



Validación de una técnica por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de isoflavonas totales

[Validation of a technique by high-performance liquid chromatography for the determination of total isoflavones]

Pilar A. Soledispa Cañarte¹, Migdalia Miranda Martínez^{1*}, Viviana García Mir²

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil. Ciudadela Universitaria "Salvador Allende". Ave. Kennedy S/N y Av. Delta. Guayaquil. Ecuador.

²Universidad Técnica de Machala. Av. Panamericana Km 5 1/2 Vía a Pasaje. Machala. Ecuador.

*E-mail: migdalia.mirandam@ug.edu.ec

Abstract

Context: Isoflavones may act as selective regulators in the prevention of various diseases. The most important source of isoflavones is the soy, from which different phytotherapeutics are elaborated of use in Ecuadorian population. However, its concentration varies depending on several factors, therefore quality assessment need to be carried out through out several analytical methods.

Aims: To validate an analytical method by high precision liquid chromatography (HPLC) to quantify total isoflavones in herbal medicine.

Methods: To quantify isoflavones, it was used a brand liquid chromatography with UV/VIS detector at 260 nm, C-18 column using isocratic method. The mobile phase was composed of 2% acetic acid: acetonitrile (75:25). The quantification was performed against reference standard. The parameters for the validation followed the established in the USP 33.

Results: The chromatogram presented six peaks with elution between 1.557 and 18.913 min. The linearity of the system and the method got r^2 equal to 0.98 and 0.99 respectively. The coefficients of variation 1.5% in the study of repetitiveness and 2% in intermediate precision. The accuracy of the adjusted lineal model exhibited $r=0.95$ and intercept reliable interval (-0.921; 1.743).

Conclusions: The validated method was specific, accurate, precise and linear. It can be used for quality control and stability studies of isoflavones present in herbal medicine.

Keywords: analysis of methods of validation; HPLC; isoflavones; quality control.

Resumen

Contexto: Las isoflavonas funcionan como reguladores selectivos en la prevención de diversas enfermedades. La fuente más importante es la soja de la que se elaboran diferentes fitoterápicos de uso en la población ecuatoriana. Sin embargo, su concentración varía dependiendo de diversos factores por ello es necesaria la evaluación de la calidad a través de diversos métodos analíticos.

Objetivos: Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta precisión (CLAR) para cuantificar isoflavonas totales en fitofármacos.

Métodos: Para cuantificar se empleó un cromatógrafo líquido con detector UV/VIS a 260 nm, columna C-18 usando el método isocrático. La fase móvil fue ácido acético 2%: acetonitrilo (75:25). La cuantificación se realizó frente a estándar de referencia. Los parámetros para la validación siguieron lo establecido en la USP 33.

Resultados: El cromatograma presentó seis picos con elución entre 1,557 y 18,913 min. La linealidad del sistema y el método obtuvieron r^2 igual a 0,98 y 0,99, respectivamente. Los coeficientes de variación 1,5% en el estudio de repetitividad y 2% en la precisión intermedia. La exactitud del modelo lineal ajustado mostró $r=0,97$ e intervalo de confianza del intercepto (-0,921; 1,743).

Conclusiones: El método validado resultó específico, preciso, exacto y lineal. Puede ser utilizado para el control de la calidad y la estabilidad de las isoflavonas presentes en los fitofármacos.

Palabras Clave: CLAR; control de calidad; isoflavonas; validación de métodos análisis.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: September 2, 2016.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: November 26, 2016.

Accepted | Aceptado: November 27, 2016.

Available Online | Publicado en Línea: December 17, 2016.

Declaration of interests | Declaración de Intereses: The authors declare no conflict of interest.

Funding | Financiación: The author confirms that the project has no funding or grants.

Academic Editor | Editor Académico: Gabino Garrido.

INTRODUCCIÓN

El papel de las isoflavonas es profundamente valorado y actualmente es objeto de numerosas investigaciones debido a la doble actividad estrogénica y antiestrogénica que presentan. Estudios recientes indican que las isoflavonas tienen beneficios potenciales como los de reducir los síntomas de la menopausia, mejorar el nivel de colesterol, retardar el agrandamiento de la glándula prostática masculina y mejorar la salud ósea. La base molecular sobre la cual se sustenta su acción esteroidea radica inicialmente en su similitud estructural con los estrógenos (Sakamoto et al., 2010; Philibert et al., 2010; Ferraz Carbone et al., 2011; García Martín et al., 2012; Pérez Rovira y Mach Casellas, 2012; Valladares et al., 2012; Gofur y Lestari, 2013; de Piano et al., 2013; Correia et al., 2015).

