

Xây dựng quy trình phân tích đồng thời một số phytoestrogen trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao

Vũ Thị Thanh An, Mạc Thị Thanh Hoa, Cao Công Khánh*

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Ngày đến tòa soạn: 01/02/2021; Ngày chấp nhận đăng: 16/09/2021

Tóm tắt

Các chất có hoạt tính phytoestrogen: puerarin, daidzin, glycitin, genistin, miroestrol, daidzein, glycitein, genistein được chiết ra khỏi nền mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) sử dụng dung môi methanol chiết rung siêu âm tại nhiệt độ 40°C. Quá trình phân tích được thực hiện trên thiết bị HPLC Alliance e2695 (Waters) sử dụng cột pha đảo C18 Reliant (250 mm × 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1,0 mL/phút kết hợp detector PDA, chương trình gradient pha động sử dụng 2 kênh: kênh A là acid phosphoric 0,1 % nước và kênh B là methanol trong vòng 45 phút. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại và độ thu hồi đạt các yêu cầu theo quy định của AOAC. Phương pháp sau thẩm định được áp dụng phân tích hàm lượng phytoestrogen trong một số mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có mặt trên thị trường.

Từ khóa: *phytoestrogen, puerarin, daidzein, miroestrol, HPLC, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.*

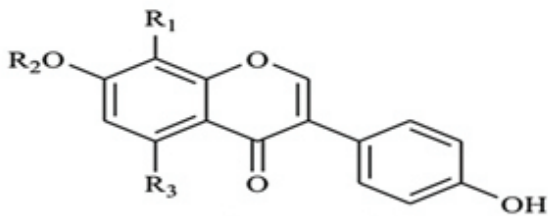
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phụ nữ bước vào tuổi trung niên (45 - 50 tuổi) thường bắt đầu xuất hiện các triệu chứng làm suy giảm chất lượng cuộc sống của phụ nữ như: rối loạn kinh nguyệt, giảm khả năng sinh sản, cơn bốc hỏa, rối loạn giấc ngủ, thay đổi tâm lý,... Theo các nhà khoa học, nguyên nhân chính dẫn đến thời kỳ này của người phụ nữ là do sự giảm tiết hormon giới tính nữ estrogen [1], do đó làm tăng nguy cơ mắc các bệnh loãng xương và xơ vữa động mạch.

Để hỗ trợ cho việc điều trị tiền mãn kinh, mãn kinh, việc bổ sung một loại TPBVSK giúp duy trì một số tác dụng giống estrogen là biện pháp thường được lựa chọn. Một trong những nguồn cung cấp chính hiện nay hay được sử dụng là isoflavon nguồn gốc từ thực vật, có cấu trúc, tác dụng tương đồng estrogen, nên còn được gọi là các phytoestrogen. Tác dụng chính của phytoestrogen là: chống loãng xương, chống oxy hóa, làm giảm nguy cơ tim mạch và làm giảm nguy cơ ung thư [4]. Nhằm đáp ứng nhu cầu trên, hiện nay thị trường đã xuất hiện hàng loạt các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có bổ sung thành phần phytoestrogen với tác dụng hỗ trợ sinh lý phụ nữ thời kỳ mãn kinh, tiền mãn kinh. Các nguồn cung cấp phytoestrogen nguồn gốc dược liệu thường được sử dụng và công bố trên nhãn sản phẩm là các chiết xuất từ đậu nành (*Glycine max*), sắn dây (*Pueraria thomsonii*), sắn dây củ tròn (*Pueraria candollei* var. *mirifica*). Tuy nhiên, mỗi loại dược liệu trên có thành phần và hàm lượng hoạt chất nhóm phytoestrogen khác nhau. Các chiết xuất từ đậu nành được dùng phổ biến nhất với thành phần là các hoạt chất chính gồm: daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein. Chiết xuất từ củ sắn dây (dược liệu Cát căn) còn chứa thêm thành phần puerarin. Theo một số nghiên cứu thì sắn dây củ tròn (còn gọi là sâm tố nữ) thì ngoài các chất phytoestrogen trên còn có chứa hoạt chất đặc trưng là miroestrol.

