

NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT HOẠT CHẤT CHỐNG OXY HÓA TỪ CỦ TỎI (*Allium sativum* L.) THEO CÁCH TIẾP CẬN CÔNG NGHỆ XANH

Nguyễn Thị Yến Phương^{1*} và Huỳnh Nguyễn Duy Bảo²

¹Khoa Khoa học biển và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Kiên Giang

²Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Nguyễn Thị Yến Phương (email: yenphuong.nguyen.nt@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/07/2019

Ngày nhận bài sửa: 06/02/2020

Ngày duyệt đăng: 28/02/2020

Title:

Study on green extraction of antioxidants from garlic bulbs (*Allium sativum* L.)

Từ khóa:

Tỏi (*Allium sativum* L.), hợp chất phenol, flavonoid, hoạt tính chống oxy hóa, chiết xuất với sự hỗ trợ siêu âm

Keywords:

Garlic, antioxidant activity, green extraction, ultrasound-assisted extraction

ABSTRACT

This study is aimed to evaluate the influence of extraction conditions assisted by ultrasound on total flavonoid and total phenolic contents as well as antioxidant activity of extracts from garlic bulbs (*Allium sativum* L.) through DPPH free radical scavenging activity and total reducing power. The results showed that ultrasound-assisted extraction increased the extract efficiency, and extraction solvents, garlic bulbs-to-solvent ratio, extraction time, extraction temperature affected the total flavonoid and total phenolic contents as well as antioxidant activity of garlic extracts. The best conditions to extract antioxidants from garlic bulbs were: distilled water to garlic bulbs ratio, 10 ml/g; extraction time, 15 min; extraction temperature, 30°C and extracting twice.

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của điều kiện chiết xuất với sự hỗ trợ siêu âm đến hàm lượng flavonoid tổng số, hàm lượng hợp chất phenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi (*Allium sativum* L.) dựa vào hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử. Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm làm tăng hiệu quả chiết xuất. Loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết có ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid tổng số, hàm lượng hợp chất phenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi. Điều kiện tốt nhất để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi là dùng nước cất với tỷ lệ 10 ml/g củ tỏi chiết xuất trong 15 phút ở 30°C, chiết 2 lần.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Yến Phương và Huỳnh Nguyễn Duy Bảo, 2020. Nghiên cứu chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi (*Allium sativum* L.) theo cách tiếp cận công nghệ xanh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(1B): 124-135.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỏi thuộc họ hành *Alliaceae* và có tên khoa học là *Allium sativum* L. Những đặc tính có lợi của tỏi đã được công nhận trong hơn 5000 năm qua (Amagase *et al.*, 2001), củ tỏi có vai trò nổi bật trong số các loại gia vị thực phẩm của con người vì ngoài tác dụng như một loại gia vị nó còn có tác dụng bảo

quản thực phẩm và hỗ trợ điều trị một số bệnh nhờ có chứa các hoạt chất sinh học. Theo y học cổ truyền, tỏi có tác dụng thanh nhiệt giải độc, sát trùng, chữa băng đới, trùng tích, huyết ly, tấy ứ, thông khiếu, tiêu nọt, hạch ở phổi, tiêu đờm, đầy chướng, đại tiểu tiện khó khăn, tả lỵ (Đỗ Tất Lợi, 2006). Trong lịch sử, tỏi được dùng để điều trị cảm lạnh, ho, hen suyễn và những nghiên cứu gần đây

cho thấy tỏi có tác dụng làm tăng cường hệ thống miễn dịch (Lawrence, 2011). Ngoài ra, tỏi còn có một số tác dụng như kháng khuẩn (Shobana *et al.*, 2009), kháng nấm (Pai and Platt, 1995), kháng virus (Weber *et al.*, 1992), chống ung thư (Kaschula *et al.*, 2010), chống oxy hóa (Galano and Marquez, 2009), ức chế sự tổng hợp cholesterol làm hạ thấp mức cholesterol trong máu, chống tập hợp tiểu cầu và hoạt tính kháng viêm (Piscitelli *et al.*, 2002). Các dược tính của tỏi phụ thuộc vào thành phần các hợp chất phenol, flavonoid, polysaccharide và protein có trong tỏi (Bianchini and Vainio, 2001; Nishimura *et al.*, 2004).

Hiện nay, tỏi được trồng phổ biến trên 90 quốc gia ở Châu Á, Châu Mỹ, Châu Âu và Châu Đại Dương với tổng sản lượng hàng năm khoảng 17 triệu tấn và năng suất đạt từ 4,4 - 30,0 tấn/ha (Hồ Huy Cường, 2013). Tại Việt Nam, tỏi được du nhập khá lâu và được trồng phổ biến trong cả nước, nhưng tập trung chủ yếu ở các vùng như: Hải Dương, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Lý Sơn - Quảng Ngãi và Phan Rang - Ninh Thuận (Hồ Huy Cường, 2013). Nhiều nghiên cứu về chiết xuất hoạt chất sinh học từ củ tỏi đã được công bố trên thế giới và trong nước, nhưng hầu hết các nghiên cứu đã sử dụng dung môi độc hại như chloroform, methanol để chiết xuất nên hoạt chất thu được không phù hợp cho ứng dụng trong thực phẩm, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và dược phẩm (Jang *et al.*, 2017). Đồng thời, việc sử dụng các dung môi độc hại để chiết xuất còn gây ảnh hưởng đến sức khỏe và môi trường. Trong những năm gần đây, xu hướng thế giới quan tâm về phát triển bền vững như hoá học xanh, công nghệ xanh... Trong đó, việc chiết xuất các hoạt chất sinh học tự nhiên theo hướng tiếp cận công nghệ xanh đang được quan tâm đặc biệt nhằm giảm thiểu những ảnh hưởng đối với môi trường và các tác hại đối với con người. Các nhà nghiên cứu đã đưa ra ba giải pháp chủ yếu về ứng dụng công nghệ xanh trên quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp, cụ thể là: cải thiện và tối ưu hóa các quy trình hiện có; ứng dụng công nghệ mới, sử dụng thiết bị hiện đại để nâng cao hiệu quả; thay thế các dung môi độc hại bằng dung môi an toàn trong nghiên cứu và sản xuất (Chemat *et al.*, 2012). Vì vậy, để thu nhận hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi cho ứng dụng trong thực phẩm, nghiên cứu này đã tiến hành xác định điều kiện thích hợp để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi theo hướng tiếp cận công nghệ xanh, bằng cách sử dụng dung môi là nước và ethanol để chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Củ tỏi (*Allium sativum* L.) dùng trong nghiên cứu này là tỏi khô được mua trực tiếp tại thôn Thái

An, xã Vĩnh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận. Tỏi sau khi mua được bảo quản ở nơi khô ráo, thoáng mát dùng cho quá trình thí nghiệm.



