de la desviación típica. Este tipo de escalado se presenta como una solución intermedia, en comparación con el centrado, resta protagonismo a los picos grandes pero tampoco asigna igual desviación típica a todas las variables, lo cual permite controlar el peso final de las variables que sólo aportan ruido.

Una vez realizado el preprocesamiento de los datos, los datos escalados se emplearon en la elaboración de los diferentes modelos para cada una de las legumbres analizadas, aplicando las distintas técnicas de análisis multivariante descritas anteriormente.

5.3.3.1. *Análisis de componentes principales (PCA)*

Como se ha comentado anteriormente, este tipo de análisis pretende encontrar tendencias inherentes en los datos reduciendo la dimensionalidad de la matriz sin perder información.

La robustez de los modelos generados viene dada por dos parámetros: Q^2 , porcentaje de la variación en cuanto a la predicción del modelo, y R^2 , porcentaje de la variación explicada por el modelo. Un valor de R^2 próximo a la unidad es condición necesaria para un buen modelo, pero no suficiente. Un valor de $Q^2 > 0.5$ es indicativo de una buena capacidad predictiva en el modelo. Sin embargo, en el caso del análisis de componentes principales un valor de Q^2 próximo a 0.3 es suficiente para demostrar dicha capacidad.

En las figuras 5.5, 5.7 y 5.10 se muestran los diagramas de puntuaciones o “scores plot” de dos dimensiones -para garbanzos, lentejas y alubias, respectivamente- en los que se proyectan todos los datos para cada una de las muestras en estudio. Los valores de T1 y T2 son las nuevas variables que resumen las variables X, es decir, las dos primeras componentes principales.

Como se ha mencionado con anterioridad, el software empleado en el análisis estadístico es SIMCA 13.0.3.0 (Umetrics). El gráfico de dispersión T1 vs T2 mostrado es una ventana, en el espacio X, que muestra cómo están situadas las observaciones X unas con respecto a otras. El gráfico muestra, por tanto, la posible presencia de valores atípicos, grupos, semejanzas u otros patrones en los datos. Para ello, el programa dibuja una elipse de tolerancia basada en T^2 de Hotelling, que proporciona información acerca de los valores atípicos en función de la posición de éstos en el interior o en el exterior de la elipse.

En la figura 5.5 se muestra el modelo PCA desarrollado para las muestras de garbanzos.

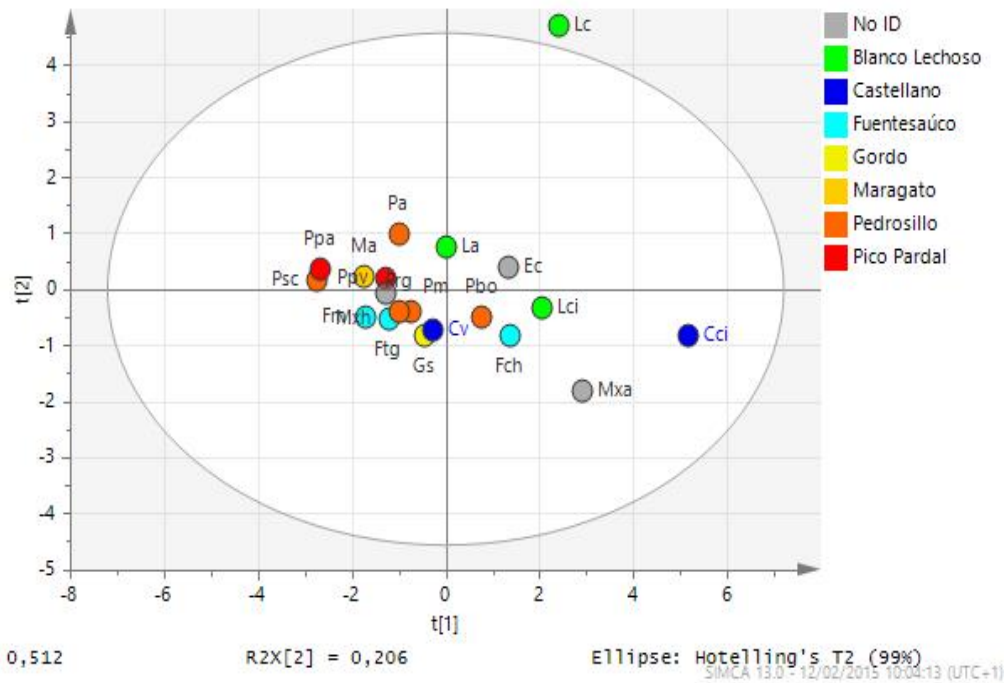


Figura 5.5. Modelo PCA generado para las muestras de garbanzos según su denominación comercial.

Los valores de R^2 ($> 98\%$) y Q^2 ($> 85\%$) obtenidos ponen de manifiesto la robustez del modelo propuesto. Como se ha mencionado anteriormente, en PCA no se asigna ninguna clase de forma previa al análisis. Una vez construido el modelo, cada una de las puntuaciones fue coloreada en función de la denominación que figura en el etiquetado del producto.

Se aprecia en este gráfico la dificultad de diferenciar, únicamente mediante un análisis de componentes principales, diferentes ecotipos de una misma variedad de una determinada especie de garbanzos, *Cicer arietinum* var. *macrocarpum*. Se aprecian similitudes entre las muestras comerciales denominadas “Pico Pardal”, “Maragato” y “Gordo”, con el ecotipo “Pedrosillo”, por lo que dichas muestras podrían ser englobadas en este ecotipo reconocido.

V. CLASIFICACIÓN DE LEGUMBRES

Se elaboró un nuevo modelo de PCA teniendo en cuenta únicamente los ecotipos seleccionados en el estudio (Blanco lechoso, Castellano y Pedrosillano). La gráfica correspondiente a dicho modelo se muestra en la figura 5.6.

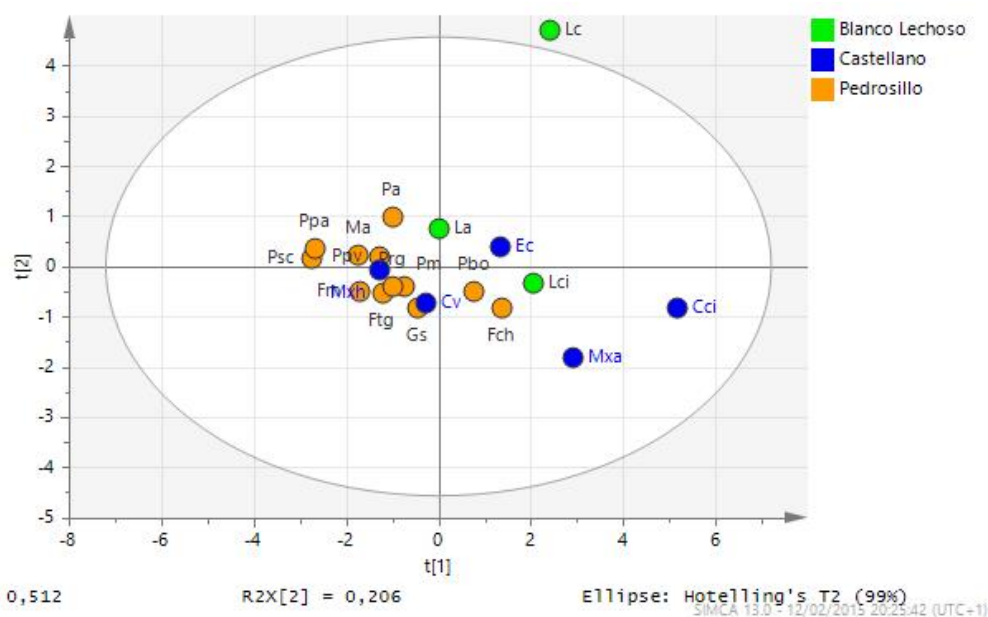


Figura 5.6. Modelo PCA generado para las diferentes muestras de garbanzos clasificadas según su ecotipo.

Al igual que en el modelo anterior, este nuevo modelo tampoco permite discriminar los diferentes ecotipos de la variedad *macrocarpum* de los garbanzos en base a su contenido en isoflavonas.

Para las muestras de lentejas, el modelo de PCA generado (figura 5.7) presenta una mayor discriminación que en el caso de las muestras de garbanzos, y una buena robustez ($R^2 > 93\%$, $Q^2 > 85\%$). Las muestras de lentejas analizadas pertenecen a tres variedades diferentes de una misma especie, en lugar de ser diferentes ecotipos de una misma variedad.

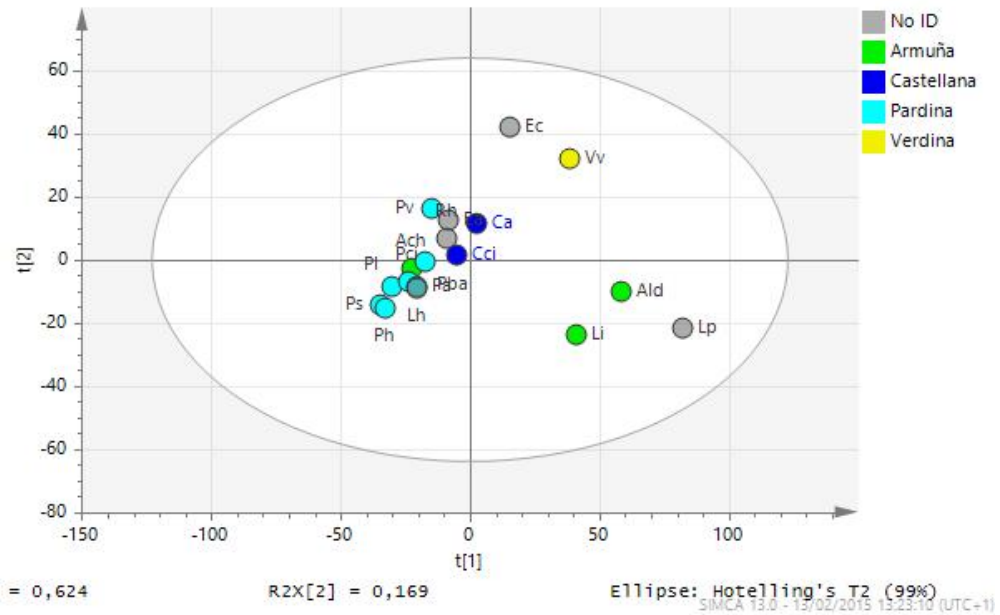


Figura 5.7. Modelo de PCA generado para las muestras de lentejas en función de la denominación comercial.

Existen diversas muestras en cuyo etiquetado no figura la variedad de lenteja a la que pertenece. Para asignarles una variedad hemos tenido en cuenta los porcentajes de participación de los analitos mayoritarios en las muestras. En la figura 5.8 se muestra la influencia de los analitos genistéina y formononetina para cada una de las muestras de lentejas en el PCA.

V. CLASIFICACIÓN DE LEGUMBRES

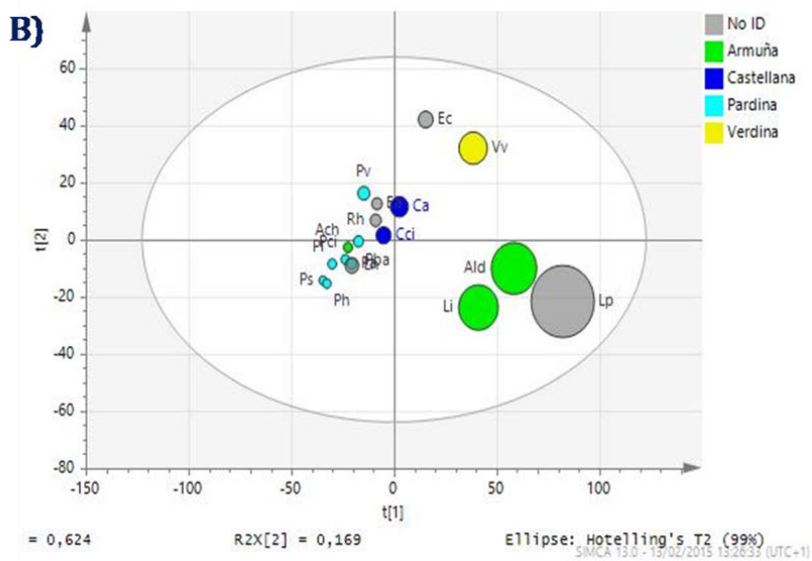
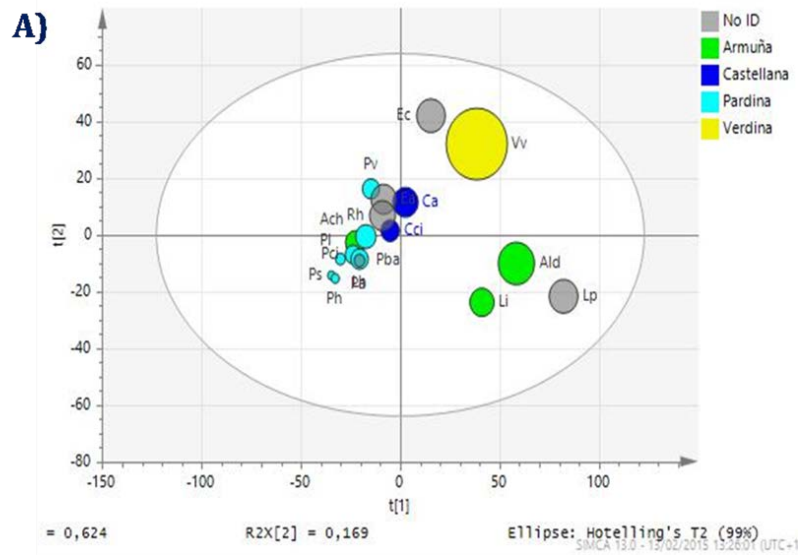


Figura 5.8. Influencia de los analitos mayoritarios, A) Genisteína y B) Formononetina, en las puntuaciones de cada una de las muestras de lentejas.

En base a la morfología y coloración de las semillas, se podría concluir que la mayoría de muestras no identificadas pertenecen a la variedad *Lens culinaris*

Medicus var. *vulgaris*. Para diferenciar entre las dos subvariedades presentes en la misma, Rubia de la Armuña y Rubia Castellana, se tendrán en cuenta los porcentajes de participación de los analitos mayoritarios en cada una de las puntuaciones de las muestras.

En la figura 5.8 se puede observar que la muestra Lp, de variedad comercial desconocida pero origen Salamanca, presenta altos contenidos en formononetina, característica de las muestras Rubia de la Armuña. De manera similar, la muestra Ec, a pesar de situarse próxima a la variedad “Verdina”, presenta contenidos similares a la variedad *vulgaris*; concretamente al tipo “Rubia Castellana” teniendo en cuenta el contenido de genisteína y de formononetina.

En la figura 5.9 se recoge el modelo definitivo de PCA teniendo en cuenta las variedades de la especie *Lens culinaris Medicus*. Como puede apreciarse, el PCA permite una diferenciación entre las distintas variedades de lentejas, aunque la separación de clases no es completa.

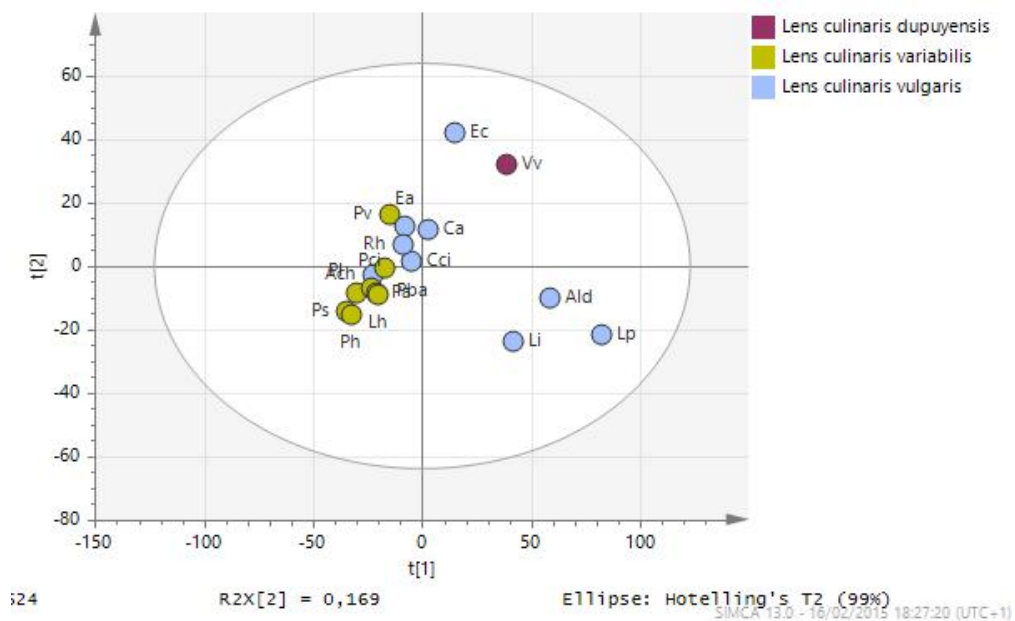


Figura 5.9. Modelo de PCA generado para las muestras de lentejas en función de la variedad analizada.

V. CLASIFICACIÓN DE LEGUMBRES

El último modelo de PCA generado corresponde a muestras de alubias y se recoge en la figura 5.10 ($R^2 > 97\%$, $Q^2 > 85\%$). Las puntuaciones de cada una de las muestras han sido coloreadas en función de la información aportada por el etiquetado del producto.

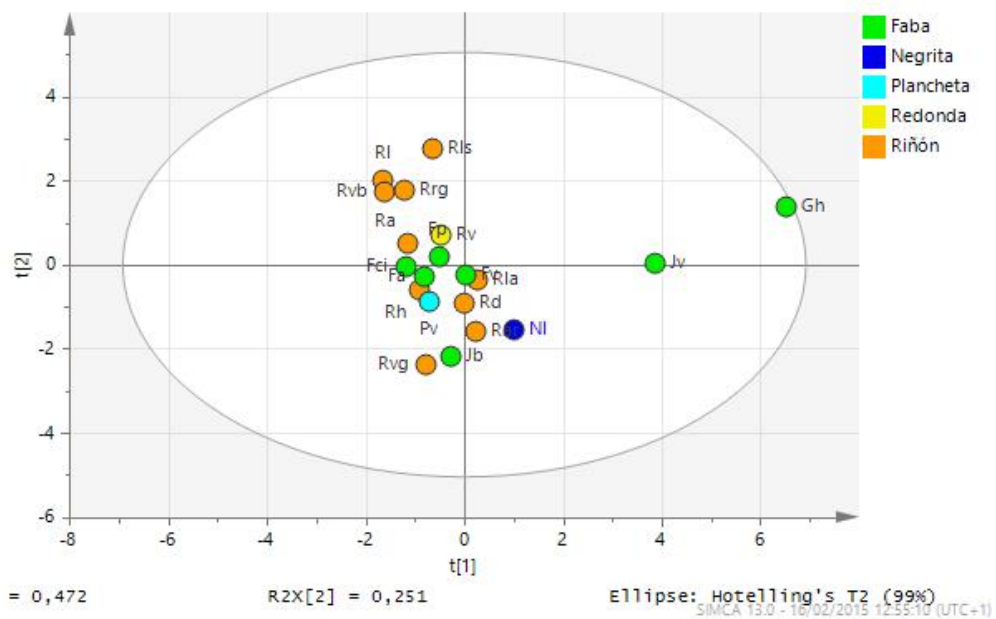


Figura 5.10. Modelo PCA generado para las muestras de alubias en función de la denominación comercial.

Las muestras de alubias analizadas pertenecen a dos especies diferentes, independientemente de los nombres comerciales otorgados en el etiquetado del producto. En la figura 5.11 se observan los modelos de PCA generados teniendo en cuenta las dos especies estudiadas, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus multiflorus* (A), e incluyendo las diferentes subespecies de *Phaseolus vulgaris*, nanus y volúbilis (B).