* Điện thoại: 0943850316 Email: caokhanh2985@yahoo.com

Cấu tạo chung của một số phytoestrogen chính trong sắn dây như ở Hình 1. Do vậy giá thành và hiệu quả sử dụng sẽ khác nhau giữa các loại TPBVSK có chứa các hợp chất trên.



Hình 1 . Công thức cấu tạo chung của các phytoestrogen chính trong sắn dây

Đến nay, trên thế giới các phương pháp phân tích isoflavon đã được phát triển trên nhiều kỹ thuật khác nhau như quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS), điện di (CE), HPLC và LC-MS/MS [1, 3, 5-6]. Trong đó, kỹ thuật HPLC với detector PDA là phương pháp vừa đơn giản, phổ biến, dễ dàng áp dụng vừa có độ nhạy thích hợp cho việc xác định hàm lượng các phytoestrogen.

Vì vậy, để đảm bảo quyền lợi của người tiêu dùng và giúp các nhà sản xuất tăng cường đảm bảo chất lượng sản phẩm, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp phân tích đồng thời 08 hợp chất nhóm phytoestrogen trên trong các sản phẩm TPBVSK bằng kỹ thuật HPLC-PDA.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng phân tích: phytoestrogen trong đậu nành, sắn dây, sắn dây củ tròn (daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein, puerarin, miroestrol).

- Đối tượng mẫu: TPBVSK dạng viên nang, dạng nguyên liệu cao khô.

2.2. Thuốc thử và hóa chất

- Chất chuẩn: puerarin (98,0 %), daidzin (98,6 %), glycitin (98,5 %), genistin (98,2 %), daidzein (98,0 %), glycitein (98,0 %), genistein (99,0 %), miroestrol (Sigma hoặc tương đương).

- Hóa chất: Acetonitril, methanol, acid acetic (Merck), nước (đạt tinh khiết sắc ký).

2.3. Thiết bị

- Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Alliance với detector PDA, cột sắc ký C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μm) và tiền cột tương ứng.

- Các dụng cụ và thiết bị phụ trợ khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

- Tối ưu hóa quá trình phân tích trên HPLC: thử nghiệm và lựa chọn các điều kiện về sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC): cột sắc ký C18, bước sóng xác định các chất, tốc độ dòng: 1,0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 20 μL, nhiệt độ buồng cột: 30°C, thành phần pha động: theo chương trình gradient của hỗn hợp dung môi hữu cơ (methanol, acetonitril) và nước acid hóa.

- Khảo sát quy trình chiết phytoestrogen trong TPBVSK: cân chính xác mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm dung môi chiết. Mẫu được chiết nhiều lần với sự hỗ trợ của kỹ thuật. Mẫu được chiết nhiều lần với sự hỗ trợ của kỹ thuật siêu âm cách thủy hoặc lắc ngang. Dung dịch chiết thu được lọc qua màng lọc 0,45 μm và phân tích trên HPLC.

- Thẩm định phương pháp: đánh giá các thông số: độ đặc hiệu/độ chọn lọc, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ thu hồi theo hướng dẫn của AOAC.

