

Métodos analíticos para determinação de isoflavonas em matrizes complexas

Analytical methods for determination of isoflavones in complex matrices

**Luis Felipe da Silva; Marcela
Jordan-Sinisterra; Fernando
Mauro Lanças***

Universidade de São Paulo – USP

Instituto de Química de São Carlos,
CEP 13.560-970, São Carlos, SP, Brasil

*flancas@iqsc.usp.br

Resumo

As isoflavonas formam uma importante subclasse dos fitoestrógenos. Encontradas em todo o reino vegetal, estão diariamente presentes em nossa alimentação e são associadas a diversos benefícios à saúde humana, como prevenção de doenças cardiovasculares e de câncer de mama. Esses fatores despertaram o interesse da comunidade científica, ocasionando um expressivo aumento no número de publicações relacionadas a estes compostos nas últimas duas décadas. Este trabalho traz uma visão geral das técnicas de preparo de amostra; técnicas cromatográficas e eletroforéticas de separação; e técnicas de detecção acopladas, assim como suas aplicações em análises de isoflavonas nas mais diversas matrizes, desde 2010 até 2018. São relatados trabalhos de análises de isoflavonas em soja, produtos comerciais derivados de soja, leite bovino, urina, plasma, água e outros. Dentre as técnicas de preparo de amostra destacam-se os trabalhos com LLE, SLE, SPE, QuEChERS, MSPD SPME e MEPS. O uso de técnicas clássicas de preparo de amostra ainda é o mais comum; mesmo com micro técnicas já bem desenvolvidas como a SPME e a MEPS, o uso destas ainda é escasso limitando-se, principalmente, à trabalhos de desenvolvimento analítico. Dentre as técnicas de separação, as cromatográfica, como a HPLC, UHPLC e GC são destaque; as técnicas eletroforéticas também encontram aplicações na área. Dentre os detectores mais empregados estão os espectrômetros massas e os espectrofotômetros na região UV-Vis, respectivamente.

Palavras chaves: isoflavonas, matrizes complexas, métodos analíticos, preparo de amostra, técnicas de separação.

Abstract

Isoflavones are an important subclass of phytoestrogens. They are throughout the plant kingdom, often present in our diet and are associated with several benefits to human health, such as prevention of cardiovascular diseases and breast cancer. These factors have aroused the interest of the scientific community, causing a significant increase in the number of publications related to these compounds in the last two decades. In this work we present an overview on sample preparation techniques, chromatographic separation techniques, and chromatography coupled to different detection techniques applied to the analysis of isoflavones in several matrices, from 2010 to the present days. Studies have reported on the analysis of isoflavones in soybean, soy derivatives, bovine milk, urine, plasma, water and others. Among the sample preparation techniques, there are reports involving LLE, SLE, SPE, QuEChERS, MSPD SPME and MEPS. Classical sample preparation techniques are often used. There are well-developed micro-techniques such as SPME and MEPS, however their use in sample preparation aiming to determine isoflavones is very limited, practically restricted to analytical development studies. Among the chromatographic techniques HPLC, UHPLC and GC are the most popular ones, being followed by the electrophoretic techniques. The most common detectors in this analytical niche are mass spectrometers and UV-Vis spectrophotometers, respectively.

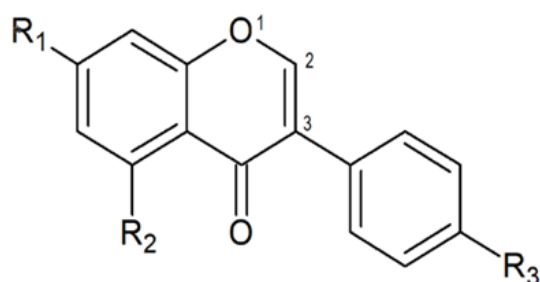
Keywords: isoflavones, complex matrices, analytical methods, sample preparation, separation techniques.

1. Introdução

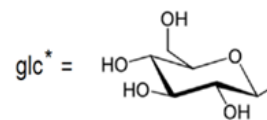
Fitoestrógenos são metabólitos secundários de plantas não esteroides, biologicamente ativos, os quais possuem estrutura química semelhante à do estradiol, ou seja, propriedades semelhantes a hormônios sexuais femininos endógenos, o que possibilita que se liguem a receptores de estrogênio exercendo efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos (1,2). Vários benefícios à saúde tem sido atribuídos aos fitoestrógenos e em regiões do mundo onde se pratica dietas conhecidas como dieta mediterrânea a incidência de doenças como câncer e doenças cardiovasculares é menor do que em regiões onde a dieta é rica em gorduras e proteínas (3). Entretanto, há trabalhos que relatam que os efeitos benéficos à saúde, proporcionados pelos fitoestrógenos, somente ficam evidentes em exposição à doses elevadas, sendo que em doses baixas estes compostos acabam realizando função contrária ao esperado e gerando malefícios à saúde,

tal como o câncer de mama (4,5). Contudo, os estudos associados à saúde humana parecem ainda controversos e inconclusivos (6).

Dentre os fitoestrógenos, os flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas, antocianidinas, auronas, chalconas e isoflavonas entre outros) formam uma importante classe de substâncias naturais encontradas em frutas, legumes, grãos, casca, raízes, caules e flores em todo o reino vegetal. Possuem ação antioxidante e propriedades que previnem inflamações, aterosclerose, trombose, osteoporose, infecções virais, tumores e doenças cardiovasculares (7,8). A estrutura química básica dos flavonóides inclui um polifenol formado por um anel aromático e um anel heterocíclico condensados, mais um anel aromático ligado ao anel heterocíclico, onde o grau de oxidação do anel heterocíclico difere as subclasses (9). Por exemplo, para as isoflavonas o anel aromático se liga ao anel heterocíclico na posição 3, tal como mostrado na Figura 1.



Exemplos:	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzeína	OH	--	OH
Daidzina	Oglc*	--	OH
Genisteína	OH	OH	OH
Genistina	Oglc*	OH	OH
Formononetina	OH	--	OCH ₃
Biochanina A	OH	OH	OCH ₃



-- corresponde a H

Figura 1. Estrutura básica para as isoflavonas, formada por um anel aromático e um anel heterocíclico condensados mais um anel aromático ligado ao anel heterocíclico na posição 3.

As isoflavonas formam a mais importante subclasse dos fitoestrógenos. São encontradas mais facilmente em leguminosas como soja, feijão, grão de bico e sementes de girassol, atuando na proteção contra fungos, herbívoros, radiação ultravioleta e na regulação hormonal (10). Encontradas em uma grande variedade de plantas e grãos, as isoflavonas estão frequentemente presentes em nossa dieta,

possibilitando potenciais benefícios para a saúde humana, tal como diminuição do risco de câncer (11,12), prevenção de obesidade e diabetes (2), doenças cardiovasculares (13), osteoporose (14) e diminuição dos sintomas da menopausa (15).

Nos vegetais, as isoflavonas estão presentes na forma inativa como glicosídeos (ex: daidzina e genistina)

e quando ingeridos são hidrolisados no intestino e convertidos em agliconas (ex: daidzeína e genisteína), agora bioativas, e que são absorvida mais facilmente pelo organismo no intestino, conjugadas à glicuronídeos no fígado, e reabsorvidas ou excretadas na urina. As isoflavonas daidzeína, genisteína e equol são as principais isoflavonas detectadas no sangue e na urina de humanos e animais (2,16).

Os benefícios à saúde associados às isoflavonas aumentou o interesse da sociedade científica para estes compostos. Nas duas últimas décadas é notável o aumento no número de publicações e de citações relacionadas às isoflavonas. Uma rápida busca de publicações nas bases de dados, em língua inglesa, empregando o termo isoflavonas, mostra um aumento expressivo do número de publicações e citações de 1999 até 2018 (Figura 2).

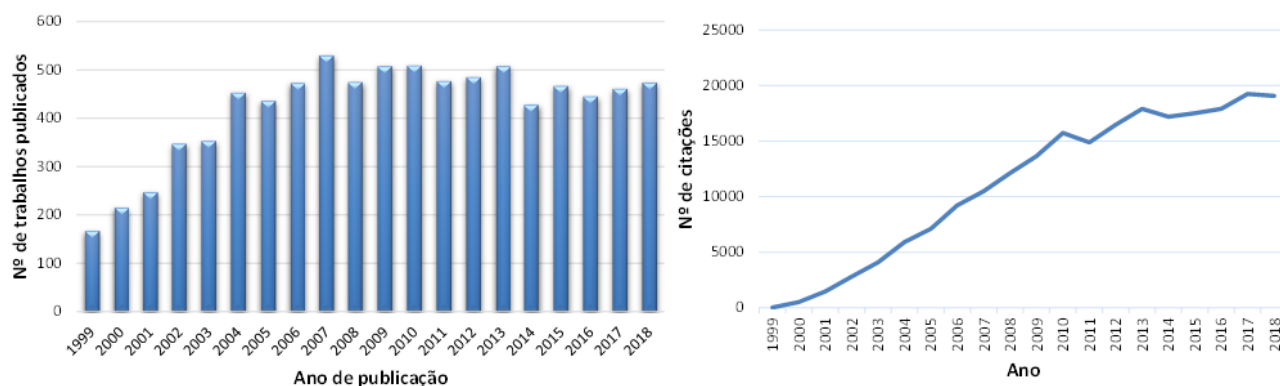


Figura 2. Distribuição do número de artigos publicados e citações sobre isoflavonas em função do tempo. Fonte dos dados: Web of Science.