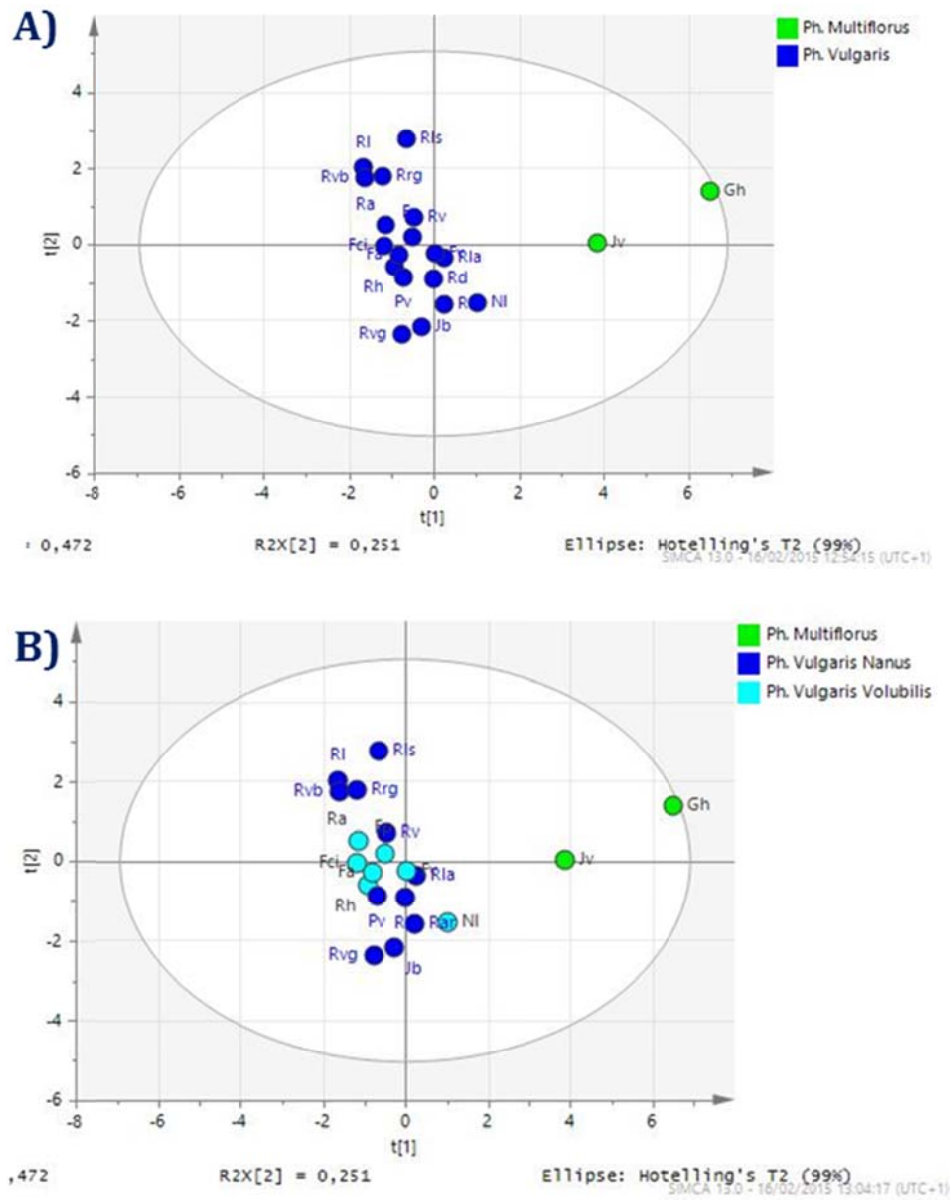


Figura 5.11. Modelos PCA generado para las muestras de alubias. A) Puntuaciones coloreadas en base a la especie analizada. B) Puntuaciones coloreadas en base a la especie y subespecie analizadas.

Al analizar las puntuaciones de la figura 5.10 B, se observa un grupo, constituido por las muestras RI, RI, Rvb y Rrg ligeramente diferenciado del resto de muestras pertenecientes a la subespecie *Phaseolus vulgaris nanus*. Para estudiar estas diferencias se generó un modelo teniendo en cuenta los contenidos del analito mayoritario, biochanina-A. Como se aprecia en la figura 5.12 dichos contenidos son superiores a los generalmente encontrados en la subespecie *Phaseolus vulgaris nanus*, y bastante más parecidos a los de la subespecie *Phaseolus vulgaris volúbilis*.

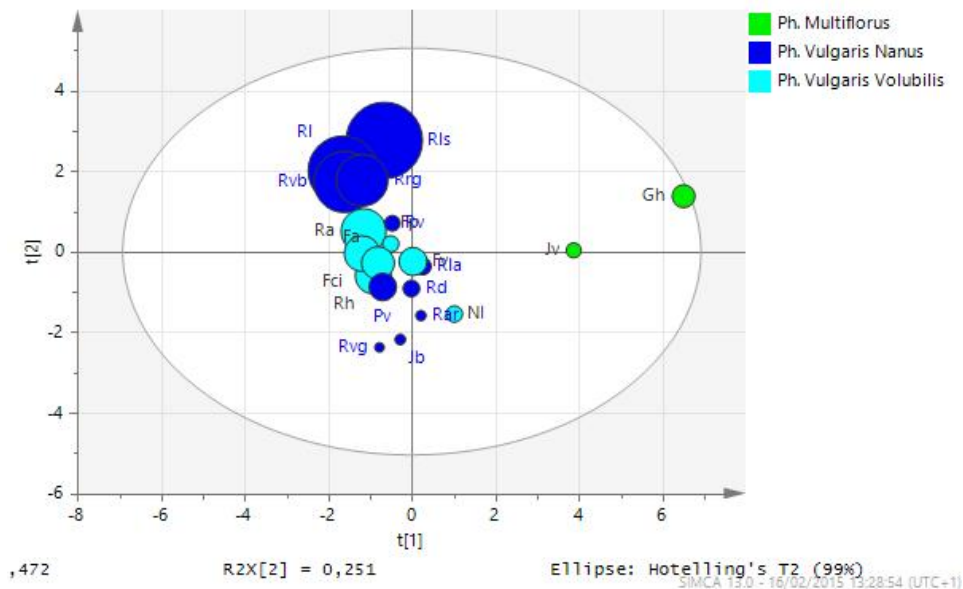


Figura 5.12. Influencia del analito biochanina-A en las puntuaciones de las diferentes muestras de alubias.

5.3.3.2. Análisis de agrupamientos jerárquico (HCA)

A partir de los modelos PCA óptimos generados, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento de los datos de tipo jerárquico (*Hierarchical Cluster Analysis, HCA*). Los dendogramas obtenidos muestran el número de grupos

en función de la coordenada vertical. El eje vertical indica la pérdida de similitud dentro de un grupo, es decir, la varianza aumenta cuando los grupos se fusionan.

En el estudio de muestras de garbanzos, la figura 5.13 muestra el dendograma generado al aplicar HCA. Se observan tres grupos o clases correspondientes a los tres ecotipos analizados (Blanco Lechoso, Castellano y Pedrosillano).

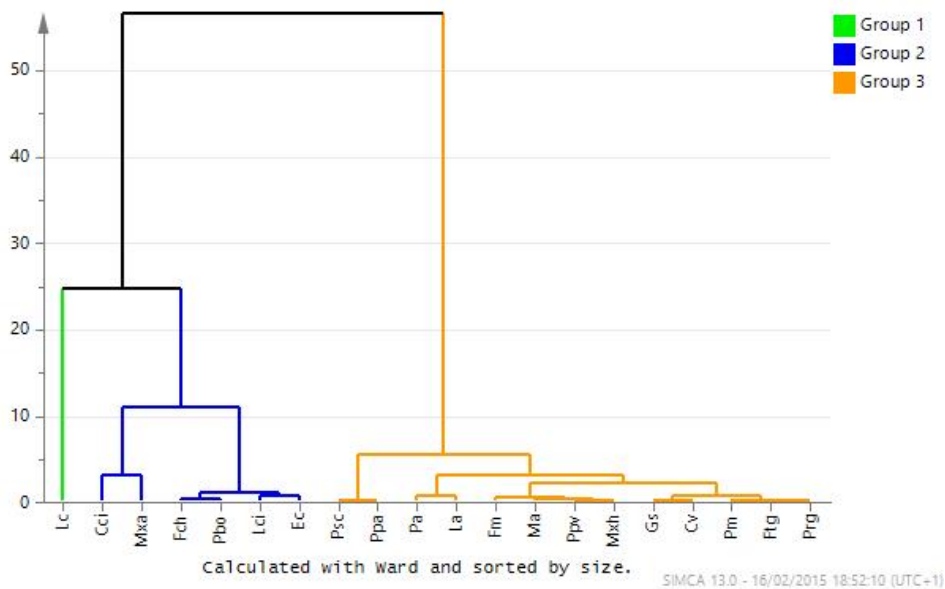


Figura 5.13. HCA correspondiente a las diferentes muestras de garbanzos. Grupo 1 : Blanco Lechoso, Grupo 2: Castellano, Grupo 3: Pedrosillano.

A continuación se recoge el estudio correspondiente a muestras de lentejas. En este caso, las muestras analizadas pertenecen a tres variedades diferentes de una misma especie. Dentro de una misma variedad se pueden diferenciar, además, dos subvariedades.

Al llevar a cabo el análisis de agrupamientos se obtiene el dendograma de la figura 5.14. Como puede verse, las muestras de lentejas pueden ser clasificadas en dos grupos subdivididos dos a dos. Destaca la separación no sólo entre variedades, sino también entre las subvariedades. Sería lógico pensar que una misma rama del dendograma, correspondiente a la variedad *Lens Culinaris Medicus* var. *Vulgaris*, se dividiera en las subvariedades “Rubia de la Armuña” y “Rubia Castellana”; sin embargo, al estudiar el dendograma ambas subvariedades presentan una diferenciación mayor.

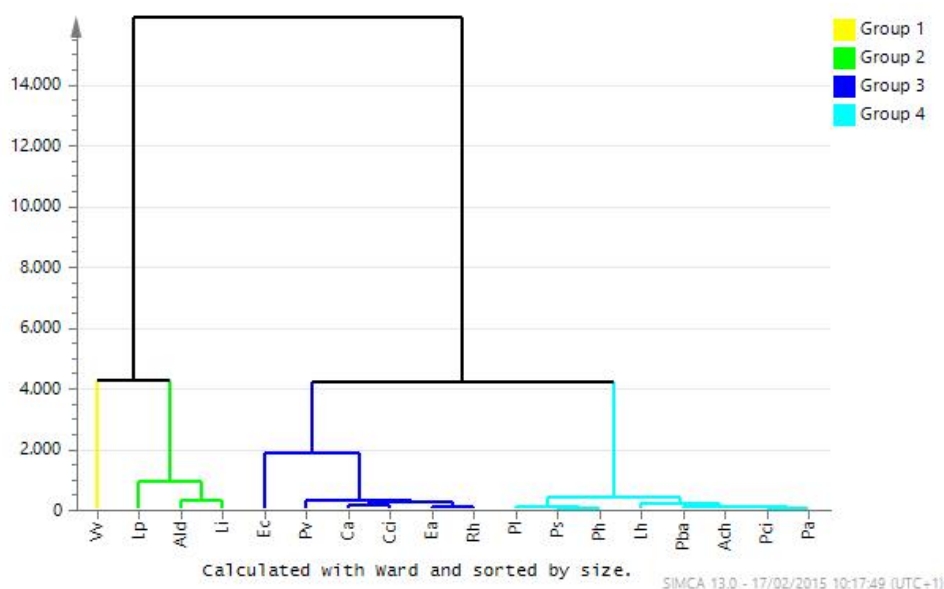


Figura 5.14. HCA correspondiente a las diferentes muestras de lentejas. Grupo 1: “Verdina”, Grupo 2: “Rubia de la Armuña”, Grupo 3: “Rubia Castellana” y Grupo 4: “Pardina”.

Esta diferenciación se podría explicar en base a los contenidos de formononetina, uno de los analitos mayoritarios en muestras de lentejas. Tal y como se vio en el modelo PCA (figura 5.7), el contenido de formononetina

es superior en las puntuaciones correspondientes a la subvariedad “Rubia de la Armuña” que en el resto de variedades o subvariedades. Este mayor contenido en formononetina podría justificarse teniendo en cuenta la procedencia de las muestras. Estas muestras comercializadas bajo la denominación “Rubia de la Armuña” (Ald, Li, Lp) proceden de la región de Castilla y León, más concretamente del municipio de Gomecello (Salamanca); mientras que las muestras clasificadas como “Rubia Castellana” son en su mayoría procedentes de la provincia de León, o bien procedentes de Estados Unidos o Canadá y empaquetadas en esta zona. Se ha descrito en bibliografía que las condiciones climatológicas pueden influir en los contenidos de isoflavonas. Teniendo en cuenta las diferencias climatológicas entre León y Salamanca, con una mayor diferencia entre temperaturas máxima absoluta y mínima absoluta en Salamanca que en León, esto podría ocasionar esta diferencia en los contenidos.

Finalmente se recoge el estudio correspondiente a muestras de alubias. La figura 5.15 muestra el dendograma obtenido al aplicar el análisis de agrupamientos jerárquico, apreciándose la separación de las dos especies estudiadas, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus multiflorus*.

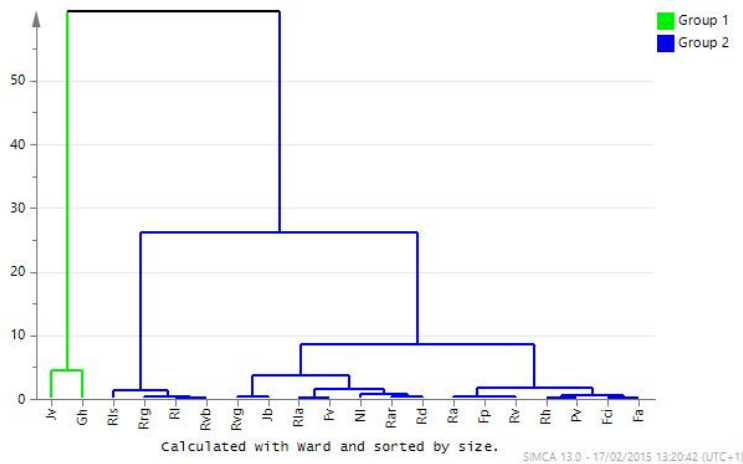


Figura 5.15. HCA correspondiente a las diferentes muestras de alubias teniendo en cuenta las especies. Grupo 1: *Phaseolus Multiflorus*, Grupo 2: *Phaseolus vulgaris*.

En esta figura se aprecia que el grupo 2 (Especie *Phaseolus vulgaris*) se subdivide en dos grupos claramente diferenciados. Esto nos lleva a pensar en las dos subespecies estudiadas, *nanus* y *volubilis*. Para comprobarlo se llevó a cabo un análisis de agrupamientos teniendo en cuenta todos los rasgos de diferenciación existentes entre las muestras de alubias (especies y subespecies). La figura 5.16 muestra el dendograma obtenido.

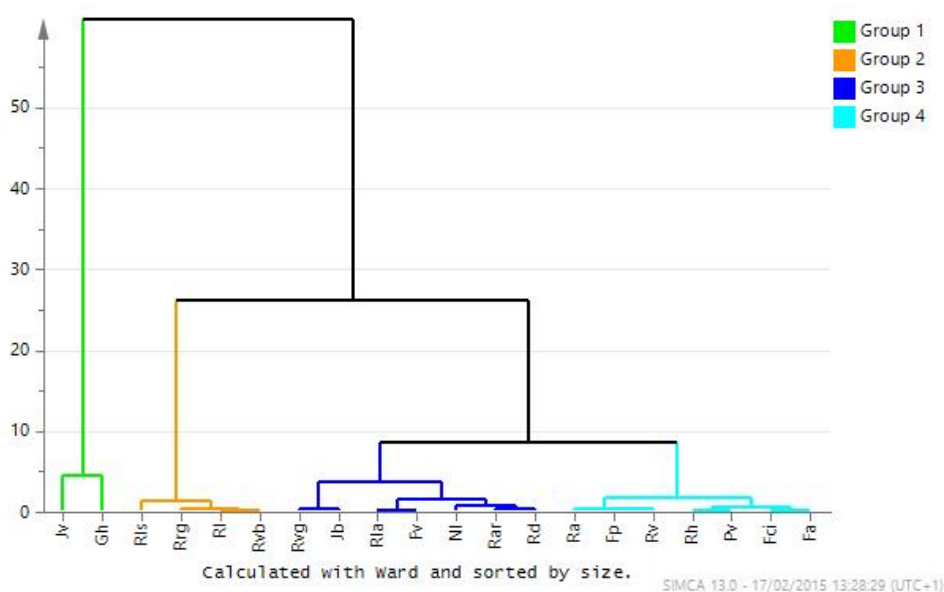


Figura 5.16. Dendograma obtenido para las diferentes muestras de alubias teniendo en cuenta especies y subespecies. Grupo 1: *Phaseolus multiflorus*, Grupo 2: Desconocido., Grupo 3: *Phaseolus vulgaris* *Nanus*, Grupo 4: *Phaseolus vulgaris* *Volubilis*.

Como se ha indicado anteriormente, se observa una subdivisión en la segunda rama del dendograma. Se aprecia una clara separación entre el grupo 2 y los grupos 3 y 4. Los grupos 3 y 4 representan las subespecies *nanus* y *volubilis*, respectivamente. El grupo 2 corresponde a las muestras Rls, Rl, Rvb y Rrg, etiquetadas por el fabricante como alubias tipo “Riñón”, por lo que pertenecerían a la subespecie *nanus*; sin embargo, se encuentran

muy diferenciadas de éstas. Si tenemos en cuenta el contenido en biochanina-A de las muestras pertenecientes al grupo 2, se aprecia una clara diferencia respecto al que presentan las correspondientes al grupo 3, como vimos en la figura 5.12. Si las comparamos morfológicamente, las muestras pertenecientes al grupo 2 presentan diferencias frente al grupo 3, por lo que podrían tratarse de una variedad diferente a la de “Riñón” a pesar de ser denominadas así por su proveedor.

5.3.3.3. *Análisis discriminante mediante regresión por mínimos cuadrados (PLS-DA)*

Como se ha mencionado anteriormente, el PLS-DA es una técnica discriminante supervisada que supone un caso particular de regresión parcial por mínimos cuadrados, donde las variables dependientes son categorizadas y expresan la pertenencia o no a una clase concreta. Así, el objetivo de PLS-DA es encontrar un modelo que separe clases de observaciones sobre la base de sus variables X. Los modelos de PLS-DA para los distintos tipos de legumbres se generaron a partir de los dendogramas obtenidos en los análisis de agrupamientos anteriores.

En el caso de las muestras de garbanzos, la clasificación mediante PCA no era posible. La diferenciación entre las distintas clases de garbanzos se fundamenta sobre todo en cuestiones morfológicas y prácticas agrícolas. No obstante, al aplicar el análisis discriminante, se aprecia una buena diferenciación entre la muestra correspondiente al ecotipo “Blanco Lechoso” procedente de Andalucía, en verde, y los otros dos ecotipos. En la figura 5.17 se muestra el modelo generado al aplicar PLS-DA a las muestras de garbanzos. Los valores correspondientes a R^2 y Q^2 son superiores al 90% y el 83%, respectivamente.

