

**KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT HÀNH TÍM
(*ALLIUM ASCALONICUM* L., *AMARYLLIDACEAE*)
CHO HÀM LƯỢNG FLAVANOID CAO**

**Huỳnh Thị Mỹ Duyên, Lê Thị Minh Ngọc, Huỳnh Trần,
Đoàn Thiện Phúc, Nguyễn Thanh Trúc, Dương Khánh Vy***

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: 1953030089@student.ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 25/6/2024

Ngày phản biện: 01/12/2024

Ngày duyệt đăng: 25/12/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hiện nay, tỉ lệ mắc bệnh đái tháo đường và rối loạn lipid máu trong nước ngày càng tăng vì vậy nhu cầu sử dụng dược phẩm điều trị tăng cao. Hành tím (*Allium ascalonicum* L., *Amaryllidaceae*) chứa nhiều hợp chất flavonoid có nhiều tác dụng dược lý quan trọng, nổi bật là khả năng loại bỏ các gốc tự do và chống oxy hóa có tiềm năng trong việc hỗ trợ điều trị đái tháo đường và rối loạn lipid máu.... Tuy nhiên, tại Việt Nam có rất ít nghiên cứu khảo sát điều kiện chiết xuất Hành tím cho hàm lượng flavanoid cao. Xuất phát từ các lý do trên, việc nghiên cứu khảo sát quy trình chiết xuất và định lượng flavanoid có trong củ Hành tím là cần thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng, thẩm định quy trình định lượng flavanoid trong cao đặc Hành tím bằng phương pháp quang phổ UV-Vis và khảo sát điều kiện chiết xuất flavanoid tối ưu. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Hành tím thu hái tại địa bàn Thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Định lượng flavanoid bằng phương pháp đo quang dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử $AlCl_3$, thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của ICH, AOAC và khảo sát các điều kiện chiết xuất bao gồm nồng độ ethanol sử dụng, tỉ lệ dược liệu/dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ ảnh hưởng đến hàm lượng flavanoid trong cao chiết. **Kết quả:** Quy trình đạt độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng, đường hồi quy $y = 0,0610x + 0,2864$ với $R^2 = 0,9981$; nồng độ ethanol 80%, tỉ lệ dược liệu/dung môi (1:10), thời gian chiết (18 giờ), nhiệt độ phòng. **Kết luận:** Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đáp ứng yêu cầu theo quy định đồng thời tìm được điều kiện chiết xuất cho hàm lượng flavanoid cao nhất 8,34 mg QE/g cao đặc.

Từ khóa: *Allium ascalonicum* L., cao Hành, quy trình chiết xuất, UV-Vis.

ABSTRACT

**INVESTIGATE THE EXTRACTION CONDITION OF
ALLIUM ASCALONICUM L., *AMARYLLIDACEAE* WITH
HIGH FLAVANOID CONTENT**

**Huynh Thi My Duyen, Le Thi Minh Ngoc, Huynh Tran,
Doan Thien Phuc, Nguyen Thanh Truc, Duong Khanh Vy***

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Currently, the incidence of diabetes and dyslipidemia in our country is increasing, leading to an increased demand for pharmaceutical treatments. Shallot (*Allium ascalonicum* L. *Amaryllidaceae*) contains many flavonoid compounds that have many important pharmacological effects, notably the ability to remove free radicals and its antioxidant activity, which have potential in supporting the treatment of diabetes and dyslipidemia. However, in Viet Nam there are still few studies on investigating the extraction condition of shallot for high flavanoid content. Based on these reasons above, our team conducted an investigation on the extraction

process and quantification of flavanoid in shallot. **Objectives:** To develop and validate the quantitative process of shallot extract using the UV-Vis spectrophotometric method and investigate the optimal conditions of shallot extraction. **Materials and methods:** Shallots harvested in Vinh Chau town, Soc Trang province. Quantify flavanoid using the UV-Vis spectrophotometric method based on the color reaction with $AlCl_3$ reagent, validate the quantitative method according to ICH, AOAC guidelines and investigate the extraction conditions including ethanol concentration, medicinal herbs/solvent ratio, extraction time and temperature affecting the flavanoid content in shallot extract. **Results:** The process achieves specificity, precision, accuracy, regression line $y = 0.0610x + 0.2864$, $R^2 = 0.9981$; 80% ethanol concentration, medicinal herbs/solvent ratio (1:10), extraction time (18 hours), room temperature. **Conclusion:** Developed and validated the quantitative process to meet the requirements according regulation and determined the optimal conditions for the optimal quercetin content of 8,34 mg QE/ g extract.