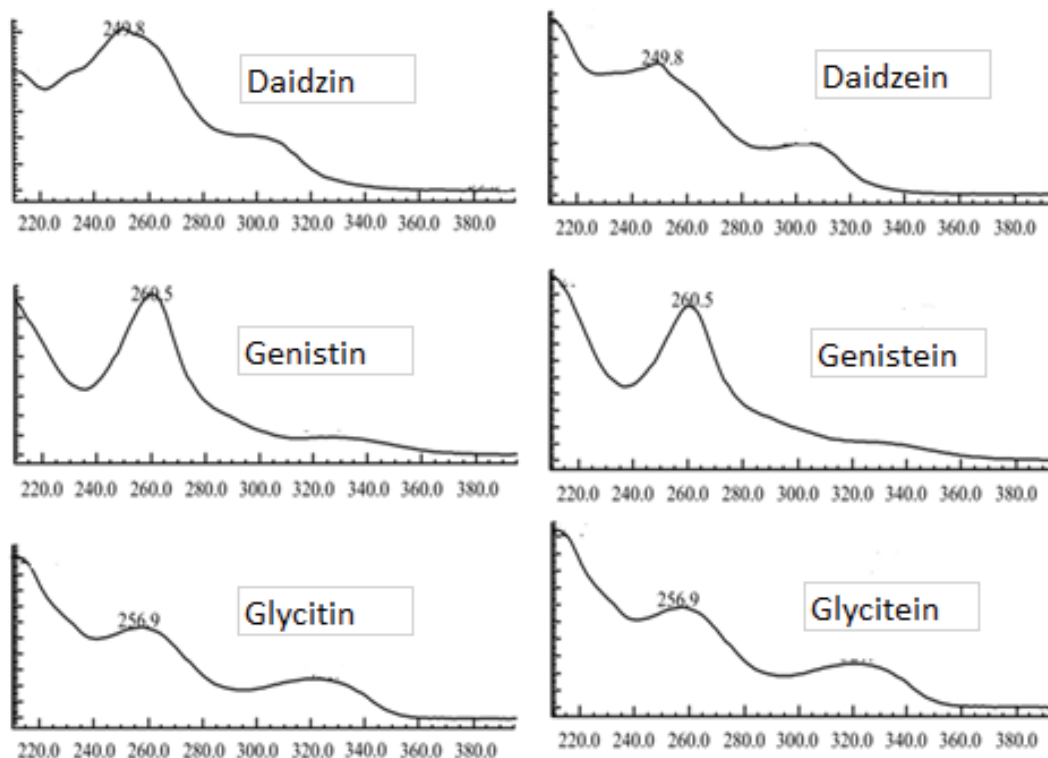
- Áp dụng phân tích mẫu thực tế: tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng các mẫu được lấy ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội, đánh giá sơ bộ về tổng hàm lượng phytoestrogen.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện phân tích phytoestrogen bằng phương pháp HPLC

Từ tính chất lý hóa, khung cấu trúc chung của phytoestrogen cũng như tham khảo các tài liệu nghiên cứu khác có thể thấy các phytoestrogen có khả năng hấp thụ quang (với cực đại hấp thụ trong khoảng 250 - 260 nm (Hình 2) và có độ phân cực yếu nên có thể được phân tách trên cột sắc ký lỏng pha đảo. Chính vì thế, nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật HPLC với cột pha đảo C18 với detector PDA để khảo sát quá trình phân tích các phytoestrogen.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của một số phytoestrogen

Một số điều kiện sắc ký được lựa chọn:

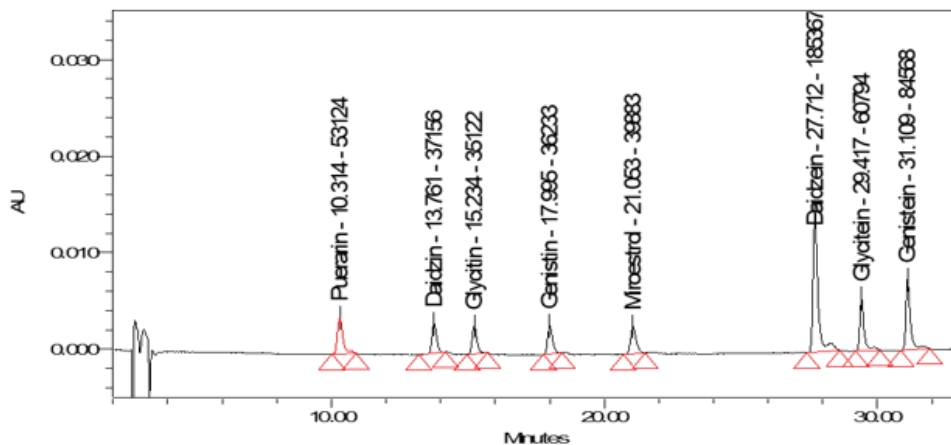
- Cột pha tĩnh: Cột sắc ký RP-C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) và tiền cột tương ứng;
- Thẻ tích tiêm mẫu: 20 μL;
- Nhiệt độ buồng cột: 30°C;
- Detector PDA: bước sóng định lượng 260 nm, khoảng ghi phổ 200 - 400 nm.