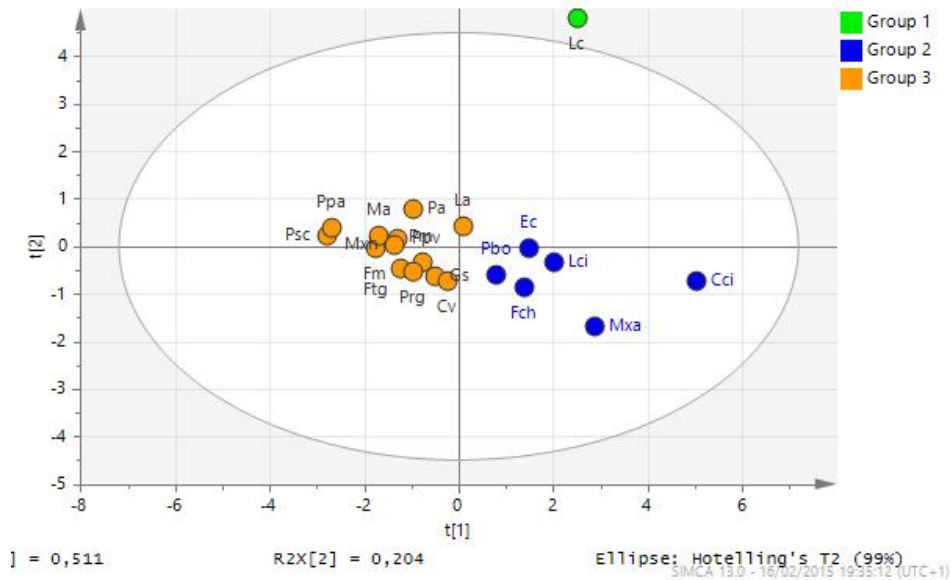


Figura 5.17. Modelo PLS-DA correspondiente a las diferentes muestras de garbanzos. Grupo 1: “Blanco Lechoso”, Grupo 2: “Castellano”, Grupos 3: “Pedrosillano”

Este modelo, al ser supervisado, permite una mayor diferenciación entre las clases generadas y con ello poder asignar el ecotipo correcto a las muestras de origen desconocido.

Por ejemplo, muestras como Fch o Pbo, que habían sido consideradas de ecotipo “Pedrosillano”, son clasificadas como ecotipo “Castellano” según el análisis por PLS-DA. Se corrobora de nuevo esta diferenciación en base a la procedencia de las legumbres. Así pues, Fch, denominada por el fabricante como “Garbanzo de Fuentesauco” y de supuesto ecotipo “Pedrosillano” puede ser en realidad de ecotipo “Castellano”, probablemente debido a que el proveedor distribuye también este segundo ecotipo.

La misma situación se presenta con la muestra Mxa, denominada como garbanzo de procedencia mexicana. Este tipo de garbanzo deriva del ecotipo “Castellano”; sin embargo, tanto los modelos generados mediante HCA como posteriormente por PLS-DA lo engloban en el ecotipo “Pedrosillano”. La casa comercial que distribuye este garbanzo distribuye también garbanzos del tipo “Pedrosillano” por lo que la muestra podría

estar mezclada, aproximándola a las características y contenidos en isoflavonas explicados para dicho ecotipo.

En la figura 5.18 se muestra el modelo generado al aplicar PLS-DA a las muestras de lentejas. Los valores correspondientes a R^2 y Q^2 son superiores al 93% y el 85%, respectivamente.

En la figura se observa cómo las muestras Ach y Pv, etiquetadas por el productor como “Rubia de la Armuña” y ”Pardina” respectivamente, no pertenecen a dichas clases designadas sino que son “Pardina” y “Castellana”, respectivamente. Al igual que en otros casos, la diferenciación en la clasificación de estas muestras se ve fundamentada en su procedencia. Así, por ejemplo, la muestra Ach procede del municipio de La Vellés (Salamanca), municipio en el cual se cultivan lentejas de la variedad “Pardina”. Además, la distribuidora comercial de este producto comercializa también otros etiquetados bajo el nombre de “Lentejas Pardinas”.

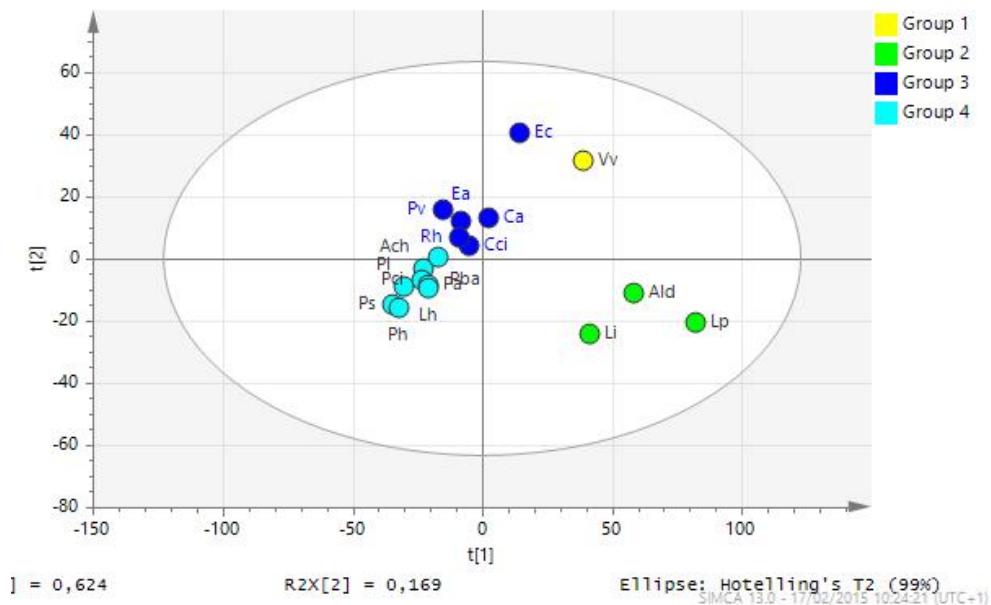


Figura 5.18. Modelo PLS-DA generado para las diferentes muestras de lentejas. Grupo 1: “Verdina”, Grupo 2: “Rubia de la Armuña”, Grupo 3: “Rubia Castellana” y Grupo 4: “Pardina”.

Finalmente se recogen los modelos de PLS-DA obtenidos en el estudio correspondiente a muestras de alubias, tanto teniendo en cuenta las dos especies estudiadas, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus multiflorus* (Figura 5.19), como atendiendo a todos los rasgos de diferenciación existentes en las muestras de alubias (Figura 5.20), al igual que se hizo al aplicar HCA. Los valores de R^2 y Q^2 obtenidos fueron superiores al 95% y el 87%, respectivamente.

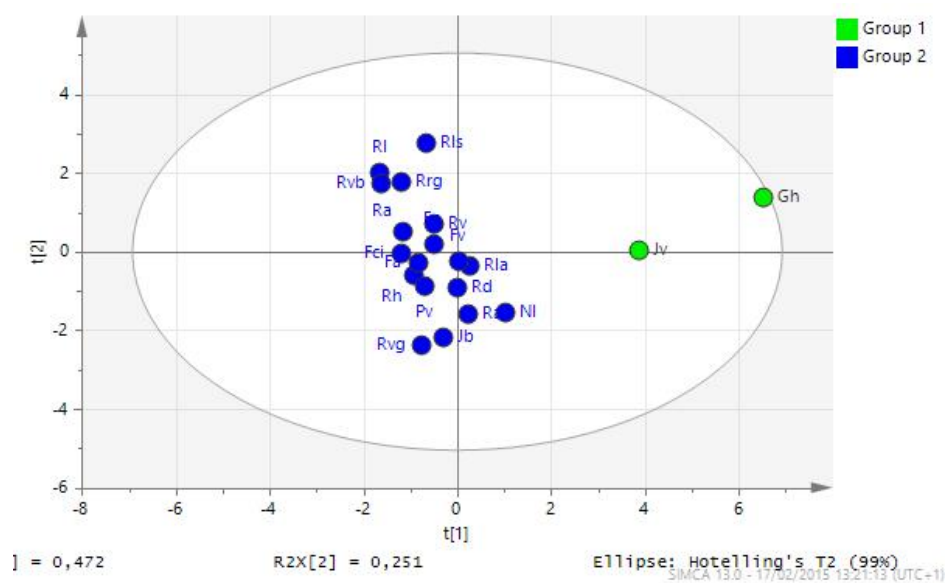


Figura 5.19. Modelo PLS-DA generado para las diferentes muestras de alubias en función de las especies, Grupo 1: *Phaseolus multiflorus*, Grupo 2: *Phaseolus vulgaris*.

Los resultados coinciden con los obtenidos mediante el análisis de agrupamientos. Como se puede observar, en la figura 5.20 se aprecia, al igual que allí, una separación entre el grupo 2 de muestras y el grupo al que, según el fabricante, debería pertenecer (grupo 3) formado por las muestras *Phaseolus vulgaris* spp. *nanus*.

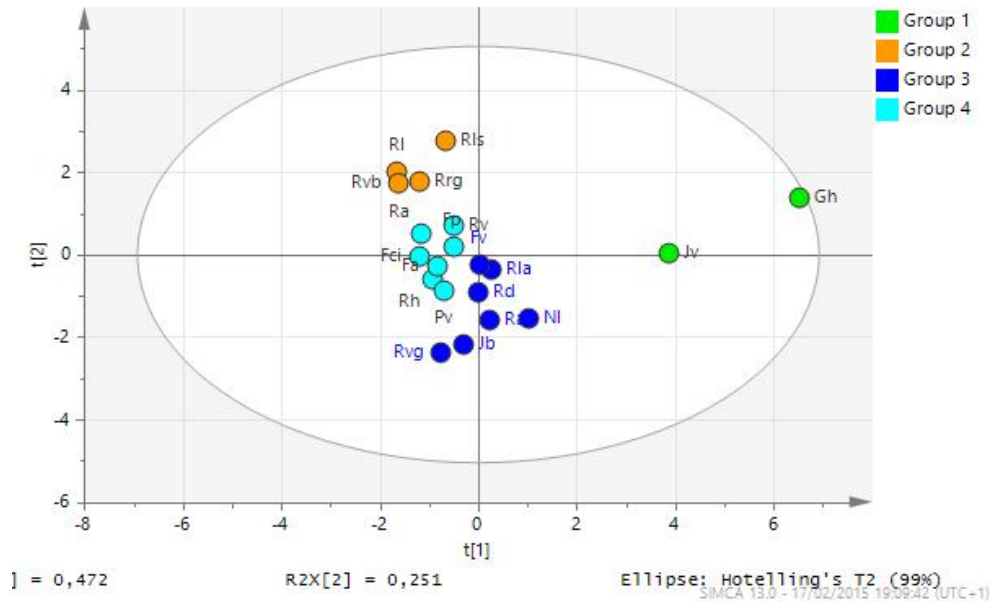


Figura 5.20. Modelo PLS-DA generado para las diferentes muestras de alubias en función de especies y subespecies. Grupo 1: *Phaseolus multiflorus*, Grupo 2: Desconocido, Grupo 3: *Phaseolus vulgaris nanus*, Grupo 4: *Phaseolus vulgaris volubilis*.

· Método de validación

Una vez generados los modelos, el propio software de análisis nos permite llevar a cabo una validación cruzada mediante la permutación de los valores de los parámetros Q^2 y R^2 .

Previamente a la valoración cruzada o “Scrambling” se analizaron los parámetros Q^2 y R^2 ya que, una vez generado el modelo, informan sobre su calidad y por tanto sobre la conveniencia o no de utilizar el modelo para el análisis estadístico.

Para el PCA, método no supervisado, se considerará un buen modelo el que presente valores de R^2 próximo a la unidad y Q^2 mayores o iguales a 0.28-0.3. Para el PLS-DA, método supervisado, se aceptará como un buen modelo aquel que presente valores de $Q^2 \geq 0.5$, considerándose excelente el que presente valores $Q^2 \geq 0.9$; siendo $R^2 > Q^2$, pero con una diferencia no

demasiado elevada y sin superar el margen de $0.2-0.3$ ³³⁷. Según estas indicaciones, los modelos obtenidos para cada una de las muestras son óptimos, como puede apreciarse a partir de los datos de R^2 y Q^2 obtenidos y recogidos en cada uno de los estudios previos.

Posteriormente, para comprobar la validez de los modelos, se compararon dichos parámetros con los generados al permutar aleatoriamente, unas 100 veces, las observaciones de la matriz de variables dependientes, mientras que la matriz de variables independientes permanece intacta.

En la figura 5.21 se muestran las gráficas resultantes de la validación siguiendo el proceso de Scrambling, proporcionadas por el programa SIMCA P+. Se observan en la parte superior derecha los valores de R^2 y Q^2 del modelo original y desde ahí hacia la izquierda, los valores de R^2 y Q^2 de los modelos tras las permutaciones.

Para que la validación sea correcta, los modelos tras las permutaciones deben presentar valores de R^2 y Q^2 inferiores a los modelos del original y la línea de regresión punteada que une los valores de Q^2 debe de cortar en el eje Y por debajo de 0.05. En caso contrario, significaría que el modelo a validar no es bueno y la validación sería considerada negativa. Es decir, un modelo quedará perfectamente validado si existe una buena correlación de dichos valores, siendo Q^2 permutado inferior a cero.

Las intersecciones de las líneas que unen Q^2 con el eje Y, en el caso de las muestras analizadas, pasan todas por debajo del punto 0.05. En el caso de los garbanzos las intersecciones para R^2 y Q^2 serán (0.0, 0.131) y **(0.0, -0.245)** respectivamente; para las muestras de lentejas (0.0, 0.0236) y **(0.0, -0.425)**, y para las muestras de alubias (0.0, 0.0532) y **(0.0, -0.287)**. Queda con ello demostrado la alta capacidad predictiva del modelo propuesto.

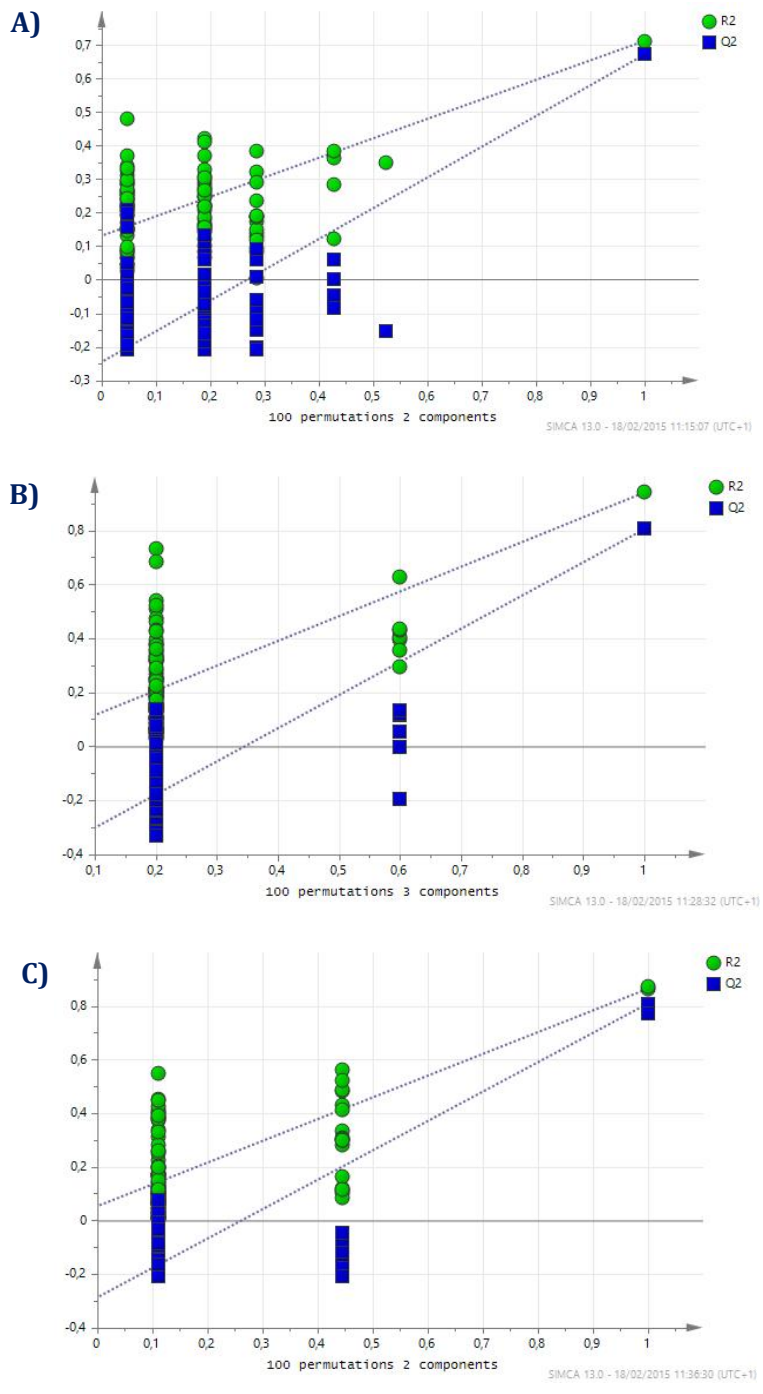


Figura 5.21. Validación cruzada o “Scrambling” para las muestras de A) Garbanzos, B) Lentejas y C) Alubias.

5.4. CONCLUSIONES

De manera general se puede concluir que la metodología analítica desarrollada, QuEChERS-LC-MS/MS, es adecuada para llevar a cabo análisis de rutina de diferentes tipos de legumbres. Además se ha logrado la clasificación de garbanzos, lentejas y alubias según su contenido en isoflavonas aplicando diferentes técnicas de análisis multivariante, tanto no supervisadas como supervisadas.

En el caso de muestras de lentejas y alubias los resultados obtenidos en los modelos de PCA generados dan una idea previa de su clasificación. Por el contrario, el modelo de PCA generado para las muestras de garbanzos no discrimina entre las mismas ya que no son variedades diferentes, sino ecotipos diferentes de una misma variedad. Se pone de manifiesto como el contenido de isoflavonas se ve influenciado no sólo por el genotipo de la especie, sino también por la procedencia de las muestras, las prácticas agrícolas llevadas a cabo.

Los dendogramas obtenidos en el análisis de agrupamientos jerárquicos y los modelos de PLS-DA generados nos permiten llevar a cabo una clasificación clara de las legumbres en base a su contenido en isoflavonas.

La diferenciación en muestras de lentejas es total, se observan las tres variedades estudiadas; *Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris*, *Lens culinaris* Medicus var. *variabilis* y *Lens culinaris* Medicus var. *dupuyensis*, incluyendo las subvariedades “Rubia Castellana” y “Rubia de la Armuña” dentro de la variedad *vulgaris*.

En el caso de alubias se discriminan las dos especies, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus multiflorus* y, dentro de la especie *P. vulgaris*, se distinguen las dos subespecies, *nanus* y *volubilis*.

En el caso de los garbanzos hay que tener en cuenta que solamente se comercializa la variedad *macrocarpum* y se ha distinguido parcialmente entre tres ecotipos diferentes: Castellano, Pedrosillano y Blanco Lechoso.

Los modelos propuestos presentan una elevada robustez, puesta de manifiesto en los valores de Q^2 y R^2 . Además la validación interna permitió



VI

**EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS
DOMÉSTICOS SOBRE EL
CONTENIDO DE ISOFLAVONAS
EN LEGUMBRES**

6.1. OBJETIVO

En la introducción de esta Memoria ya se puso de manifiesto la importancia de las isoflavonas desde el punto de vista de la salud. La aglicona es la sustancia que el organismo absorbe y ejerce su función bioactiva, los glucósidos y ésteres necesitan ser hidrolizados. El ser humano dispone de una serie de enzimas dispuestas en la flora intestinal capaces de hidrolizar estas especies a agliconas. Por ello, es importante conocer el nivel al que están presentes las isoflavonas como agliconas en los alimentos.

Las legumbres, además, precisan de un procesado previo a su consumo; la mayoría de tratamientos empleados implican procesos simples y baratos, tales como la puesta en remojo y el cocinado, que conlleva una cocción. Estos procesos son altamente eficientes en la reducción de factores antinutricionales y mejoran las características organolépticas de las legumbres. Sin embargo, estos procesos pueden ser también considerados culpables de la pérdida de algunos nutrientes por su solubilidad, por su inestabilidad térmica o por transformación de algunos compuestos.

A pesar de que se han llevado a cabo muchos estudios acerca de la composición química de las legumbres, no existen demasiados trabajos acerca del efecto que ocasionan procesos sencillos como el remojo o el cocinado sobre los contenidos de nutrientes. La bibliografía se refiere principalmente a soja, cacahuetes y diferentes especies de *Phaseolus*, mientras que la información que concierne a garbanzos, lentejas y alubias es escasa, a pesar de ser los tres tipos de legumbres más cultivados en el mundo y consumidos en el Mediterráneo.