Keywords: *Allium ascalonicum*, union extract, extraction process, UV-Vis.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, tỉ lệ mắc bệnh đái tháo đường và rối loạn lipid máu trong nước ngày càng tăng [1] vì vậy nhu cầu sử dụng các sản phẩm có khả năng phòng ngừa, hỗ trợ điều trị tăng cao. Hành tím (*Allium ascalonicum* L., Amaryllidaceae) có nguồn gốc từ Châu Á, được trồng rộng rãi ở Việt Nam và khắp nơi trên thế giới. Hành tím là một loại gia vị phổ biến trong chế độ ăn hằng ngày, cũng như mang lại nhiều giá trị về mặt kinh tế và được ứng dụng trong y học nhờ khả năng tăng cường sức khỏe.

Một số nghiên cứu cho thấy rằng, chiết xuất Hành tím chứa những hoạt chất có khả năng chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, ngăn ngừa bệnh tim mạch, ung thư và điều trị đái tháo đường [2]. Các nghiên cứu khác chứng minh được các hợp chất flavonoid, đặc biệt là quercetin có trong Hành tím có tiềm năng trong hỗ trợ điều trị đái tháo đường và rối loạn lipid máu [3]. Tuy nhiên, hiện nay trong nước lẫn ngoài nước các nghiên cứu về Hành tím còn hạn chế [4], [5]. Xuất phát từ các lý do trên, nghiên cứu “Khảo sát điều kiện chiết xuất và xác định hàm lượng flavanoid trong cao đặc Hành tím (*Allium ascalonicum* L., Amaryllidaceae)” được thực hiện với hai mục tiêu là xây dựng, thẩm định quy trình định lượng flavanoid trong cao đặc Hành tím bằng phương pháp UV-Vis và khảo sát điều kiện chiết xuất flavanoid trong Hành tím tốt nhất. Kết quả của nghiên cứu góp phần tạo nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo để chứng minh hiệu quả sinh học bảo chế, sản xuất sản phẩm chứa cao chiết Hành tím, góp phần đáp ứng nhu cầu chăm sóc sức khỏe của cộng đồng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Hành tím (*Allium ascalonicum* L., Amaryllidaceae) được thu hái tại địa bàn Thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Củ Hành tím được làm sạch, thái mỏng, loại bỏ những củ bị hỏng, nấm mốc rồi được sấy khô ở 50 - 60°C đến độ ẩm khoảng 6,5% [6], xay nhỏ và bảo quản trong bao kín tránh môi ẩm, nấm mốc.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Chất đối chiếu: Quercetin chuẩn có hàm lượng 95,6%, số lô: QT104 0723 (HD: 07/2026) từ viện kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh theo TCCS.

Hóa chất: Ethanol (Việt Nam), nước cất (Việt Nam), Methanol (Trung Quốc), Aluminium chloride ($AlCl_3$) (Trung Quốc) và Natri nitrit ($NaNO_2$) (Trung Quốc). Tất cả hóa chất đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích.

Thiết bị: Máy đo quang phổ kế UV-Vis Jasco V730 (Nhật), cân sấy ẩm hồng ngoại VOYAGER (Nhật), cân phân tích OHAUS (Mỹ), cân kỹ thuật KENKO (Đức), tủ sấy MEMMERT (Đức), bếp cách thủy MEMMERT (Đức), micropipet Eppendorf (Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng flavanoid trong cao đặc Hành tím bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Xác định bước sóng hấp thụ cực đại

Nguyên tắc: Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp tạo màu $AlCl_3$ của Sarabjot Kaur và cộng sự (2014) [7] có hiệu chỉnh. Định lượng quercetin bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis dựa trên đường chuẩn quercetin.

Quy trình thực hiện: Cho 1 mL dung dịch thử gốc hoặc dung dịch chuẩn vào bình định mức đã có sẵn 4 mL nước cất. Thêm tiếp vào bình định mức 0,1 mL $NaNO_2$ 10%. Sau 6 -7 phút, cho thêm vào 0,1 mL $AlCl_3$, lắc đều. Bổ sung nước vừa đủ, để yên 45 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Tiến hành khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại bằng cách quét phổ trong phạm vi bước sóng từ 300-600 nm để chọn ra bước sóng hấp thụ cực đại của dung dịch chuẩn.