Các nghiên cứu cho thấy các phytoestrogen có thể tách khỏi nhau khi pha động sử dụng chương trình gradient với kênh A là dung dịch acid trong nước và kênh B là dung môi hữu cơ. Tiến hành khảo sát các dung môi ở cả 2 kênh A (acid acetic, acid formic, acid phosphoric) và kênh B (methanol, acetonitril và hỗn hợp hai dung môi này). Kết quả cho thấy với chương trình gradient như trong Bảng 1 giữa acid phosphoric 1 % nước và methanol cho khả năng tách tốt các chất phytoestrogen.

Bảng 1. Gradient pha động phân tích đồng thời các chất phytoestrogen

Thời gian (min)	Methanol (%)	Hàm lượng(mg/g)
0	10	90
20	30	70
30	50	50
35	90	10
40	10	90
45	10	90

Kết quả thử nghiệm trong Hình 3 cho thấy các chất puerarin, daidzin, glycitin, genistin, miroestrol, daidzein, glycitein, genistein đã tách nhau hoàn toàn. Như vậy có thể ứng dụng các điều kiện sắc ký như trên để xây dựng phương pháp phân tích đồng thời 08 chất phytoestrogen.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích đồng thời 08 chất phytoestrogen

3.1.2. Khảo sát điều kiện chiết mẫu

Hiện nay, một số nghiên cứu về chiết phytoestrogen từ đậu nành đã được thực hiện. Tính chất hóa học của phytoestrogen là các hợp chất phân cực yếu nên nhiều tác giả thường sử dụng dung môi hữu cơ phân cực để thực hiện giai đoạn chiết xuất như methanol, ethanol hoặc hỗn hợp của chúng với nước. Ngoài ra, trong quá trình xử lý mẫu có sự hỗ trợ của kỹ thuật siêu âm cách thủy giúp tăng hiệu quả chiết mẫu. Vì vậy, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát trên 05 hệ dung môi chiết chính gồm: (1) dung môi methanol 100 %, (2) hệ dung môi methanol : nước (70 : 30, v/v), (3) hệ dung môi methanol : nước (50 : 50, v/v), (4) dung môi ethanol 100 %, (5) hệ dung môi.

ethanol : nước (70 : 30, v/v). Kết quả cho thấy, dung môi methanol 100 % là dung môi cho hiệu suất chiết các phytoestrogen tốt trên nền mẫu khảo sát là thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Khảo sát số lần chiết: mẫu thực chứa phytoestrogen được sử dụng để khảo sát số lần chiết với dung môi đã lựa chọn là methanol cho thấy, lần chiết số 3 có hàm lượng chiết $\leq 2,0$ % trên tổng số 03 lần chiết. Như vậy sau 02 lần chiết, 98,0 % các phytoestrogen đã được chiết ra khỏi nền mẫu. Chính vì thế, nghiên cứu lựa chọn 02 lần chiết để tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu. Khảo sát kỹ thuật hỗ trợ chiết mẫu cho thấy khi thực hiện siêu âm cách thủy, có sự gia nhiệt ở nhiệt độ 40°C cho hiệu quả chiết tốt hơn so với kỹ thuật lắc ngang.