Hình 1: Củ tỏi (*Allium sativum* L.)

2.2 Hóa chất

2,2 diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH), Bovine serum albumin (BSA), Folin-Ciocalteu reagent và vitamin C (VTMC) được mua từ công ty Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ. Các hóa chất còn lại là loại đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích hóa học, được mua từ công ty Loba Chemie, Ấn Độ và công ty Wako, Nhật Bản.

2.3 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm và điều kiện chiết xuất (loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết và số lần chiết) đến hoạt tính chống oxy, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi được tiến hành như sau:

2.3.1 Ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 gam củ tỏi đã được cắt nhỏ đem đi đồng hóa với 100ml dung môi (nước cất hoặc ethanol 99,5%) trong 120 giây, hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/ml) đem chiết xuất chất chống oxy hóa. Mẫu chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHZ trong thời gian 10 phút ở $10 \pm 2^\circ\text{C}$, mẫu chiết xuất không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm được tiến hành theo phương pháp ngâm chiết trong thời gian 10 phút ở $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó đưa ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, tách lấy dịch và lọc qua giấy lọc Whatman số 1, bổ sung dung môi vào dịch lọc cho đủ 500 ml dịch chiết. Các mẫu dịch chiết được giữ ở nhiệt độ trong khoảng 1-4 $^\circ\text{C}$ dùng

để phân tích xác định ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi.

2.3.2 Ảnh hưởng của loại dung môi

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 g củ tỏi đã được cắt nhỏ đưa đi đồng hóa với 50 ml dung môi, các loại dung môi khảo sát gồm: nước cất, ethanol 20%, ethanol 40%, ethanol 60%, ethanol 80% và ethanol 99,5%. Hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/ml), chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHz trong thời gian 10 phút ở $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Tiếp theo, các bước thực hiện giống như mục 2.1. Dựa vào kết quả phân tích chọn dung môi thích hợp cho chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.3 Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 g củ tỏi đã được cắt nhỏ đưa đi đồng hóa với 50 ml dung môi thích hợp. Hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi như sau: 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25 (g/ml), chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHz trong thời gian 10 phút ở $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó đưa đi ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, tách lấy dịch và lọc qua giấy lọc Whatman số 1, bổ sung thêm dung môi vào dịch lọc cho đủ 1.250 ml dịch chiết. Các mẫu dịch chiết được giữ ở nhiệt độ trong khoảng từ 1 – 4°C dùng để phân tích xác định ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hoạt tính chống oxy hóa, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số. Dựa vào kết quả phân tích chọn tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp cho chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.4 Ảnh hưởng của thời gian chiết

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 g củ tỏi đã được cắt nhỏ, đồng hóa với 50 ml dung môi thích hợp. Hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp rồi chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHz ở $10 \pm 2^\circ\text{C}$ trong các khoảng thời gian khác nhau: 5, 10, 15, 20 và 25 phút. Sau đó, ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Tiếp theo, các bước thực hiện giống như mục 2.1. Dựa vào kết quả phân tích chọn thời gian thích hợp cho chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 g củ tỏi khô đã được cắt nhỏ, đồng hóa với 50 ml dung môi thích hợp.

Hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp, chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHz trong thời gian thích hợp ở các nhiệt độ khác nhau: 10, 20, 30, 40 và 50°C (dao động tại mỗi nhiệt độ thí nghiệm là $\pm 2^\circ\text{C}$). Sau đó đưa đi ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Tiếp theo, các bước thực hiện giống như mục 2.1. Dựa vào kết quả phân tích chọn nhiệt độ thích hợp cho chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.6 Ảnh hưởng của số lần chiết

Mỗi mẫu thí nghiệm lấy 50 g củ tỏi khô đã được cắt nhỏ, đồng hóa với 50 ml dung môi thích hợp. Hỗn hợp sau khi đồng hóa được bổ sung thêm dung môi cho đạt các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp rồi chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tần số 37 KHz ở nhiệt độ thích hợp trong khoảng thời gian thích hợp. Sau đó đưa đi ly tâm ở 4°C trong 10 phút với vận tốc 3.000 vòng/phút. Sau khi ly tâm, tách lấy dịch và lọc qua giấy lọc Whatman số 1. Đối với các mẫu chiết 2 lần và 3 lần, phần bã sau khi chiết lần chiết 1 được tiến hành chiết lại tương ứng 1 và 2 lần nữa với các thông số và cách chiết như lần đầu. Mẫu chiết 1 lần không lặp lại quá trình chiết. Dịch lọc thu được từ các lần chiết nhập chung lại rồi bổ sung thêm dung môi cho đủ bằng tổng thể tích dung môi đã sử dụng để chiết xuất 3 lần. Các mẫu dịch chiết được giữ ở nhiệt độ trong khoảng từ 1 – 4°C dùng để phân tích xác định ảnh hưởng của số lần chiết đến hoạt tính chống oxy hóa, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số. Dựa vào kết quả phân tích chọn số lần chiết thích hợp cho chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi.

2.4 Phương pháp phân tích

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi được đánh giá dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử. Khả năng khử gốc tự do DPPH được phân tích theo phương pháp của (Fu *et al.*, 2002).

Cho vào ống nghiệm 0,2 - 0,5 ml mẫu cần đo cho vào 1,5 - 1,8 ml nước cất tiếp theo cho vào 1 ml ethanol. Cuối cùng thêm 1ml dung dịch DPPH (nồng độ 0.1mM pha trong ethanol). Hỗn hợp được lắc đều và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong bóng tối. Mẫu trắng được tiến hành tương tự nhưng thay dịch chiết bằng nước cất. Đo độ hấp phụ ở bước sóng 517nm trên thiết bị UV-Vis mini 1240. Khả năng khử gốc tự do DPPH được tính dựa vào đường chuẩn DPPH.

Tổng năng lực khử được xác định theo phương pháp của Oyaizu (1986).