Thẩm định quy trình định lượng

Thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH [8] các chỉ tiêu sau: độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng.

Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 0,001 g quercetin chuẩn cho vào bình định mức 10 mL, cho tiếp methanol vào 2/3 bình định mức và siêu âm khoảng 3 phút để hòa tan chuẩn. Để yên, bổ sung MeOH vừa đủ thể tích, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn gốc quercetin có nồng độ 100 $\mu g/mL$.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,05 g cao chiết cho vào becher, hoà tan cao bằng 1 mL nước cất rồi cho vào bình định mức 10 mL, tráng kỹ cốc. Bổ sung MeOH vừa đủ thể tích, lắc đều, thu được dung dịch thử gốc.

Mẫu trắng: Dung dịch tương ứng với từng mẫu đo nhưng không có dung dịch chuẩn hay thử.

Thuốc thử: Dung dịch $AlCl_3$ 10%, dung dịch $NaNO_2$ 10%.

Hàm lượng quercetin (Q) được tính theo công thức sau:

$$Q = \frac{(C \times V) \times K}{m} \quad (1)$$

C: Giá trị từ đường chuẩn quercetin (mg/mL); V: Thể tích mẫu thử tiến hành phản ứng định lượng (mL); K: độ pha loãng; m: khối lượng cao sử dụng định lượng (g); Q: hàm lượng quercetin (mg QE/g cao đặc).

2.3.2. Khảo sát điều kiện chiết xuất Hành tím

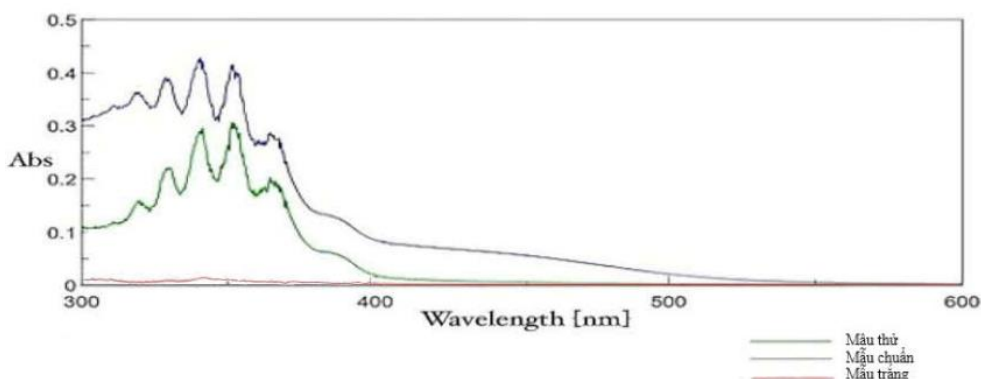
Cân một lượng bột Hành tím tương ứng 10g Hành tím (độ ẩm khoảng 6,5%). Cho vào bình nón có nút mài. Tiến hành khảo sát các điều kiện chiết xuất ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất như sau: Nồng độ dung môi chiết (ethanol 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) được kí hiệu từ QT1 - QT5; tỉ lệ dược liệu/dung môi chiết (1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16) được kí hiệu từ QT6 – QT9; thời gian chiết (12 giờ, 14 giờ, 16 giờ, 18 giờ, 20 giờ, 22 giờ, 24 giờ) được kí hiệu từ QT10 - QT15; nhiệt độ chiết (nhiệt độ phòng, 40°C, 50°C, 60°C) được kí hiệu từ QT16 – QT18. Sau khi khảo sát một yếu tố, cố định điều kiện tối ưu của yếu tố đó cho các thử nghiệm tiếp theo. Mỗi yếu tố khảo sát lặp lại 3 lần.

Đánh giá kết quả khảo sát: dựa vào hàm lượng quercetin trong cao đặc Hành tím.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xây dựng và thẩm định quy trình định lượng flavanoid trong cao đặc Hành tím bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