O interesse pelas isoflavonas se espalha por diversas áreas, como farmacologia, nutrição, química, genética e outras. A figura 3 mostra a porcentagem da distribuição dos trabalhos publicados sobre isoflavonas nos últimos 20 anos nas áreas com maior número de trabalhos. O aumento geral do interesse pelas isoflavonas pode ser associado ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas, tanto de separação e detecção quanto de preparo de amostras.

Este trabalho tem como objetivo proporcionar uma visão geral da literatura desde 2010 até os dias atuais envolvendo as principais técnicas analíticas empregadas em análises de isoflavonas nas mais diversas matrizes, com ênfase nas técnicas cromatográficas.

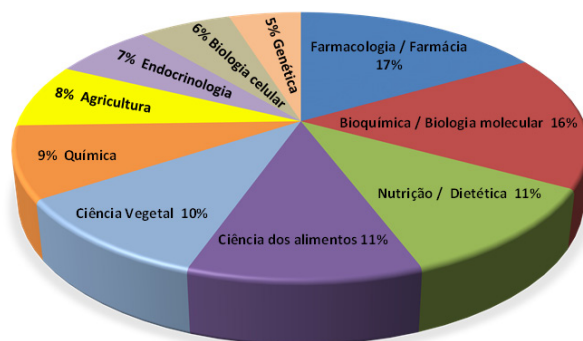


Figura 3. Distribuição dos artigos sobre isoflavonas nas diferentes áreas de aplicação. Fonte dos dados: Web of Science.

2. Preparo De Amostras Para Análise De Isoflavonas

O preparo de amostra é uma etapa importante para qualquer método analítico, pois está diretamente ligado à confiabilidade e precisão do mesmo. É comum nas técnicas mais usuais nos depararmos com etapas de secagem, homogeneização, extração, eliminação de interferentes (*clean-up*), pré-concentração, re-suspensão, etc. Levando em consideração a natureza da matriz e as propriedades químicas e físico-químicas dos analitos é um requisito básico para se obter sucesso na escolha da técnica de preparo de amostra e das condições mais adequadas para cada caso. Para análises de isoflavonas, técnicas mais convencionais como extração líquido-líquido e sólido-líquido são, de longe, as mais aplicadas. No entanto, com o desenvolvimento de novas técnicas, a busca por métodos cada vez mais rápidos, mais eficientes, confiáveis, precisos, que consumam menos tempo e solventes, específicos e seletivos, resultou em uma ampla gama de técnicas de preparo de amostra aplicáveis à extração de isoflavonas em matrizes complexas.

Podemos dividir as matrizes contendo isoflavonas em duas categorias principais, sendo elas as de origem vegetal como soja e seus produtos, e matrizes biológicas como urina, sangue e plasma. Dentro da categoria de matrizes vegetais ainda podemos ter amostras sólidas, como grãos e folhas, e amostras líquidas de produtos derivados, como leite e sucos à base de soja. As técnicas de preparo de amostra também podem ser divididas em três grupos: clássicas, intermediárias e micro técnicas. A seguir serão abordados aspectos técnicos sobre a etapa de preparo de amostra e sua aplicação em análises de isoflavonas.

2.1. Técnicas clássicas

Para amostras sólidas, como grãos, folhas e raízes a técnica de preparo de amostra mais usual é a extração com solventes orgânicos como metanol, etanol, acetonitrila, acetona e diclorometano, puros ou em soluções aquosas (17–

24). É um processo relativamente simples, onde a amostra sólida é picada ou moída, para aumentar a superfície de contato e, também, facilitar a interação entre os analitos e o solvente de extração. É deixada por um determinado tempo em repouso ou agitação à uma certa temperatura (variações do método que influenciam no processo de extração) e, em alguns casos, se faz o uso de ultrassom. Variáveis como temperatura, tempo de extração, polaridade e volume do solvente e natureza da amostra afetam a eficiência do processo. Entretanto este procedimento de extração usualmente envolve muitas etapas, tais como centrifugação, diversas filtrações, secagem e resuspensão, resultando em um processo bastante demorado que pode custar dias de trabalho para o preparo de uma única amostra (18,25,26).

A extração sólido-líquido (SLE), e suas variações, permite obter-se bom rendimento (27) e, quando combinada com separação cromatográfica empregando-se HPLC com detecção UV-vis, o método apresenta precisão, linearidade, seletividade, limite de detecção (LD) por volta de 0.3 mg L⁻¹ e limite de quantificação (LQ) por volta de 1 mg L⁻¹ (28). Porém, o uso de grandes volumes de solvente e a lentidão do processo são desvantagens do método.

Diversas modificações podem ser feitas na extração sólido-líquido para aumentar a eficiência da extração, tal como o uso de micro-ondas. Lee e Choung (26) relataram o uso de micro-ondas para assistir a hidrólise de isoflavonas, favorecendo a análise de isoflavonas totais em alimentos, com aumento de eficiência da extração, diminuição no uso de solventes e no tempo de extração.

A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica clássica e versátil de preparo de amostras, sendo indicada por muitos órgãos reguladores. Porém, a LLE convencional utiliza grandes quantidades de solventes, expondo o analista e gerando muitos resíduos potencialmente tóxicos. Por envolver várias etapas, também é considerada uma operação demorada e tediosa, podendo ocasionar contaminação e perda de analitos durante o processo (29).

Esta técnica de preparo de amostra consiste basicamente em preparar uma mistura com a amostra e

um solvente, agitar, separar as fases por decantação ou centrifugação, coletar a fase de interesse e analisar. Estas etapas ainda podem ser modificadas ou complementadas com uso de ultrassom, adição de sais, uso de misturas diversificadas e etapas de filtração para melhor rendimento e diminuição de tempo, por exemplo (20,27,30–33).

Há trabalhos que se utilizam desta técnica para análises de isoflavonas em amostras comerciais de leite

de soja (33), iogurtes e leite bovino (34), em urina (35) e plasma (36). A Tabela 1 mostra alguns trabalhos que utilizam LLE como etapa de preparo de amostra em análises de isoflavonas que relatam métodos com limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na faixa de ng mL^{-1} e pg mL^{-1} , com boa recuperação, alta sensibilidade, especificidade e precisão.

Tabela 1. Trabalhos publicados utilizando LLE como técnica de preparo de amostra para análise de isoflavonas

Autores	Ano	Matriz	Técnica de análise	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})	Recuperação (%)
KUNISUE et al. (35)	2010	Urina	HPLC - MS/MS (Triplo quadrupolo)	0.15 - 0.84	----	96.7 - 115
MA et al. (36)	2012	Plasma de rato	UPLC - Q-TOF-MS	0.5	1	média de 77.21 ± 1.63
PARK; JUNG. (33)	2017	Leite de soja	HPLC - MS/MS (Triplo quadrupolo)	0.001 - 0.03	0.004 - 0.099	89.4 - 103.2
KAŠPAROVSKÁ et al. (34)	2017	Leite e derivados	HPLC-MS (TOF)	0.3 - 0.7	0.9-2.2	103 - 109
YAO et al. (37)	2018	Plasma	HPLC - MS/MS (Triplo quadrupolo)	----	0.1-0.4	85.7 - 100.2

---- Os autores não relataram nenhum resultado

2.2. Técnicas semi-clássicas

A extração em fase sólida, mais conhecida como SPE - sigla proveniente do inglês *solid-phase extraction* - foi desenvolvida em 1976 com o intuito de suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido. Ainda hoje é a técnica de preparo de amostra mais popular, sendo aplicada em diversas áreas tais como na indústria alimentícia, farmacêutica, meio ambiente, em bioquímica e química orgânica (38,39).

São relatados vários trabalhos utilizando SPE como técnica de preparo de amostras para a análise de

isoflavonas em amostras de plasma humano (40–42), urina de humanos (43,44), plasma de ratos (45) e em água (46). A Tabela 2 mostra alguns dados dos métodos empregados para análise de isoflavonas que utilizam SPE para o preparo de amostra. Os métodos apresentam alta sensibilidade, seletividade, precisão e boa recuperação. O uso de fases extratoras baseadas em octadecilsilano (C18) são as mais comuns (44), porém a fase extratora Oasis HLB é também muito empregada. Este copolímero hidrofílico-lipofílico balanceado de fase reversa, desenvolvido para extrair compostos ácidos, básicos e neutros, se mostra

muito eficiente no *clean-up* de matrizes complexas e na recuperação dos analitos. Para análises de isoflavonas,

a fase extratora Oasis HLB permite a eliminação dos interferentes mais comuns, como açúcares e lipídios (47).