En Ecuador, muchos laboratorios farmacéuticos producen fitoterapéuticos que contienen extractos de soja, de los que se desconoce el contenido en isoflavona y no se ha establecido un método de control de calidad por medio del cual el organismo regulador pueda certificar la calidad de ellos. Esto constituye, por tanto, un problema a resolver para los organismos de salud pública.

Es por ello que el presente trabajo se plantea como objetivo: desarrollar un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para evaluar la concentración de isoflavonas en los diferentes fitofármacos que se comercializan en Ecuador y asegurar la confiabilidad de los resultados y así cumplir con lo establecido en las normas internacionales (ISO/IEC: 17025, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento analítico

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Chrom Elite®, Merck-Hitachi, Japón. La columna para realizar la separación fue una Symmetry C-18 (150 x 5 mm), Waters, Ecuador. Las pesadas se realizaron en una balanza Mettler-Toledo, Switzerland. Para la disolución de las muestras se empleó un baño ultrasónico digital Branson, Labomersa, Ecuador.

Patrones y reactivos

Los patrones empleados para la identificación y cuantificación de las isoflavonas fueron: genisteína, genistina, y daidzina, obtenidos de 5YR Nanjing Zelang Medical Technology Co., China (continental). Todos los disolventes y reactivos utilizados (etanol, acetonitrilo, ácido acético, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio), fueron de calidad Merck Darmstadt, Alemania, para uso en HPLC y se suministraron por Labomersa Ecuador; el peróxido de hidrógeno fue de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania, y se suministró por la misma empresa.

Condiciones cromatográficas

Para validar el método analítico se siguieron los procedimientos establecidos por Micke et al. (2006) y *Guidance for Industry* (2015), empleando formulaciones de fitofármacos elaborados con isoflavonas de soja.

Las condiciones experimentales fueron isocráticas, como detector se empleó el UV a 260 nm, la temperatura del horno de la columna 25°C, volumen de inyección 10 µL, flujo 1 mL/min, tiempo de corrida 30 min, fase móvil ácido acético 2% y acetonitrilo.

Preparación del estándar

Para la preparación de las muestras se tuvo en cuenta lo planteado por Rostagno (2005). En un balón aforado de 50 mL se disolvió una cantidad de extracto estandarizado de isoflavona de soja 40%, equivalente a 10,0 mg de isoflavonas totales, en 30 mL de solución etanólica 70% v/v. Se aplicó ultrasonido a temperatura de 60°C, por espacio de 20 min y luego se aforó con el mismo disolvente (concentración final: 0,2 mg/mL). Las muestras se prepararon al momento del análisis. Este procedimiento se aplicó de igual forma para los estándares daidzina, genistina y genisteína.

Preparación de la muestra

Se tomó una muestra de 20 cápsulas de concentrado de soja, las cuales fueron pesadas individualmente para determinar el contenido del producto por unidad y el peso promedio. El contenido de la muestra se homogeneizó y se pesaron 237,5 mg del

producto (equivalentes aproximadamente a 50 mg de isoflavonas totales). Se transfirió a un balón de 50 mL adicionando 20 mL de solución etanólica al 70 % v/v sonicando por 20 min, posteriormente se aforó con el mismo disolvente.

La curva de calibración a partir del estándar de referencia abarcó un rango entre 0,04 a 0,36 mg/mL a partir de la solución madre de 0,2 mg/mL, elaborada inicialmente.

Degradación del estándar y la muestra

De las soluciones de estándar y muestra elaboradas se transfirió una alícuota de 5 mL a un Erlenmeyer de 250 mL, adicionando 5 mL del producto de degradación respectivo (agua, hidróxido de sodio 0,1 N, ácido clorhídrico 0,1 N y peróxido de hidrógeno 1%). Las muestras, de forma independiente, se sometieron a reflujo a 60°C por 30 min. Después de enfriar las soluciones se transfirieron a un balón de 25 mL y se completó el volumen con solución etanólica 70% v/v. Para la detección de fotólisis se tomaron 5 mL de la solución inicial y se transfirieron a un balón de 25 mL, exponiéndolo a la luz ultravioleta durante 30 minutos.