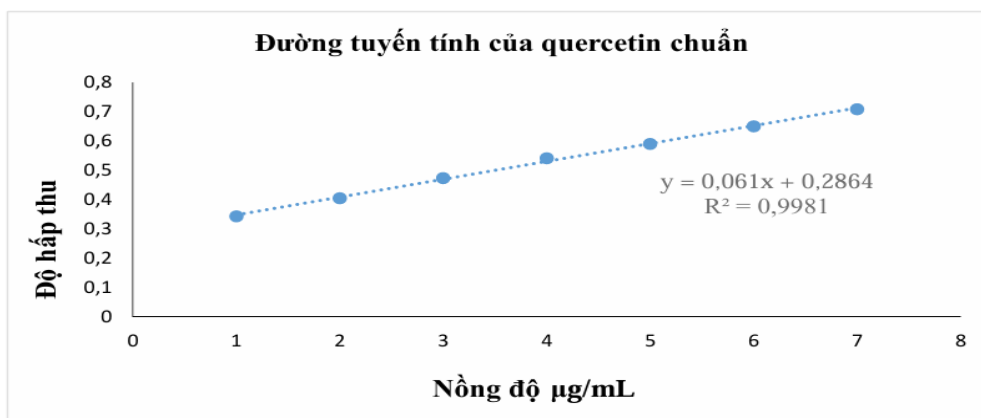
3.1.1. Tính đặc hiệu



Hình 1. Phổ mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu trắng

Nhận xét: Mẫu thử và mẫu chuẩn có cùng bước sóng hấp thụ cực đại tại 340 nm, mẫu trắng không hấp thụ ở bước sóng này. Do đó, quy trình đạt độ đặc hiệu.

3.1.2. Tính tuyến tính



Hình 2. Đường tuyến tính của quercetin chuẩn

Nhận xét: Dung dịch chuẩn quercetin có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,061x + 0,2864$ ($R^2 = 0,9981 > 0,99$) với khoảng nồng độ 1-7 $\mu\text{g/mL}$ (là khoảng nồng độ tham khảo hàm lượng quercetin có trong cao chiết Hành tím, trong đó: Phương trình tương thích với độ tin cậy 95% (mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$); $p_a = 5,09 \times 10^{-8} < \alpha = 0,05$: hệ số a có ý nghĩa; $p_b = 3,98 \times 10^{-8} < \alpha = 0,05$: hệ số b có ý nghĩa).

3.1.3. Độ chính xác

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ chính xác

Độ chính xác	Hàm lượng flavanoid trung bình (mg QE/g cao chiết)
Trong ngày (n = 6) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	$\bar{X} = 8,71 \pm 0,09$; RSD = 1,1574%
Khác ngày (n = 6) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	$\bar{X} = 8,72 \pm 0,07$; RSD = 0,8227%

Nhận xét: Giá trị RSD trong ngày và liên ngày đều $< 2\%$, như vậy phương pháp có độ chính xác.

3.1.4. Độ đúng

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng

Mẫu	Lượng chuẩn thêm vào (µg/mL)	Lượng chuẩn tìm thấy (mg/mL)	Tỉ lệ thu hồi trung bình (%)
80%	3,49	3,36	98%
		3,32	
		3,56	
100%	4,36	4,33	98%
		4,23	
		4,31	
120%	5,23	5,29	101%
		5,27	
		5,26	
Trung bình			99%

Nhận xét: Tỉ lệ hồi phục ở mỗi nồng độ riêng biệt 80%, 100%, 120% và tỉ lệ hồi phục trung bình đều nằm trong khoảng 97% - 103%. Như vậy, quy trình đạt độ đúng.

3.2. Kết quả khảo sát điều kiện chiết xuất Hành tím

Bảng 3. Kết quả khảo sát điều kiện chiết xuất Hành tím

Quy trình	Nồng độ ethanol (%)	Tỉ lệ dược liệu/dung môi (mL)	Thời gian chiết (giờ)	Nhiệt độ chiết ($^{\circ}\text{C}$)	Hàm lượng flavanoid trung bình (mg/g cao chiết)
QT1	50	1:10	24	Nhiệt độ phòng	4,21
QT2	60	1:10	24	Nhiệt độ phòng	5,39
QT3	70	1:10	24	Nhiệt độ phòng	6,44
QT4	80	1:10	24	Nhiệt độ phòng	6,69
QT5	90	1:10	24	Nhiệt độ phòng	5,43
QT6	80	1:8	24	Nhiệt độ phòng	5,59
QT7	80	1:12	24	Nhiệt độ phòng	6,43
QT8	80	1:14	24	Nhiệt độ phòng	6,32
QT9	80	1:16	24	Nhiệt độ phòng	6,11
QT10	80	1:10	12	Nhiệt độ phòng	4,25
QT11	80	1:10	14	Nhiệt độ phòng	5,87
QT12	80	1:10	16	Nhiệt độ phòng	7,87
QT13	80	1:10	18	Nhiệt độ phòng	8,37
QT14	80	1:10	20	Nhiệt độ phòng	7,56
QT15	80	1:10	22	Nhiệt độ phòng	7,22
QT16	80	1:10	18	40	8,40
QT17	80	1:10	18	50	8,76
QT18	80	1:10	18	60	8,61