El objeto de esta última parte del trabajo fue estudiar la variación en los contenidos de isoflavonas, tanto individuales como totales, que tienen lugar durante el procesado hidrotermal de las legumbres. El conocimiento de los efectos ocurridos en los diferentes procesados ayudará a seleccionar las mejores condiciones para tratar dichas legumbres y aumentar su calidad.

6.2. INTRODUCCIÓN

Las legumbres son uno de los alimentos más ampliamente consumidos en el mundo, constituyendo una parte importante de la dieta al proporcionar macronutrientes, como proteínas, grasas, carbohidratos y fibra; micronutrientes, como vitaminas del grupo B, y minerales. Las legumbres, además, poseen otros compuestos bioactivos, como fitosteroles, isoflavonas, saponinas. etc. Su consumo se ha visto incrementado en los últimos años en países desarrollados debido a la atribución de efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos bioactivos se ve influenciada por el modo de consumo de los mismos.

En el caso de las isoflavonas, como se ha mencionado ya en la introducción de esta Memoria, la forma libre se absorbe de forma más rápida que los conjugados glucosilados y los malonil o acetil ésteres³⁵². Al ser consumidas, los glucósidos pueden ser hidrolizados a la forma libre por la acción enzimática de las β -glucosidasas asociadas con la microflora intestinal. La biodisponibilidad de la enzima en el intestino está limitada, por lo que el metabolismo de las isoflavonas podrá variar entre poblaciones y en función de la dieta, la ingesta de medicamentos o el tiempo de permanencia de la comida en el intestino. Debido a estos factores, es mucho más deseable el consumo de alimentos con un elevado contenido de agliconas³⁵³.

Atendiendo a la bibliografía existente, las agliconas están presentes en pequeñas cantidades en las legumbres (especialmente en soja, que ha sido la legumbre más estudiada), con un contenido entre el 1 % y el 3% del total de isoflavonas³⁵⁴. El resto de isoflavonas presentes comprendería un 70-80% de malonil- β -glucosidos, un 5% de acetil- β -glucosidos y un 25% β -glucosidos³⁵⁵. La concentración total de isoflavonas en productos no

³⁵² T. Izumi, M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito; *J. Nutr.* 130 (2000) 1695

³⁵³ K.D.R. Setchell; *Am. J. Clin. Nutr* 68 (1998) 1333 S

³⁵⁴ S.P. Góes-Favoni; *Desenvolvimento de Farinha de Soja[Glycine mas (L.) Merrill] con Maior Teor de Genisteína*. Londrina, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

³⁵⁵ J.H. Lee, M. Renita, R.J. Fioritto, S.K. St-Martin, S.J. Schwartz, Y. Vodovotz; *J. Agric. Food Chem.* 52 (9) (2004) 2647

fermentados es dos o tres veces mayor que en productos fermentados. La concentración de isoflavonas en productos derivados de la soja está determinada por la metodología de cultivo y las condiciones de almacenamiento y de procesado, especialmente la temperatura a la que son expuestos. Ciertos métodos de procesado, como el remojo, la fermentación o la precipitación y coagulación de proteínas, ocasionan una variación significativa en el tipo de isoflavonas totales, dando lugar a un lixiviado de los componentes al medio. Chien y cols.³⁵⁶ observaron una pérdida significativa de agliconas debida a la degradación ocurrida al someter las isoflavonas a temperaturas en torno a 150-200°C, siendo los malonil-conjugados los compuestos más susceptibles al tratamiento térmico. Lee y cols.³⁵⁷ observaron los efectos que ocasionaban distintos tratamientos térmicos en la distribución total de isoflavonas en la soja. Considerando la importancia que tienen las agliconas en la salud, algunos autores han descrito cómo los tratamientos hidrotermales podrían ser empleados como un medio eficaz para incrementar los niveles de agliconas mediante la acción de la β -glucosidasa³⁵⁸.

Las prácticas más comunes a la hora de consumir este tipo de productos suelen ser el remojo y el posterior cocinado. El remojo consiste en la hidratación de las semillas en agua hasta que alcancen su peso máximo, pudiendo descartar o no el medio de remojo. El efecto obtenido dependerá del tipo de legumbre, especie y variedad, la duración del proceso, la temperatura, el pH y la salinidad del medio, e incluso del modo de almacenamiento previo al proceso³⁵⁹. Numerosos estudios indican que el remojo puede reducir los niveles totales de azúcares, minerales, ácido fítico, etc., pudiendo ser eliminados de forma parcial o total en el agua residual procedente del remojo. A pesar del incremento observado en el contenido de agliconas, una considerable cantidad de isoflavonas (12-57%) se pierden en el medio de remojo durante el proceso. Este lixiviado de isoflavonas al

³⁵⁶ J.T. Chien, H.C. Hsieh, T.H. Kao, B.H. Chen; *Food Chem.* 91 (2005) 425

³⁵⁷ S. Lee, J. Lee; *Food Chem.* 112 (2009) 316

³⁵⁸ S.P. Góes-Favoni, A.D.P. Beléia, M.C. Carrão-Panizzi; *Efeito da hidratação sobre a atividade de β -glicosidase da soja [Glycine max (L) Merrill]* In XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, Pernambuco, Anais, Recife, Brazil (2004)

³⁵⁹ M. Prodanov, I. Sierra, C. Vidal-Valverde; *Food Chem.* 84 (2004) 271

medio de remojo se ve incrementado al hacerlo la temperatura y el tiempo de exposición de las semillas³⁶⁰.

El tratamiento más antiguo que permite a las legumbres ser comestibles, es la cocción, que suele seguir a la etapa de remojo. Consiste en un cocinado en agua hirviendo hasta notar la suavidad de las semillas entre los dedos. Hay que tener en cuenta que la adición de sales, en el medio de remojo o en el medio de cocción, pueden provocar una reducción en el tiempo del proceso. Los procesos de cocción ocasionan la desnaturalización de las proteínas y su difusión a la fase líquida, inactivando los inhibidores de la tripsina³⁶¹ o disminuyendo los contenidos de ácido fítico³⁶² y galactosas³⁶³.

Los cambios en la distribución de isoflavonas dependerán, por tanto, de las condiciones del proceso. Los tratamientos térmicos convencionales ocasionan una disminución del contenido de derivados malonilos mediante su intra-conversión en β -glucosidos, mientras que las agliconas presentan una mayor resistencia al calor³⁶⁴. Si el tratamiento térmico se realiza en seco, como puede ser un tostado o un horneado, se incrementa la formación de acetyl derivados mediante la descarboxilación de los malonilos³⁶⁵.

³⁶⁰ T.H. Kao, Y.F. Lu, H.C. Hsieh, B.H. Chen; *Food Res. Int.* 37 (2004) 891

³⁶¹ J. Frias, C. Vidal-Valverde, C. Sotomayor, C. Díaz-Pollan, G. Urbano; *Eur. Food Res. Technol.* 210 (2000) 340

³⁶² A.H. Khalil, E.H. Mansour; *Food Chem.* 54 (1995) 177

³⁶³ T.A. El-Adawy; *Plant Food Hum. Nutr.* 51(1) (2002) 83

³⁶⁴ E. Shimoni; *J. Food Sci.* 69 (6) (2004) 160

³⁶⁵ M. Uzzan, T.P. Labuza; *J. Food Sci.* 69 (3) (2004) 77

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Procedimiento analítico

En el Capítulo anterior de la Memoria se analizaron diferentes variedades de garbanzos, lentejas y alubias empleando la metodología QuEChERS-LC-MS/MS. En función de los contenidos obtenidos para los distintos tipos de muestra, se han seleccionado para llevar a cabo el presente estudio aquellas variedades que presentan un mayor contenido en isoflavonas. Las muestras elegidas han sido: garbanzos de “Fuentesauco”, lentejas de la variedad “Verdina” y alubias de “La Granja”. Dichas muestras fueron sometidas a diferentes tratamientos (remojo, pelado, y cocción) antes de llevar a cabo la extracción de las isoflavonas.

Las extracciones se llevaron a cabo siguiendo la metodología QuEChERS optimizada a lo largo de esta Memoria, teniendo en cuenta el sistema de agitación más adecuado para cada uno de los casos. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem.

6.3.2. Tratamientos de procesado y cocción

Los tratamientos a los que han sido sometidas las muestras son semejantes a los llevados a cabo de forma doméstica, con el fin de comprobar si en estos procesos existe variación en el contenido en isoflavonas de los alimentos estudiados. Los procedimientos empleados han sido:

- Remojo: Las legumbres fueron sometidas a remojo en agua destilada durante 20 horas a temperatura ambiente. La relación entre la cantidad de materia y de agua utilizada fue 1:5 (w:v). Esto supuso un aumento en la humedad de las muestras próximo al 50%.

- Pelado: Una vez sometidas a remojo, las pieles de las legumbres fueron retiradas de forma manual y conservadas para su posterior análisis.

· Cocinado: Se llevó a cabo tanto en muestras secas, denominadas muestras control, como en muestras previamente sometidas a remojo. Una cantidad adecuada de legumbre se depositó en un vaso de precipitados sobre una placa calefactora y se mantuvo a ebullición hasta que las legumbres presentaban suavidad entre los dedos. La cantidad de agua utilizada viene dada por la relación 1:4 (w:v) en las muestras control y una relación 1:3 (w:v) para las muestras tratadas.

Una vez realizado el tratamiento correspondiente, las muestras fueron secadas y posteriormente congeladas. Antes de llevar a cabo la extracción de las isoflavonas de cada una de las muestras, éstas fueron trituradas.

En la figura 6.1 se recoge el esquema de los tratamientos llevados a cabo.

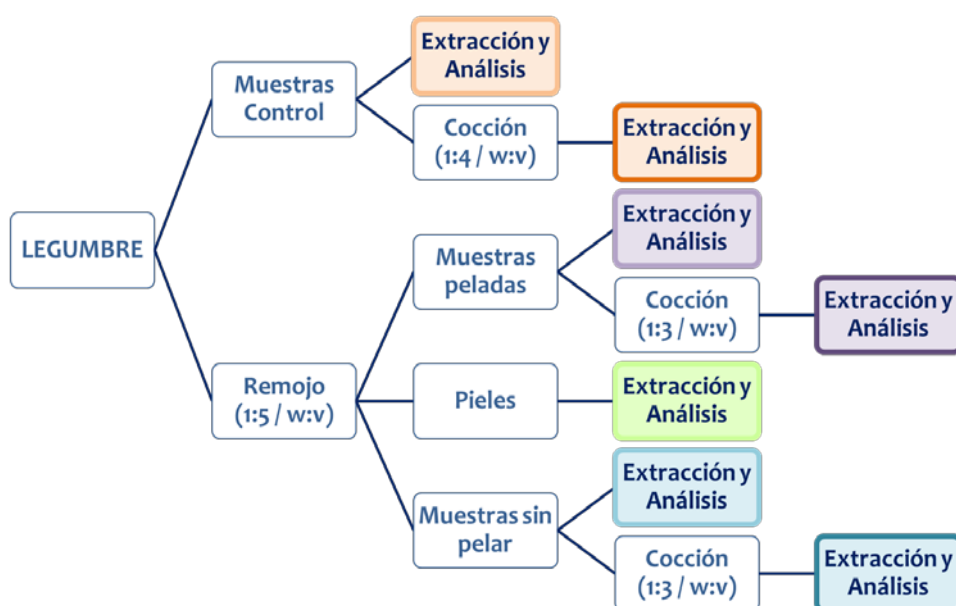


Figura 6.1. Esquema de los tratamientos llevados a cabo en las muestras de legumbres.

6.3.3. Evaluación de los datos

En la tabla 6.1 se muestran los contenidos encontrados en la cuantificación de cada una de las muestras tras los diferentes tratamientos llevados a cabo. Las muestras de garbanzos no mostraron resultados concluyentes, por lo que únicamente se exponen en la tabla los resultados obtenidos para muestras de lentejas y alubias.

Tabla 6.1. Cuantificación ($\mu\text{g} / 100\text{g}$ materia seca) de las muestras de lentejas y alubias en función de los diferentes tratamientos llevados a cabo.

		DAIDZINA	GLICITINA	GENISTINA	DAIDZEÍNA	GENISTEÍNA	FORMONONETINA	BIOCHANINA-A	
LENTEJAS	CONTROL	<i>Crudo</i>	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01		0.28 ± 0.02	21.8 ± 0.2	3.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2
		<i>Cocinado</i>	0.12 ± 0.01	0.05 ± 0.01		0.32 ± 0.02	12.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
	REMOJO	<i>Crudo</i>	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01		0.35 ± 0.02	24.1 ± 0.2	3.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2
		<i>Cocinado</i>	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01		0.19 ± 0.02	15.2 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	REMOJO + PELADO	<i>Crudo</i>	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01		0.05 ± 0.02	10.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2
		<i>Cocinado</i>	0.09 ± 0.01	0.24 ± 0.01			3.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2
	PIELES					0.13 ± 0.02	20.1 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
	ALUBIAS	CONTROL	<i>Crudo</i>	0.49 ± 0.02	0.43 ± 0.03	8.8 ± 0.2	5.2 ± 0.2		1.7 ± 0.3
<i>Cocinado</i>			0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	9.4 ± 0.2	4.6 ± 0.2		1.0 ± 0.3	
REMOJO		<i>Crudo</i>	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.03	6.4 ± 0.2	9.5 ± 0.2		18.3 ± 0.3	
		<i>Cocinado</i>	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2		2.1 ± 0.3	
REMOJO + PELADO		<i>Crudo</i>	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.03	5.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2		8.4 ± 0.3	
		<i>Cocinado</i>	0.24 ± 0.02	0.46 ± 0.03	2.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2		1.8 ± 0.3	
PIELES				1.9 ± 0.2	10.1 ± 0.2		0.5 ± 0.3		

Analizando los resultados mostrados en la tabla, se observan diferencias entre los contenidos de analitos en función de los tratamientos y de la matriz en estudio. Se tendrán en cuenta solamente las isoflavonas mayoritarias (genisteína, formononetina, biochanina-A en lentejas y daidzeína, genisteína, biochanin-A en alubias) ya que algunas de las restantes se encuentran prácticamente en el límite de cuantificación.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el caso de las muestras de lentejas. En la figura 6.3 se representan los contenidos de analitos mayoritarios de las muestras de lentejas en función del tratamiento aplicado.

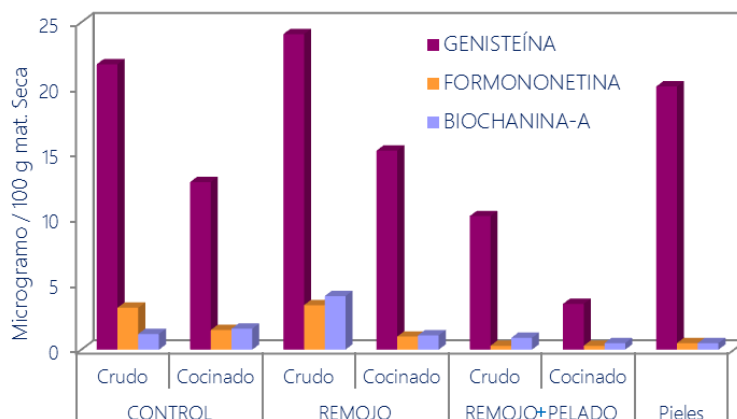


Figura 6.3. Contenidos de analitos mayoritarios ($\mu\text{g} / 100\text{g}$ materia seca) en muestras de lentejas frente al tratamiento aplicado.

En primer lugar se estudia el efecto del remojo sobre las muestras sin pelar. A la vista de los resultados obtenidos se puede deducir que el contenido de los tres analitos mayoritarios experimenta un ligero aumento respecto a la muestra control.

En el análisis de muestras sometidas a remojo y peladas se observa, por el contrario, una disminución en el contenido de isoflavonas, tanto frente a la muestra control como a la muestra sometida a remojo y con piel. Como puede verse, en los hollejos de las lentejas se encontraron presentes isoflavonas, especialmente genisteína.

Por otra parte, las muestras sometidas a cocción, en todos los casos, presentan una disminución en el contenido de isoflavonas, motivada probablemente por la degradación térmica. Esta disminución también se observa en la muestra control cocinada, encontrándose pérdidas de hasta el 50%. La disminución es más acusada en el caso de muestras peladas, ya que la presencia de los hollejos puede proteger a la legumbre de la pérdida de analitos. En este caso se observa una disminución del 84 % respecto a la muestra control no cocinada.

Seguidamente se describen los resultados obtenidos para las muestras de alubias. En la figura 6.4 se muestran los contenidos de las isoflavonas mayoritarias en las muestras de alubias en función de los tratamientos llevados a cabo.

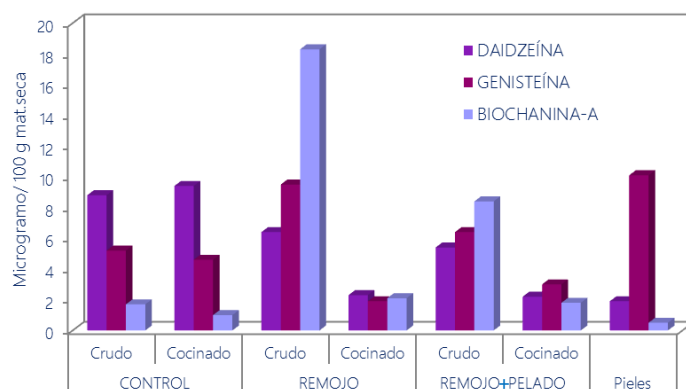


Figura 6.4. Contenidos de analitos mayoritarios ($\mu\text{g} / 100\text{g}$ materia seca), en muestras de alubias frente al tratamiento aplicado.

Del estudio del efecto del remojo se puede deducir que existe un aumento de genisteína y biochanina A; sin embargo, existe una disminución del contenido de daidzeína presente frente a la muestra control, tanto en el caso de muestras peladas como sin pelar.

Si se comparan entre sí los resultados obtenidos para las muestras sometidas a remojo, se observa una disminución de los contenidos de agliconas para las muestras peladas. De la misma forma que en el caso de lentejas, en los hollejos de las alubias se encontraron presentes isoflavonas, especialmente genisteína.

En cuando al proceso de cocción de alubias, se observa que en el caso de la muestra control los contenidos en agliconas no sufren una variación significativa. Sin embargo, en las muestras cocinadas que han sido previamente sometidas a remojo, la degradación de las agliconas es mucho mayor.

6.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se han estudiado las variaciones en los contenidos de isoflavonas presentes en legumbres al ser sometidas a un procesado hidrotermal. Los tratamientos aplicados fueron los habitualmente realizados de forma doméstica- remojo y cocinado-, puesto que existe interés en el conocimiento de la ingesta real de isoflavonas al consumir legumbres.

En el caso de lentejas, las muestras sometidas a cocción presentan una disminución en el contenido de isoflavonas, tanto en la muestra control como las sometidas a remojo, motivada probablemente por la degradación térmica. En el caso de alubias, los contenidos totales no varían durante el proceso de cocción cuando las muestras no se han sometido a remojo, sin embargo si lo hacen cuando se lleva a cabo remojo y cocción consecutivamente; tratamiento habitual antes de su consumo.

Como conclusión general se puede decir que la ingesta real de isoflavonas es inferior al contenido de las mismas presente en estas legumbres.



VII

CONCLUSIONES

Se ha logrado el objetivo de la investigación, que fue desarrollar metodologías analíticas para analizar isoflavonas en matrices tan complejas como son los alimentos, y determinar estas sustancias en la forma en la que están naturalmente presentes en las legumbres de amplio consumo en España, a pesar de que se encuentran en bajas concentraciones, a nivel de trazas en algún caso.

Se han optimizado tratamientos de muestra sencillos y compatibles con las determinaciones posteriores, que han sido cromatografía líquida y electroforesis capilar con detección mediante espectrometría de masas. Igualmente las separaciones y las detecciones utilizadas se optimizaron para cada caso.

La metodología de extracción mediante líquidos presurizados (PLE), con escasas aplicaciones en el análisis de alimentos, es una técnica de extracción válida para isoflavonas en muestras de legumbres. El método de extracción desarrollado destaca por su sencillez, sin ninguna etapa de limpieza de los extractos previa a la determinación. La ventaja de la automatización de este tratamiento de muestra lo hace muy adecuado en análisis de rutina.