Tabela 2. Trabalhos publicados utilizando SPE como técnica de preparo de amostra para análise de isoflavonas.

Autores	Ano	Matriz	Técnica de análise	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Fase extratora
HOSODA; FURUTA; ISHII. (40)	2010	Plasma humano	HPLC-UV (DAD)	7.9-9.4	21.1-23.4	76.6% - 109.4	Oasis HLB
SARACINO; RAGGI. (41)	2010	Plasma humano	HPLC-ESA (ESA Coulochem III)	0.008 - 0.15	0.25 - 0.5	>90.0	Oasis HLB
BARANOWSKA; MAGIERA; BARANOWSKI. (43)	2011	Urina de humano	HPLC-UV	10.7 - 78.6	32.2 - 235.9	70.14 - 99.85	Oasis HLB
LI et al.(45)	2013	Plasma de rato	HPLC-MS	0.17	0.51	89.36±3.49 - 98.90±5.21	Zorbax SB-C18
RODRIGUEZ-MORATO et al. (42)	2015	Plasma humano	HPLC - MS/MS (Tripto quadrupolo)	0.6 - 1	5	79 - 86.2	Oasis MAX
REDRUELLO et al. (44)	2015	Urina de humano	UHPLC-PDA-FLR	2.93 - 15.17nM*	2 - 12 nM*	70 -114	C18
PROCHÁZKOVÁ et al. (46)	2017	Água	UHPLC-MS/MS	-----	3 10 ⁻⁶ - 3 10 ⁻³	< 50	Oasis HLB

*Concentração em nanomolar

----- Os autores não relataram nenhum resultado

Em matrizes biológicas como sangue e urina, as isoflavonas são encontradas na forma glicosilada, as quais são hidrolisadas por micro-organismos formando agliconas as quais, por sua vez, são absorvidas e convertidas em seus conjugados glucuronídeo ou sulfato como metabólitos de fase II. Por serem compostos ácidos altamente polares há baixa recuperação dos metabólitos das isoflavonas pelas fases convencionais empregadas em SPE, sendo um revés nos casos de análise simultânea de isoflavonas e seus metabólitos. Este fato contribui para a popularidade da fase Oasis HLB em análise de isoflavonas (40).

Um enfoque utilizado no preparo de amostra comum na indústria, para análise de isoflavonas em alimentos, é denominada QuEChERS. A sigla é proveniente das iniciais

das palavras *quick* (rápido), *easy* (fácil), *cheap* (barato), *effective* (eficaz), *rugged* (robusto) e *safe* (seguro).

Originalmente, o procedimento consistia em uma extração com acetonitrila seguida de partição com sulfato de magnésio, isoladamente ou em combinação com outros sais, geralmente NaCl, seguido da técnica d-SPE (*dispersive solid-phase extraction*) com o objetivo de eliminar interferentes. Esta técnica foi desenvolvida para análises de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais e, posteriormente, passou por várias modificações. Atualmente a técnica é aplicada em análises de pesticidas, fármacos, micotoxinas, PAHs (48) e também isoflavonas.

Delgado-Zamarreño e colaboradores relataram o desenvolvimento de um método analítico para determinação de isoflavonas em legumes utilizando a técnica QuEChERS para o preparo da amostra na determinação de oito isoflavonas. O método apresentou LD na faixa de 0.7 a 1.5 ng mL⁻¹, recuperação de 72 a 119% e RSD menor que 25% para a precisão inter-dia. Os autores concluíram que o método é capaz de identificar isoflavonas livres e conjugadas, é preciso, seletivo e não consome muito tempo (49).

Merlanti e colaboradores relatam o desenvolvimento de um método analítico para determinação de isoflavonas em peixes (músculo de truta) expostos a dieta baseada em grãos de soja e derivados de soja, utilizando QuEChERS como técnica de preparo de amostra e LC – MS como técnica de separação e detecção. O método apresentou LD na faixa de 0.003 a 0.098 µg kg⁻¹ e LQ de 0.2 µg kg⁻¹, recuperação de 78.77 a 109.93% e RSD de 1.10 a 12.67% para a precisão intra-dia e 2.80 a 14.46% inter-dia, satisfazendo os requisitos adotados como referência no trabalho. O método pode ser classificado como simples, rápido, eficiente, reprodutível e preciso, tal como sugere o nome da técnica de preparo de amostra, além de fornecer um menor LQ do que os procedimentos propostos na literatura atualmente (50).

Benedetti e colaboradores compararam a técnica QuEChERS com SPE na análise de isoflavonas em hambúrgueres de soja; obtiveram maior recuperação, menor RSD e menor efeito de matriz utilizando QuEChERS, concluindo que esta técnica é mais adequada que SPE para este tipo de amostra (47).

A técnica MSPD “*matrix solid-phase dispersion*” pode ser utilizada no preparo de amostras biológicas sólidas, semi-sólidas ou líquidas altamente viscosas, permitindo que seja realizada a extração e *clean-up* em uma única etapa para analitos de diversas classes, em diferentes matrizes naturais (51,52).

O procedimento MSPD é muito parecido com a SPE. A matriz é previamente tratada, misturada

e homogeneizada com a fase estacionária e depois empacotada em um cartucho de SPE como uma coluna. Então um solvente adequado realiza a eluição dos analitos. Outras colunas podem ser adicionadas ao procedimento para auxiliar na separação dos analitos ou no *clean-up* da amostra (52,53). As fases estacionárias mais comuns são C18, sílica gel, forisil (silicato de magnésio) e alumina.

Em análise de isoflavonas, MSPD foi utilizada por Visnevschi Necrasov e colaboradores no desenvolvimento de um método analítico para análise de isoflavonas em vegetais, tendo MSPD como técnica de preparo de amostra e análise por HPLC-DAD. O método apresentou LD na faixa de 11 a 171 ng mL⁻¹ e LQ de 37 a 569 ng mL⁻¹, recuperação de 82 a 104% e RSD de 4 a 9%. O método possibilita a extração e *clean-up* da amostra em uma única etapa, requer pequenas quantidades de amostra, baixo consumo de solvente e tempo de análise, sendo uma boa escolha para análises de rotina (54).

Xu e colaboradores relatam uma modificação na MSPD para análise de isoflavonas, onde foi utilizado titânia (óxido de titânio) devido a sua propriedade de troca iônica, propondo que a interação entre titânia e açúcar, que é um interferente, libera H⁺ e é favorecida em pH alto (55).

2.3. Micro técnicas

O desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra nos leva a percepção de que se busca métodos cada vez mais rápidos, confiáveis, precisos e que consumam menos tempo e solventes, porém não é uma tarefa simples em se tratando de matrizes complexas que envolvem uma gama muito ampla de componentes.

Em 1990 Arthur e Pawilczyn propuseram a micro extração em fase sólida, conhecida como SPME do inglês “*solid-phase microextraction*”, que se tornou muito popular. É uma técnica baseada no equilíbrio de partição do analito entre a matriz e a fase estacionária, de fácil operação, rápida e pequeno ou nenhum consumo de solvente. Entretanto, deve-se sempre avaliar a natureza da

matriz para se obter um bom desempenho da SPME no preparo de amostras (56,57).

A SPME é aplicada em análises de isoflavonas em bebidas à base de soja, onde foram utilizadas fibras comerciais com fase estacionária contendo polidimetilsiloxano (PDMS) recomendado para compostos apolares, polidimetilsiloxano – divinilbenzeno (PDMS-DVB) que é recomendado para uso geral e poliacrilato (PA) recomendado para extrair analitos muito polares de amostras polares. Todas se mostraram capazes de extrair as isoflavonas da matriz, porém a fase PDMS-DVB apresentou maior eficiência em comparação com as outras em estudo (58).

A escolha do tipo do material que reveste a fibra é importante para a SPME, porém a espessura do revestimento também deve ser avaliada, pois é um fator que altera o tempo de equilíbrio e a sensibilidade do método. Revestimentos de maior espessura necessitam de um tempo maior mas, por outro lado, aumentam a recuperação (57,58).

Outros fatores, além da fase estacionária empregada, podem influenciar na eficiência da extração de isoflavonas, como a temperatura, que pode diminuir o tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio de partição do analito entre a fase estacionária e a matriz. Entretanto, o pH possui papel relevante, uma vez que em meio ácido há um aumento na extração das isoflavonas devido à baixa solubilidade destas no meio. A força iônica do meio pode ser alterada pelo feito “*salting-out*” que, como o pH, altera a solubilidade das isoflavonas na matriz (58).