Validación del método

Para la validación del método se evaluó, primeramente, la especificidad. En esta determinación se emplearon muestras sometidas a la degradación y el arreglo de diodo como método, para observar la aparición de picos secundarios a otras longitudes de onda y la no interferencia de posibles picos con el principal.

La precisión se determinó mediante la prueba de repetibilidad y la precisión intermedia. Para ello se emplearon soluciones de tres concentraciones: 50% (0,16 mg/mL), 100% (0,20 mg/mL) y 150% (0,24 mg/mL) de la cantidad teórica, por dos analistas, en diferentes días, siguiendo el método de análisis propuesto. Se determinó la media, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (CV). Los resultados se compararon estadísticamente mediante las pruebas de F de Fisher y *t de Student*. El criterio de aceptación incluyó valores de coeficiente de variación inferiores al 1,5% y al 2% para los estudios de repetibilidad y precisión intermedia, respectivamente.

Para comprobar la linealidad del sistema cromatográfico se prepararon a partir de una solución madre de isoflavonas totales (0,2 mg/mL), soluciones de 0,04; 0,12; 0,20; 0,28; 0,36 mg/mL que abarcaron el rango entre 20 y 180% de la cantidad de isoflavonas totales presente en la muestra. La curva de regresión de mejor ajuste sobre los puntos individuales se determinó por el método de mínimos cuadrados de seis réplicas.

La exactitud y linealidad del método se realizó por un análisis repetido de muestras de diferentes concentraciones 0,16; 0,20; 0,24 mg/mL de isoflavonas totales presente en la muestra. Se consideró en cada punto el CV, el porcentaje de recobro y los resultados de la prueba de *t de Student*, entre la recuperación media y 100%. También, se determinó la G de Cochran para conocer si las varianzas de las concentraciones eran equivalentes.

Análisis estadístico

Los resultados en los diferentes ensayos se procesaron estadísticamente con un nivel de significación $\alpha = 0.05$ mediante el programa *Statgraphics Centurion 16.1.11 plus* para Windows.

RESULTADOS

En la Fig. 1A, se muestra el cromatograma de la mezcla de los estándares, el cual, según las condiciones descritas presentó picos cuya elución estuvo comprendida entre 1,557 y 18,913 min. Los picos principales fueron: daidzina con TR 1,557 min, genistina con TR 3,17 min y genisteína con TR 18,913 min.

En los cromatogramas (Figs. 1 B-E) se visualizan los resultados de la aplicación del método analítico en diferentes condiciones degradativas (oxidación y fotólisis).

En la Tabla 1 se reportan los valores de las abundancias relativas para las tres curvas de calibración realizadas con el estándar y la muestra y en la Tabla 2 los parámetros estadísticos del método correspondientes a cada determinación.

En el estudio de precisión resultaron los coeficientes de variación CV 80% = 0,568; CV 100% = 0,743% y CV 120 % = 0,470% para la repetibilidad y al 0,59% en la precisión intermedia. Los resultados

del procesamiento estadístico (Tabla 2) muestran la relación entre los analistas ($p=0,05$; $p=0,14$).

En la linealidad del sistema se obtuvo una ecuación de la curva ajustada $\text{Área} = 2,87 + 1,95E8 \cdot \text{Concentración}$, con pendiente significativa (0,00). La Fig. 2A muestra la curva de calibración correspondiente. De igual manera se analizó la linealidad del método analítico mostrando resultados similares (Fig. 2B) a la del sistema.

La Tabla 2 reporta los porcentajes de isoflavonas totales calculados utilizando como referencia el estándar. A partir de estos valores se construyó una curva de calibrado de cantidades añadidas vs. cantidades recuperadas.

Como se observa, para el modelo lineal ajustado, se obtuvo un valor de $r=0,97$, el intervalo de confianza del intercepto (-0,921; 1,743) incluyendo el cero. A partir de los resultados en el cálculo de las isoflavonas totales, se determinó el porcentaje de recuperación o recobrado (R) para cada concentración (Fig. 2C).