Như vậy, quy trình xử lý mẫu phân tích phytoestrogen trong các mẫu TPBVSK như sau: Cân khoảng 2 - 3 g mẫu đã đồng nhất, cho vào ống ly tâm, thêm 30 mL methanol, lắc vortex trong 1 phút. Siêu âm cách thủy 30 phút ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, ly tâm 6.000 vòng/phút trong 5 phút, gạn lấy dịch trong cho vào bình định mức 50 mL. Phần cặn chiết lặp lại với 15 mL methanol. Gộp dịch chiết, định mức đến vạch bằng methanol, lắc đều. Lọc dịch chiết qua màng lọc cho vào lọ đựng mẫu (pha loãng nếu cần) và phân tích trên hệ thống HPLC.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp sau khi được tối ưu hóa quá trình phân tích và được tiến hành thẩm định đầy đủ theo các tiêu chí của AOAC trên 02 nền mẫu viên nang cứng và nền mẫu viên nang mềm. Kết quả thu được như sau:

- Độ đặc hiệu, độ chọn lọc: trên sắc ký đồ của mẫu trắng, tại thời gian lưu tương ứng của 08 hợp chất nghiên cứu không có pic. Thời gian lưu và phổ hấp thụ UV giữa các pic tương ứng trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chiết xuất được liệu giống nhau.

- Khoảng tuyến tính và đường chuẩn: hoạt chất miroestrol có khoảng tuyến tính từ 0,2 - 40 $\mu\text{g/mL}$, 07 hoạt chất phytoestrogen còn lại đều có khoảng tuyến tính từ 0,1 - 20 $\mu\text{g/mL}$ với hệ số $R^2 \geq 0,995$ và độ lệch của các điểm trong khoảng tuyến tính đều nhỏ hơn 15 %. Điều này đáp ứng khả năng phân tích hàm lượng phytoestrogen trong các mẫu nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

- Thực hiện phân tích các mẫu trắng (viên nang cứng) có thêm chuẩn có hàm lượng thấp (khoảng 5 - 10 lần giá trị LOD ước lượng) được phân tích lặp lại 10 lần để xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). Kết quả được trình bày tại Bảng 2.

Bảng 2. LOD, LOQ của phytoestrogen trong TPBVSK

Chất phân tích	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
<i>Puerarin</i>	0,44	1,5
<i>Daidzin</i>	0,55	2,0
<i>Glycitin</i>	0,50	1,7
<i>Genistin</i>	0,37	1,3
<i>Miroestrol</i>	1,40	5,0
<i>Daidzein</i>	0,48	1,6
<i>Glycitein</i>	0,45	1,5
<i>Genistein</i>	0,56	2,0

- Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần các mẫu nguyên liệu và các mẫu TPBVSK dạng viên nang cứng và viên nang mềm theo quy trình đã được xây dựng ở trên. Đánh giá độ lặp lại qua thông số độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của hàm lượng hoạt chất phytoestrogen. Kết quả thu được thể hiện tại Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phytoestrogen

Chất phân tích	RSD (%)		
	Cao khô nguyên liệu	Nang cứng	Nang mềm
<i>Puerarin</i>	1,81	2,25	3,26
<i>Daidzin</i>	1,76	2,14	2,43
<i>Glycitin</i>	1,93	2,36	2,47
<i>Genistin</i>	1,87	2,19	2,65
<i>Miroestrol</i>	2,68	2,81	2,98
<i>Daidzein</i>	1,55	1,96	2,23
<i>Glycitein</i>	2,42	2,67	2,79
<i>Genistein</i>	1,94	2,12	2,41

Từ các kết quả trong bảng trên cho thấy độ lặp lại khi phân tích hàm lượng phytoestrogen trong các loại nguyên liệu và TPBVSK bằng kỹ thuật HPLC có giá trị RSD khoảng từ 1,55 - 3,26 %. Như vậy phương pháp trong nghiên cứu này đạt các yêu cầu của AOAC về độ lặp lại.

- Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua độ thu hồi. Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần các mẫu trắng TPBVSK (dạng viên nang cứng và dạng viên nang mềm, đã được xác định là không chứa các chất phân tích) thêm chuẩn. So sánh và đánh giá nồng độ các chất phân tích phytoestrogen tính được so với hàm lượng phytoestrogen tương ứng thêm chuẩn ban đầu, tính hiệu suất thu hồi (R%). Kết quả thử nghiệm thu được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ thu hồi của phytoestrogen

