



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 167 191**

② Número de solicitud: 009902799

⑤ Int. Cl.⁷: B01D 15/08

C07K 1/20

C07K 14/415

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **21.12.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2002

⑦ Solicitante/s:
UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES

⑦ Inventor/es:
García López, María Concepción;
Marina Alegre, María Luisa y
Torre Roldán, Mercedes

⑦ Agente: **Carpintero López, Francisco**

⑤ Título: **Procedimiento de caracterización y cuantificación de proteínas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de caracterización y cuantificación de proteínas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

El objeto de la invención es el desarrollo de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa para caracterizar y cuantificar proteínas de soja en productos comerciales a base de soja en cortos tiempos de análisis.

La invención consiste en un gradiente binario y lineal en dos pasos con acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético a flujo determinado en función del tiempo de gradiente (para mantener un volumen de gradiente constante de 9 ml), una temperatura entre 25 y 60° y detección a 254 nm. La inyección de las muestras en disolución acuosa se lleva a cabo de forma directa en el sistema cromatográfico.

ES 2 167 191 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de caracterización y cuantificación de proteínas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

5 Este método cromatográfico permite la caracterización y determinación cuantitativa de las proteínas de soja en productos comerciales a base de soja. Esto supone un gran avance para el análisis rutinario de estos productos elaborados a base de soja, puesto que el análisis se realiza en tiempos muy bajos. Para ello, se utiliza la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

10 Estado de la técnica

La caracterización de las proteínas de soja ha sido llevada a cabo por diferentes técnicas. Entre ellas, la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) ha sido la técnica que más se ha utilizado durante los últimos años para este fin. Sin embargo, la caracterización de las proteínas de soja por CLAE suponía 15 unos tiempos de análisis elevados (entre 35 y 90 min. dependiendo de la modalidad cromatográfica, exclusión molecular o fase inversa) y métodos muy tediosos, costosos y complejos.

Recientemente, el tiempo requerido para la caracterización de las proteínas de soja por CLAE fue reducido por los inventores de este método a 9 min. (M. C. García, M. Torre, F. Laborda, M. L. Marina, 20 (1997) J. Chromatogr. A, 758, 75-83). A pesar de ello, se pueden conseguir tiempos de análisis menores y en consecuencia se ha inventado un nuevo método cuyas características son el objeto de la presente invención.

25 Descripción de la invención

El método para la determinación de las proteínas de soja en productos comerciales a base de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta presión que permita trabajar en gradiente y que tenga acoplado un detector de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) de longitud de onda variable. La columna utilizada es una columna con relleno de 30 perfusión en la modalidad de fase inversa.

El método consiste en un gradiente lineal y binario en dos pasos, cuyo volumen (Flujo x Tiempo del gradiente) es igual a 9 ml. A un flujo de 3 ml/min, el gradiente es el siguiente: de 5 a 25 % de fase móvil (FM) B en 1,7 min y de 25 a 45 % de FM B en 1,3 min, seguido de un gradiente lineal inverso de 45 a 5 % 35 de FM B en 1 min y 1 min a 5 % de FM B para re-equilibrar la columna en las condiciones iniciales. Para utilizar este gradiente a otros flujos, se hace un ajuste del tiempo de gradiente para mantener el volumen de éste constante. Las fases móviles utilizadas para la separación son: Fase móvil A, agua de grado CLAE con una proporción de ácido trifluoroacético entre 0,05 y 0,3 % (v/v); Fase móvil B, acetonitrilo de grado CLAE con una proporción de ácido trifluoroacético entre 0, 05 y 0, 3 % (v/v) . Las fases móviles 40 se filtran a través de membranas de nylon de 0,45 μm y se desgasifican antes de su utilización.

Es posible llevar a cabo la separación a una temperatura de columna comprendida entre 25 y 60°C. La detección se realiza a una longitud de onda de 254 nm.

45 El protocolo para la preparación de la muestra es el siguiente: se pesa la muestra comercial de soja, se suspende en un medio acuoso (agua de grado CLAE), se mezcla, se sonica y se centrifuga para recoger el sobrenadante, que se deja a una temperatura de 2 a 5°C hasta el momento de la inyección.

El método cromatográfico inventado es aplicable a la caracterización y determinación cuantitativa de 50 las proteínas de soja en muestras comerciales a base de soja. El análisis cuantitativo se basa en el empleo de proteína aislada de soja o harina de soja, ambos productos comerciales, para la preparación de las disoluciones patrón que se van a utilizar en el calibrado. Los cromatogramas para un patrón (proteína aislada de soja) constan de 8 picos (Figura 1).