Cho vào ống nghiệm 0,2 - 0,5 ml mẫu cần đo tiếp đó cho 0,5 ml $K_3Fe(CN)_6$ 1% bổ sung tiếp 0,5 - 0,8 ml dung dịch đậm (pH = 6,6) cho đủ 1,5 ml. Hỗn hợp được đem ủ ở 50°C trong 20 phút.

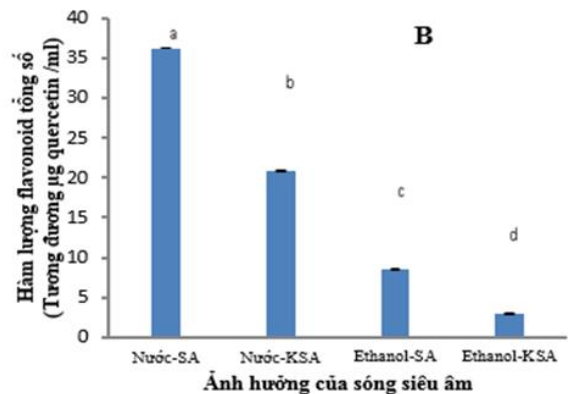
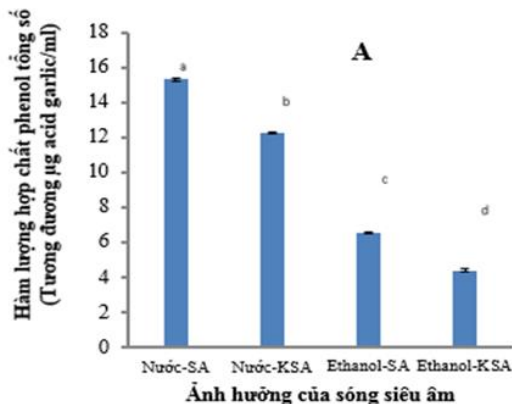
Sau đó bổ sung vào ống nghiệm 0,5 ml CCl_3COOH 10%. Tiếp tục bổ sung từ từ 2 ml nước cất và 0,4 ml $FeCl_3$ 0,1%. Mẫu trắng được tiến hành tương tự nhưng thay dịch chiết bằng dung dịch đậm.

Khả năng khử của hỗn hợp được đo độ hấp phụ ở bước sóng 700nm trên thiết bị UV-Vis mini

Hàm lượng các hợp chất phenol tổng số được xác định theo phương pháp của Singleton *et al.* (1999) và hàm lượng hợp chất flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Quettier *et al.* (2000)

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu trình bày trong bài báo này là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Tính giá trị trung bình và



Hình 2: Hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) của dịch chiết từ củ tỏi với sự hỗ trợ của sóng siêu âm (SA) và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Từ kết quả ở Hình 2(A) và Hình 2(B) nhận thấy rằng trong cả hai trường hợp sử dụng dung môi chiết là nước cất hoặc ethanol, sự hỗ trợ của sóng siêu âm trong quá trình chiết đều làm tăng đáng kể ($p < 0,05$) hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và hàm lượng flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi so với chiết xuất không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Hàm lượng các hợp chất phenol tổng số của dịch chiết từ củ tỏi được chiết xuất bằng nước cất hoặc ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tương ứng là 15,31 µg GAE/ml và 6,54 µg GAE/ml. Trong khi đó, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số của dịch chiết từ củ tỏi chiết xuất bằng nước cất hoặc ethanol không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm chỉ tương ứng là 12,26 µg GAE/ml và 4,39 µg GAE/ml. Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng flavonoid tổng số của

về đồ thị sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) của các giá trị trung bình được phân tích trên phần mềm thống kê R phiên bản 3.6.0.

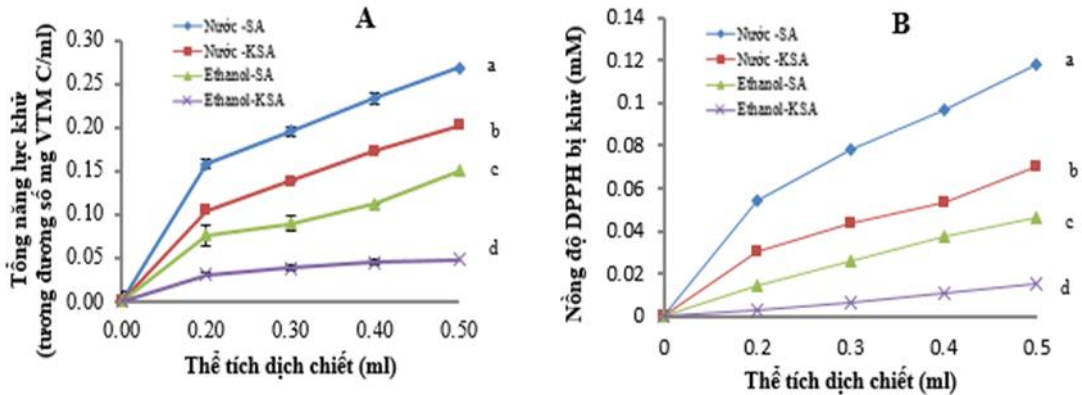
3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi

Chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đã được chứng minh có thể nâng cao hiệu quả thu nhận các chất dinh dưỡng cũng như chất có hoạt tính sinh học từ nguồn nguyên liệu tự nhiên (Chemat *et al.*, 2017). Ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 2.

dịch chiết từ củ tỏi chiết xuất bằng nước cất hoặc ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tương ứng là 36,22 µg QE /ml và 8,52 µg QE/ml. Trong khi đó, hàm lượng flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi chiết xuất bằng nước cất hoặc ethanol không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm chỉ tương ứng là 20,79 µg QE /ml và 2,89 µg QE/ml.

Ảnh hưởng của chiết xuất với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 3. Từ kết quả ở Hình 3(A) và Hình 3(B) nhận thấy rằng trong cả hai trường hợp sử dụng dung môi chiết là nước cất hoặc ethanol, sự hỗ trợ của sóng siêu âm trong quá trình chiết đều làm tăng đáng kể ($p < 0,05$).