Chất phân tích	Nang cứng (R%)	Nang mềm (R%)
<i>Puerarin</i>	96,1 - 101	95,6 - 98,6
<i>Daidzin</i>	96,3 - 99,5	94,7 - 99,3
<i>Glycitin</i>	93,9 - 97,7	94,1 - 98,0
<i>Genistin</i>	94,6 - 98,1	95,3 - 102
<i>Miroestrol</i>	95,8 - 99,2	93,8 - 97,7
<i>Daidzein</i>	95,5 - 98,8	94,8 - 102
<i>Glycitein</i>	93,2 - 98,9	93,5 - 98,4
<i>Genistein</i>	94,1 - 99,8	94,6 - 99,5

Kết quả thử nghiệm cho thấy độ thu hồi của các chất phytoestrogen khi phân tích trong nền mẫu dạng viên nang cứng từ 93,2 - 101 %, trong nền mẫu dạng viên nang mềm từ 93,5 - 102 %. Như vậy, phương pháp đạt các yêu cầu của AOAC về độ thu hồi.

3.3. Áp dụng phương pháp phân tích mẫu thực trên thị trường

Nhằm đánh giá khả năng triển khai áp dụng trên thực tế, phương pháp này đã được sử dụng để kiểm nghiệm các mẫu thực. Các mẫu TPBVSK được lấy ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội, được bảo quản theo đúng điều kiện khuyến cáo của nhà sản xuất và tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng ở trên. Nghiên cứu đã tiến hành phân tích 15 mẫu viên nang, 05 mẫu nguyên liệu dạng cao khô. Kết quả kiểm nghiệm hàm lượng tổng 08 hoạt chất phytoestrogen thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích hàm lượng tổng các phytoestrogen trong mẫu thực trên thị trường

Mẫu phân tích	Hàm lượng các phytoestrogen nghiên cứu trong một số mẫu thực tế (mg/g)								
	Puerarin	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein	Miroestrol	Tổng
Viên nang 1	KPH	0,22	0,06	0,08	5,59	0,21	KPH	KPH	6,16
Viên nang 2	0,61	0,42	0,07	0,05	7,71	0,07	KPH	KPH	8,93
Viên nang 3	0,78	0,12	0,06	0,09	0,07	KPH	0,01	KPH	1,13
Viên nang 4	KPH	KPH	0,04	0,02	3,89	KPH	KPH	KPH	3,95
Viên nang 5	KPH	9,07	KPH	5,27	28,0	1,36	1,07	KPH	44,8
Viên nang 6	KPH	3,17	1,32	1,08	66,6	4,61	0,29	KPH	77,1
Viên nang 7	KPH	0,08	0,10	0,02	7,37	KPH	KPH	KPH	7,57
Viên nang 8	74,3	10,9	6,02	8,11	6,81	KPH	1,26	1,04	109
Viên nang 9	KPH	1,63	0,69	0,38	20,1	KPH	1,11	KPH	23,9
Viên nang 10	KPH	1,23	0,26	0,41	45,1	KPH	0,27	KPH	47,3
Viên nang 11	1,53	1,01	0,21	0,25	120	5,61	0,62	KPH	129
Viên nang 12	KPH	4,89	1,75	1,45	95,1	KPH	0,09	KPH	103
Viên nang 13	KPH	9,07	KPH	5,27	28,1	1,36	1,07	KPH	44,9
Viên nang 14	KPH	20,8	2,34	18,4	12,0	2,17	2,88	KPH	58,6
Viên nang 15	KPH	11,6	8,57	2,17	0,23	0,89	KPH	KPH	23,5
Cao nguyên liệu 1	KPH	7,91	2,86	2,82	405	6,40	0,13	KPH	425
Cao nguyên liệu 2	KPH	5,73	2,09	2,91	411	KPH	KPH	KPH	422
Cao nguyên liệu 3	KPH	17,3	6,88	5,13	422	KPH	2,17	KPH	453
Cao nguyên liệu 4	KPH	13,8	5,49	5,38	377	1,11	0,35	KPH	403
Cao nguyên liệu 5	KPH	3,61	1,32	0,77	363	25,1	15,6	KPH	409