Como es bien conocido, la extracción mediante metodología QuEChERS se ha empleado habitualmente como tratamiento de muestra en la determinación de pesticidas y otros contaminantes en alimentos. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que es posible su utilización para aislar analitos presentes de forma natural en las muestras, obteniendo buenos resultados en su determinación. También se ha llegado a la conclusión de que la forma de poner en contacto el extractante y la muestra influye en la eficacia en la extracción. Utilizando esta metodología QuEChERS se ha llevado a cabo la extracción de isoflavonas de forma rápida, sencilla y eficaz, minimizando el consumo de disolventes, así como el coste del análisis.

En cuanto a la determinación de los analitos, el acoplamiento tanto de cromatografía líquida como de electroforesis capilar con espectrometría de masas ha permitido desarrollar métodos de elevada sensibilidad y selectividad. El estudio de las fragmentaciones de los analitos de interés ha permitido realizar el seguimiento de las diferentes transiciones, asegurando, con un alto grado de fiabilidad, la identificación de los mismos.

De forma general, se puede concluir que los métodos puestos a punto son rápidos, sensibles y selectivos, eliminando procesos de tratamiento de muestra laboriosos o tediosos. Dichos métodos se han validado utilizando parámetros tales como la recuperación, la repetibilidad o la reproducibilidad, y se pueden aplicar en análisis de rutina en el control de calidad de este tipo de alimentos.

De forma más concreta, se puede concluir que la extracción mediante líquidos presurizados (PLE) seguida de la separación y cuantificación mediante HPLC-DAD ha permitido la extracción y determinación de isoflavonas, tanto agliconas como glucósidos, con límites de detección de 15 – 73 $\mu\text{g L}^{-1}$. La metodología propuesta es de fácil aplicación. Cabe destacar que no existen antecedentes bibliográficos sobre este tipo de aislamiento en la determinación de isoflavonas en legumbres, muestras con un bajo contenido en estos analitos.

Respecto a la extracción mediante la metodología QuEChERS, se han podido determinar, de forma simultánea, isoflavonas en su forma libre y glucosilada mediante la aplicación de dos etapas consecutivas de extracción con una disminución de polaridad del solvente extractante. La eliminación de la etapa final de limpieza aumenta la rapidez y sencillez del método. La determinación de las isoflavonas mediante UHPLC-MS/MS permitió obtener límites de detección de 0.7 – 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Un posterior estudio de la puesta en contacto entre muestra y disolvente permitió mejorar las características analíticas del método así como facilitar su aplicabilidad a análisis de rutina. Los sistemas de agitación más adecuados son bandeja termostataada de agitación y sonda de ultrasonidos; el primero permite el análisis de varias muestras simultáneamente, hecho interesante cuando hay que analizar un gran número de muestras. En el caso de las muestras de garbanzos y alubias, ambas metodologías ofrecen resultados adecuados; sin embargo, en las muestras de lentejas se obtienen mejores resultados con la sonda de ultrasonidos.

Además de los métodos cromatográficos, se ha desarrollado un método de separación y determinación basado en el acoplamiento CE-MS. La comparación entre los resultados obtenidos mediante LC-ESI-MS/MS y CE-ESI-MS permitió concluir que no existían diferencias significativas entre

dichas metodologías, siendo ambas similares en cuanto a precisión, recuperación y límites de detección. No obstante, se puede afirmar que la metodología CE-ESI-MS es más adecuada para el análisis de agliconas, mientras que LC-ESI-MS/MS puede ser aplicada, con mejores resultados, tanto para la determinación de glucósidos como de agliconas.

Las metodologías propuestas son adecuadas para llevar a cabo análisis de rutina de muestras de diferentes tipos de legumbres. La aplicación de dichas metodologías a un elevado número de muestras ha permitido, además, la clasificación de garbanzos, lentejas y alubias en función de sus contenidos en isoflavonas, aplicando diferentes técnicas de análisis multivariante (análisis de componentes principales (PCA), análisis de agrupamientos jerárquico (HCA) y análisis discriminante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Los modelos estadísticos propuestos permitieron la diferenciación de muestras de lentejas en función de las tres variedades en estudio, *Lens culinaris* Medicus var. *variabilis* y *Lens culinaris* Medicus var. *dupuyensis* y *Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris*, incluyendo diferentes subvariedades. En el caso de las alubias, los modelos permitieron diferenciar las especies

Phaseolus multiflorus y *Phaseolus vulgaris*, incluyendo las subespecies *nanus* y *volubilis*. En el caso de muestras de garbanzos, las muestras analizadas son ecotipos de la misma variedad, por lo que la diferenciación entre clases fue menor. Los modelos estadísticos propuestos fueron validados, corroborando su robustez y calidad.

En última instancia, se comprobó la variación que experimentan los contenidos de isoflavonas al someter a las legumbres a los tratamientos habituales de procesado y cocinado previos a su consumo. Se concluyó que la estabilidad de las isoflavonas se ve afectada por dichos procedimientos, lo que implica que la ingesta real de isoflavonas es inferior al contenido de estas sustancias en las legumbres.



SUMMARY IN
ENGLISH

TABLE OF CONTENTS

1. AIM.....	347
2. RESULTS AND DISCUSSION.....	350
3. CONCLUSIONS.....	369

8.1. AIM

The nutritional properties of foods are under constant surveillance with a view to controlling their quality. In recent years there has been increasing interest in knowing, besides nutritional properties, the bioactive properties of foodstuffs. Bioactive compounds are naturally present in food and cause some healthy effects. Among these compounds are species such as phytoestrogens, and among these, most notably the isoflavones.

The overall objective of the present research is to develop analytical methodologies that facilitate the analysis of isoflavones in widely consumed foods.

In this regard, pulses are foods with high contents of proteins, carbohydrates, fibre and other micronutrients such as vitamins. Furthermore, pulses contain bioactive compounds, among which are isoflavones. Among the legumes, soya has high levels of these substances, and this pulse has been studied in depth as regards its bioactive properties. The consumption of soya is not very high in Spain, unlike other legumes such as chickpeas, lentils or faba beans, such that it would be of great interest to have data concerning both its nutritional and bioactive properties.

Analytical methodologies include a sample treatment step and another step in which the separation, identification and quantification of analytes take place. In food analysis, one of the fundamental problems arising from the complexity of the matrices stems from analyte extraction prior to determination. In the determination of bioactive compounds in foods, sample treatment is a critical step and sometimes limits the development of analytical methodologies.

Traditional methods proposed tedious time-consuming sample treatments which needed large amounts of organic solvent and possibly introduced errors in the determination step. Accordingly, there is a need to develop new methods with reduced organic solvent consumption and sample manipulation in order to avoid clean-up steps and, if possible, allow the pre-concentration of the analytes in order to

increase extraction efficiency. *Automation of the sample treatment or of some of the steps involved is also important.*

Thus, one of the aims of this work is to develop sample treatments that meet these requirements and are also compatible with liquid chromatography or capillary electrophoresis as separation and measurement methods. Moreover, isoflavones are found in plants in free or glycosylated derivatives with different bioavailabilities. Another factor to be considered is the use of treatments to isolate analytes in the form in which they are naturally present in the samples.

The extraction methods proposed to achieve this aim are *Pressurized Liquid Extraction (PLE)* and the *QuEChERS extraction method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)*.

Most applications using PLE have focused on the determination of contaminants in environmental samples, few of them being used in foods. The QuEChERS methodology has primarily focused on the extraction of pesticide residues from fruits and vegetables, and there are almost no references concerning its use in extracting substances that are present in samples naturally.

In this research, sample treatments were based on extraction with pressurized liquids, and a modified QuEChERS method adapted to samples of legumes in order to extract the compounds naturally present in these matrices in the form of glycosides and aglycones. In the case of the QuEChERS methodology, a study addressing the issue of placing the sample and solvent in contact for extraction was also carried out, since this point has been considered important for improving the efficiency in this kind extraction.

Liquid chromatography is the technique most widely used in the determination of bioactive compounds for all types of sample. Capillary electrophoresis has been little used in the analysis of phytoestrogens. In this work, the aim was to use both liquid chromatography and capillary electrophoresis for analyte separation after applying the sample treatments developed.

Detection was carried out using mass spectrometry coupling both LC and CE to ESI-MS with a view to improving the selectivity and sensitivity provided by spectrophotometric detection. In the case of liquid chromatography, the mass spectrometry detector used was MS/MS in tandem, with the triple quadrupole version.

Ultimately, the methodologies developed were applied to samples of chickpeas, lentils and beans in order to study the possibility of classifying the different types of pulses according to their variety, taking into account the observed isoflavone profiles.

8.2. RESULTS AND DISCUSSION

8.2.1. Pressurized Liquid Extraction

Research article:

“Pressurized Liquid Extraction as a simple preparation method for the analysis of isoflavones in pulses”.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2) (2012) 361..... 145

8.2.2. Extraction by the QuEChERS method

Research article:

“A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry”.

Talanta 100 (2012) 320.....199

8.2.3. Study the placing on contact between sample and solvent in the QuEChERS methodology

Research article:

“Comparative study of the methodology used in the extraction of isoflavones from legumes applying a modified QuEChERS approach”.

Phytochemical Analysis 25 (2013) 170.....237

8.2.4. Determination of isoflavone contents in foodstuff by Capillary Electrophoresis

Research article:

“Determination of isoflavones in legumes by QuEChERS-capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry”.

Current Analytical Chemistry 11 (2015) 117..... 273

8.2.5. Classification of pulses based on their isoflavone content

Research article:

“Classification of different varieties of chickpeas, lentils and beans based on their isoflavone content using multivariate analysis”

Not yet published

Research article: (Not yet published)

“Classification of different varieties of chickpeas, lentils and beans based on their isoflavone content using multivariate analysis”

L. Pérez-Martín, M. Bustamante-Rangel, M.M. Delgado-Zamarreño

Department de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Salamanca. Plaza de los caídos s/n 37008 Salamanca

8.2.5.1. Abstract

Food legumes (*Fabaceae*) form an important part of the human diet, providing a high proportion of proteins, fats, carbohydrates, dietary fibres, B-group vitamins and minerals. Several *Fabaceae* species are acknowledged for their high levels of secondary metabolites. Isoflavones are among the most well-known examples of these compounds, being recognized for their varied types of biological activity. Isoflavone profiles are characterized in four species of *Fabaceae* genera (*Cicer arietinum*, *Lens culinaris* Medicus, *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus multiflorus*). Here, in particular, three ecotypes of the variety *macrocarpum*, three varieties of the species *Lens culinaris* Medicus and two subspecies with different varieties of the species *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus multiflorus* were analysed. The analysis of isoflavones was carried out using HPLC-MS/MS. To extract the analytes, a modified QuEChERS approach was used. The chromatographic peak areas obtained, after scaling in Pareto mode, were used to build statistical models. Both supervised and unsupervised techniques were applied for the different types of pulses used in the study. The results obtained revealed a similarity between the different ecotypes of the same variety of chickpeas and significant differences among varieties and subspecies belonging to the same species. Other factors besides the genotypic features, such as origin or agricultural practice, also contribute to the isoflavone content. Here, one of the statistical methods was validated by internal validation, obtaining satisfactory results.

8.2.5.2. Introduction

Legumes are the second most important crop as a source of food, feed for livestock and raw materials for industry. The importance of legumes is also associated with their secondary metabolites, in particular phytoestrogens. This family (*Fabaceae*) often comprises edible seeds. There are 13000 species of known legumes, of which about 20 are consumed by humans [1].

The three main classes of phytoestrogens are isoflavones, lignans and coumestans [2] and their biosynthesis depends heavily on the environment and plant species in question [3].

Isoflavones in particular are a subclass of flavonoids with a chemical structure similar to that of estradiol. They are mainly found as glycosides, conjugated with carbohydrates, which may be esterified with acetyl or malonyl groups. Flavonoids and isoflavonoids, these two groups of compounds have phenolic groups in both ends of the molecule, making them unique from the chemical, biochemical and biological point of view and giving the molecules exceptional stability [4].

Depending on the methylation or glycosylation of the hydroxyl groups, the ability of isoflavones to bind to estrogen receptors varies. Recently, the possibility of a duality in the estrogenic activity of isoflavones, which depends on endogenous estrogen concentrations, has been studied [5-7]. This underscores the beneficial effects gained from the consumption of this type of phytoestrogen for humans, such as the treatment of menopausal symptoms [8,9]; as an alternative to hormone-replacement therapy (HRT); in cardiovascular disease [10,11]; diabetes and obesity [12,13]; in osteoporosis [14,15], and even in cancer (e.g., prostate [16] and endometrial cancer [17]).

Isoflavones are typically associated with soybean, despite being synthesized by many other *Fabaceae* plants, such as alfalfa, clover, pea, peanut, beans, etc [2]. It is known that the amount of isoflavones present in species such as the legume family is influenced by genotype, agricultural practices, the time of ripening and harvesting, storage,

weather conditions, processing conditions, etc [18]. Owing to this , there are many reports that show that the isoflavone content of legumes is strongly influenced by the genotype [18-20], agricultural practices [21], climatic factors [22], etc.

The *Fabaceae* species selected for this study are native to the Mediterranean areas of Europe, specifically Spain, and are characterized by their high protein content, good nutritional quality and good hay and silage quality. Also, they are grown easily.

A modified QuEChERS approach described previously [23] was implemented for the analysis of isoflavones in legume samples, followed by separation and quantification using HPLC-MS/MS. The data from HPLC-MS/MS are three-dimensional (retention time, mass and abundance) and therefore had to be pre-treated. The chromatographic peak areas obtained, after scaling in Pareto mode, were used to build statistical models. Both supervised and unsupervised techniques were applied.

8.2.5.3. *Material and methods*

- *Standards and reagents*

Isoflavone standards: Daidzin (Di, CASRN552-66-9), Glycitin (Gli, CAS RN40246-10-4), Genistin (Gi, CASRN529-59-9), Daidzein (De, CAS RN 486-66-8), Glycitein (Gle, CASRN40957-83-3), Genistein (Ge, CASRN 446-72-0), Formononetin (For, CASRN485-72-3), and Biochanin-A (Bio, CAS RN491-80-5) were purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). The organic solvents –acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) – were of HPLC grade and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (>98%) was from Fluka (Alcobendas, Madrid, Spain). Anhydrous magnesium sulphate, sodium chloride and trisodium citrate dehydrate ($\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Disodium hydrogen citrate sesquihydrate ($\text{Na}_2\text{HCit} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$) was from Sigma-Aldrich. Ultra-high quality (UHQ)

water was obtained with a Wasserlab (Spain) water purification system. All other chemicals used were of analytical reagent grade.

- Samples

The samples analysed were purchased from local supermarkets.

Only the variety *macrocarpum* of the specie *Cicer arietinum* is commercialized in Spanish supermarkets; specifically, five ecotypes of this variety. In this study only three ecotypes were analysed, Blanco Lechoso (BL), Castellano (CS) and Pedrosillano (PD). Twenty chickpea samples from nine different producers from Andalucía and Castilla-León (Spain) were analysed. The samples analysed were labelled with the name of producer: “Fuentesaúco”, “Pico Pardal”, “Maragato”, “Gordo” “Organically Grown”, “Mexican” and “Castellano” “Pedrosillano” and “Blanco Lechoso”.

The lentils most widely cultivated in Spain are of the species *Lens culinaris* Medicus. Three different varieties of this species exist: *Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris* (including “Rubia de la Armuña” and “Rubia Castellana”), *Lens culinaris* Medicus var. *variabilis* and *Lens culinaris* Medicus var. *dupuyensis*. Twenty lentil samples from eight different producers of these three varieties in Castilla-León (Spain) were studied. The samples analysed were labelled with the name of producer.

Finally, twenty bean samples from twelve different producers in Castilla-León and Asturias (Spain) were analysed. In this case, two different species were analysed (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus multiflorus*), including two different subspecies from *Phaseolus vulgaris*, spp. *nanus* and spp. *volubilis*. The samples studied were “Blanca Riñón” and “Blanca Redonda” from *Phaseolus vulgaris* spp. *nanus*; “Granja fabada”, “Plancheta” and “Negrita” from *Phaseolus vulgaris* spp. *volubilis* and “Judión” from the species *Phaseolus multiflorus*.

- Extraction procedure

Before extraction, samples were ground with a Knifetec™ 1905 from Foss (Barcelona, Spain) and were stored in a cool, dry place in closed containers.

Extraction was carried out following the QuEChERS methodology optimized in a previous work [24]. Depending on the type of matrix, an appropriate amount of sample was extracted in two steps: first, 10 mL of ACN: H₂O (70:30, v/v) was added and the mixture was shaken for 5 min; then, 5 mL of ACN was added and the mixture was stirred again for 5 min. The chickpea and bean extractions were carried out using a VWR thermostatted shaking tray (Radnor, Pennsylvania, USA), while lentil extractions were accomplished using a Microson Misonix Ultrasonic Cell Disruptor probe (Farmingdale, NY, USA). After extraction, a mixture of MgSO₄: NaCl (4:1, w/w) together with citrate buffer (in the case of chickpeas and beans) was added, and the mixture was shaken vigorously for 1 min and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The upper layer was filtered through a 0.22 µm PVDF syringe filter before injection into the chromatographic system.

- HPLC determination of isoflavones

LC analyses were performed on a HP 1200 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, and a six-port valve. The analytical column was a 50x4.6 mm Zorbax Eclipse XDB-C18 with 1.8 µm particles (Agilent). The mobile phase consisted of an acetonitrile (solvent A) and 0.01% aqueous formic acid (solvent B) gradient at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The gradient elution was as follows: 0–1.5min, 10% A; 1.5– 2.5 min, 10–25% A; 2.5–3.5min, 25% A; 3.5–7min, 25–50% A; 7–8 min, 50–80% A; 8–10min, 80% A, 10–12min, 80–10% A. The analytical column was thermostatted at 25°C, and the injection volume was 2 µL. Detection was carried out on a Triple Quad LC/MS6410 (Agilent) equipped with an electrospray (ESI) source. ESI-MS spectra were acquired in positive-ion multiple reaction monitoring (MRM)

mode. The conditions of the MS analysis were as follows: the electrospray capillary voltage was 3500 V and the nebulizer pressure was 35 psi. Nitrogen was used as a drying gas at a flow rate of 12 L min⁻¹ and a temperature of 350 °C. The whole system was controlled by Agilent MassHunter software, version B.04.01.

- *Statistical analysis*

Data analysis was performed with multivariate statistical methods, using SIMCA P+ version 13.0 software (Umetrics, Sweden). Pareto scaling was applied to the data prior to the development of the chemometric models. Principal component analysis (PCA), an unsupervised model, and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), a supervised model, were used for the discrimination and classification of legumes.

Principal component analysis (PCA) is one of the most widely used unsupervised techniques in multivariate data analysis because it is easy to interpret. PCA helps to reduce the dimensionality of the data while retaining most of the information insofar that all the variable relationships are studied simultaneously [25].

This mathematical process aims to reduce the complexity of the data, identify the inherent trend of a set of experimental measurements, and classify the samples according to their similarities and differences, providing graphic visualization in the space defined by the principal components. The principal components were displayed as a set of scores (t), which highlights clustering or outliers, and a set of loadings (p), which highlights the influence of input variables on t [26].

Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) is a supervised model that uses information about the identity of each group of samples to generate a mathematical model that optimizes the separation between classes and allows the class to which new samples belong to be predicted.

PLS-DA is a classical PLS regression where the dependent variables (Y-matrix) are categorical and express the fact of belonging or not to a particular class. The matrix consisted of as many columns as there were classes and an observation took a value of one for the class it belonged to and zero for the rest [27]. PLS-DA provides rugged models, with predictive capability, that allow the differences between two sample groups to be found.

Validation of data models (PLS-DA) is essential to check whether the conclusions obtained are reliable according to the information provided by the model. For this, the parameters R^2 (total variance explained by the model) and Q^2 (predictive capacity of the model) were evaluated.