Nhận xét: Điều kiện chiết của QT17 cho hàm lượng flavanoid cao nhất (8,76 mg QE/g cao chiết). Tuy nhiên, hàm lượng flavanoid ở nhiệt độ phòng QT13 (8,34 mg QE/g cao chiết) so với 50 $^{\circ}\text{C}$ QT17 không có sự chênh lệch đáng kể. Do đó, nghiên cứu lựa chọn QT18 làm điều kiện thích hợp để chiết cao đặc Hành tím.

IV. BÀN LUẬN

Theo kết quả nghiên cứu, sau khi khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại trong phạm vi 300-600 nm của dung dịch chuẩn thu được hai đỉnh hấp thụ cực đại là 340 nm và 351 nm. Đồng thời, độ hấp thụ tại bước sóng 340 nm cao hơn so với bước sóng 351 nm. Theo dữ liệu phân tích hồi quy của Makawi và cộng sự (2009) [9], chất chuẩn quercetin cũng được ghi ở bước sóng 340 nm. Do đó, nghiên cứu chọn bước sóng hấp thụ cực đại phù hợp là 340 nm để tiếp tục quy trình khảo sát điều kiện chiết xuất tối ưu và định lượng hàm lượng flavanoid trong mẫu Hành tím. Đồng thời, phương pháp định lượng bằng quang phổ UV-Vis ở bước sóng 340 nm đạt tất cả các yêu cầu theo ICH, phương pháp này được sử dụng vì kỹ thuật nhanh chóng, đơn giản và được sử dụng rộng rãi để định lượng flavonoid dựa trên phản ứng tạo phức của nó với $AlCl_3$ [10].

Theo nghiên cứu của Reza và cộng sự (2010) [11], quercetin là hợp chất ít tan trong nước, chủ yếu tan trong dung môi hữu cơ. Khi sử dụng ethanol làm dung môi chiết sẽ hạn chế được vi khuẩn và nấm mốc phát triển so với nước. Trong nghiên cứu, khi tăng dần nồng độ ethanol từ 50% đến 90% thì hàm lượng quercetin cao nhất ở nồng độ 80%, tương tự với nghiên cứu của Viera và cộng sự (2017) [12]. Khi nồng độ ethanol tăng sẽ làm thay đổi độ phân cực của dung môi phù hợp với chất tan nên hiệu quả chiết xuất tăng lên, tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol thì độ phân cực của dung môi thay đổi có thể không phù hợp với độ phân cực của quercetin nên làm giảm hiệu quả chiết xuất quercetin [5]. Vì vậy, ethanol 80% là dung môi tối ưu để chiết xuất quercetin trong Hành tím.

Tỉ lệ dược liệu/dung môi cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến hàm lượng hoạt chất trong cao chiết. Sau khi tiến hành khảo sát tỉ lệ dược liệu/dung môi từ 1:8 đến 1:16, tỉ lệ tối ưu cho hiệu quả chiết cao nhất là 1:10. Với tỉ lệ dược liệu/dung môi thấp hơn thì lượng dung môi hoà tan có thể chưa đủ để chiết xuất hết flavanoid có trong Hành tím. Ngược lại, nếu tăng tỉ lệ dược liệu/dung môi cao hơn nữa thì hàm lượng flavanoid tăng thêm không đáng kể nhưng lượng tạp lại nhiều hơn, kéo dài thời gian và thời gian cô dịch chiết làm ảnh hưởng đến hàm lượng flavanoid trong cao chiết. Mặt khác, việc sử dụng quá nhiều dung môi cũng sẽ làm tăng thêm chi phí cho sản phẩm và tốn nhiều thời gian trong quá trình thu hồi dung môi tạo cao đặc [13].

Sau khi tiến hành khảo sát thời gian chiết dược liệu tăng dần từ 12 đến 24 giờ, cho kết quả thời gian chiết xuất tốt nhất ở 18 giờ. Với thời gian chiết ngắn, chưa chiết hết hoạt chất trong dược liệu, khi thời gian chiết kéo dài làm tăng khả năng tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi, các hoạt chất dễ dàng di chuyển ra môi trường [5] mang lại hiệu quả chiết xuất càng cao, tuy nhiên nếu thời gian chiết quá dài sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng quercetin không tăng mà còn giảm.