Uma aplicação interessante da SPME para análise de isoflavonas é relatada por Calvello e colaboradores (59), onde é investigado o potencial anti-inflamatório de leite bovino e leite de soja e das isoflavonas equol, daidzeína e genisteína, utilizando um modelo in vitro de células epiteliais intestinais. O autor relata que a aplicação da SPME como técnica de preparo de amostra produziu resultados comparáveis a trabalhos anteriores.

A técnica de micro extração em sorbente empacotado, conhecida como MEPS sigla proveniente do inglês “*microextraction in packet sorbent*” também é aplicada em análises de isoflavonas em matrizes complexas. Esta técnica foi desenvolvida por Abdel-Rehim no ano de 2004 como uma proposta de miniaturização da SPE (60). Como na sua predecessora, o uso da MEPS para preparo de amostras em análises de isoflavonas tem alguns parâmetros a serem estudados como a fase estacionária empregada, etapa de *clean-up* e melhor solvente de eluição. É uma técnica baseada no equilíbrio de partição do analito entre a matriz e a fase estacionária tal como a SPME, e possui uma ampla gama de fases estacionárias como a SPE, podendo até ser produzidas fases estacionárias “*lab-made*” diferenciadas. Gonçalves e colaboradores (61) relatam o uso de MEPS como técnica de preparo de amostra para análises de polifenóis, dentre as quais duas isoflavonas, em vinho. Foram avaliadas fases estacionárias compostas por C2, C8, C18, sílica e um mix de 80% de C8 e 20% de SCX, onde a fase de C8 apresentou melhores resultados. O processo de extração foi classificado como simples, eficiente, rápido, requer pouco volume de solventes e aplicável para pequenos volumes de amostra.

2.4. Técnicas automatizadas

Na atualidade, trabalhos completamente automatizados para a análise de isoflavonas ainda são escassos. Entretanto, vem se desenvolvendo estratégias com o objetivo de num futuro próximo conseguir realizar estudos “on-line”. Foi relatado, por exemplo, o desenvolvimento de um dispositivo em formato de microchip de separação de microfluidos acoplado a MS, o qual incrementa notoriamente as bioanálises por eletroforese capilar e por LC. Chang e colaboradores utilizaram o microchip com LC-MS para determinar isoflavonas em soja, fazendo a extração assistida por ultrassom. O extrato foi filtrado e carregado num cartucho HLB de SPE, identificando isoflavonas tais como geisteína na semente de soja, pela primeira vez (62). Comparando com o método de análise convencional HPLC-MS, o

procedimento proposto foi mais rápido e a quantidade de analitos detectados no primeiro teste foi maior. O método foi aplicado em 6 diferentes amostras reais, observando-se que três isoflavonas representam quase 80% do conteúdo total de flavonoides, sendo a quantidade maior na soja colhida na primavera do que a colhida no verão.

Na literatura, ainda não foram encontrados muitos trabalhos automatizados de quantificação de isoflavonas em alimentos usando eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS), mas estão sendo desenvolvidos métodos automatizados para estas análises, como o relatado por Bustamante-Rangel e colaboradores (63).

3. Separação das isoflavonas por técnicas cromatográficas e eletroforéticas

As isoflavonas foram classicamente separadas por cromatografia de camada delgada usando como principal sorvente poliamida (64). Nos últimos anos, a cromatografia líquida em coluna vem se destacando com uso, por exemplo, de sorventes como C8 e C18 em fase reversa, sendo a separação determinada pela solubilidade dos analitos em água, pois na fase reversa a separação ocorre segundo as interações hidrofóbicas de cada uma delas (64). Além disso, outros fatores também são destacáveis para obter-se uma boa separação cromatográfica, como a afinidade com a fase estacionária, a composição da fase móvel, o gradiente de eluição, a temperatura da coluna, entre outros (65).

Trabalhos vem sendo relatados há bastante tempo em matrizes alimentares (66), ressaltando-se alimentos como soja (67) na qual realiza-se um processamento que inclui evaporação, cocção, torrefação e fermentação microbiana para a quebra da ligação glicosídea permitindo a formação das agliconas que, junto com os glicosídeos, vão ser separados facilmente em uma coluna de fase reversa (68). Neste caso empregar uma eluição isocrática não

é suficiente; o uso de um gradiente é mais aconselhável, começando geralmente com uma porcentagem entre 8 e 15% v/v de solvente orgânico (acetonitrila, metanol entre outros), sendo as agliconas eluídas nos conteúdos mais altos de solvente orgânico. Fiechter e colaboradores, obtiveram uma separação em 3 minutos, sendo o tempo total entre as injeções de 8 minutos, usando um gradiente com ácido fórmico 0,3% e metanol (69).

Outra das atuais modificações que tem melhorado a separação das isoflavonas é a aplicação de colunas de diâmetro interno menor, o que faz que o tamanho de partícula da fase estacionária também seja menor, usualmente inferior a 2 μm , diminuindo os tempos de análises e incrementando a efetividade da separação. Isto vem sendo relatado em pesquisas em alimentos (70,71) ao comparar-se essas colunas com as clássicas que empregam como fases estacionárias C18. Dentre essas colunas miniaturizadas, vem se destacando as colunas monolíticas, as quais são relativamente simples de obter, mostrando bons resultados na separação das isoflavonas (72).

Outro conjunto de técnicas de separação, o qual vem aumentando o número de publicações desde a década passada para analisar matrizes naturais (73), é conhecido como técnicas de eletromigração capilar, sendo sua principal vantagem a facilidade de acoplamento dos detectores eletroquímicos (DE) sensíveis, pois se trabalha com sistemas de eletrólitos muito simples (geralmente tampão de borato a concentrações milimolar) (74). A desvantagem desta técnica é a limitação que apresenta devido à presença de modificadores orgânicos nas fases móveis.

O termo “técnicas de eletromigração capilar” faz referência a um grupo de técnicas de separação que utilizam uma corrente elétrica para obter variações em seus princípios de separação, e inclui (i) eletroforese capilar de zona (CZE); (ii) eletroforese capilar em gel (CGE); (iii) cromatografia eletro cinética micelar (MECK); (iv) eletrocromatografia capilar (CEC); (v) focalização isoeletrica capilar (CIF); e (vi) isotacoforese capilar (CIP).

Os primeiros relatos de separação de isoflavonas por CZE ocorreram em 1994, sendo esta técnica a mais utilizada para estudo destes analitos (75). Bons resultados foram obtidos no estudo de soja, lupino e ervilhas verdes quando comparados com o uso de HPLC utilizando como detector diodos UV-Vis-diode (DAD). Por outro lado, a HPLC obtém melhor seletividade.

Estudos recentes tem descrito combinações de CZE com detectores eletroquímicos para análise de diversas formas glicosiladas de glicitina, daidzina e genistina, e agliconas como formononetina, biocanina A, glicitina, daidzeína e genisteína em amostras comerciais (76).

A MECK também tem sido utilizada para separar compostos polifenólicos pouco solúveis em água. A ononina, daidzina, genistina, biochanina A, formononetina, puerarina, genisteína e daidzeína foram separadas da pueraria (77) usando MEKC em combinação com um detector de UV. Foram comparadas várias fases estacionárias, incluindo surfactante aniônico, dodecilsulfato de sódio (SDS); surfactante catiônico, brometo de hexadeciltrimetilamonio; surfactante neutro polioxietileno sorbitato monolaurate (Tween 20); um tensoativo do tipo líquido iônico, tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio ($C_{12}MIMBF_4$); aditivo (modificador), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ($BMIImBF_4$); e micelas mistas de SDS + Tween 20 e $C_{12}MIMBF_4$ + Tween 20. Se demonstrou que SDS com $BMIImBF_4$ e SDS + Tween 20, tivessem maior eficiência de separação nos oito compostos estudados em tempos inferiores a 10 minutos. A diferença entre CZE e MECK, é que esta última permite a separação efetiva das agliconas hidrófobas que são pouco solúveis nos tampões da CZE (78).

A Tabela 3 mostra alguns trabalhos recentes que usam diversas técnicas de separação como as descritas no texto, para análises de isoflavonas, incluindo-os limites de detecção (LD) obtidos com boa recuperação, alta sensibilidade, especificidade e precisão.

4. Identificação e quantificação das isoflavonas via espectrometria de massas

Nas últimas décadas, a espectrometria de massas tem demonstrado ser uma via muito efetiva na identificação de compostos em diversas matrizes, principalmente amostras complexas. Por sua alta sensibilidade, especificidade e acoplamento simples com a cromatografia, a espectrometria de massas tem sido escolhida como uma das principais técnicas de identificação pelos analistas, usando para a análise de isoflavonas principalmente os métodos descritos a seguir.