DISCUSIÓN

En las muestras que fueron tratadas con hidróxido de sodio 0,1 N se observó una marcada disminución de los picos cromatográficos correspondientes a las isoflavonas, lo cual es indicativo de que en este medio se produce una degradación de éstas que puede ser debida al rompimiento del anillo con la consiguiente formación de sales de cadena abierta. El tratamiento con el medio oxidante provocó, de igual forma, una significativa disminución de las isoflavonas. No obstante a estos cambios, no se observó la aparición de nuevos picos cromatográficos que pudieran interferir en la determinación, lo que garantiza la especificidad del método ensayado.

Para comprobar la linealidad del método se aplicó el estadígrafo *t de Student*, a través del cual se demostró que los valores experimentales cumplieron con el criterio de aceptación para el intercepto. El valor medio del coeficiente de respuesta fue cercano al valor de la pendiente de la recta y el coeficiente de variación de los factores de respuesta menor que 5%. El r obtenido indicó que existe una fuerte correlación lineal positiva entre las variables "x" (concentración del analito) y "y" (área bajo la curva) lo que indica el cumplimiento del parámetro de linealidad para el método propuesto.

Los resultados obtenidos cumplieron con el límite establecido para el coeficiente de variación de métodos cromatográficos, el cual debió ser menor o igual que 2%; esto señala que el método es repetible. El valor de la C - experimental en el test de Cochran fue menor que el tabulado lo cual indica que la concentración no influye en la precisión. Al cumplirse los criterios de aceptación entre las dispersiones y las medias de ambos analistas, puede asumirse que existe homogeneidad en los datos y de esta forma se demuestra que el método es reproducible.

En la demostración de la exactitud del método, se pudo comprobar que en todos los casos el coeficiente de variación obtenido fue menor que 2%, los porcentajes de recuperación estuvieron entre 98 y 102%, lo que cumple lo establecido en la literatura (Micke et al., 2006). No se encontraron diferencias significativas entre la recuperación media y 100% de recobro. Las varianzas de las concentraciones son equivalentes, con valores de G de Cochran experimental menor que la tabulada; por lo tanto puede asumirse que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Da Costa César et al. (2007), obtuvieron resultados similares para la determinación por CLAR de las isoflavonas de soja.

Estudios realizados por Rostagno (2005), para evaluar la estabilidad de las isoflavonas de soja, demostraron que los extractos de isoflavonas se pueden conservar sin que se produzca degradación significativa a -20°C durante 30 días en la oscuridad o entre 5 y 10°C durante 7 días, en la oscuridad o con luz incidente. En este estudio, las muestras a analizar se elaboraron en el momento en que se iban a procesar, por lo que no deben haberse presentado degradaciones producto del almacenamiento.

Otro aspecto evaluado por este autor, fue la eficacia del empleo del ultrasonido como método de extracción. Él señaló que la eficacia de extracción de las isoflavonas aumenta con el empleo del ultrasonido, pero es fuertemente dependiente del disolvente empleado y sugiere como mejores disolventes al etanol al 50% y al metanol al 50%, debido a que con la presencia del agua se transmiten mejor las ondas ultrasónicas, finalmente estableció en su protocolo que una temperatura de 60°C y un tiempo de 20 min, serían los más apropiados.