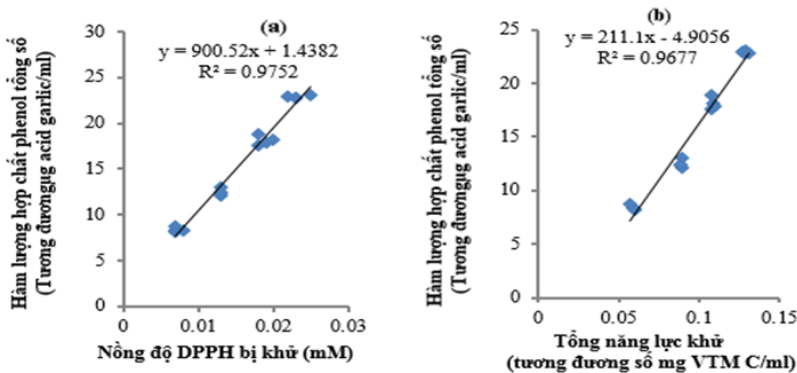
Hình 3: Hoạt tính khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) của dịch chiết từ củ tỏi với sự hỗ trợ của sóng siêu âm (SA) và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm (KSA)

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hoạt tính khử gốc tự do DPPH của 0,5 mL dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất hoặc ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm tương ứng là 0,12 mM DPPH và 0,05 mM DPPH. Trong khi đó, hoạt tính khử gốc tự do DPPH của 0,5 mL dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất hoặc ethanol không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm chỉ tương ứng là 0,07 mM DPPH và 0,01 mM DPPH. Kết quả phân tích cũng cho thấy 0,5 mL dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất hoặc ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm có tổng năng lực khử lần lượt tương đương với 0,27 mg VTMC/mL và 0,15 mg VTMC/mL. Trong khi đó, tổng năng lực khử của 0,5 mL dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất hoặc ethanol không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm chỉ tương đương với 0,20 mg VTMC/mL và 0,05 mg VTMC/mL.

Kết quả phân tích tương quan hồi quy cho thấy hệ số xác định mối tương quan giữa hàm lượng các

hợp chất phenol tổng số với khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tương ứng là 0,975 (Hình 4.a) và 0,968 (Hình 4.b). Hàm lượng các hợp chất phenol tổng số có mối tương quan dương rất cao với khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi, điều này cho thấy các hợp chất phenol đóng vai trò quan trọng cho khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi. Các hợp chất polyphenol được chứng minh là chất chống oxy hóa quan trọng nhất trong hầu hết các loài thực vật, hệ số xác định mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol với hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ *Marrubium peregrinum* L. là 0,999 (Stankovic, 2010). Nghiên cứu của Anesini *et al.* (2008) chỉ ra rằng mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ trà xanh trồng tại Argentina với hệ số xác định là 0,914.

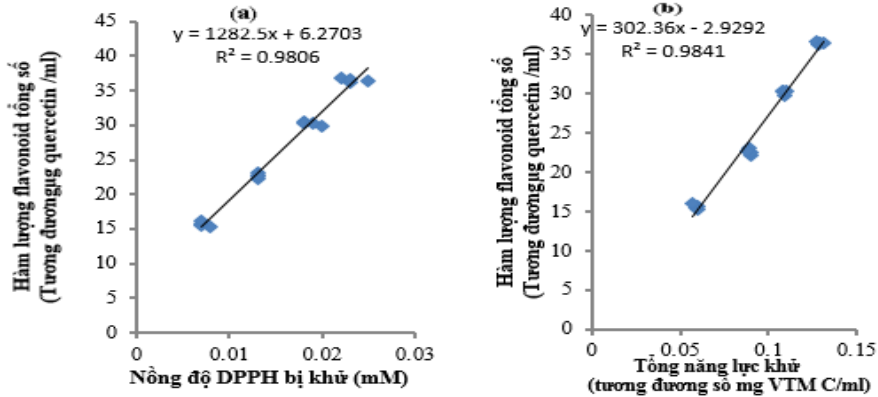


Hình 4: Mối tương quan giữa hàm lượng các hợp chất phenol tổng số với khả năng khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b) của dịch chiết củ tỏi

Kết quả phân tích tương quan hồi quy cho thấy hệ số xác định mối tương quan giữa hàm lượng

flavonoid tổng số với khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tương

ứng là 0,980 (Hình 5.a) và 0,984 (Hình 5.b). Hàm lượng flavonoid tổng số cũng có mối tương quan dương rất cao với khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi, điều này



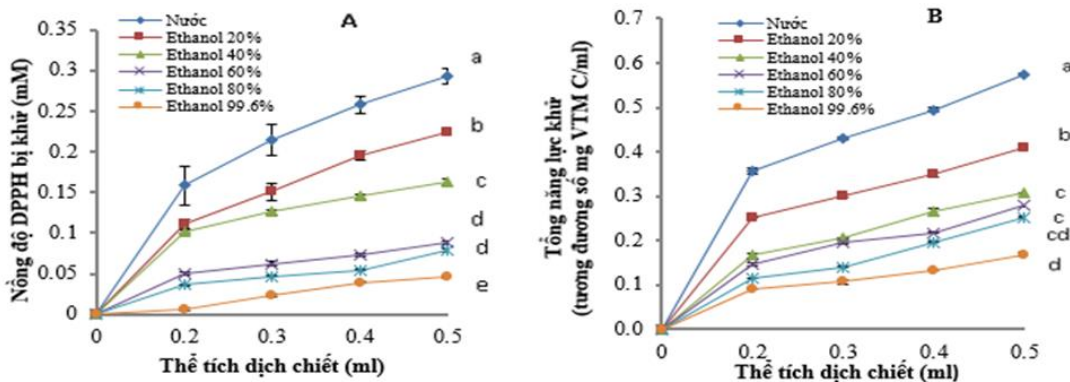
Hình 5: Mối tương quan giữa hàm lượng flavonoid tổng số với khả năng khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b) của dịch chiết củ tỏi

Hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất phenol và flavonoid đã được nhiều nghiên cứu công bố (Bozin *et al.*, 2008; Priccina and Karlina, 2013). Từ những kết quả trên cho thấy cả hai trường hợp chiết xuất bằng nước cất hoặc ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm đều thu được dịch chiết từ củ tỏi có hàm lượng các hợp chất phenol tổng số, flavonoid

tổng số và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn trường hợp chiết xuất không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm.

3.2 Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi

Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 6.