4.1. Cromatografia de gases – espectrometria de massas (GC-MS)

Os compostos voláteis geralmente são analisados por esta técnica que mistura as destacáveis propriedades da separação por GC com a sensibilidade e seletividade da MS, a qual depende da fonte de íons e do modo de obter esses íons. Devido à excessiva fragmentação que se pode apresentar durante a análise, especialmente empregando a ionização com elétrons, os íons moleculares podem estar ausentes no espectro obtido. Neste caso o uso de baixa voltagem de ionização, ou ionização química, é recomendado para verificar-se o íon molecular. Na análise de amostras complexas é muito comum o uso de monitoramento de íons selecionados (SIM) para obter um espectro mais específico (88). A desvantagem é que para bioflavonoides precisa-se de derivatização dos compostos não voláteis, sendo ainda pior para os metabolitos biológicos ou compostos termicamente lábeis dos flavonoides (89).

4.2. Bombardeamento com átomos rápidos (FAB) e espectrometria de massa de íons secundários líquidos (LSIMS)

Para evitar a derivatização dos compostos, pode-se empregar um destes dois métodos. No FAB, o impacto de uma partícula energética inicia a evaporação da amostra e os processos de ionização dos analitos,

Tabela 3. Aplicações de diversas técnicas de separação para a análise de isoflavonas em diferentes matrizes.

Autores	Ano	Matriz	Técnica de análise	LD	LQ	Recuperação %
FIECHTER et al. (79)	2013	Soja	UV-UPLC	0.5 – 0.9 mg g ⁻¹	1.8 – 3.1 mg g ⁻¹	90±2 - 99± 3
BUSTAMANTE et al. (80)	2013	Alimentos à base de soja	QuEChERS CE-ESI-MS	0.21 – 2.0 µg L ⁻¹	0.69 – 6.6 µg L ⁻¹	92- 102
MARTÍ et al. (81)	2017	Tomate	MECK HPLC	0.8 – 3.8 mg kg ⁻¹	2.6 – 12.6 mg kg ⁻¹	77 - 106
SONG et al. (82)	2013	Flores <i>Trollius</i> comerciais	HPLC	0.01 – 0.08 µg mL ⁻¹	0.03 - 0.29 µg mL ⁻¹	95.8 - 105.1
GANZERA et al. (83)	2015	Soja	SFC	0.03 – 0.21 µg mL ⁻¹	0.11 - 0.65 µg mL ⁻¹	97.6 - 102.4
VANDERMOLEN et al. (84)	2013	Suco De Toranja	UPLC	0.78 – 69 µM	2.6 - 230 µM	----
BARFI et al. (85)	2013	Sucos de frutas cítricas	SM-USA-MSPD HPLC	23.3 – 46.8 ng mL ⁻¹	74.8 - 141.5 ng mL ⁻¹	84.6–101.5
BADJAH et al. (86)	2014	Diversos méis iemenitas	HPLC	0.018 – 0.14 µg mL ⁻¹	0.06 - 0.46 µg mL ⁻¹	< 2.5
SHIM et al. (87)	2015	Soja, feijão vermelho, feijão preto e pasta de soja	UHPLC/PDA	0.03 – 0.33 mg kg ⁻¹	0.10 - 0.33 mg kg ⁻¹	85.6 ± 5.7 - 113.5 ± 5.7

---- Os autores não relataram nenhum resultado

evitando ter que volatilizar termicamente a amostra. No LSIMS, a matriz tem que ser líquida (usa-se glicerol, tioglicerol, entre outros que apresentam alta temperatura de ebulição), e a evaporação e ionização dos analitos é causado por um feixe primário de íons Césio. Estes dois métodos de ionização produzem íons fragmento em menor quantidade, sendo adequados para analisar compostos iônicos e termolábeis (90).

4.3. Ionização por electrospray (ESI)-MS e ionização química à pressão atmosférica (APCI)-MS

Outra técnica empregadas para evitar-se a realização de processos de derivatização prévios é a

chamada ionização por electrospray (ESI)-MS, na qual se geram partículas altamente carregadas que produzem a expulsão dos íons durante o processo de evaporação. Um campo elétrico é obtido no nebulizador pela aplicação de alta voltagem e pela proximidade do contra eletrodo, sendo os íons atraídos pelo campo elétrico para as partículas geradas, segundo a polaridade escolhida, sendo as interfaces ESI frequentemente empregadas com espectrômetros de massas tendo como analisador de massas um quadrupolo (91).

Outra forma de ionização empregada no acoplamento LC-MS é a chamada ionização química à pressão atmosférica (APCI), a qual envolve reações

íon-molécula para que os íons se encontrem na fase gasosa. Estas duas tecnologias (ESI e APCI) estão sendo utilizadas para estudar uma variedade de flavonoides como as isoflavonas, uma vez que a ESI apresenta uma maior sensibilidade que as técnicas de FAB e LSIMS; além disso a ESI tem uma melhor relação sinal-ruído, porque se obtém um quantidade reduzida de íons ficando na faixa inferior aos 300 Da, região importante para aqueles analitos (92).

Parets e colaboradores relataram recentemente a obtenção de uma melhora na eficiência da ionização usando a técnica de fotoionização (93).

Uma das desvantagens das técnicas ESI e APCI é que não são compatíveis com o uso de modificadores comuns na fase móvel no HPLC como ácido trifluoroacético ou fosfato de sódio, pois interferem no processo de ionização. Assim, é necessário trabalhar-se com modificadores tipo ácido fórmico ou acetato de amônio no caso dos tampões de fosfato. Embora ambas técnicas possam ser empregadas no modo de íons positivos ou negativos, as isoflavonas geralmente são analisadas no modo negativo (94).

4.4. Eletroforese capilar - espectrometria de massa (CE-MS)

A eletroforese capilar de zona (CZE) foi descrita pela primeira vez em 1981 (95), e é considerada relativamente nova em relação à GC e HPLC. A CE baseia-se na diferença das mobilidades eletroforéticas dos analitos em solução, carregados num campo elétrico em capilares de pequenos diâmetros – comumente entre 50 e 100 μm - que permitem uma rápida separação e alta resolução. O volume empregado, da ordem de nanolitros, permite obter excelentes limites de detecção empregando-se um espectrômetro de massas como detector. Esta técnica vem sendo usada em diferentes modos, como descrito anteriormente (76,77). Como as isoflavonas são ácidos fracos, usa-se tampões alcalinos para garantir que o resíduo fenólico é carregado por separação eletroforética, pois a estrutura e composição do tampão influem no comportamento eletroforético das amostras a analisar (96).

Ao comparar o fluxo de trabalho do CE (geralmente inferior a $1\mu\text{L min}^{-1}$) com o fluxo do HPLC convencional (1 mL min^{-1}), observa-se que é mais adequado trabalhar com CE quando usa-se um MS como detector, sendo possível introduzir o efluente do CE no MS através da interfase ESI, sem divisão do fluxo. Assim, é possível manter-se a eficiência e a boa resolução na separação. A primeira interfase CE-MS foi relatada no ano 1987 por Smith e colaboradores (97), sendo desenvolvidas muitas outras interfaces ao longo do tempo (98). Zhao e colaboradores (99) apresentaram o avanço da CE e CEC nas análises fitoquímicas durante 2012 e 2013, assim como para amostras biomédicas, farmacêuticas, ambientais e de alimentos, contendo analitos como isoflavonas.

Ainda hoje a conexão entre CE e MS é considerada difícil; as altas concentrações de isoflavonas nas amostras discutidas faz com que as análises apresentem sensibilidade adequada, aumentando assim a importância do desenvolvimento das técnicas de CE-MS para estudos em matrizes fisiológicas como tecidos, sangue e urina.

4.5. Ionização e desorção assistida pela matriz, acoplada a espectrometria de massas em tempo-de-voe (MALDI-TOF-MS)

A ionização e desorção por laser assistida pela matriz, MALDI, foi estudada pela primeira vez por Karas e colaboradores (100), com o objetivo de converter amostras sólidas em amostras gasosas para serem detectadas por MS. A técnica MALDI-TOF-MS apresenta como vantagem, ao ser comparada com as outras apresentadas, a alta velocidade de análise a boa sensibilidade; a boa tolerância com contaminantes; e a produção, principalmente, de íons com carga única, o que não acontece com ESI-MS (101). Por isso, é possível determinar, simultaneamente, compostos presentes em amostras complexas com alto e baixo peso molecular.

Embora a MALDI-TOF-MS seja usada principalmente como ferramenta para análises de biomoléculas, recentemente vem sendo empregada em análises das isoflavonas (102) em matrizes alimentícias.