55 Las ventajas de la utilización de este método son las siguientes:

- El método objeto de la invención se puede realizar con una instrumentación básica y es por tanto accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis.

60 - El método consiste en un gradiente lineal y binario sencillo que permite la caracterización y cuantificación de las proteínas de soja en dos pasos.

- El método es sencillo porque no requiere tratamiento previo complejo de las muestras ni de los patrones. Las disoluciones de las muestras se preparan en agua de grado CLAE, lo cual reduce no sólo el tiempo de preparación de la muestra sino también el gasto en disolventes. La disolución de la muestra se inyecta directamente en el sistema cromatográfico, sin necesidad de utilizar filtros y jeringas, lo cual también reduce el tiempo de análisis y el coste.

- La posible aplicación industrial del método se basa en que permite la determinación ultrarrápida de proteínas de soja. Los tiempos de análisis lo hacen ideal en controles de rutina. No existe precedente en la bibliografía de un método tan rápido y sencillo para caracterizar y cuantificar proteínas de soja en muestras comerciales para el consumo humano. Así, por ejemplo, si la separación se lleva a cabo a un flujo de fase móvil de 3 ml/min, el tiempo en el que se separan las proteínas no excede los 3 min (a los que hay que añadir 2 min para re-equilibrar la columna). En estas condiciones, es posible analizar hasta 288 muestras en 24 horas.

- El método permite la caracterización y cuantificación de las proteínas de soja de forma simultánea.

- El método desarrollado permite determinar el contenido en proteína de soja en muestras con otros aditivos que contienen nitrógeno y para las cuales los métodos existentes para la determinación del nitrógeno total no permiten especificar el contenido en proteína. Así, este método permite hacer una diferenciación entre el contenido total en proteína de soja y el contenido en nitrógeno total para bebidas de soja y fórmulas infantiles que además de proteína de soja contengan otros compuestos añadidos (aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, etc.).

Descripción de la figura

Figura 1.- Cromatograma correspondiente a la separación de proteínas de soja a partir de un patrón de proteína aislada de soja. Condiciones: disolución acuosa del patrón de concentración 1,2026 mg/ml (en base seca); Flujo: 3 ml/min; Temperatura de columna: 60°C; Gradiente: 5-25 % FM B en 1,7 min y 25-45- % FM B 1,3 min (tiempo de gradiente = 3 min), seguido de un gradiente lineal inverso de 45 a 5 % de FM B en 1 min y 1 min a 5 % de FM B para re-equilibrar la columna en las condiciones iniciales; Fases móviles: 0,1 % ácido trifluoroacético en agua (FM A) y 0,1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo (FM B); Volumen de inyección: 20 µl; Detección: 254 nm.

Modo de realización

La aplicación del método a muestras comerciales a base de soja, como son las bebidas de soja (líquidas y en polvo) y las fórmulas infantiles a base de soja se citan como ejemplos.

Preparación de muestras y patrones

Se preparan suspensiones de 3 a 6 mg de muestra/ml (bebidas de soja en polvo y fórmulas infantiles a base de soja) y de 12 a 15 mg de muestra/ml (bebidas de soja líquidas). Estas suspensiones se agitan, se sonicen durante 3 min y se centrifugan a 3000 rpm durante 5 min para recoger el sobrenadante que se inyecta en el cromatógrafo.

Asimismo, se preparan disoluciones acuosas de un patrón de soja (proteína aislada de soja) de concentraciones comprendidas entre 0,4 y 1,5 mg/ml, siguiendo el mismo protocolo que se ha indicado para la preparación de las muestras. El contenido en proteína de cada disolución patrón utilizada en el calibrado se determina teniendo en cuenta la pureza y la humedad de éste. La humedad del patrón se determina secando éste a 130°C en una estufa, hasta peso constante.

Determinación cuantitativa de las proteínas de soja en muestras comerciales a base de soja

Se realiza un calibrado por el método del patrón externo con las disoluciones patrón preparadas previamente. Para ello, se inyecta por triplicado cada disolución patrón (volumen de inyección: 20 µl). Las condiciones cromatográficas para realizar el calibrado y posterior análisis de muestras fueron:

- Columna: Relleno de perfusión; tamaño de partícula de 10 µm; dimensiones: 50 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

- Gradiente: de 5 a 25 % de FM B en 1,7 min y de 25 a 45 % de FM B en 1,3 min (tiempo de gradiente = 3 min), seguido de un gradiente lineal inverso de 45 a 5 % de FM B en 1 min y 1 min a 5 % de FM B

ES 2 167 191 A1

para re-equilibrar la columna en las condiciones iniciales.