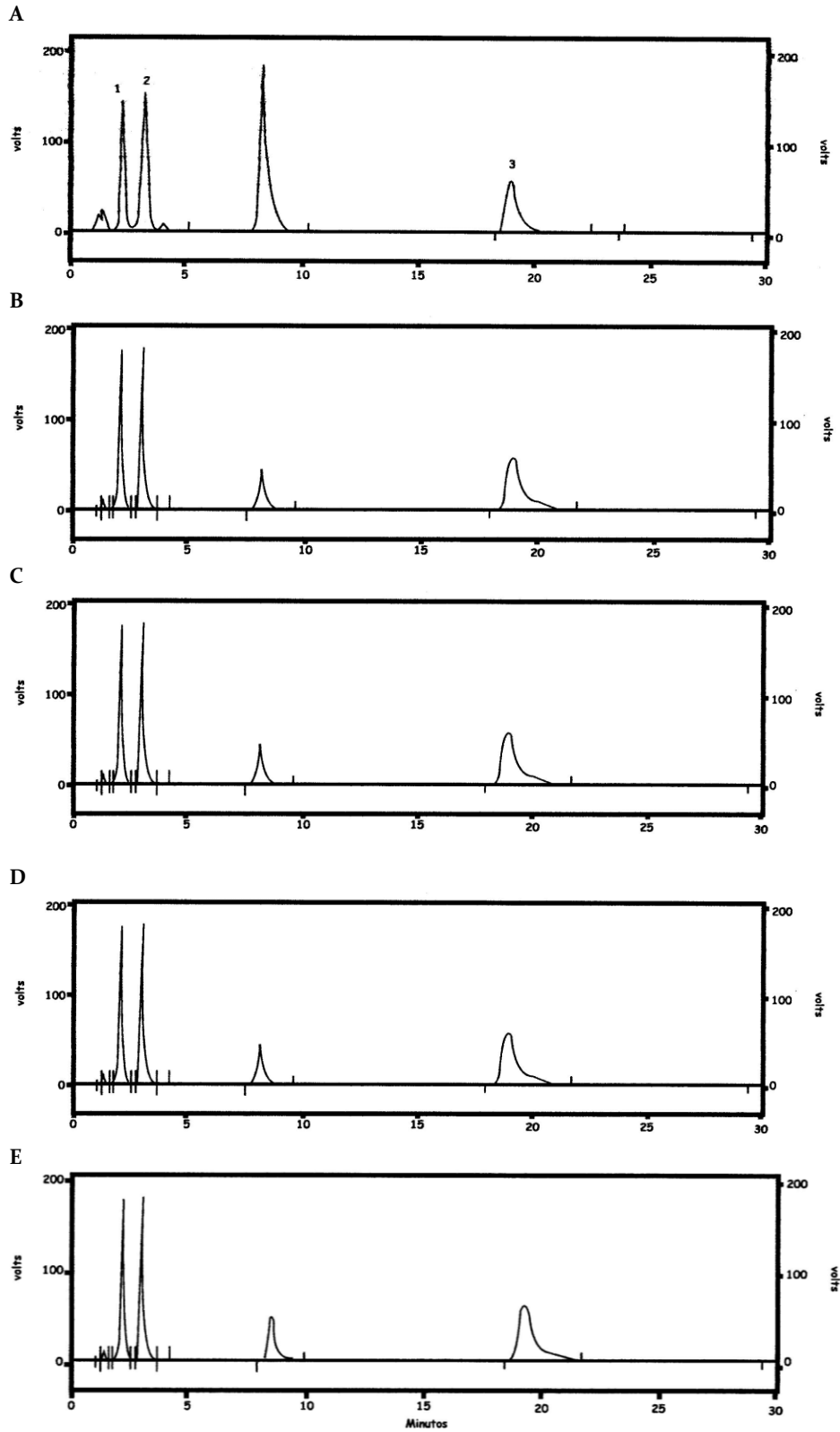


Figura 1. Estudio de degradación del estándar de isoflavonas sometido a diferentes medios.

(A) Cromatograma del estándar: daidzina (1), genistina (2), genisteína (3); (B) estándar tratado con ácido clorhídrico; (C) estándar tratado con hidróxido de sodio; (D) estándar tratado con peróxido de hidrógeno; (E) estándar sometido a fotólisis.

Tabla 1. Abundancia relativa de los picos cromatográficos de las disoluciones estándares y las muestras.

| Corridas del estándar | Concentración de las diluciones/Abundancia relativa | | | | |
|------------------------|---|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | 20% | 60% | 100% | 140% | 180% |
| 1 | 9474076 | 26514672 | 44259219 | 59832516 | 73088487 |
| 2 | 9532894 | 26895331 | 43778360 | 64099571 | 73477952 |
| 3 | 9520910 | 27305973 | 45737273 | 63913433 | 73149698 |
| Media ± D.E. | 9509293,33 ± 31082,14 | 26905325,33 ± 395745,16 | 44591617,33 ± 1020882,72 | 62615173,33 ± 2411648,44 | 73238712,33 ± 209435,93 |
| Corridas de la muestra | 20% | 60% | 100% | 140% | 180% |
| 1 | 9583924 | 26163279 | 42194411 | 60852583 | 78982899 |
| 2 | 9450143 | 26670847 | 43693558 | 60719958 | 78624512 |
| 3 | 9350470 | 26675814 | 44467219 | 62798198 | 77722885 |
| Media ± D.E. | 9461512,33 ± 117141,53 | 26503313,33 ± 294488,84 | 43451729,33 ± 1155540,94 | 61456913,00 ± 1163478,16 | 78443432,00 ± 649231,31 |

D.E: desviación estándar.