R^2 and Q^2 were calculated by cross-validation. In cross-validation, the prediction capacity of the model is determined by developing a model with part of the data set (training set) and using another part of the data (test set) for testing the model. Both the training and test sets contain samples representative of each class. This procedure, consisting of model development and model testing, is repeated several times so that the samples will have the same probability of being used as the training and as the test sets [28]. The results were compared with the original data and the quadratic sum of errors, divided by the initial sum of squares, and subtracted from 1, affording the value of Q^2 on a scale comparable to that of R^2 [29].

8.2.5.4. Results and discussion

To study the isoflavone content of chickpeas, lentils and beans, all extractions were performed in triplicate and each replica was quantified in duplicate. Estimation of the content was carried out with the external calibration method.

Data were expressed as means \pm standard deviations ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$). The isoflavone profiles varied greatly among the species assayed, even among varieties from the same species. In all cases, the aglycone content found was higher than the corresponding glucosides. As an

example, the isoflavone compositions of the lentils analysed are shown in table 1.

- *Principal Component Analysis (PCA)*

Using the variables scaled with the Pareto mode, principal component analysis (PCA) models capable of classifying (among species, variety and ecotype) each class of legume based on its isoflavone content were constructed.

Figure 1 shows the PC2xPC1 score plot resulting from the application of PCA to the scaled results for chickpeas, lentils and beans respectively.

Figure 1.a-1 shows the PCA corresponding to chickpea samples, with a total explained variance >98% (R^2 (cum)) and a predictive capacity >85% (Q^2 (cum)). As can be seen, in figure 1.a-1 the chickpeas were denominated according to the label of the producer. Only the “Castellano”, “Pedrosillano” and “Blanco Lechoso” ecotypes were considered as such. The samples designated “Maragato”, “Gordo” or “Pico Pardal” can be considered to be from the “Pedrosillano” ecotype based on their isoflavone content and morphology. The sample denominated “Fuentesaúco” by the producer could be considered as being of the “Castellano” ecotype or the “Pedrosillano” ecotype, depending on the origin of sample and its isoflavone content. The same producer provided samples of different ecotypes and hence contamination among samples was possible. Figure 1.a-2 shows the PCA model generated taking into account only the three ecotypes studied. As can be seen, it was not possible to classify among the different ecotypes of the same variety of chickpeas, *macrocarpum*.

Figure 1.b-1 shows the PCA corresponding to the lentil samples, with a total explained variance >93% (R^2 (cum)) and a predictive capacity >85% (Q^2 (cum)). In this case, three different varieties of the same species (*Lens culinaris Medicus*) were analysed; *vulgaris*, *variabilis*, and *dupuyensis*. The samples were labelled with the label of the producer, “Rubia Castellana”, “Rubia de la Armuña”, “Pardina” and “Verdina”. Samples of unknown variety were identified considering the similarity

(colour and morphology) to those known and, as can be seen, nearly all the samples of the same variety lie very close on the score plot. “Rubia Castellana” and “Rubia de la Armuña” belong to the same variety, *vulgaris*, but their isoflavone contents are very different. The formononetin content in “Rubia de la Armuña” sample is greater than in the “Rubia Castellana” sample. Figure 1.b-2 shows the PCA model generated for lentil samples as a function to the three different varieties: *vulgaris*, *variabilis* and *dupuyensis*

Finally, the classification of the bean samples is shown in figure 1c. Figure 1.c-1 shows the PCA model corresponding to the bean samples labelled by the producer. As may be seen, two perfectly differentiated groups were found. These groups corresponded to two different species studied, *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus multiflorus*. Only two samples belonged to *Phaseolus multiflorus*, namely samples Gh and Jv. The other samples, belonging to *P. vulgaris*, can be classified in two subspecies: *nanus* and *volubilis*, as can be seen in fig 1.c-2. In this figure some samples- Rls, RI, Rvb and Rrg - belonging to the subspecies *nanus* are separated from the other samples of this subspecies; the isoflavone contents are also very different from those of the *volubilis* sample.

The later PLS-DA study carried out could improve the PCA classification.

- Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)

As mentioned above, a supervised technique -partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was conducted. This analysis allowed a more effective separation between classes, since the variables affecting the separation were known. Before PLS-DA, an HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) was carried out.

Analysis of the results confirmed the hypothesis made with PCA. For chickpea samples, a clear separation between “Blanco Lechoso” and the other two ecotypes, “Castellano” and “Pedrosillano”, was observed in HCA and PLS-DA. Figure 2a shows the results obtained.

In the case of lentil samples (Figure 2b), on analysing the results provided by HCA it was observed that the samples were classified in four groups. The results obtained with this supervised technique corroborated the discrimination between “Rubia de la Armuña” lentils and the rest of the samples, as in the principal component analysis. As mentioned above, this variety of lentils had a higher content of aglycones; specifically with regard to the formononetin content. The explanation for this is similar to that invoked for the case of the chickpeas, i.e., the isoflavone content, which was dependent upon the origin and producer of the sample. However, separation among groups was better in lentil samples than in chickpea samples.

Finally, linear discriminant analysis was applied to the bean samples. First, a clear separation between two species, *P. multiflorus* and *P. vulgaris*, can be observed in the dendrogram (Figure 2c). On analysing the results provided by the second branch of the dendrogram, classification in subspecies was possible (three in the case of *P. vulgaris*: *nanus*, *volubilis* and another unknown one). The samples denominated Rls, Rl, Rvb and Rrg were separated from the *nanus* and *volubilis*. Even though the producer had labelled these samples as var. “Riñon” (the *nanus* spp.), the isoflavone contents found were very different from those of this subspecies. The isoflavone content in biochanin-A was higher than in the rest of samples.

In light of the above it may be concluded that PLS-DA affords a better classification than the PCA model.

- Method validation

After generating the models, they were validated to check the reliability of the conclusions based on the information provided by them. For this, the parameters R^2 (total variance explained by the model) and Q^2 (predictive capability of the model) were evaluated with the permutation method using a “Scrambling” validation. The permutation method revealed that the high predictability of the models was not due to over-fitting of the data. Furthermore, as can be seen in Figure 3, the models were statistically valid since the Q^2 intercepts were

less than 0.05. The results obtained were (0.0, -0.245), (0.0, -0.425) and (0.0, -0.287) for chickpea, lentil and bean samples respectively.

8.2.5.5. Conclusions

The objective of this work was to classify different varieties of legumes according to their isoflavone contents. For this, the data on chromatographic peak areas were scaled using the Pareto mode. Unsupervised and supervised techniques such as PCA, HCA and PLS-DA were applied respectively.

In the case of the samples of lentils and beans, according to the results generated using PCA models it seems that the different species and varieties can be distinguished. By contrast, for chickpeas there is no discrimination among them, because that the samples analyzed are ecotypes of the same variety. Despite this, it has been described that the isoflavone content is influenced not only by the genotype of the species, but also by the origin of the samples, the agricultural practices used, or even the time of harvest. Using a PCA model allows a classification among species and varieties, but not of ecotypes.

The results afforded by PLS-DA corroborated the above. A clear separation among the three varieties of lentil samples was observed, including the separation between “Rubia de la Armuña” and “Rubia Castellana”, subvarieties from *Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris*. The case of the bean samples was similar. A differentiation between two species of beans was observed and a separation between the spp. *nanus* and spp. *volubilis* was observed.

The case of the chickpea samples was different. The separation of chickpea samples by PLS-DA was barely possible because the samples analysed were different ecotypes of the same variety, *macrocarpum*.

The relevance of this study is clear since the differences between pulses of a given variety based on its isoflavone content are corroborated.

8.2.5.6. Figures and tables

Table 1: Isoflavone content of lentil samples ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

	Daidzin	Glycitin	Genistin	Dadzein	Glycitein	Genistein	Formononetin	Biochanin-A
Al	1.32 ± 0.06	0.79 ± 0.01	0.51 ± 0.04	3.2 ± 0.4	4.4 ± 0.8	27 ± 1	15.2 ± 0.6	18 ± 1
Ald	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.12 ± 0.04	<i>nd</i>	5.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	<i>nd</i>
Ach	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3 ± 0.2	<i>nd</i>	1.2 ± 0.4
Li	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.4 ± 0.2	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Ps	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.6 ± 0.9	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Pl	0.17 ± 0.02	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.3 ± 0.1	<i>nd</i>	3.9 ± 0.9	0.9 ± 0.2	3 ± 0.2
Pv	0.43 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.25 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	7.0 ± 0.4	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.9
Pci	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.9 ± 0.2	<i>nd</i>	0.8 ± 0.4
Pba	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.09 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.9 ± 0.2	0.22 ± 0.02	1.0 ± 0.4
Pa	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.4 ± 0.2	0.18 ± 0.02	1.1 ± 0.4
Ph	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1.6 ± 0.4	<i>nd</i>	1.8 ± 0.9
Ca	<i>nd</i>	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.0 ± 0.2	1.17 ± 0.06	1.9 ± 0.4
Cv	0.086 ± 0.006	0.1 ± 0.01	0.18 ± 0.01	2.52 ± 0.09	<i>nd</i>	10.4 ± 0.4	4.64 ± 0.09	2.3 ± 0.4
Cci	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.28 ± 0.01	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2.6 ± 0.2	0.82 ± 0.06	3.1 ± 0.4
Vv	0.25 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	32.3 ± 0.9	8.4 ± 0.2	4.6 ± 0.9
Ea	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.4 ± 0.2	0.31 ± 0.06	<i>nd</i>
Rh	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	4.5 ± 0.2	0.38 ± 0.06	0.9 ± 0.4
Ec	<i>nd</i>	0.15 ± 0.004	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	7.4 ± 0.2	0.87 ± 0.06	1.1 ± 0.4
lh	0.15 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.06	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.1	1.9 ± 0.9
Lp	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.19 ± 0.02	0.28 ± 0.06	<i>nd</i>	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	<i>nd</i>

Figure 1 Principal component analysis of isoflavones contents of legume samples. A) Chickpeas; a-1) Samples denominated by label of manufacturer, a-2) Samples denominated by their ecotypes. B) Lentils, b-1) Samples denominated by label manufacturer, b-2) Samples denominated by their varieties. C) Beans, c-1) Samples denominated by label manufacturer. Blue circle and green circle were used to note *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus Multiflorus* species respectively. c-2) Samples denominated by their species and subspecies

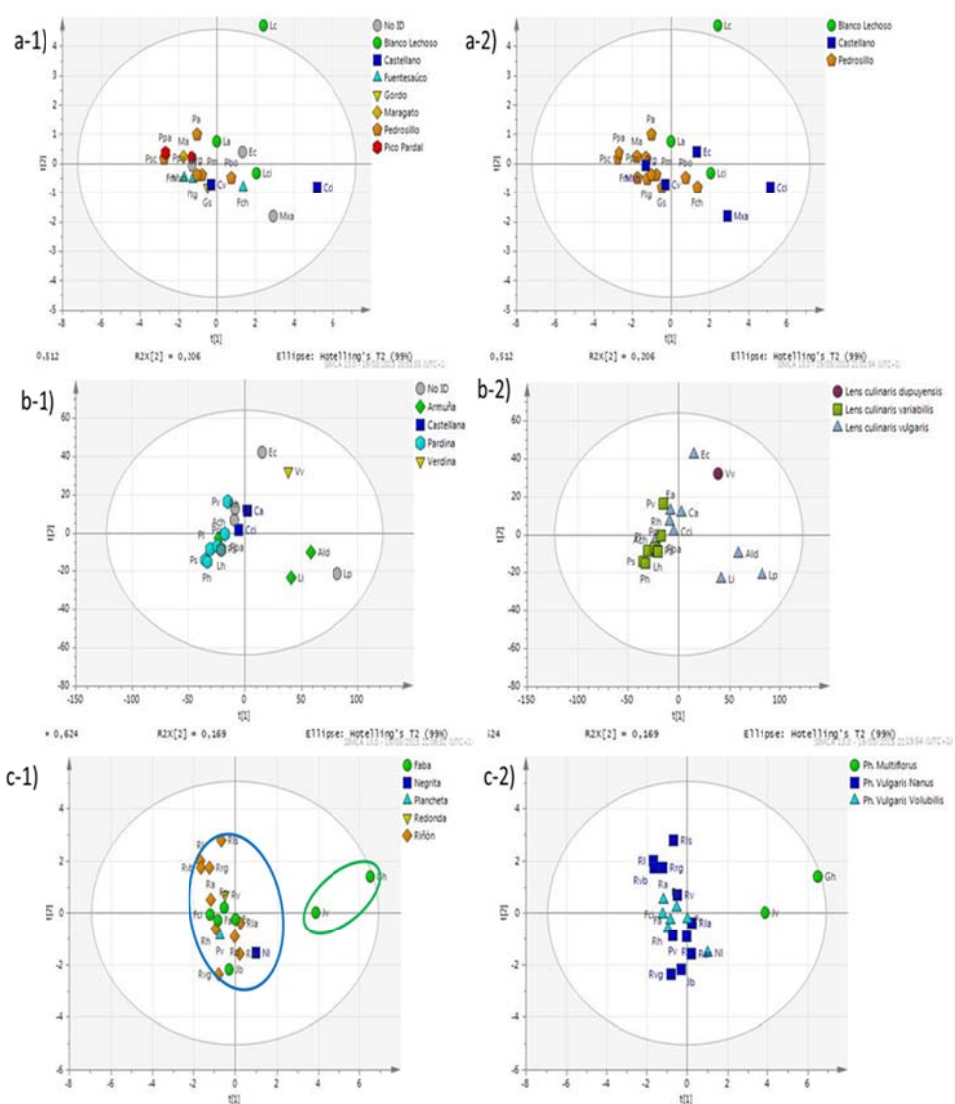


Figure 2 Hierarchical analysis cluster and Partial least squares discriminant analysis of isoflavones contents of legume samples. A) Chickpeas; Group 1: "Blanco Lechoso", Group 2: "Castellano", Group 3: "Pedrosillano" B) Lentils; Group 1: "Verdina", Group 2: "Rubia de la Armuña", Group 3: "Rubia Castellana", Group 4: "Pardina" C) Beans; Group 1: "Phaseolus Multigflorus", Group 2: "Unknown", Group 3: "Phaseolus vulgaris nanus", Group 4: "Phaseolus vulgaris volubilis"

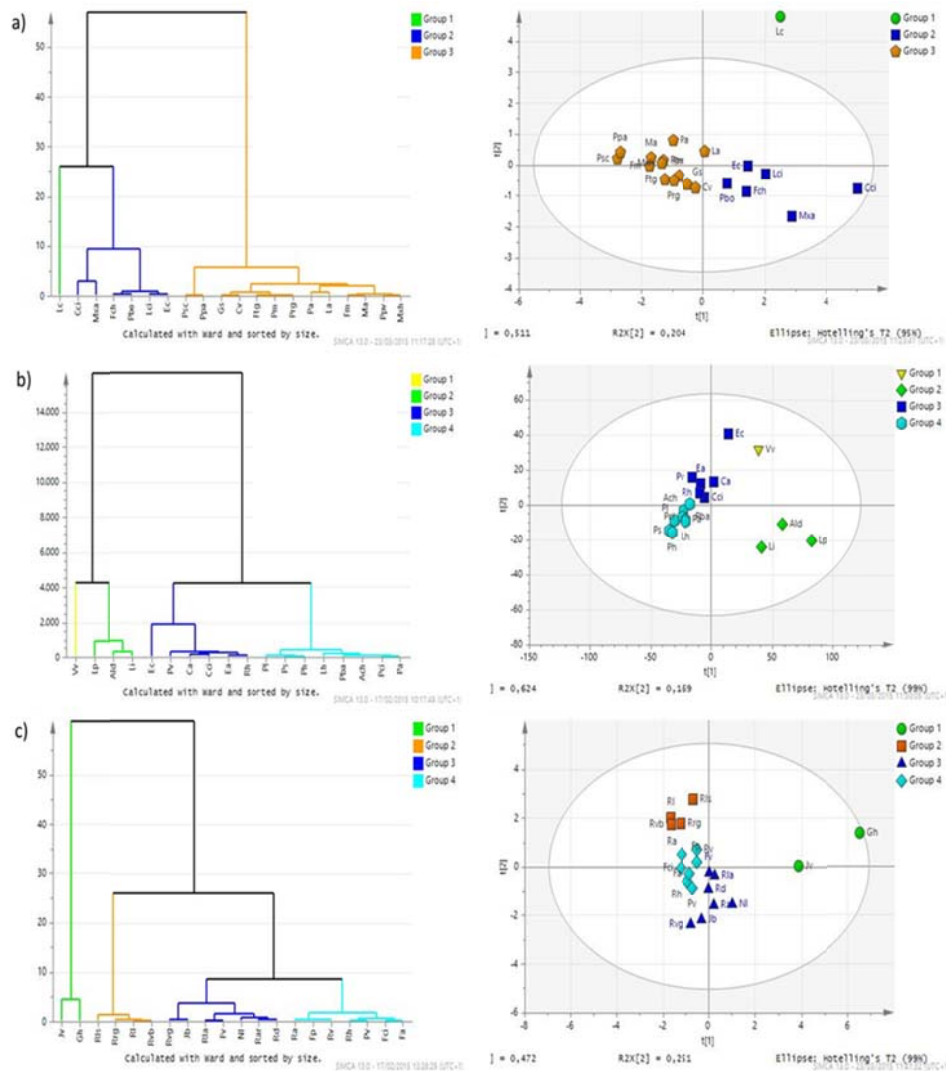
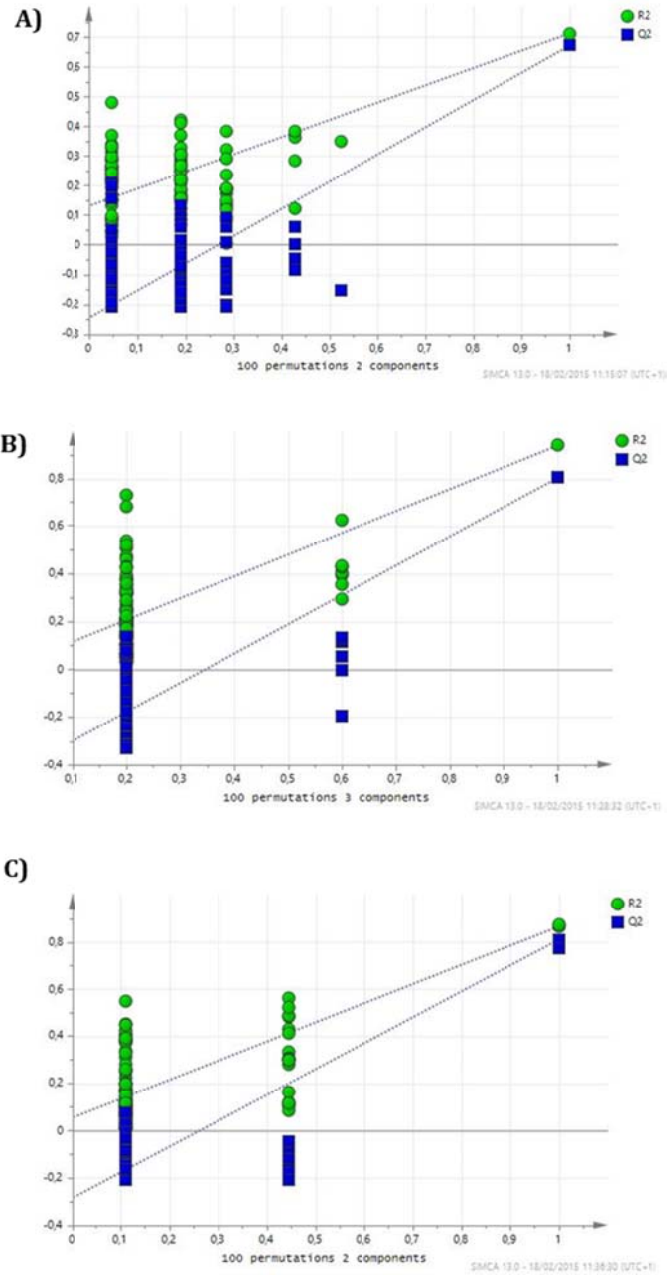