- Flujo: 3 ml/min.

5 - Fases móviles: Fase móvil A, agua de grado CLAE con 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético; Fase móvil B, acetonitrilo de grado CLAE con 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético.

- Temperatura de la columna: 60°C.

10 *Calibración*

La recta de calibrado se obtiene representando el área total (suma de las áreas de todos los picos) en función de la concentración inyectada del patrón correspondiente (corregido con la pureza y la humedad). El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados dio lugar a los siguientes resultados:

15

$$y = 32,64 x + 1,994; r^2 = 0,9996; n = 4;$$

error estándar de la recta = 0,3433

20 donde y es el área total (la suma de las áreas de todos los picos de las proteínas obtenidos en el cromatograma del patrón) y x es la concentración en proteína de la disolución patrón.

Características analíticas del método

25 Las características analíticas del método (intervalo lineal, límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad) se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

30	Intervalo lineal 0,4379-1,3025 (mg/ml)	
	Límite de detección	70 µg de proteína aislada de soja/ml
	Repetibilidad para el patrón (%), n=10 ^a	
	en área de pico	3,10
35	en concentración	3,11
	Reproducibilidad, en concentración, para las muestras (%), n=10 ^b	
	Fórmula infantil a base de soja	5,00
	Bebida de soja en polvo	2,65
40	Bebida de soja líquida	2,00

^a Número de inyecciones de una disolución patrón de proteína aislada de soja (0,7659 mg/ml).

45 ^b Análisis de diez disoluciones individuales de cada una de las muestras (cada disolución se inyecta por triplicado).

Determinación del contenido de proteína de soja en las muestras

50 Una vez obtenida la recta de calibrado, se inyecta la disolución acuosa de la muestra. Los cromatogramas correspondientes a estas muestras a base de soja presentan un número variable y máximo de 8 picos de proteínas de soja, cuyos tiempos de retención se corresponden con los obtenidos para los picos del cromatograma del patrón de proteína aislada de soja. El número de picos y tamaño de éstos permite llevar a cabo la caracterización de cada muestra.

55 Por otra parte, el área total de los picos de proteína medida en el cromatograma correspondiente a cada muestra problema nos permite realizar el análisis cuantitativo de proteínas de soja en la misma interpolando dicho valor de área directamente sobre la recta de calibrado. El resultado del análisis se refiere a peso seco de muestra, una vez determinada la humedad de la muestra por secado en una estufa a 102°C hasta peso constante. A título de ejemplo en la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos
60 para tres muestras analizadas.

ES 2 167 191 A1

TABLA 2

Muestra	Concentración de proteína de soja (g/100 g de muestra)		
	Método Kjeldahl ^{a,b}	Etiqueta ^c	Método de perfusión ^{b,d}
Fórmula infantil a base de soja	14,30 (0,70)	15,00	15,37 (0,83)
Bebida de soja en polvo	34,81 (1,63)	35,00	35,49 (0,94)
Bebida de soja líquida	2,82 (0,12)	3,10	2,82 (0,04)

^a Resultado correspondiente al valor medio de seis análisis independientes.

^b La desviación estándar se indica entre paréntesis.

^c Valor que aparece en la etiqueta del producto comercial como contenido en proteínas.

^d Resultado correspondiente al valor medio de dos análisis independientes.

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de proteínas de soja por cromatografía **caracterizado** porque comprende la caracterización y determinación cuantitativa de dichas proteínas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.
5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha cromatografía de alta eficacia de perfusión en fase inversa comprende la aplicación de un gradiente lineal.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque en la realización de dicha cromatografía se usan dos fases móviles.
10
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dichas fases móviles son: FM A: agua con ácido trifluoroacético y FM B: acetonitrilo con ácido trifluoroacético.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las fases móviles contienen ácido trifluoroacético en una proporción entre 0,05 % y 0,3 % (v/v).
15
6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicho gradiente de volumen constante se puede conseguir utilizando distintos flujos de fase móvil.
20
7. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicho gradiente es el siguiente: para un flujo de 3 ml/min: 5-25 % de FM B en 1,70 min y 25-45 % de FM B en 1,30 min seguido de una etapa de reequilibrado de la columna a las condiciones iniciales.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la columna de perfusión en fase inversa utilizada para realizar la cromatografía tiene una longitud de 50 mm y un diámetro interno de 4,6 mm y el tamaño de partícula es de 10 μ m.
25
9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la columna se mantiene a una temperatura constante.
30
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la temperatura de la columna está comprendida entre 25°C y 60°C.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la temperatura de la columna es de 60°C.
35
12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección se realiza mediante un detector de absorción UV-visible.
40
13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la longitud de onda utilizada para la detección es 254 nm.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza como patrón para la determinación cuantitativa de las proteínas de soja, proteína aislada de soja o harina de soja comerciales con contenido en soja conocido.
45
15. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la preparación de la muestra hasta su inyección en la columna comprende las etapas de
50
- pesada de la muestra
 - suspensión de la misma
 - 55 - agitación manual
 - ultrasonificación
 - centrifugación para recoger el sobrenadante e
 - 60 - inyección del sobrenadante en el sistema cromatográfico.