Tabla 2. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta precisión (CLAR) para evaluar la concentración de isoflavonas.

| Parámetros | Criterios | Resultados |
|------------------------|---|--|
| Linealidad del sistema | $r > 0,99$; $r^2 > 0,98$ | $r=0,99$; $r^2=0,98$ |
| | Intercepto no significativo | Área = $2,87 + 1,95E8 \cdot \text{Conc}$ |
| | $\tau_{\text{exp}} < \tau_{\text{tab}}$ | $C_{\text{exp}}=0,37 < C_{\text{tab}} = 0,68$ |
| | Pendiente significativa ($p < 0,05$) | $F_{\text{experimental}} = 783,98$; $p = 0,00$ Pendiente significativa ($p = 0,00$) Intercepto no significativo ($p=0,099$) |
| Linealidad del método | $r > 0,99$; $r^2 > 0,98$ | Área = $657039,0 + 2,15E8 \cdot \text{Conc}$ |
| | Intercepto no significativo | $r = 0,99$; $r^2 = 0,99$ |
| | $\tau_{\text{exp}} < \tau_{\text{tab}}$ | ANOVA $p = 0,00$ |
| | Pendiente significativa ($p < 0,05$) | Pendiente significativa ($0,00$) Intercepto no significativo ($p = 0,12$) |
| Exactitud | $\bar{R} = 97 - 103\%$ | $\bar{R} = 100,85\%$ |
| | $\tau_{\text{exp}} < \tau_{\text{tab}}$ | % obtenido = $9,9327 + 0,9060 \cdot \%$ teórico |
| | $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ | $t_{\text{experimental}} (0,90)$ y $t_{\text{tabulada}} (2,92)$. $G_{\text{experimental}} 0,42$ y $G_{\text{teórico}} 0,71$ |
| Repetibilidad | $CV \leq 1,5\%$ | $CV_{80\%} = 0,568\%$ $CV_{100\%} = 0,743\%$ $CV_{120\%} = 0,470\%$ |
| | $CV \leq 3\%$ | $CV = 0,594\%$ |
| | $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$ | $F_{\text{exp}} = 2,46$; $F_{\text{tab}} = 5,05$ |
| Precisión intermedia | $\tau_{\text{exp}} < \tau_{\text{tab}}$ | $\tau_{\text{exp}} = 0,13$; $\tau_{\text{tab}} = 2,23$ |

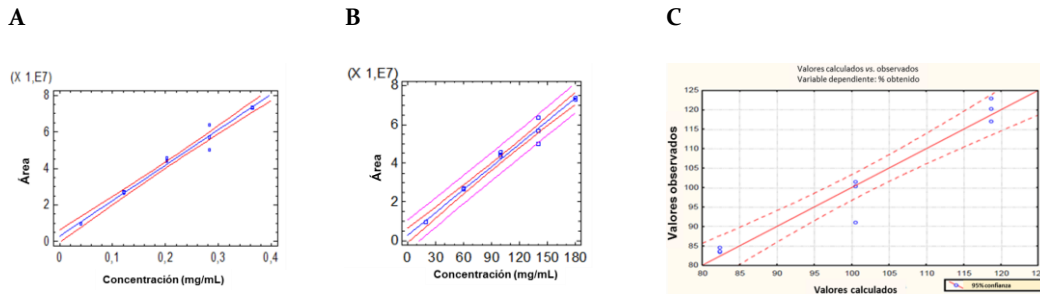


Figura 2. Curvas de calibración de linealidad y exactitud.

(A) Curva de calibración de la linealidad del sistema; (B) Curva de calibración de la linealidad del método analítico por cromatografía líquida de alta precisión (CLAR); (C) Curva de calibración de la exactitud del método analítico por CLAR.