Figure 3: Scrambling validation of the model. A) Chickpeas, B) Lentils, C) Beans



8.2.5.7. References

- [1] W.M. Mazur, J.A. Duke, K. Wahala, S. Rasku, H. Adlercreutz; *Nutr. Biochem* 9 (1998) 193
- [2] A. Jacobs, U. Wegewitz, C. Sommerfeld, R. Grossklaus, A. Lampen; *Molec Nutr & Food Res.* 53 (2009) 1084
- [3] L.M. Martin, M.C. Castilho, M.I. Silveira, J.M. Abreau; *J. Liquid Chromatogr Rel Technol* 29 (2006) 2875
- [4] H. Adlercreutz, *Baill Clin. Endoc.* 12 (1998) 605
- [5] L.A. Fitzpatrick, L.A. *Endocrin. Metab. Clin.* 32 (2003) 233
- [6] M.F. McCarty, *Med. Hypotheses* 66 (2006) 1093
- [7] C.E Wood, T.C Register, A.A Franke, M.S Anthony, J.M Cline; *Cancer Res.* 66 (2006) 1241
- [8] C.S. Hwang, H.S. Kwak, H.J. Lim, S.H. Lee, Y.S. Kang, T.B. Choe, H.G. Hur, K.O. Han; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101 (2006) 246
- [9] A. Cassidy, P. Albertazzi, I.L. NielsenHall, G. Williamson, I. Tetens, S. Atkins, H. Cross, Y. Manios, A. Wolk, C. Steiner, F. Branca; *Proc. Nutr. Soc.* 65 (2006) 76
- [10] B.J. Trock, L. Hilakivi-Clarke, R. Clarke; *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 459
- [11] G. Rimbach, C. Boesch-Saadatmandi, J. Frank, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, W.L. Hall, P.D. Weinberg, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 1308
- [12] A. Cano, M.A. García-Pérez, J.J. Tarín, *Maturitas.* 67 (2010) 219
- [13] A.A. Ali, M.T. Velasquez, C.T. Hansen, A.I. Mohamed, S.J. Bhatena, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 583
- [14] C. Morris, J. Thorpe, L. Ambrosio, M. Santin; *J. Nutr.* 136 (2006) 1166
- [15] B.H. Arjmandi, B.J. Smith; *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 130

- [16] M. Raschke, K. Wähälä, B.L. Pool-Zobel; *J. Nutr.* 96 (2006) 426
- [17] G.E. Hale, C.L. Hughes, J.M. Cline; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3
- [18] V. Kumar, A. Rani, A.K. Dixit, D. Pratap, D.A. Bhatnagar; *Food Res Int* 43 (2010) 323
- [19] S.J. Lee, W. Yan, J.K. Ahn, I.M. Chung; *Field Crops Res* 81 (2003) 181
- [20] S.J. Lee, p. Seguin, J.J. Kim, H.I. Moond, H.M. Ro, E.H. Kim, S.H. Seo, E.Y. Kang, J.K. Ahn, I.M. Chung; *Food Compos Anal* 23 (2010) 160
- [21] T. Vamerali, G. Barion, m. Hewdy, G. Mosca; *Eur J Agron* 41 (2012)1
- [22] M.J. Morrison, E.R. Cober, M.F. Salem, N.B. McLaughlin, J.Frégeau-Reid, B.L. Ma, L. Woodrow; *Field Crops Res* 117 (2010) 113
- [23] M.M. Delgado-Zamarreño, L. Pérez-Martín, M. Bustamante-Rangel; *Talanta* 100 (2012) 320
- [24] M.M. Delgado-Zamarreño, L. Pérez-Martín, M. Bustamante-Rangel; *Phytochem Anal* 25 (2013) 170
- [25] R. Brereton; *Chemometrics for pattern recognition*; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 2009; pp 47-74.
- [26] J.E. Jackson; *A User's Guide to Principal Components*; Wiley: New York, NY, 2004; pp 4-25.
- [27] M. Sjostrom, S. Wold, B. Soderstrom; *PLS discriminant plots in pattern recognition in practice II*; E.S. Gelsema, L.N. Kanal, Elsevier: Amsterdam, Netherland, 1986; pp 486
- [28] L.A. Berrueta, R.M. Alonso-Salces, K. Héberger; *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 196
- [29] H. Wen, S.S. Yoo, J. Kang, H.G. Kim, J.S. Park, S. Jeong, J. Lee, H.N. Kwon, S. Kang, D.H. Lee, S. Park; *J. Hepatol.* 52 (2010) 228

8.3. CONCLUSIONS

The aim of this research has been achieved; i.e. the development of analytical methodologies to analyze isoflavones in matrices as complex as food, and to determine these substances in the form in which they are present naturally in vegetables widely consumed in Spain, although found in low concentrations and even at trace levels in some cases.

The optimized sample treatments are simple and compatible with subsequent determinations, which were performed with liquid chromatography and capillary electrophoresis, with detection by mass spectrometry. The separation and detection methods used were also optimized for each case.

Pressurized liquid extraction (PLE), which has found few applications in food analysis, is a type of extraction that is valid as sample treatment for isoflavones in legumes. The optimized extraction method stands out for its simplicity, not requiring any extract cleaning step prior to determination, and has the advantage of sample treatment automation, which makes the method highly suitable for routine treatment.

As is known, extraction with QuEChERS methodology has usually been employed as sample treatment in the analysis of pesticides and other contaminants in food. This work has shown that it is possible to use it to isolate analytes naturally present in samples, obtaining good results in their determination. It is also concluded that the manner of placing the extractant and the sample in contact affects the extraction efficiency. Using QuEChERS methodology, the extraction of isoflavones was carried out quickly, easily and efficiently, minimizing the consumption of solvents and the cost of the analyses.

For the determination of analytes, the coupling of both liquid chromatography and capillary electrophoresis with mass spectrometry has allowed highly sensitive and selective methods to be developed. Study of the fragmentation of the analytes of interest

allows the different transitions to be tracked, ensuring their identification with a high degree of reliability.

In general, it may be concluded that the methods developed are fast, sensitive and selective, and no tedious sample treatments are required. These methods have been validated using parameters such as recovery, repeatability and reproducibility, and can be applied in the routine analyses mandatory in food quality control.

More specifically it may be concluded that pressurized liquid extraction (PLE) allows extraction before the HPLC-DAD determination of isoflavones, with detection limits of 15-73 $\mu\text{g L}^{-1}$. The proposed methodology is easy to apply. There are no bibliographic references to this type of extraction for the determination of isoflavones in these legumes.

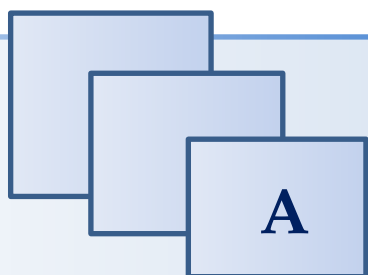
Regarding the extraction method by QuEChERS used here, this is able to simultaneously determine isoflavones in free and glucosylated form by applying two-step extraction with a decreased polarity of the extracting solvent. Elimination of the final cleaning step increases the speed and simplicity of the method. The determination of isoflavones by UHPLC-MS / MS detection limits yielded 0.7 - 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A subsequent study of the contact between sample and solvent allowed the performance characteristics of the method and its applicability in facilitating routine analysis to be improved. The most suitable stirring systems are a thermostatted tray and an ultrasound probe. The former allows the analysis of multiple samples simultaneously, which is of great interest when analyzing large numbers of samples. In case of samples of chickpeas and beans, both methods offer adequate results; however, better results were obtained in lentil samples with an ultrasound probe.

Besides chromatographic methods, a capillary electrophoresis-mass spectrometry method was developed for the determination of isoflavones. Comparison of the results obtained by LC-ESI-MS / MS and CE-ESI-MS allows us to conclude that there are no significant differences between these methodologies, both being similar in terms of precision, recovery and detection limits. However, it should be noted

that the CE-ESI-MS method is more suitable for the analysis of aglycones, while LC-ESI-MS / MS can be applied, and with better results, for the determination of both glycosides and aglycones.

The proposed methodologies were suitable for performing routine analysis of different types of legumes. Application of the QuEChERS-LC-MS/MS method to a large number of samples has allowed the classification of chickpeas, lentils and beans according to their isoflavone content, applying different multivariate analysis techniques (PCA, HCA, PLS-DA).

The statistical models proposed allowed the differentiation of lentil samples according to the three varieties under study, *Lens culinaris* Medicus var. *variabilis* *Lens culinaris* Medicus var. *dupuyensis* and *Lens culinaris* Medicus var. *vulgaris*, including different sub-varieties. In the case of the bean samples, the models allowed the differentiation of the species *Phaseolus multiflorus* and *Phaseolus vulgaris*, including the subspecies, *nanus* and *volubilis*. In the case of the chickpea samples, the tested samples were ecotypes of the same variety and hence the differentiation among classes with PLS-DA was barely possible. The proposed statistical models were validated, corroborating their robustness and quality.



**APÉNDICE:
ESPECTROS DE MS**

I. ESPECTROS DE MASAS. TRAMPA IÓNICA

Se muestran en este apéndice I los espectros de masas (MS) y de fragmentación de los diferentes compuestos estudiados en esta tesis.

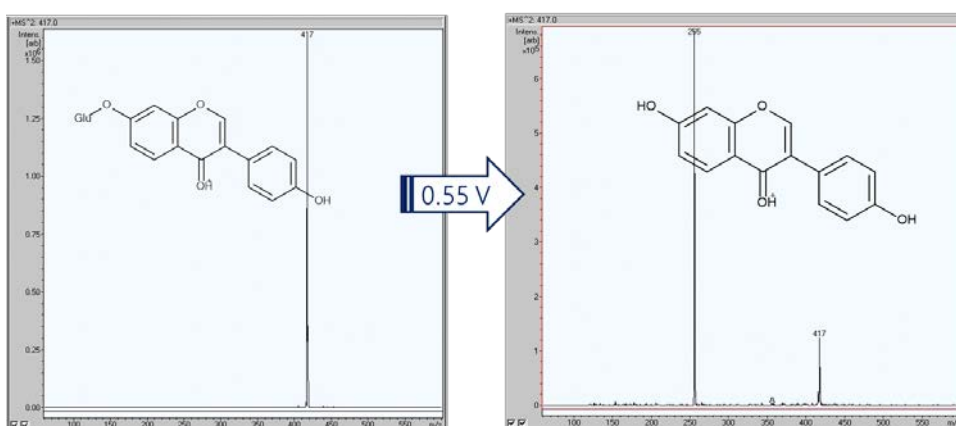
Para cada uno de ellos se encuentra, en la parte izquierda la señal obtenida en un barrido de masas simple (sin fragmentación). Se señala, en todos los casos, la estructura más probable del ión más abundante.

En la parte de la derecha, se muestra la señal obtenida en un barrido de iones producto correspondiente a la fragmentación del ion mayoritario en el barrido de masas simple (ion precursor). Se señala de nuevo, en todos los casos, la estructura más probable del ion producto.

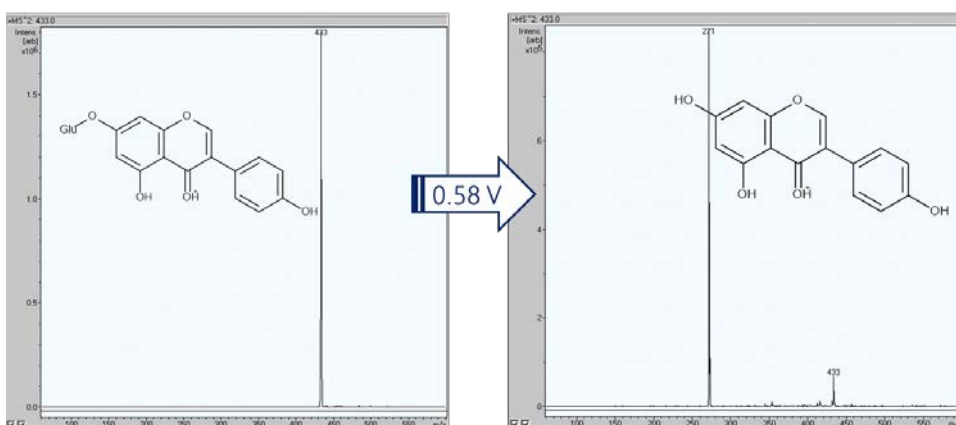
Las condiciones de trabajo fueron:

- ESI: modo positivo
- Voltaje del capilar: 3500 V
- Gas de secado: N₂
- Flujo de gas de secado: 11 mL min⁻¹
- Temperatura de gas de secado: 350 °C
- Presión de nebulización: 60 psi
- Voltaje de cono: 60 V
- Gas de fragmentación: He

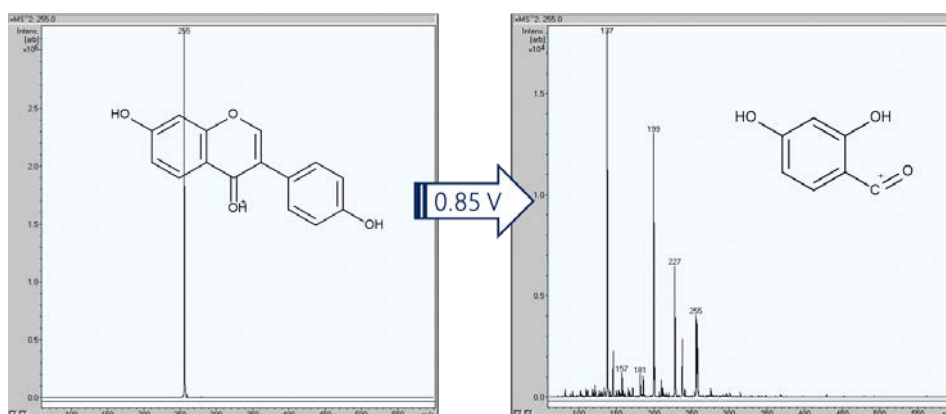
DAIDZINA (417,1 → 255,1)



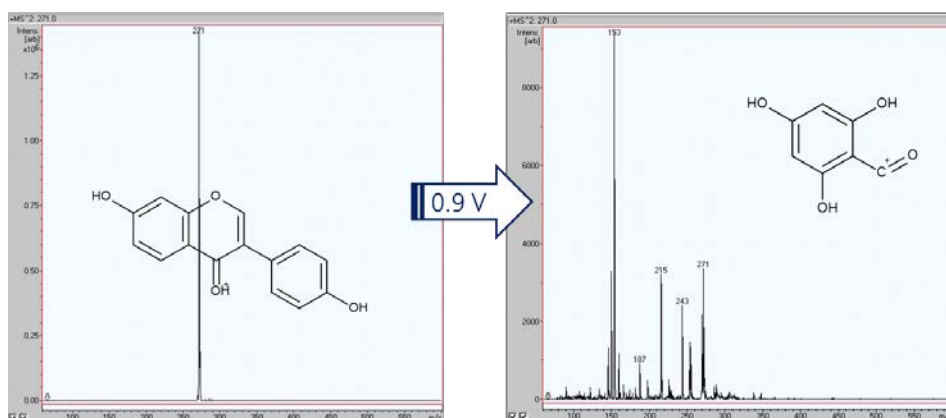
GENISTINA (433,1 → 271,1)



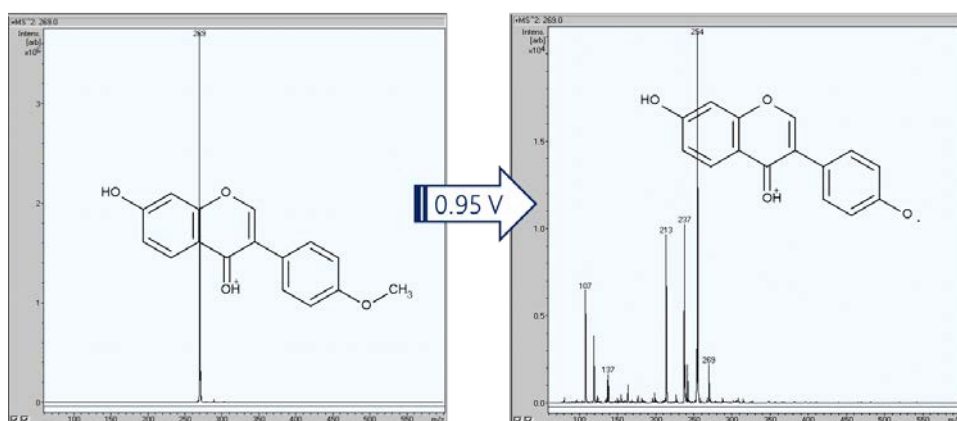
DAIDZEÍNA (255,1 → 137)



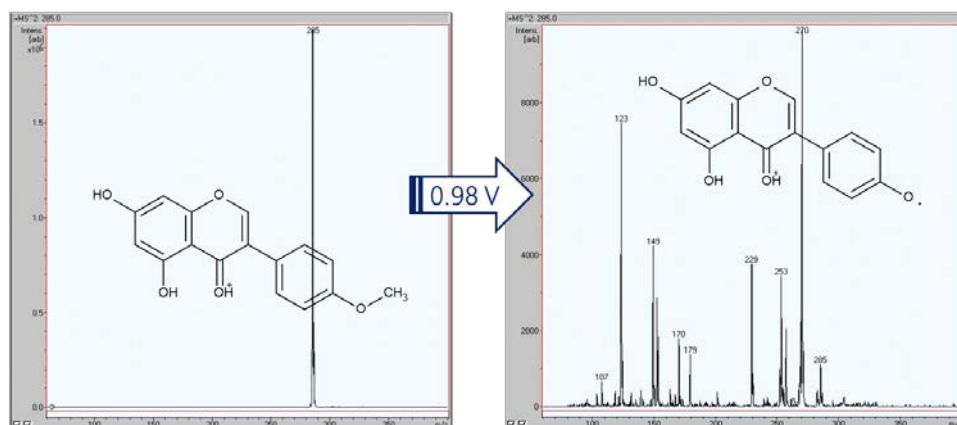
GENISTEÍNA (271,1 → 153)



FORMONONETINA (269,1 → 254)



BIOCHANINA – A (285,1 → 270)



II. ESPECTROS DE MASAS. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM.

Se muestran en este apéndice II los espectros de masas (MS) y de fragmentación de los diferentes compuestos estudiados en esta tesis.

Para cada uno de ellos se encuentra, en la parte izquierda la señal obtenida en un barrido de masas simple (sin fragmentación). Se señala, en todos los casos, la estructura más probable del ión más abundante.

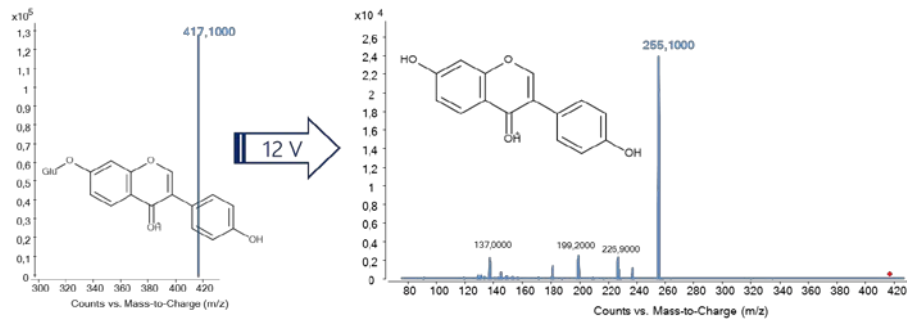
En la parte de la derecha, se muestra la señal obtenida en un barrido de iones producto correspondiente a la fragmentación del ion mayoritario en el barrido de masas simple (ion precursor). Se señala de nuevo, en todos los casos, la estructura más probable del ion producto.