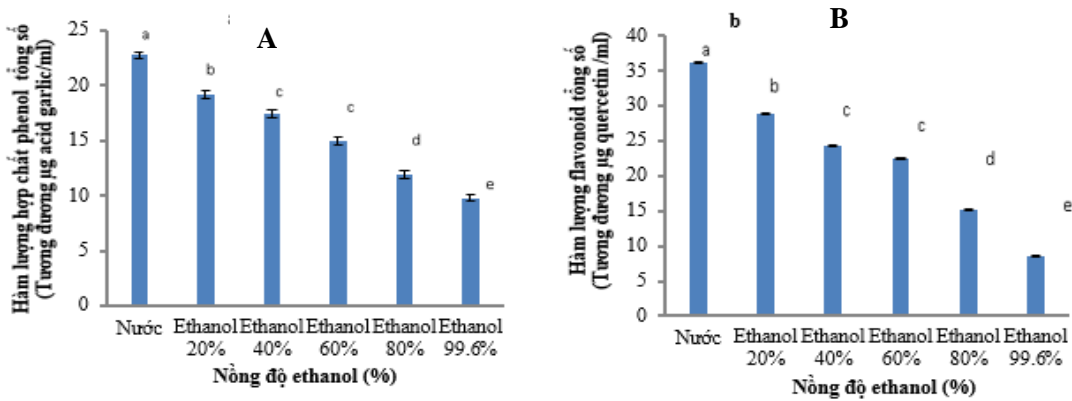
Hình 6: Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) của dịch chiết củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả ở Hình 6 cho thấy dịch chiết từ củ tỏi bằng các dung môi khác nhau có hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử khác nhau ($p < 0,05$). Trong đó, dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất có hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử cao nhất và nồng độ ethanol của dung môi chiết càng tăng, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng

năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi càng giảm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của El-Hamidi and El-Shami (2015).

Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện ở Hình 7.



Hình 7: Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) trong dịch chiết từ củ tỏi

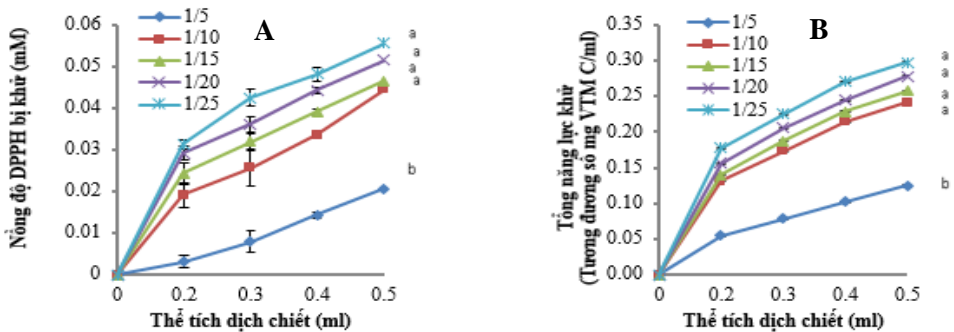
Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Hình 7 cho thấy ảnh hưởng của nồng độ ethanol của dung môi chiết càng tăng, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi thu được càng giảm ($p < 0,05$). Dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất có hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số cao nhất tương ứng là 22,77 µg GAE/ml và 36,22 µg QE/ml. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Mona and Safinaz (2015). Trong điều kiện thí nghiệm này, dịch chiết từ củ tỏi bằng nước cất có hoạt tính khử

gốc tự do DPPH, tổng năng lực khử, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số cao nhất nên đã chọn nước cất làm dung môi để chiết xuất chất chống oxy hóa từ củ tỏi.

3.3 Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ hành tím

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 8.



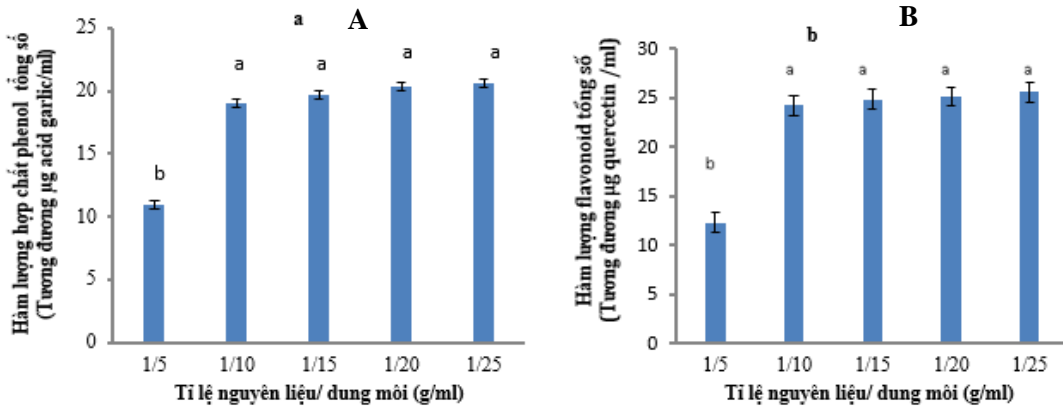
Hình 8: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến khả năng khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) của dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Hình 8A cho thấy khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/5 đến 1/10 (g/ml), hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ củ tỏi tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) tương ứng tăng từ 0,021 mM lên 0,044 mM DPPH. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên 1/15 (g/ml), hoạt tính khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ củ tỏi tăng lên 0,047 mM, giá trị này không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) so với mẫu chiết với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 (g/ml). Tương tự kết quả ở Hình

8B cũng cho thấy khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/5 đến 1/10 (g/ml) thì tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tăng đáng kể ($p < 0,05$), nhưng khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên 1/15 (g/ml), tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tăng lên không đáng kể ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi được trình bày ở Hình 9.