4.6. Técnicas combinadas e espectrometria de massas empregando transformada de Fourier e ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR-MS)

Existe uma grande variedade de técnicas baseadas na espectrometria de massas, as quais podem ser empregadas no estudo das isoflavonas, como vem sendo relatado nesta revisão. Na atualidade vem-se estudando a combinação destas técnicas com o objetivo de aproveitar as vantagens que cada uma delas pode oferecer, como é o caso da LC-ESI-MS, na qual o analisador quadrupolo pode ser trocado por um analisador de íons - “*ion trap*”) ou um de analisador do tipo tempo-de-voe (ToF). O *Íon Trap* tem a vantagem de fazer a fragmentação sequencial primeiro do íon molecular principal e depois dos íons secundários, o qual é muito útil na análise de flavonóides isômeros como, por exemplo, glucósidos de genisteína, uma isoflavona, a qual apresenta a mesma massa molecular e um comportamento cromatográfico muito similar à apigenina, uma flavona (103).

Na proteômica, frequentemente usa-se um instrumento híbrido TOF-TOF, onde íons presentes no primeiro analisador TOF são selecionados temporalmente numa região. Os íons então vão colidir com um gás (por exemplo argônio) para serem de novo acelerados para o segundo analisador TOF. A técnica é considerada rápida e permite analisar muitas amostras em pouco tempo (104). Porém, os baixos valores m/z dos bioflavonoides e seus metabolitos são um impedimento para obter uma ótima separação como já foi relatado, mas continua-se tentando obter avanços no uso de instrumentos híbridos para análises de isoflavonas.

Em FT-ICR-MS, os íons são inseridos em uma cela cilíndrica localizada no centro do campo magnético de um ímã supercondutor, sendo a resolução função do campo magnético. Os íons ficam ao redor do centro do campo magnético em orbitas muito próximos. A radiação do ciclotron incrementa a energia dos íons, levando eles a criarem orbitas maiores. Quando a radiação é removida, os íons excitados voltam a seus estados iniciais, criando assim um sinal em queda livre (FID), no tempo, similar a um experimento RMN. Este sinal é rapidamente processado

pela transformada de Fourier, na frequência obtendo-se, assim, um espectro de massas.

Esta técnica tem demonstrado ser muito promissora na análise de peptídeos em análises proteômicas, mas ainda não é muito explorada na análise de isoflavonas, embora já existam publicações onde é usado (105), pois sua capacidade para determinar as massas com precisão, garante a identificação correta dos metabolitos presentes nas matrizes em estudo.

A Tabela 4 resume diferentes técnicas de identificação e quantificação de isoflavonas, via espectrometria de massas, em diferentes tipos de matrizes.

5. Conclusões

Isoflavonas formam uma subclasse muito importante de fitoestrógenos e estão associadas à prevenção de diversas doenças. Metabolitos secundários de plantas, são encontradas em todo o reino vegetal e constantemente presentes em nossa dieta, seja por consumo direto de vegetais ou de produtos industrializados, o que causa uma constante vigilância sobre a bioatividade e propriedades nutricionais destes compostos.

Na última década, o crescente interesse pelas isoflavonas resultou em um aumento no número de pesquisas científicas relacionadas ao tema. Desde 2010, os trabalhos relatam análises de isoflavonas nas mais variadas matrizes, como soja, produtos industrializados a base de soja, leite bovino, urina e plasma humano, utilizando diversas técnicas de separação e detecção, como HPLC – UV, UHPLC – MS/MS, CE – UV e GC – MS/MS.

Mesmo com o avanço das técnicas de preparo de amostra, onde atualmente temos micro técnicas bem desenvolvidas e até mesmo métodos *on-line* de preparo de amostra, o uso de técnicas clássicas como as extrações com solvente ainda são muito comuns, principalmente nos trabalhos que visam apenas aplicação de um método já desenvolvido. Técnicas como a SPME e MEPS, as quais são mais recentes, são empregadas em análises de

Tabela 4. Técnicas de identificação e quantificação das isoflavonas em diferentes tipos de matrizes empregando a espectrometria de massas.

Autores	Ano	Matriz	Técnica de análise	LD	LQ	Recuperação (%)
SCHMIDT et al. (88)	2013	Urina	GC-MS/MS	0.1 - 0.6 µg L ⁻¹	0.3 - 2.0 µg L ⁻¹	40 - 111
NAKATA et al. (90)	2018	Plantas à base de soja	IT-TOF-MS	-----	-----	-----
YAN et al. (91)	2014	Plasma de rato	LC-ESI-MS/MS	-----	1.7 - 17.6 ng mL ⁻¹	72.9 ± 9.8 - 117.4 ± 7.6
LEI et al. (92)	2015	Produto de uma planta natural	UHPLC-MS	-----	-----	-----
SCHMIDT et al. (94)	2019	Resveratrol	ESI-HCD (MS)	-----	-----	-----
PEREZ-MARTIN et al. (96)		Legumes	CE-MS LC-MS/MS	0.20 - 1.8 µg L ⁻¹	-----	80 - 120
SAKAMOTO et al. (102)	2015	Soja	MALDI-TOF-MS	-----	-----	99.9 e 108.8
GIMÉNEZ-CASSINA et al. (105)	2014	Própolis vermelha	ESI(-)-FT-ICR-MS	-----	-----	-----

----- Os autores não relataram nenhum resultado

isoflavonas em trabalhos que visam o desenvolvimento de métodos analíticos e são mais facilmente encontrados em revistas científicas da área de cromatografia.

O uso de técnicas eletroforéticas, como a CZE e MEKC, é muito comum na separação de isoflavonas. Nos últimos anos a diminuição do diâmetro interno das colunas analíticas, destacando o uso de colunas capilares monolíticas, tem resultado em melhora na efetividade das separações e diminuição do tempo de análises. Dentre os detectores destacam-se o uso de espectrômetros de massas assim como técnicas combinadas de cromatografia líquida, gasosa e eletroforese à espectrometria de massas.

Espera-se, em um futuro próximo, o aumento do uso de técnicas analíticas totalmente automatizadas para a

análise “on-line” de isoflavonas, incluindo o preparo das amostras, separação e a detecção por espectrometria de massas, em uma única etapa.

Agradecimentos

Os Autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001; pela bolsa de estudos para L. F. Silva (Proc. 1717460/2017-05) e para M. Jordan-Sinisterra (Proc. 1654065/2016-10), assim como o apoio financeiro da FAPESP (Proc. 2017/02147-0) e CNPq (Proc. 140277/2018-8 e Proc. 307293/2014-9).

Referências

- [1] Wu Q, Wang M, Simon JE. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2004 Dec;812(1–2 SPEC. ISS.):325–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.008>
- [2] Bhatena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2002 Dec;76(6):1191–201. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.6.1191>
- [3] López-Biedma A, Sánchez-Quesada C, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. *J Funct Foods.* 2016 Oct;26:36–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.005>
- [4] Yu J, Wu Q, Qiao S, Yu Z, Jin N, Yu B. Simultaneous determination of phytoestrogens and key metabolites in breast cancer patients' urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2009 Dec;50(5):939–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.06.032>
- [5] Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Apr;94(5):431–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.041>
- [6] Vejdovsky K, Schmidt V, Warth B, Marko D. Combinatory estrogenic effects between the isoflavone genistein and the mycotoxins zearalenone and alternariol in vitro. *Mol Nutr Food Res.* 2017 Oct;61(3):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600526>
- [7] Nijveldt RJ, Nood Ev, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74:418–25. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
- [8] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996 Nov;20(7):933–56. Available from: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- [9] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 May;63(7):1035–42. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np9904509>
- [10] Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Chen J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. *Eur J Nutr.* 2001 Aug;40(4):135–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/PL00007388>
- [11] Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC. Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev [Internet].* 1996 Nov;5(11):901–6. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/content/5/11/901.short>
- [12] Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Dec;83(1–5):113–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00273-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00273-X)
- [13] Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: Potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec;68(6 SUPPL.):1390–3. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1390S>
- [14] Zhi CD, Lowik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Jul;16(5):207–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.05.001>
- [15] Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol.* 1996 May;87(5):897–904. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0029784496804613>
- [16] Tsunoda N, Pomeroy S, Nestel P. Absorption in Humans of Isoflavones from Soy and Red Clover Is Similar. *J Nutr.* 2018 Aug;132(8):2199–201. Available from: <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2199>
- [17] Manchón N, D'Arrigo M, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Ramos A, Martínez, JA, Rostagno, MA. Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta.* 2010 Oct;82(5):1986–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.050>
- [18] Lee JH, Choung MG. Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC. *Food Chem.* 2011 Feb;124(3):1217–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.049>
- [19] Yanaka K, Takebayashi J, Matsumoto T, Ishimi Y. Determination of 15 isoflavone isomers in soy foods and supplements by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2012 Mar;60(16):4012–6. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf205154x>
- [20] Jankowiak L, Kantzas N, Boom R, Van Der Goot AJ. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chem.* 2014 Oct;160:371–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.082>