Las condiciones de trabajo fueron:

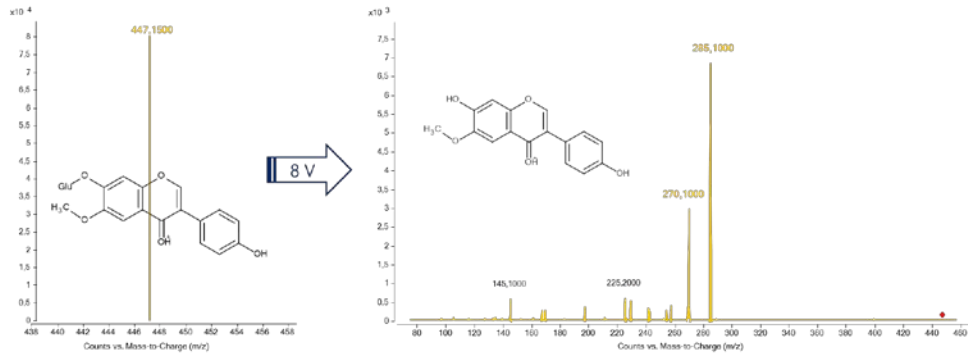
- ESI: modo positivo
- Voltaje del capilar: 3500 V
- Gas de secado: N₂
- Flujo de gas de secado: 12 mL min⁻¹
- Temperatura de gas de secado: 350 °C
- Presión de nebulización: 35 psi
- Voltaje de cono: 90 - 150 V
- Gas de fragmentación: N₂

APÉNDICE A: ESPECTROS DE MASAS

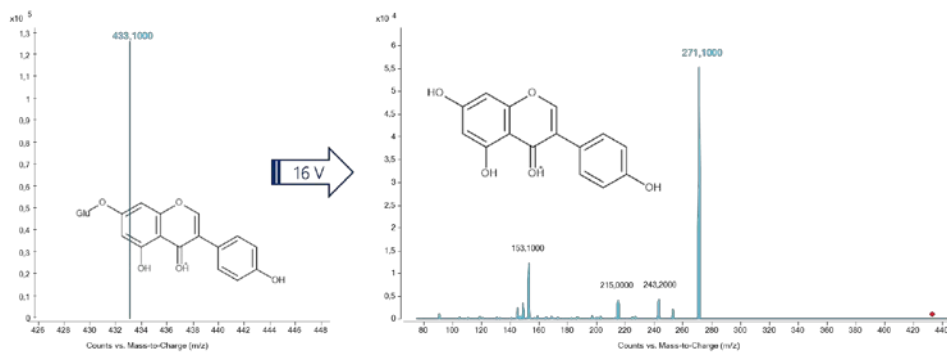
DAIDZINA (417,1 → 255,1)



GLICITINA (447,1 → 285,1)

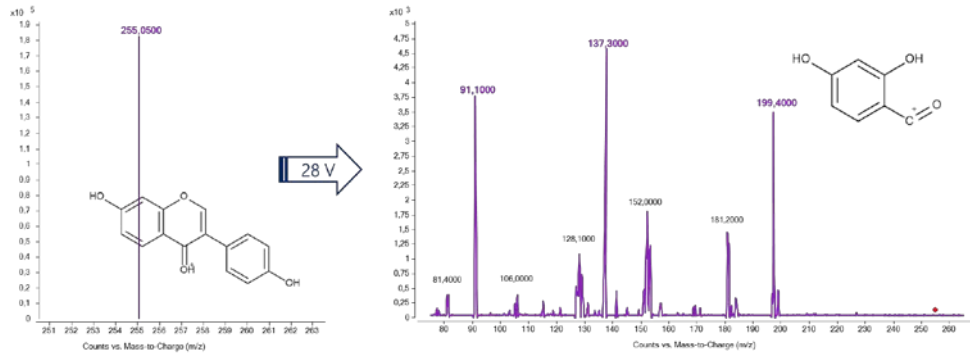


GENISTINA (433,1 → 271,1)

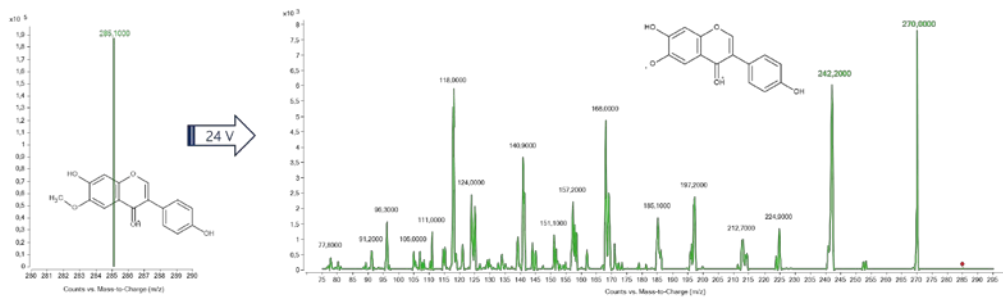


APÉNDICE A: ESPECTROS DE MASAS

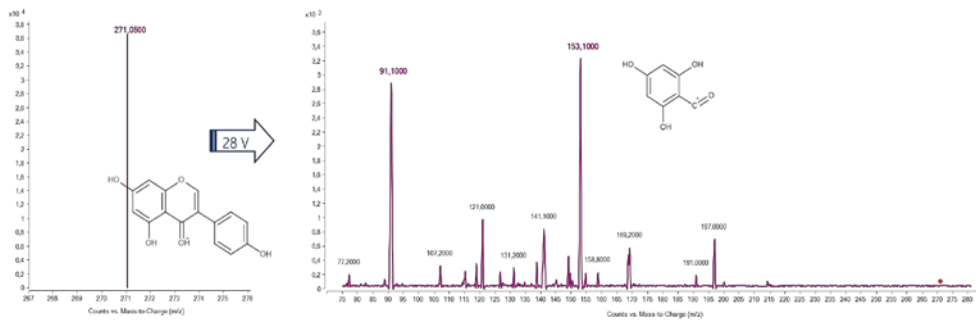
DAIDZEÍNA (255,1 → 137)



GLICITEÍNA (285,1 → 270)

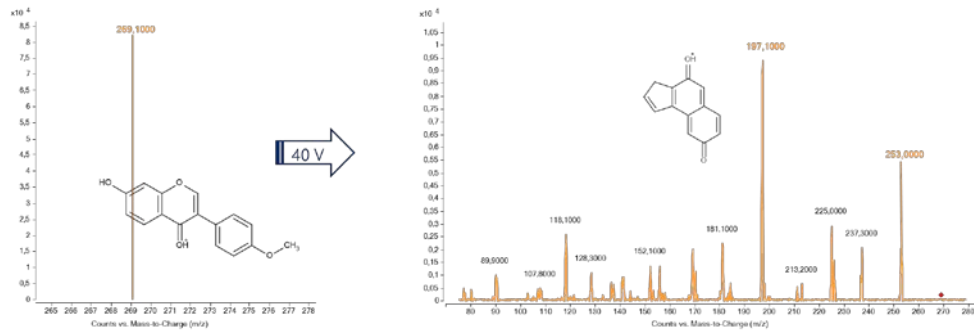


GENISTEÍNA (271,1 → 153)

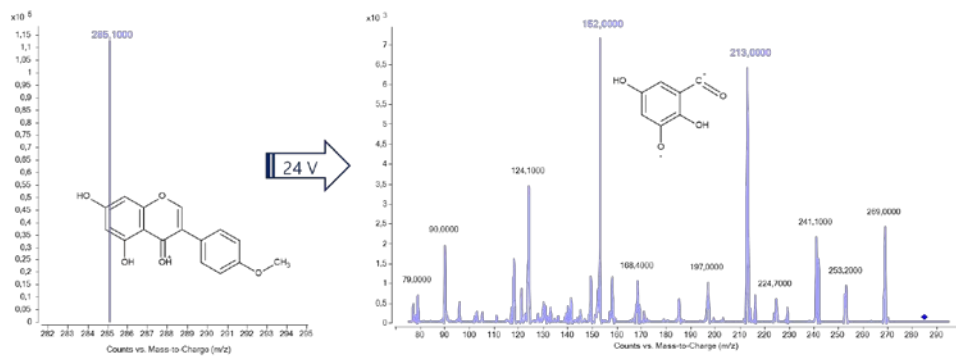


APÉNDICE A: ESPECTROS DE MASAS

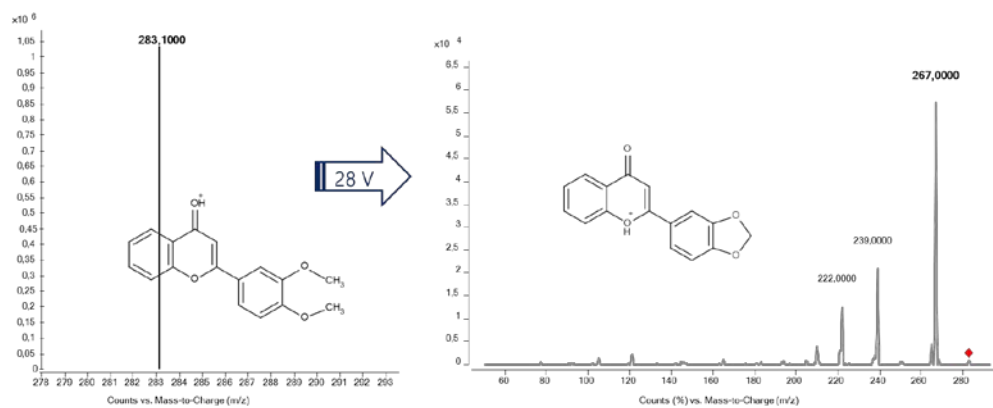
FORMONONETINA (269,1 → 197,1)



BIOCHANINA – A (285,1 → 152)

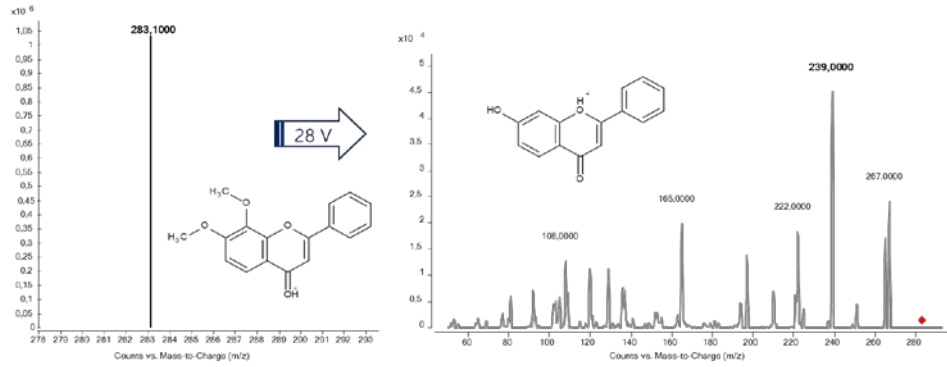


3',4'- DIMETOXIFLAVONA (283,1 → 267,1)

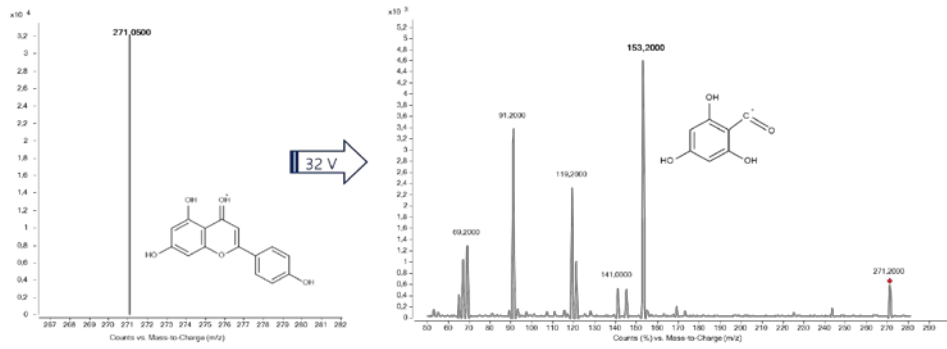


APÉNDICE A: ESPECTROS DE MASAS

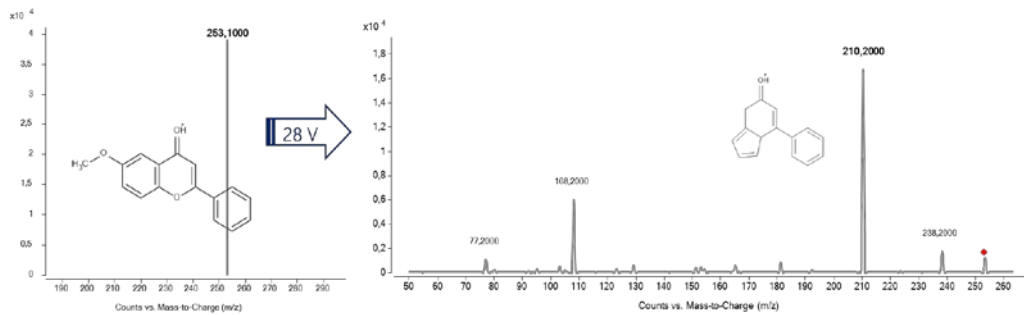
7,8 - DIMETOXIFLAVONA (283,1 → 239,1)

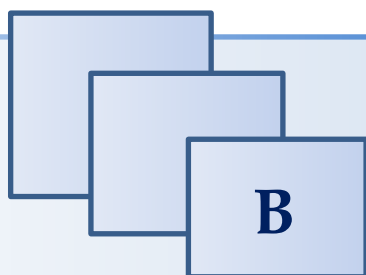


APIGENINA (271,1 → 153,2)



6 - METOXIFLAVONA (253,1 → 210,3)





**APÉNDICE: MENCIÓN
"DOCTORADO
INTERNACIONAL"**

Con la elaboración y defensa de esta Memoria de tesis se pretende optar a la obtención de la mención "Doctorado Internacional", al considerar que la doctoranda reúne los requisitos para optar a tal mención:

- La doctoranda ha realizado una estancia de tres meses en el Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg (Alemania) relacionada con la presente tesis.
- Esta memoria incluye un resumen en inglés, incluyendo objetivo y conclusiones.
- La tesis cuenta con los informes favorables de dos doctores expertos pertenecientes a instituciones de educación superior de la Unión Europea.
- Uno de los miembros que ha de formar parte del tribunal evaluador de la tesis es un experto perteneciente a una institución de educación superior de la Unión Europea.

Se incluyen, en este apéndice, los pertinentes informes favorables así como la certificación de la estancia breve.

DOCUMENTOS PARA LA ESTANCIA BREVE O TRASLADO TEMPORAL
ADMISIÓN EN EL CENTRO RECEPTOR DE LA ESTANCIA

1. Becario/ Applicant:
Nombre y apellidos/ Name: LARA PÉREZ MARTÍN
D.N.I./ National identity Card: 70894394 E
Centro de aplicación de la beca/ Home Institution: Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Salamanca
2. Centro en el que se realiza la estancia/ Host institution:
Nombre/ Name: University of Hamburg
Dirección/ Address: Grindelallee 117, 20146 Hamburg
Localidad/ Country: Germany
3. Investigador responsable en el centro / Person in charge of the Host institution:
Institución/ Institution: University of Hamburg, Institute of Food Chemistry
Nombre/ Name: Prof. Dr. Sascha ROHN
Cargo/ Post: Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany
CERTIFICO: que acepta al becario arriba mencionado durante la estancia en este centro durante las siguientes fechas: desde / / / hasta / /
THIS IS TO CERTIFY: that this Institution accepts the above mentioned applicant during his/her temporary stay in the following dates: from: 01/ June / 2013 to 31/ August / 2013
Lugar y fecha/ City and date: Hamburg, 28. February 2013
Firma y Sello/ Signature & Stamp

28.02.2013

UNIVERSITÄT HAMBURG
Institut für Lebensmittelchemie
Grindelallee 117
20146 Hamburg



UHH – Hamburg School of Food Science
Grindelallee 117 · 20146 Hamburg, GERMANY

**Fakultät für
Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften**

Prof. Dr. rer.nat. habil. Sascha Rohn

Hamburg School of Food Science

Institute of Food Chemistry

Grindelallee 117

20146 Hamburg, GERMANY

Tel. +49 (0)40 - 42838 - 7979

Fax +49 (0)40 - 42838 - 9185

rohn@chemie.uni-hamburg.de

www.chemie.uni-hamburg.de/lc

25.08.2013

Letter of Recommendation – Research stay in Hamburg Ms. Lara Pérez Martín

This letter serves to confirm that Ms. Lara Pérez Martín from the University of Salamanca was employed as a student apprentice in the Department of Food Analysis. She worked with us from June until September, 2013.

During her time with us Ms. Pérez Martín dealt with the establishment of a High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) method used for the analysis of saponins from different legume varieties. Due to her good knowledge in chromatography, she optimized the sample preparation, the separation of standard mixtures and extracts, allowing a qualitative and quantitative determination of the saponins present in peas and chickpeas.

It has been a pleasure to have Ms Pérez Martín working for us. She has performed all tasks to our complete satisfaction. She used initiative and has been much liked by his fellow workers. Her cooperative personality and wide background in Food Chemistry and Analysis make her a desirable person in any kind of activity, so that we have no hesitation in recommending her.

Yours sincerely,


UNIVERSITÄT HAMBURG
Institut für Lebensmittelchemie
Grindelallee 117
20146 Hamburg

Sascha Rohn



PhD REPORT

The main purpose of the manuscript presented by Lara Pérez Martín in order to obtain the *PhD degree with International Mention* entitled: ‘*Development of Analytical Methodologies for the Analysis of Isoflavones in Legumes*’ is to develop new analytical methodologies to determine isoflavones in legumes, such as chickpeas, lentils and beans.

This work has a great potential value for the field of isoflavones analysis in food. The experiments were well designed and correctly carried out, and great new information is provided. The literature review is very thorough and the analytical approach is very good. The overall scientific quality of the results is very high, as can be seen in the number and quality of scientific articles published by the applicant.

The manuscript is divided into eight different parts containing a general introduction, an objective and the description of the experimental part. The results and discussion are shown in the chapter four and five. Chapter four contains the published papers:

- *Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses*
- *A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*
- *Comparative study of the methodology used in the extraction of isoflavones from legumes applying a modified QuEChERS approach*
- *Determination of isoflavones in legumes by QuEChERS-capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*

APÉNDICE B: MENCIÓN "DOCTORADO INTERNACIONAL"

Chapters five and six are focused in the classification of the legumes depending on their amount of isoflavones and in the effect of the different 'cooking' treatments in the amount of isoflavones, respectively. Finally, chapter seven shows the most important conclusions and chapter eight summarizes this wide and completed study.

This work shows adequate methodologies to extract, characterize and quantify isoflavones in different cultivars of chickpeas, lentils and beans and therefore serves to perform the routine analysis of different types of legumes.

From my point of view, this dissertation has the scientific level more than enough for its presentation and defense in order to obtain the *PhD degree with International Mention*.

Porto, June 9, 2015



PhD Raúl Ferrer Gallego

*Research from Department of Chemistry and Biochemistry
Faculty Science
University of Porto*



09-June-2015

Statement over the PhD thesis entitled:

"Development of the analytical methodologies for the analysis of isoflavones in legumes"

presented by Lara Pérez Martín, University of Salamanca.

The PhD thesis reviewed here consists of seven chapters, being the first chapter the general aim of the thesis and the final one the conclusions. Aims were well-defined and cutting edge science, bearing in mind the importance of bioactive compounds in human health. The isoflavones studied in this thesis are phytochemicals of great interest because of their association with a large variety of positive effects in human health. The determination of these compounds in legume samples such as chickpeas, lentils and beans is very interesting because previous literature is scarce.

Lara Pérez Martín has developed modern analytical techniques and sample treatment methods that will certainly make the analysis of foodstuff less tedious and time-consuming, improving the efficiency of the whole process regarding separation, identification and quantification. Analytical techniques such as High-Performance Liquid Chromatography, (HPLC) and Capillary Electrophoresis (CE), both coupled with mass spectrometry, were investigated and compared. The use of the methods developed in practical analytical work shows the importance of combining method development with practical application.

The thesis is well written and the content is well organized and logically presented. Moreover, the results obtained are successful and have yielded four scientific articles published in analytical journals listed in the ISI index, that could be extended by a fifth article that has been recently submitted.

In view of the quality of the work presented and the possible advantages in the field of food chemistry of the methodologies proposed, I strongly propose this thesis to be accepted in the context of the International PhD Programme of the University of Salamanca.

Marco Migliore, PhD
IIT-Senior PostDoc -Medicinal Chemistry
D3-Drug Discovery and Development Department
Via Morego, 30
16163 Genova Italy
Phone:+39 010 71781932
<mailto:marco.migliore@iit.it>