Hình 9: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) trong dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

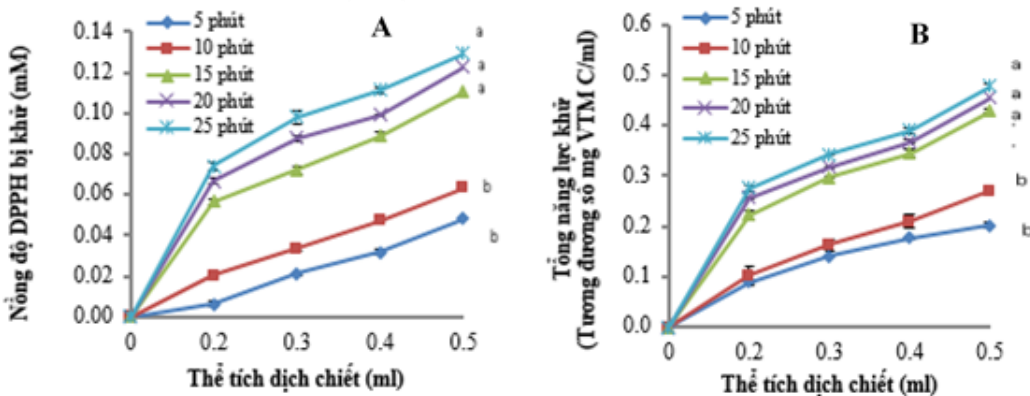
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất chiết các hoạt chất sinh học tự nhiên nói chung, các hợp chất phenol và flavonoid nói riêng. Kết quả ở Hình 9A và Hình 9B cho thấy khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/5 đến 1/10, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi tăng lên đáng kể ($p < 0,05$), tương ứng hàm lượng các hợp chất phenol tổng số tăng từ 11,01 lên 19,05 µg GAE/ml và hàm lượng flavonoid tổng số tăng từ 12,30 lên 24,24 µg QE /ml. Khi tiếp tục tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên trên 1/10, hàm lượng các

hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số tăng thêm không đáng kể ($p < 0,05$).

Từ những kết quả trên cho thấy tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi là 1/10 (g/ml) nên đã chọn tỷ lệ này để chiết xuất chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 10.



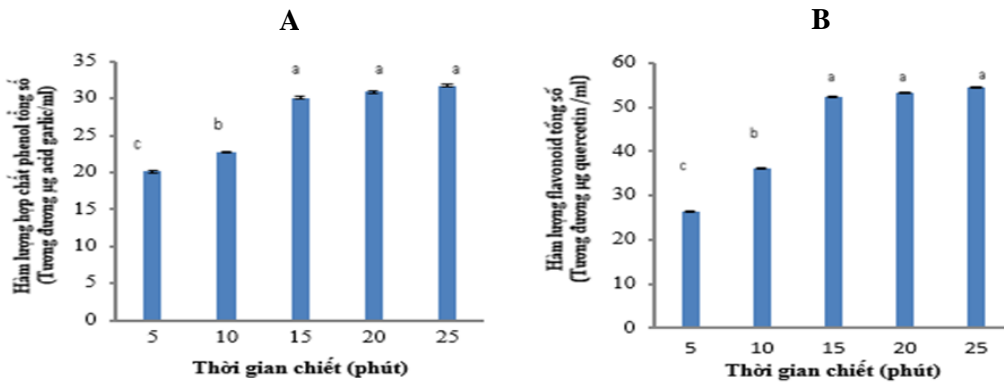
Hình 10: Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) trong dịch chiết củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Hình 10A và Hình 10B cho thấy khi tăng thời gian chiết từ 5 phút lên 15 phút, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi đều tăng ($p < 0,05$). Khi tiếp tục tăng thời gian chiết từ 15 phút lên 25 phút, hoạt tính khử

gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tăng không đáng kể ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện ở Hình 11.



Hình 11: Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) trong dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

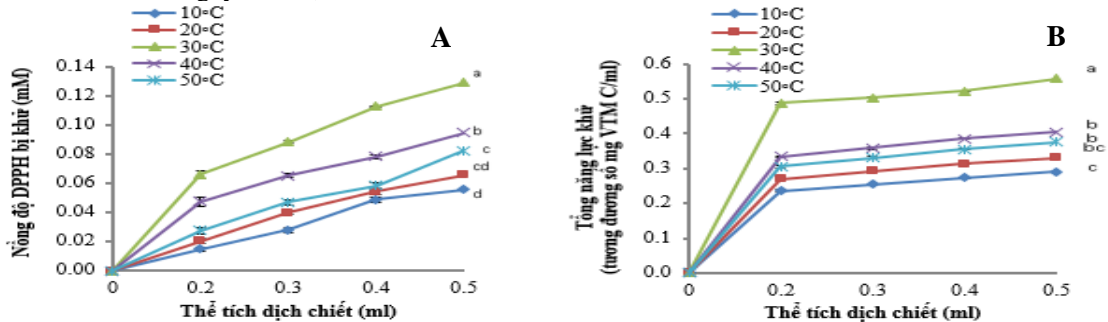
Kết quả ở Hình 11A và Hình 11B cho thấy hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) khi tăng thời gian chiết từ 5 phút lên 15 phút. Với thời gian chiết 15 phút, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi tương ứng là 30,12 µg GAE/ml và 52,22 µg QE /ml. Khi tiếp tục tăng thời gian chiết từ 15 phút lên 25 phút, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi tăng không đáng kể ($p > 0,05$). Do thời gian đầu của quá trình chiết các hợp chất có khả năng chống oxy hóa được giải phóng ra trong dịch chiết chưa nhiều, khi tăng thời gian chiết lên sẽ tạo điều kiện cho dung môi thấm sâu vào nguyên liệu, hòa tan các chất

chống oxy hóa có trong tỏi và khuếch tán vào dịch chiết. Do đó, hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết tăng.

Từ những kết quả trên cho thấy thời gian thích hợp để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi là 15 phút nên đã chọn thời lượng này để chiết xuất chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 12.



Hình 12: Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) của dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

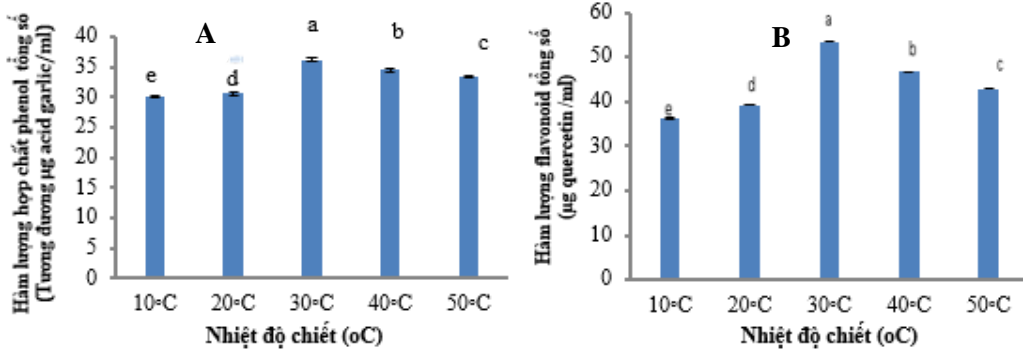
Kết quả ở Hình 12 cho thấy khi tăng nhiệt độ chiết từ 10 °C lên 30°C, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi tăng đáng kể ($p < 0,05$), tương ứng hoạt tính khử gốc tự do DPPH tăng từ 0,06 mM lên 0,120 mM và tổng năng lực khử tăng từ tương đương 0,40 mgVTMC/ml lên 0,56 mgVTMC/ml. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 40°C và 50°C, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết

từ củ tỏi giảm đáng kể so với dịch chiết ở 30°C. Điều đó cho thấy khi nhiệt độ cao sẽ làm tăng chuyển động nhiệt của các phân tử chất khuếch tán cũng như dung môi làm cho hàm lượng chất chống oxy hóa trong dịch chiết tăng lên nên hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết tăng. Nhiệt độ cao có thể phá vỡ màng tế bào mạnh nên phần lớn các chất chống oxy hóa bị hòa tan vào dịch chiết. Từ nhiệt độ 10 đến 20 °C, khả năng khử gốc tự do và tổng năng lực khử

hầu như không tăng ($p > 0,05$). Điều này có thể giải thích khi ở nhiệt độ thấp, nhiệt độ không ảnh hưởng đến hiệu quả chiết, vì nhiệt độ cao sẽ làm tăng chuyển động nhiệt các phân tử khuếch tán cũng như dung môi, trong khoảng nhiệt độ thấp tốc độ chuyển động nhiệt tương đối ổn định, không cao nên hoạt tính chống oxy hóa trong dịch chiết trong khoảng này thu được không khác nhau. Tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 40°C và 50°C, hoạt tính chống oxy hóa

khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử giảm. Điều này cho thấy nhiệt độ cao làm biến tính và phân hủy các thành phần có hoạt tính chống oxy hóa do đó làm giảm hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết củ tỏi.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện ở Hình 13.



Hình 13: Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) trong dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

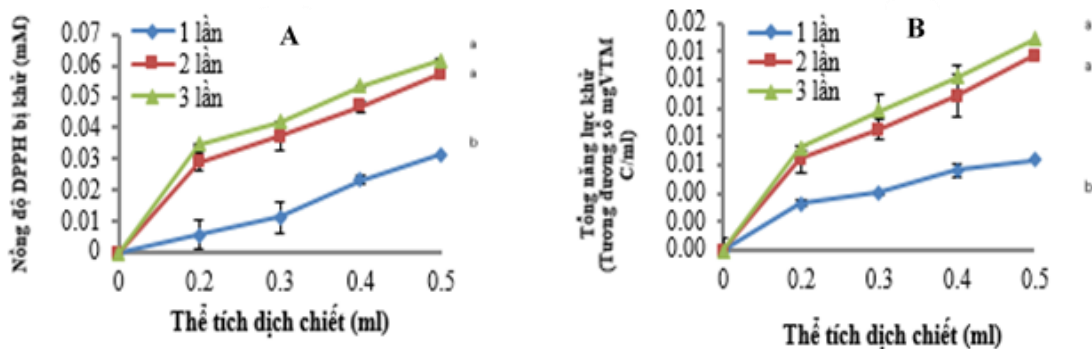
Kết quả ở Hình 13 cho thấy khi tăng nhiệt độ chiết từ 10°C lên 30°C, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi tăng đáng kể ($p < 0,05$), tương ứng hàm lượng các hợp chất phenol tổng số tăng từ 30,09 µg GAE/ml lên 36,25 µg GAE/ml và hàm lượng flavonoid tổng số tăng từ 36,22 µg QE/ml lên 53,46 µg QE/ml. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết lên 40°C và 50°C, hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số của dịch chiết từ củ tỏi giảm đáng kể so với dịch chiết ở 30°C. Điều này có lẽ là do nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme alliinase là 33 – 37°C (Reuter *et al.*, 1996), nên khi chiết ở 30°C enzyme này sẽ hoạt động mạnh thủy phân alliin trong tỏi thành alliin có hoạt tính chống oxy hóa cao. Bên cạnh đó, các hợp chất phenol và flavonoid không bền với nhiệt độ (Cacace and

Mazza, 2003) nên khi chiết ở 40 °C và 50 °C thu được dịch chiết có hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số thấp hơn so với dịch chiết ở 30°C.

Từ những kết quả trên cho thấy nhiệt độ thích hợp để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi là 30°C nên đã chọn nhiệt độ này để chiết xuất chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.6 Ảnh hưởng của số lần chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ củ tỏi

Ảnh hưởng của số lần chiết đến hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện trên Hình 14



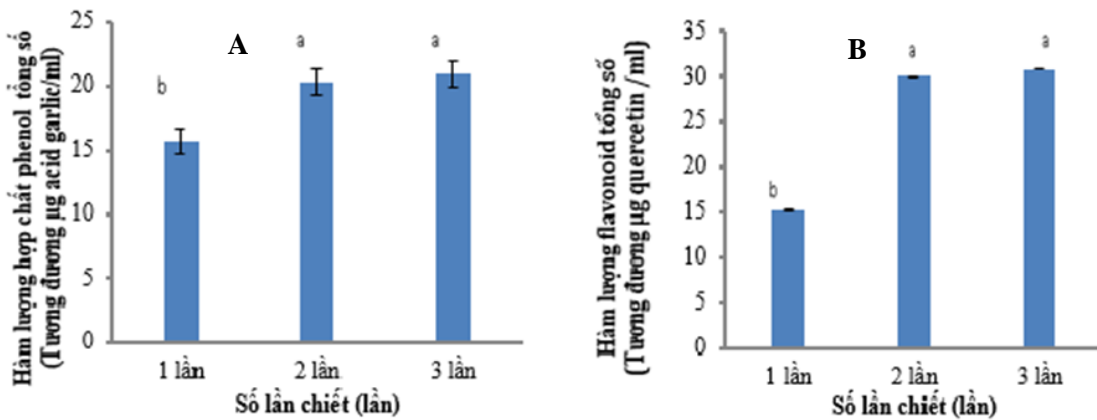
Hình 14: Ảnh hưởng của số lần chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH (A) và tổng năng lực khử (B) của dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Hình 14 cho thấy khi lặp lại quá trình chiết 2 lần, dịch chiết thu được có hoạt tính khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) so với dịch chiết 1 lần, tương ứng hoạt tính khử gốc tự do DPPH tăng từ 0,031 mM lên 0,057 mM và tổng năng lực khử tăng từ 0,006 mgVTMC/ml lên 0,014 mgVTMC/ml. Kết quả ở Hình 14 cũng cho thấy không có sự khác biệt ($p > 0,05$) về hoạt tính khử gốc tự do DPPH cũng như tổng năng lực khử giữa các mẫu dịch chiết lặp lại 2 lần và lặp lại 3 lần. Điều này có thể giải thích là khi chiết 1 lần dịch chiết vẫn chưa được chiết rút triệt để các chất chống oxy hóa có trong củ tỏi vì vậy cho