En este trabajo, con excepción del disolvente empleado, que fue etanol al 70%, se cumplieron con todos los aspectos establecidos en el trabajo de Ros-tagno (2005) y resulta importante señalar que se obtuvo una buena extracción de las muestras estudiadas ya que no existe una gran diferencia de polaridad entre los disolventes sugeridos y el empleado, por lo que se considera que las condiciones de extracción fueron adecuadas y no influyentes en la validación del método.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que el método desarrollado es específico, preciso, exacto y lineal, por lo que puede ser empleado para la cuantificación de isoflavonas totales en los fitome-dicamentos que se comercializan en Ecuador.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores confirman que este estudio no cuenta con fondos ni subvenciones.

REFERENCIAS

- Correia Silva ML, Leite Speridião PG, Marciano R, Amâncio OMS, de Moraes TB, de Moraes MB (2015) Effects of soy beverage and soy-based formula on growth, weight, and fecal moisture: experimental study in rats. *J Pediatr* 91(3): 306-312.
- da Costa César I, Castro Braga F, Duarte Vianna-Soares C, de Aguiar Nunan E, Franco Barbosa TA, Moreira-Campos LM (2007) Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína

em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Rev Bras Farmacogn* 17(4): 616-625.

- de Piano A, de Mello MT, Watson RR, Dâmaso AR (2013) The effects of a fermented soy product and isoflavones in metabolic syndrome control. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Elsevier Inc., pp. 481-494.
- Ferraz Carbonel AA, Simões RS, Barros Rabelo Santos RH, Pinheiro Baracat MC, Simões MJ, Baracat ECH, Soares Júnior JM (2011) Effects of high-dose isoflavones on rat uterus. *Rev Ass Med Bras* 57(5): 524-529.
- García-Martín A, Quesada Charneco M, Álvarez Guisado A, Jiménez Moleón JJ, Fonollá Joya J, Muñoz-Torres M (2012) Efecto de un preparado lácteo con isoflavonas de la soja sobre la calidad de vida y el metabolismo óseo en mujeres posmenopáusicas: estudio aleatorizado. *Med Clin* 138(2): 47-51.
- Gofur A, Lestari SR (2016) Effect of black soybean natto extract (*Glycine soja*) on reproduction system of hypercholesterolemia male mice. *Asian Pac J Reprod* 5(5): 387-390.
- Guidance for Industry (2015) *Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- ISO/IEC 17025 (2005) *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:vi:es>. [Consultado 1 de septiembre, 2016].
- Micke GA, Fujiya NM, Tonin FG, de Oliveira Costa AC, Maggi Tavares MF (2006) Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetics chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1625-1632.
- Pérez Rovira A, Mach Casellas N (2012) Efecto del consumo de soja en relación con los síntomas de la menopausia. *Rev Esp Nutr Hum Diet* 16(2): 69-76.
- Philibert Ch, El Messaoui S, Gignoux M, Pinzani V, Larrey D, Hillaire-Buys D (2010) Liver injury from phytotherapy

treatment containing soy isoflavones. *Therapie* 65(5): 501-503.

Rostagno MA (2005) Nuevos Métodos para la Determinación de Isoflavonas en Soja y Alimentos Derivados. Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica Universidad de Cádiz. <http://docplayer.es/5891602-Nuevos-metodos-para-la-determinacion-de-isoflavonas-en-soja-y-alimentos-derivados.html> [Consultado 1 de septiembre, 2016].

Sakamoto T, Horiguchi H, Oguma E, Kayama F (2010) Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *J Neurosci Res* 88: 877-886.

Valladares L, Garrido A, Sierralta W (2012) Isoflavonas de soja y salud humana: cáncer de mama y sincronización de la pubertad. *Rev Med Chile* 140: 512-516.

Contribución de los autores:

| Contribución | Soledispa Cañarte PA | Miranda Martínez M | García Mir V |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| Conceptos o Ideas | x | x | x |
| Diseño | x | x | x |
| Definición del contenido intelectual | x | x | x |
| Búsqueda bibliográfica | x | - | - |
| Estudios experimentales | x | - | - |
| Adquisición de datos | x | - | . |
| Análisis de datos | x | x | x |
| Análisis estadístico | - | - | x |
| Preparación del manuscrito | x | x | |
| Edición del manuscrito | x | x | |
| Revisión del manuscrito | | x | x |

Formato de cita: Soledispa Cañarte PA, Miranda Martínez M, García Mir V (2017) Validación de una técnica por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de isoflavonas totales. [Validation of a technique by high-performance liquid chromatography for the determination of total isoflavones]. *J Pharm Pharmacogn Res* 5(2): 106-113.