ES 2 167 191 A1

16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque las muestras se disuelven en agua.

17. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque las muestras se sonicán durante
5 tres minutos.

18. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque las muestras se centrifugan a 3000 rpm durante cinco minutos.

10 19. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se pueden caracterizar y cuantificar varias proteínas simultáneamente.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

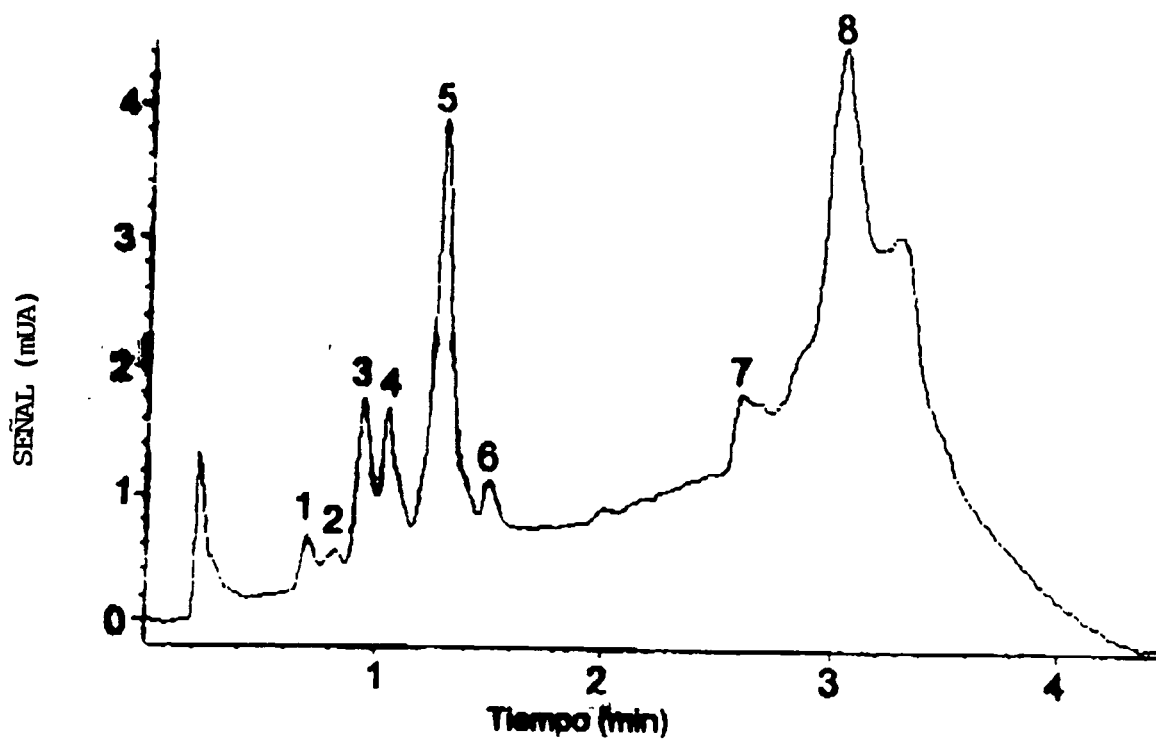


Figura 1.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: B01D 15/08, C07K 1/20, 14/415

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA, M.C. et al.: "A perfusion reversed-phase chromatographic method for ultrarapid determination of soybean proteins in soybean infant formulas and soybean milks: method development and validation", 1998, J. Chromatographic Science, Vol. 36, páginas 527-534. Todo el documento.	1-19
X	GARCÍA, M.C. et al.: "Ultrarapid detection of bovine whey proteins in powdered soybean milk by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography", 1998, J. Chromatography, Vol. 822, páginas 225-232. Todo el documento.	1-19
X	GARCÍA, M.C. et al.: "Rapid separation of soybean globulins by reversed-phase high-performance liquid chromatography", 1997, J. Chromatography, Vol. 758, páginas 75-83. Todo el documento.	1-5,10, 12,13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

26.03.2002

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1