hiệu suất chống oxy hóa thấp. Sau lần chiết thứ 2 lượng dung môi thẩm thấu nhiều và hòa tan hết lượng chất chống oxy hóa có trong củ tỏi nên hiệu suất tăng mạnh. Sau lần chiết thứ 3, hoạt tính khử gốc tự do DPPH và năng lực khử trong dịch chiết củ tỏi có xu hướng tăng nhưng không đáng kể ($p > 0,05$), điều này có thể là do sau 2 lần chiết các chất có hoạt tính chống oxy hóa đã được hòa tan rất nhiều ở 2 lần chiết trước đó và các thành phần có hoạt tính chống oxy hóa có thể ở trạng thái cân bằng và hòa tan ít.

Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết từ củ tỏi được thể hiện ở Hình 15.



Hình 15: Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng các hợp chất phenol tổng số (A) và hàm lượng flavonoid tổng số (B) của dịch chiết từ củ tỏi

Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Hình 15 cho thấy khi lặp lại quá trình chiết 2 lần, dịch chiết thu được có hàm lượng các hợp chất phenol tổng số và hàm lượng flavonoid tổng số tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) so với dịch chiết 1 lần, tương ứng hàm lượng các hợp chất phenol tổng số tăng từ 15,77 µg GAE/ml lên 20,39 µg GAE/ml và hàm lượng flavonoid tổng số tăng từ 15,24 µg QE/ml lên 29,99 µg QE/ml. Kết quả ở Hình 15 cũng cho thấy không có sự khác biệt ($p > 0,05$) về hàm lượng các hợp chất phenol tổng số cũng như hàm lượng flavonoid tổng số giữa các mẫu dịch chiết lặp lại 2 lần và lặp lại 3 lần.

Từ những kết quả trên nhận thấy rằng để chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi trong điều kiện này cần lặp lại quá trình chiết 2 lần.

4 KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy, chiết xuất hoạt chất chống oxy hóa từ củ tỏi đem lại hiệu quả cao nhất được xác định bởi các điều kiện chiết thích hợp với thông số: chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm ở tần số 37 kHz, dung môi chiết là nước, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 1/10 (g/ml), nhiệt độ chiết là 30°C, thời gian chiết là 15 phút, đồng hóa là 120 giây, số lần chiết là 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y, 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*, 131:955S–962S.

Bianchini, F. and H. Vainio, 2001. Allium vegetables and organosulfur compounds: Do they help prevent cancer?. *Environ. Health Perspect.*, 109: 893-902.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., and Igic, R., 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem.*, 111(4): 925-929.

Cacace, J.E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries *Journal of Food Engineering*, 59, 379–389.

Chemat, Maryline Abert Vian and Giancarlo Cravotto, 2012. *Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles*, ISSN: 1422-0067.

Chemat, Rombaut N., Anne-Gaëlle S., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.S., Abert-Vian.M, 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and

- applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34: 540–560.
- Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- El-Hamidi, M., and El-Shami, S. M. (2015). Scavenging activity of different garlic extracts and garlic powder and their antioxidant effect on heated sunflower oil. *American Journal of Food Technology*, 10(4): 135-146.
- Fu, H., Shieh D., Ho C., 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Food lipids*, 9: 35–46.
- Galano, A. and M. Francisco-Marquez, 2009. Peroxyl-radical-scavenging activity of garlic: 2-propenylsulfenic acid versus allicin, *J. Phys. Chem. B*, 113: 16077-16081.
- Hồ Huy Cường, 2013. Nghiên cứu phục tráng giống tỏi ở Lý Sơn. Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ, Viện KHKT Nông nghiệp Duyên hải Nam Trung bộ, số: 05/2009/HĐ-ĐTKHCN.
- Jang, J.W., Kim, M.K., Lee, Y.S., et al., 2017. RAC-LATS1/2 signaling regulates YAP activity by switching between the YAP-binding partners TEAD4 and RUNX3. *Oncogene* 36(7): 999-1011.
- Kaschula, C.H., R. Hunter and M.I. Parker, 2010. Garlic-derived anticancer agents: Structure and biological activity of ajoene, *BioFactors*, 36: 78-85.
- Lawrence, R. and K. Lawrence, 2011. Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium sativum*) grown in North Indian plains. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 1: S51-S54.
- Nishimura M., Naito S., Yokoi T., 2004. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19:135–149.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.
- Pai, S.T. and M.W. Platt, 1995. Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* species involved in otomycosis. *Lett. Applied Microbiol.*, 20: 14-18.
- Piscitelli, S.C., A.H. Burstein, N. Welden, K.D. Gallicano and J. Falloon, 2002. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 234-238.
- Priecina, L., and Karlina, D., 2013. Total polyphenol, flavonoid content and antiradical activity of celery, dill, parsley. Onion and garlic dried in convective and microwave-vacuum dryers. *International Conference on Nutrition and Food Sciences IPCBEE*.
- Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx MC, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F, 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 72: 35–42.
- Reuter, H.D., Koch, H.P. and Lawson, D., 1996. Therapeutic Effects and Applications of Garlic and Its Preparations. In: Lawson, L.D. and Koch, H.P., Eds., *Garlic: The Science and Therapeutic Applications of Allium sativum L. and Related Species*, 2nd Edition, William & Wilkins, Baltimore:135-212.
- Shobana, S., Vidhya V.G. and Ramya M., 2009. Antibacterial activity of garlic varieties (*Ophioscordon* and *Sativum*) on enteric pathogens, *Curr. Res. J. Biol. Sci* 1: 123-126.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Stanković, S., 2010. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts, *Kragujevac J. Sci.* 33: 63-72.
- Weber, N. D., Andersen, D. O., North, J. A., Murray, B. K., Lawson, L. D., and Hughes, B. G., 1992. In vitro virucidal effects of *Allium sativum*(garlic) extract and compounds, *Planta Medica*, 58: 417-423.