Nhiệt độ có ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất trong dịch chiết, nhiệt độ cao sẽ giúp quá trình hòa tan chiết xuất được tốt hơn tuy nhiên nếu nhiệt độ quá cao có thể làm giảm hàm lượng hoạt chất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tăng nhiệt độ chiết lên 50°C thì hàm lượng hoạt chất tăng nhưng đến 60°C thì bắt đầu giảm. Hàm lượng flavanoid chiết ở điều kiện nhiệt độ phòng là 8,34 mg QE/g cao chiết không có sự chênh lệch đáng kể so với ở 50°C nên nghiên cứu chọn nhiệt độ phòng để chiết vì dung môi sử dụng là cồn. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Gao và cộng sự (2005) [14], chiết xuất flavonoid ở nhiệt độ phòng là tối ưu nhất.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình định lượng flavanoid bằng phương pháp UV-Vis đồng thời xác định được quy trình chiết xuất cao đặc Hành tím gồm dung môi là ethanol 80%, tỉ lệ được liệu/dung môi là 1:10, thời gian chiết xuất 18 giờ, ở nhiệt độ phòng thu được hàm lượng flavanoid tối ưu 8,34 mg QE/g cao đặc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Khoảng 5 triệu người Việt đang mắc căn bệnh gây nhiều biến chứng về tim mạch, thần kinh, cắt cụt chi. 2022, <https://moh.gov.vn>.
2. Moldovan C., Frumuzachi O., Babotă M., Barros L., Mocan A., et al. Therapeutic uses and pharmacological properties of shallot (*Allium ascalonicum*): a systematic review. *Frontiers in Nutrition*. 2022. 9, 1-32. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.903686>.
3. Peng J., Li Q., Li K., Zhu L., Lin X., et al. Quercetin improves glucose and lipid metabolism of diabetic rats: involvement of Akt signaling and SIRT1. *Journal of diabetes research*. 2017. 2017(1), 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/3417306>.
4. Nurcahyo H., Sumiwi S. A., Halimah E., Wilar G. Secondary metabolite determination from Brebes shallot's ethanol extract and its ethyl acetate fraction "*Allium ascalonicum* L.". *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*. 2022. 12(1-2022), 70-73, <https://doi.org/10.51847/NfNMFJB9ac>.
5. Nguyễn Thị Như Lạc, Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành. Biện pháp tiền xử lý và tối ưu hóa điều kiện trích ly Quercetin từ của Hành tím (*Allium cepa*). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2016. 1, 75-83, <http://dx.doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.024>.
6. Bộ Y Tế. Dược điển Việt nam V. Nhà xuất bản Y học Hà Nội. 2018. Tập 1.
7. Kaur S., Mondal P. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 2014. 1(1). DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00005.
8. Ajay S., Rohit S. Validation Of Analytical Procedures: A Comparison of ICH vs Pharmacopoeia (USP) vs FDA. *Int. Res. J. Pharm*. 2012. 3, 39-44.
9. Makawi S. Z. A., Gadkariem E. A., Ayoub S. M. H. Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *E-Journal of Chemistry*. 2009. 6 (S1), 429-437. DOI: 10.1155/2009/382504.
10. Silva L. A. L., Pezzini B. R., Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy magazine*. 2015. 11(41), 96, <https://doi.org/10.4103%2F0973-1296.149721>.
11. Razmara R. S., Daneshfar A., Sahraei R. Solubility of quercetin in water + methanol and water+ ethanol from (292.8 to 333.8) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2010. 55(9), 3934-3936, <https://doi.org/10.1021/je9010757>.
12. Viera V. B., Piovesan N., Rodrigues J. B., de O Mello R., Prestes R. C., et al. Extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antimicrobial capacity of red onion skin (*Allium cepa* L.). *International Food Research Journal*. 2017. 24(3), 990-999.
13. Predescu N. C., Papuc C., Nicorescu V., Gajaila I. U. L. I. A. N. A., Goran G. V., et al. The influence of solid-to-solvent ratio and extraction method on total phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts. *Rev. Chim*. 2016. 67, 1922-1927.
14. Gao M., Liu C. Z. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005. 21, 1461-1463, <https://doi.org/10.1007/s11274-005-6809-1>.