Ghi chú: KPH - Không phát hiện, hàm lượng chất phân tích dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp

Kết quả phân tích các mẫu nguyên liệu trên thị trường cho thấy cả 05 mẫu cao khô nguyên liệu chứa hàm lượng phytoestrogen từ 403 - 453 mg/g. Không phát hiện thấy có puerarin và miroestrogen trong các mẫu nguyên liệu, điều này sơ bộ có thể nhận định các mẫu nguyên liệu này đều là chiết xuất từ đậu nành. Trong 15 mẫu TPBVSK dạng viên nang phát hiện thấy có 01 mẫu chứa miroestrol, 04 mẫu chứa puerarin với hàm lượng tổng phytoestrogen từ 1,13 - 129 mg/g. Các kết quả phân tích hàm lượng tổng phytoestrogen có sự dao động lớn giữa các mẫu TPBVSK dạng viên nang. Trong khi đó, phần lớn các sản phẩm TPBVSK chưa công bố hàm lượng từng thành phần hoặc tổng phytoestrogen. Điều này gây khó khăn trong việc kiểm soát chất lượng của các sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp phân tích đồng thời một số phytoestrogen trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng kỹ thuật HPLC đã xác định được 08 phytoestrogen phổ biến, thường có mặt trong các sản phẩm TPBVSK, kết quả phân tích góp phần phân biệt được nguồn gốc của các hoạt chất này dựa trên các đặc trưng của từng loại nguyên liệu. Nghiên cứu đã được tiến hành khảo sát, tối ưu hóa điều kiện phân tích và thẩm định theo đầy đủ các tiêu chí của AOAC về phương pháp phân tích hóa lý. Phương pháp cũng đã được triển khai áp dụng phân tích các mẫu thực cho thấy tiềm năng ứng dụng phục vụ công tác kiểm tra chất lượng sản phẩm và bảo vệ lợi ích người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. G. Aaron and W. C. Mark, "Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 913, no. 1, 2, pp. 397-413, 2001.
- [2]. Association of Official Analytical Chemists, "AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals," 2002.
- [3]. A. Aresta, P. Cotugno, F. Massari, and C. Zambonin, "Determination of isoflavones in soybean flour by matrix solid-phase dispersion extraction and liquid chromatography with UV-diode array detection," *Journal of Food Quality*, vol. 2017, Article ID 8049039, 2017.
- [4]. S. Malaivijitnond, K. Chansri, P. Kijkuokul, N. Urasopon, and W. Cherdshewasart, "Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb," *Journal of Ethnopharmacol*, vol. 107, no. 3, pp. 354-360, 2006.
- [5]. F. P. Pedro and C. J. Gonçalo, "Structural analysis of flavonoids and related compounds - a review of spectroscopic application," *In Book - Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, pp. 33-56, 2012.
- [6]. J. M. Sun, B. L. Sun, F. X. Han, S. R. Yan, H. Yang, and K. Akio, "Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds," *Agricultural Sciences in China*, vol. 10, no. 1, pp. 70-77, 2011.

Simultaneous determination of phytoestrogens in dietary supplements by high-performance liquid chromatography

Vu Thi Thanh An, Mac Thi Thanh Hoa, Cao Cong Khanh
National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

The bio-active phytoestrogen compounds (puerarin, daidzin, glycitin, genistin, miroestrol, daidzein, glycitein, genistein) in dietary supplements were extracted by ultrasonic method with methanol solvent in 40°C. The analysis procedure was carried out on HPLC Alliance e2695 (Waters) system, with RP-C18 Reliant (25 mm × 4.6 mm; 5µm) column, at 30°C. Phytoestrogens were separated by using gradient elution with a mobile phase consisting 0.1 % (v/v) phosphoric aqueous solution and methanol in 45 minutes. The method was validated by determining its specificity, linear range, limit of detection, limit of quantification, repeatability and accuracy. This method was applied successfully to determine content of Phytoestrogens in commercial dietary supplement products.

Keywords: *phytoestrogen, puerarin, daidzein, miroestrol, HPLC, dietary supplement.*