- [21] Desfontaine V, Guillaume D, Francotte E, Nováková L. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2015 Sep;113:56–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.007>
- [22] Yuk HJ, Song YH, Curtis-Long MJ, Kim DW, Woo SG, Lee YB, Uddin Z, Kim CY, Park KH. Ethylene Induced a High Accumulation of Dietary Isoflavones and Expression of Isoflavonoid Biosynthetic Genes in Soybean (*Glycine max*) Leaves. *J Agric Food Chem*. 2016 Sep;64(39):7315–24. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b02543>
- [23] Yilmaz A, Rudolph HL, Hurst JJ, Wood TD. High-Throughput Metabolic Profiling of Soybean Leaves by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2016 Dec;88(2):1188–94. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.5b03340>
- [24] Zhang M, Sun J, Chen P. Development of a Comprehensive Flavonoid Analysis Computational Tool for Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-High-Resolution Accurate Mass-Mass Spectrometry Data. *Anal Chem*. 2017 Jun;89(14):7388–97. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.7b00771>
- [25] Góes-Favoni SP, Carrão-Panizzi MC, Beleia A. Changes of isoflavone in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chem*. 2010 Apr;119(4):1605–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.051>
- [26] Lee JH, Choung MG. Determination of optimal acid hydrolysis time of soybean isoflavones using drying oven and microwave assisted methods. *Food Chem*. 2011 Nov;129(2):577–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.069>
- [27] Terigar BG, Balasubramanian S, Boldor D, Xu Z, Lima M, Sabliov CM. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresour Technol*. 2010 Apr;101(7):2466–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.039>
- [28] Zafra-Gómez A, Garballo A, García-Ayuso LE, Morales JC. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. *Food Chem*. 2010 Dec;123(3):872–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.009>
- [29] Moreira BJ, Yokoya JMC, Gaitani CM De. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos , inovações e aplicações biológicas. *Sci Chromatogr*. 2014 Dec;6(3):186–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.005>
- [30] Nara K, Nihei KI, Ogasawara Y, Koga H, Kato Y. Novel isoflavone diglycoside in groundnut (*Apios americana* Medik). *Food Chem*. 2011 Feb;124(3):703–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.107>
- [31] Zhang Wd, Yang Wj, Wang Xj, Gu Y, Wang R. Simultaneous determination of tectorigenin, irigenin and irisflorethin in rat plasma and urine by UHPLC-MS/MS: Application to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2011 Dec;879(31):3735–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.022>
- [32] Matsumoto D, Kotani A, Hakamata H, Takahashi K, Kusu F. Column switching high-performance liquid chromatography with two channels electrochemical detection for high-sensitive determination of isoflavones. *J Chromatogr A*. 2010 Apr;1217(17):2986–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.050>
- [33] Park HJ, Jung MY. One step salting-out assisted liquid-liquid extraction followed by UHPLC-ESI-MS/MS for the analysis of isoflavones in soy milk. *Food Chem*. 2017 Aug;229:797–804. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.145>
- [34] Kašparovská J, Dadáková K, Lochman J, Hadrová S, Křížová L, Kašparovský T. Changes in equol and major soybean isoflavone contents during processing and storage of yogurts made from control or isoflavone-enriched bovine milk determined using LC–MS (TOF) analysis. *Food Chem*. 2017 May;222:67–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.010>
- [35] Kunisue T, Tanabe S, Isobe T, Aldous KM, Kannan K. Profiles of phytoestrogens in human urine from several Asian countries. *J Agric Food Chem*. 2010 Aug;58(17):9838–46. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf102253j>
- [36] Ma Y, Zhang L, Zhao X, Shen Q. Analysis of daidzein in nanoparticles after oral co-administration with sodium caprate to rats by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2012 Oct;907:21–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.026>
- [37] Fiechter G, Raba B, Jungmayr A, Mayer HK. Characterization of isoflavone composition in soy-based nutritional supplements via ultra performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2010 Jul;672(1–2):72–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.004>
- [38] Jardim ICSF. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Sci Chromatogr*. 2010;2(1):13–25. Available from: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a2.pdf>
- [39] Nováková L, Vlčková H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods : Chromatography and sample preparation. *Anal Chim Acta*. 2009 Dec;656:8–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>

- [40] Hosoda K, Furuta T, Ishii K. Simultaneous determination of glucuronic acid and sulfuric acid conjugated metabolites of daidzein and genistein in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2010 Mar;878(7–8):628–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.01.028>
- [41] Saracino MA, Raggi MA. Analysis of soy isoflavone plasma levels using HPLC with coulometric detection in postmenopausal women. *J Pharm Biomed Anal*. 2010 Nov;53(3):682–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.001>
- [42] Rodríguez-Morató J, Farré M, Pérez-Maná C, Papaseit E, Martínez-Riera R, de la Torre R, Pizarro, N. Pharmacokinetic Comparison of Soy Isoflavone Extracts in Human Plasma. *J Agric Food Chem*. 2015 Jul;63(31):6946–53. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02891>
- [43] Baranowska I, Magiera S, Baranowski J. UHPLC method for the simultaneous determination of β -blockers, isoflavones, and flavonoids in human urine. *J Chromatogr Sci*. 2011 Mar;49(10):764–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.026>
- [44] Redruello B, Guadamuro L, Cuesta I, Álvarez-Buylla JR, Mayo B, Delgado S. A novel UHPLC method for the rapid and simultaneous determination of daidzein, genistein and equol in human urine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2015 Nov;1005:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.029>
- [45] Li T, Wang Y, Wang Y, Liang R, Zhang D, Zhang H, Chen L, Yang W. Development of an SPE-HPLC-MS method for simultaneous determination and pharmacokinetic study of bioactive constituents of Yu Ping Feng San in rat plasma after oral administration. *J Ethnopharmacol*. 2013 Feb;145(3):784–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.010>
- [46] Procházková T, Sychrová E, Javůrková B, Večerková J, Kohoutek J, Lepšová-Skácelová O, Bláha L, Hilscherová K. Phytoestrogens and sterols in waters with cyanobacterial blooms - Analytical methods and estrogenic potencies. *Chemosphere*. 2017 Mar;170:104–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.006>
- [47] Benedetti B, Di Carro MD, Magi E. Phytoestrogens in soy-based meat substitutes: Comparison of different extraction methods for the subsequent analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2018 Jul;53(9):862–70. Available from: <https://doi.org/10.1002/jms.4268>
- [48] González-Curbelo MÁ, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Trends in Analytical Chemistry Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends Anal Chem [Internet]*. 2015 Sep;71:169–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>
- [49] Delgado-Zamarreño MM, Pérez-Martín L, Bustamante-Rangel M, Carabias-Martínez R. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. 2012 Oct;100:320–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.070>
- [50] Merlanti R, Lucatello L, Inacio JL, Pastore RM, Laverda S, Capolongo F. Isoflavones quantification in rainbow trout muscle by QuEChERS technique and liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Food Compos Anal [Internet]*. 2018 Jul;70:114–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.009>
- [51] Capriotti AL, Cavaliere C, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J Chromatogr A*. 2010 Apr;1217:2521–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.030>
- [52] Barker SA. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J Biochem Biophys Methods*. 2007 Mar;70:151–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- [53] Peng L, Li Q, Chang Y, An M, Yang R, Tan Z, Hao J, Cao J, Xu JJ, Hu SS. Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid-phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A [Internet]*. 2016 Jul;1456:68–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.011>
- [54] Visnevschi-Necrasov T, Barreira JCM, Cunha SC, Pereira G, Oliveira MBPP. Advances in Isoflavone Profile Characterisation using Matrix Solid-phase Dispersion Coupled to HPLC / DAD in Medicago Species. *Phytochem Anal*. 2015 Aug;26:40–6. Available from: <https://doi.org/10.1002/pca.2534>
- [55] Xu, L.; Shi, H.; Liang, T.; Feng, J.; Jin, Y.; Ke, Y.; Liang X. Selective separation of flavonoid glycosides in *Dalbergia odorifera* by matrix solid-phase dispersion using titanania. *J Sep Sci*. 2011 Apr;34(11):1347–54. Available from: <https://doi.org/10.1002/jssc.201100024>
- [56] Balasubramanian S, Panigrahi S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2011 Jan;4(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3>

- [57] Aulakh JS, Malik AK, Kaur V, Schmitt-Kopplin P. A review on solid phase micro extraction - High performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit Rev Anal Chem*. 2005 Oct;35(1):71–85. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408340590947952>
- [58] Aresta A, Di Grumo F, Zambonin C. Determination of Major Isoflavones in Soy Drinks by Solid-Phase Micro Extraction Coupled to Liquid Chromatography. *Food Anal Methods*. 2016 Jul;9(4):925–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0260-1>
- [59] Calvello R, Aresta A, Trapani A, Zambonin C, Cianciulli A, Salvatore R, Clodoveo ML, Corbo F, Franchini C, Panaro MA. Bovine and soybean milk bioactive compounds : Effects on inflammatory response of human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem*. 2016 Nov;210:276–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.067>
- [60] Abdel-Rehim M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I . Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2004 Mar;801(2):317–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.042>
- [61] Gonçalves J, Mendes B, Silva CL, Câmara JS. Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. *J Chromatogr A*. 2012 Mar;1229:13–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.023>
- [62] Chang Y, Zhao C, Wu Z, Zhou J, Zhao S, Lu X, Xu, G. Chip-based nanoflow high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling of soybean flavonoids. *Electrophoresis* [Internet]. 2012 Jun;33(15):2399–406. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201100581>
- [63] Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, 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* [Internet]. 2012 Jan;709:113–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.015>
- [64] Vacek J, Klejdus B, Lojtková L, Kubán V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *J Sep Sci* [Internet]. 2008 Jul;31(11):2054–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700569>
- [65] Engida AM, Kasim NS, Tsigie YA, Ismadji S, Huynh LH, Ju Y-H. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013 Jan;41:392–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.043>
- [66] Merken HM, Beecher GR. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. 2000 Feb; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990872o>
- [67] Zaheer K, Akhtar MH. Critical Reviews in Food Science and Nutrition An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. 2015 Nov; Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.989958>
- [68] Uifălean A, Farcaș A, Iliș M, Hegheș SC, Ionescu C, Iuga CA. Assessment of isoflavone aglycones variability in soy food supplements using a validated hplc-uv method. *Orig Res Clujul Med* [Internet]. 2015 Jul;88(3):373–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632898/pdf/cm-88-373.pdf>
- [69] Fiechter G, Opacak I, Raba B, Mayer HK. 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. 2013 Mar; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.038>
- [70] Klejdus B, Vacek J, Benešová L, Kopecký J, Lapčík O, Kubán V. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2007 Dec;389(7–8):2277–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1606-3>
- [71] Repollés C, Herrero-Martínez JM, Ràfols C. Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *J Chromatogr A* [Internet]. 2006 Oct;1131(1–2):51–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.012>
- [72] Jandera P. Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013 Oct;1313:37–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.010>
- [73] Herrero M, Ibáñez E, Cifuentes A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *J Sep Sci* [Internet]. 2005 Jun;28(9–10):883–97. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200400104>

- [74] Wiczorek P, Ligor M, Buszewski B. Applications of Electromigration Techniques: Applications of Electromigration Techniques in Food Analysis. In Springer, Berlin, Heidelberg; 2013 Apr; 105:299–333. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-35043-6_17
- [75] Shihabi ZK, Kute T, Garcia LL, Hinsdale M. Analysis of isoflavones by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* [Internet]. 1994 Sep;680(1):181–5. Available from: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80066-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80066-9)
- [76] Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, 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* [Internet]. 2013 May;108:203–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.10.023>
- [77] Xiao W, Chen C, Zhang Q, Zhang Q-H, Hu Y-J, Xia Z-N, Yang, F-Q. Separation Study of Eight Isoflavones by MEKC with Different Surfactants. *Chromatographia* [Internet]. 2015 Nov;78(21–22):1385–93. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10337-015-2969-9>
- [78] Martí R, Valcárcel M, Herrero-Martínez JM, Cebolla-Cornejo J, Roselló S. Simultaneous determination of main phenolic acids and flavonoids in tomato by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Chem* [Internet]. 2017 Apr;221:439–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.105>
- [79] Fiechter G, Opacak I, Raba B, Mayer HK. 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 Research International*. 2013 Mar; 50(2):586–592. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.038>
- [80] Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, 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 May;108:203–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.10.023>
- [81] Martí R, Valcárcel M, Herrero-Martínez JM, Cebolla-Cornejo J, Roselló S. Simultaneous determination of main phenolic acids and flavonoids in tomato by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Chem*. 2017 Apr;221:439–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.105>
- [82] Song Z, Hashi Y, Sun H, Liang Y, Lan Y, Wang H, Chen S. Simultaneous determination of 19 flavonoids in commercial trollflowers by using high-performance liquid chromatography and classification of samples by hierarchical clustering analysis. *Fitoterapia*. 2013 Dec;91:272–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.09.006>
- [83] Ganzera M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Mar;107:364–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.013>
- [84] VanderMolen KM, Cech NB, Paine MF, Oberlies NH. Rapid Quantitation of Furanocoumarins and Flavonoids in Grapefruit Juice using Ultra-Performance Liquid Chromatography. *Phytochem Anal*. 2013 Jun;24(6):654–60. Available from: <https://doi.org/10.1002/pca.2449>
- [85] Barfi B, Asghari A, Rajabi M, Barfi A, Saeidi I. Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers. *J Chromatogr A*. 2013 Oct;1311:30–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.078>
- [86] Ahmed AYBH, Obbed MS, Wabaidur SM, AlOthman ZA, Al-Shaalan NH. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phenolic Acid, Flavonoid, and Phenol Contents in Various Natural Yemeni Honeys Using Multi-walled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Adsorbent. *J Agric Food Chem*. 2014 Jun;62(24):5443–50. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf5011758>
- [87] Shim Y-S, Yoon W-J, Hwang J-B, Park H-J, Seo D, Ha J. Rapid method for the determination of 14 isoflavones in food using UHPLC coupled to photo diode array detection. *Food Chem*. 2015 Nov;187:391–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.077>
- [88] Schmidt L, Müller J, Göen T. Simultaneous monitoring of seven phenolic metabolites of endocrine disrupting compounds (EDC) in human urine using gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2013 Feb;405(6):2019–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6618-y>
- [89] Roh C. Biotransformation of Isoflavone Using Enzymatic Reactions. *Molecules* [Internet]. 2013 Mar;18(3):3028–40. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules18033028>

- [90] Nakata R, Yoshinaga N, Teraishi M, Okumoto Y, Huffaker A, Schmelz EA, Mori, N. A fragmentation study of isoflavones by IT-TOF-MS using biosynthesized isotopes. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2018 Aug;82(8):1309–15. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2018.1465810>
- [91] Yan Y, Chai C-Z, Wang D-W, Wu J, Xiao H-H, Huo L-X, Zhu D-N, Yu B.Y. Simultaneous determination of puerarin, daidzin, daidzein, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin and liquiritigenin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Ge-Gen Decoction by a liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2014 Jul;95:76–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.013>
- [92] Lei Z, Jing L, Qiu F, Zhang H, Huhman D, Zhou Z, Sumner LW. Construction of an Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectral Library of Plant Natural Products and Comparative Spectral Analyses. *Anal Chem* [Internet]. 2015 Jun;87(14):7373–81. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b01559>
- [93] Parets L, Alechaga É, Núñez O, Saurina J, Hernández-Cassou S, Puignou L. Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural extracts. *Anal Methods* [Internet]. 2016 Jun;8(22):4363–78. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY00929H>
- [94] Schmidt J. Negative ion electrospray high-resolution tandem mass spectrometry of polyphenols. *J Mass Spectrom* [Internet]. 2016 Jan;51(1):33–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3712>
- [95] Jorgenson JW, Lukacs KA. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: Preliminary data on performance. *J High Resolut Chromatogr* [Internet]. 1981 May;4(5):230–1. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jhrc.1240040507>
- [96] Perez-Martin L, Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreno MM. Determination of Isoflavones in Legumes by QuEChERS-Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. Bentham Science Publishers. 2015 Apr;11(2):117-123 Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cac/2015/00000011/00000002/art00008#>
- [97] Olivares JA, Nguyen NT, Yonker CR, Smith RD. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* [Internet]. 1987 Apr;59(8):1230–2. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00135a034>
- [98] Zhong X, Chen Z, Snovida S, Liu Y, Rogers JC, Li L. Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Quantitative Analysis of Glycans Labeled with Multiplex Carbonyl-Reactive Tandem Mass Tags. *Anal Chem* [Internet]. 2015 Jul;87(13):6527–34. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b01835>
- [99] Zhao J, Hu D-j, Lao K, Yang Z-m, Li S. Advance of CE and CEC in phytochemical analysis (2012-2013). *Electrophoresis* [Internet]. 2014 Jan;35(1):205–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201300321>
- [100] Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process* [Internet]. 1987 Sep;78:53–68. Available from: [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(87\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0168-1176(87)87041-6)
- [101] Theparee T, Das S, Thomson RB. Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround Times in the Clinical Microbiology Laboratory: a Retrospective Analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Jan;56(1):e01242-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118171>
- [102] Sakamoto S, Yusakul G, Pongkitwittoon B, Paudel MK, Tanaka H, Morimoto S. Simultaneous determination of soy isoflavone glycosides, daidzin and genistin by monoclonal antibody-based highly sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Chem* [Internet]. 2015 Feb;169:127–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.004>
- [103] Cui Q, Peng X, Yao X-H, Wei Z-F, Luo M, Wang W, Zhao, C-J, Fu Y-J, Zu Y-G. Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2015 Aug;150:63–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.026>
- [104] Wang L, Wang ZQ, Hu DD, Cui J. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 Jun;2013:139745. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/139745>
- [105] Giménez-Cassina B, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem* [Internet]. 2014 Mar;146:174–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063>