

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PHENOLIC, FLAVONOID VÀ SAPONIN TỔNG SỐ TRONG CÂY NGÒ GAI (*Eryngium foetidum* L.)

NGUYỄN NGỌC QUÍ¹ - VƯƠNG BẢO THY¹ - ĐẶNG XUÂN ĐÀO¹ -
NGUYỄN THỊ THẢO SƯƠNG¹ - TRẦN HỮU THANH HUY¹ - BÙI THẾ VINH¹

¹Trường Đại học Cửu Long
Cuu Long University

Ngày nhận bài: 12/5/2026

Ngày sửa bài: 26/5/2026

Ngày duyệt đăng bài: 11/6/2026

Tóm tắt:

Ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) là loài rau gia vị và dược liệu chứa nhiều hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị, trong đó có phenolic, flavonoid và saponin. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định hàm lượng phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và saponin tổng số (TSC) trong cây ngò gai. Hàm lượng TPC được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu, TFC được xác định bằng phương pháp tạo phức với $AlCl_3$ và TSC được xác định bằng phương pháp vanillin-acid sulfuric. Kết quả nghiên cứu cho thấy cây ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) chứa hàm lượng đáng kể các hợp chất hoạt tính sinh học, góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về tối ưu hóa quá trình trích ly, đánh giá hoạt tính sinh học và phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ nguồn nguyên liệu này.

Từ khóa: ngò gai, *Eryngium foetidum* L., hoạt chất sinh học, flavonoid tổng số, phenolic tổng số, saponin tổng số.

Determination of Total Phenolic, Flavonoid, and Saponin Contents in Culantro (*Eryngium foetidum* L.)

Abstract:

Culantro (*Eryngium foetidum* L.) is a culinary and medicinal plant containing valuable bioactive compounds, including phenolics, flavonoids, and saponins. This study aimed to determine the total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and total saponin content (TSC) in the whole plant of culantro. TPC was determined using the Folin–Ciocalteu method, TFC was measured by the aluminum chloride colorimetric method, and TSC was quantified using the vanillin–sulfuric acid method. The results indicate that culantro (*Eryngium foetidum* L.) contains considerable amounts of bioactive compounds, providing a scientific basis for further studies on extraction optimization, biological activity evaluation, and the development of value-added products from this plant.

Keywords: Culantro (*Eryngium foetidum* L.), bioactive compounds, total flavonoids, total phenolics, total saponins.

1. Đặt vấn đề

Ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) thuộc họ Hoa tán (Apiaceae), là loài thực vật được sử dụng phổ biến làm rau gia vị và dược liệu tại nhiều quốc gia nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Bên cạnh giá trị cảm quan trong chế biến thực phẩm, ngò gai còn được sử dụng trong y học dân gian ở nhiều khu vực nhằm hỗ trợ điều trị một số vấn đề liên quan đến rối loạn tiêu hóa, cảm sốt và viêm nhiễm. Các nghiên cứu hiện đại cho thấy, loài thực vật này chứa nhiều nhóm hợp chất hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, carotenoid, tinh dầu và các hợp chất chuyển hóa thứ cấp khác, góp phần tạo nên giá trị hóa thực vật và tiềm năng ứng dụng của nguyên liệu (Rodrigues et al., 2022; Singh et al., 2013).

Trong số các hợp chất hoạt tính sinh học có nguồn gốc thực vật, phenolic và flavonoid là hai nhóm chất được quan tâm nhiều do có khả năng tham gia vào cơ chế chống oxy hóa thông qua việc cho proton hoặc electron để trung hòa các gốc tự do. Đối với ngò gai, một số hợp chất phenolic như chlorogenic acid, caffeic acid và các dẫn xuất flavonoid đã được ghi nhận trong dịch chiết thực vật, góp phần làm rõ cơ sở hóa học cho các hoạt tính sinh học của loài cây này (Rodrigues et al., 2022; Leitão et al., 2023). Nghiên cứu của Leitão et al. (2023) cũng cho thấy dịch chiết lá ngò gai từ vùng Amazon chứa các hợp chất phenolic đáng chú ý và thể hiện khả năng chống oxy hóa trong điều kiện *in vitro*.

Bên cạnh phenolic và flavonoid, saponin cũng là nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp đáng quan tâm trong các loài thuộc chi *Eryngium*. Nhiều nghiên cứu về hóa thực vật cho thấy, các loài thuộc chi này có thể chứa triterpene saponin, đặc biệt là các dẫn xuất có khung oleanane. Sự hiện diện của saponin cùng với các nhóm hợp chất phenolic và flavonoid góp phần làm tăng giá trị nghiên cứu của ngò gai như một nguồn nguyên liệu thực vật giàu hoạt chất sinh học (Erdem et al., 2015; Rodrigues et al., 2022).

Trong những năm gần đây, xu hướng khai thác các nguồn nguyên liệu tự nhiên giàu hợp chất hoạt tính sinh học phục vụ nghiên cứu thực phẩm và dược liệu ngày càng được quan tâm. Tuy nhiên, các nghiên cứu xác định đồng thời hàm lượng phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và saponin tổng số (TSC) trong toàn bộ cây ngò gai bằng các phương pháp đo quang phổ vẫn còn hạn chế. Việc đánh giá đồng thời các nhóm hợp chất này có ý nghĩa trong việc cung cấp dữ liệu ban đầu về giá trị hóa thực vật của nguyên liệu, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về tối ưu hóa quá trình trích ly, định danh thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học.

Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu “Xác định hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin tổng số trong cây ngò gai (*Eryngium foetidum* L.)” được thực hiện nhằm xác định hàm lượng của 3 nhóm hợp chất hoạt tính sinh học chính trong nguyên liệu. Kết quả nghiên cứu góp phần bổ sung dữ liệu khoa học về thành phần hóa thực vật của cây ngò gai và định hướng cho các nghiên cứu phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ nguồn nguyên liệu này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu chính: Cây ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) được thu hoạch tại vườn dược liệu của Khoa Khoa học sức khỏe, Trường Đại học Cửu Long ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng (60-70 ngày sau trồng).

Sau khi thu hoạch, mẫu được rửa sạch bằng nước cất để loại bỏ bụi bẩn và tạp chất bám trên bề mặt. Mẫu sau đó được sấy ở nhiệt độ 45°C đến khi độ ẩm đạt dưới 10% nhằm hạn chế hoạt động của enzyme và giảm sự biến đổi của các hợp chất sinh học trong quá trình bảo quản. Mẫu khô được nghiền bằng máy nghiền công nghiệp, rây qua lưới có kích thước lỗ 0,25 mm để thu bột đồng nhất, sau đó được bảo quản trong túi nhôm hút chân không ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) cho đến khi phân tích.

2.1.2. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm thuốc thử Folin-Ciocalteu, acid gallic, quercetin, oleanolic acid, nhôm clorua (AlCl_3), natri carbonat (Na_2CO_3), vanillin, acid sulfuric (H_2SO_4) và ethanol. Tất cả hóa chất đều đạt cấp độ tinh khiết phân tích (Analytical Reagent, AR).

Thiết bị sử dụng gồm máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis, bể siêu âm, máy cô quay chân không, cân phân tích bốn số lẻ và các dụng cụ thủy tinh thông dụng trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp trích ly dịch chiết

Dịch chiết được chuẩn bị theo phương pháp trích ly hỗ trợ siêu âm dựa trên nguyên lý được mô tả bởi Chemat et al. (2017), có điều chỉnh phù hợp với điều kiện nghiên cứu. Cân chính xác 5,00 g bột ngò gai khô cho vào bình tam giác 250 mL, bổ sung 100 mL ethanol 70% (tỷ lệ nguyên liệu : dung môi = 1:20, w/v). Hỗn hợp được trích ly bằng bể siêu âm ở tần số 40 kHz, nhiệt độ $45 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 45 phút. Sau quá trình trích ly, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman No. 1. Dịch lọc được cô quay chân không ở 50°C nhằm loại bỏ một phần dung môi, sau đó được định mức chính xác đến 100 mL bằng ethanol 70% trong bình định mức. Dịch chiết thu được được sử dụng cho các thí nghiệm xác định hàm lượng phenolic tổng số, flavonoid tổng số và saponin tổng số.

2.3. Phương pháp định lượng các hợp chất sinh học tổng số

Hàm lượng phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và saponin tổng số (TSC) được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis dựa trên các phản ứng tạo màu đặc trưng. Các đường chuẩn được xây dựng từ các chất chuẩn tương ứng gồm acid gallic, quercetin và oleanolic acid.

Hàm lượng các hợp chất sinh học được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng hoạt chất (mg/g CK)} = \frac{C \times V \times F}{1000 \times m}$$

Trong đó: C là nồng độ chất tương ứng (gallic acid, quercetin, oleanolic acid) tra từ đường chuẩn. V là thể tích dịch chiết ban đầu (mL). F là hệ số pha loãng mẫu khi đo. M là khối lượng bột nguyên liệu khô đem trích ly (g). 1000 là hệ số chuyển đổi từ μg sang mg.

2.3.1. Xác định hàm lượng phenolic tổng số (TPC)

Hàm lượng phenolic tổng số được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu của Singleton et al. (1999). Hút 0,5 mL dịch chiết đã pha loãng thích hợp cho vào ống nghiệm, bổ sung 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Sau 5 phút, thêm 2,0 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%, lắc đều và ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 765 nm bằng máy UV-Vis. Hàm lượng phenolic tổng số được tính từ đường chuẩn gallic acid (0-100 $\mu\text{g/mL}$) và biểu diễn dưới dạng miligam tương đương acid gallic trên một gam chất khô (mg GAE/g CK).

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng số (TFC)

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định bằng phương pháp tạo phức với AlCl_3 theo Chang et al. (2002). Trộn 0,5 mL dịch chiết với 1,5 mL ethanol 95%, 0,1 mL dung dịch AlCl_3 10%, 0,1 mL potassium acetate 1 M và 2,8 mL nước cất. Hỗn hợp được lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 40 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 415 nm. Hàm lượng flavonoid tổng số được tính toán từ đường chuẩn quercetin (0-50 $\mu\text{g/mL}$) và biểu diễn dưới dạng miligam tương đương quercetin trên một gam chất khô (mg QE/g CK).

2.3.3. Xác định hàm lượng saponin tổng số (TSC)

Hàm lượng saponin tổng số được xác định theo phương pháp vanillin-acid sulfuric của Makkar et

al. (2007). Hút 0,2 mL dịch chiết cho vào ống nghiệm, bổ sung 0,25 mL dung dịch vanillin 8% (trong ethanol) và 2,5 mL dung dịch H_2SO_4 72%. Hỗn hợp được gia nhiệt trong bể cách thủy ở 60°C trong 15 phút, sau đó làm lạnh nhanh bằng nước đá đến nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 544 nm. Hàm lượng saponin tổng số được xác định từ đường chuẩn oleanolic acid (0-100 $\mu\text{g/mL}$) và biểu diễn dưới dạng miligam tương đương oleanolic acid trên một gam chất khô (mg OAE/g CK).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm xác định hàm lượng TPC, TFC và TSC được thực hiện độc lập với 3 lần lặp lại ($n = 3$) trên cùng một mẫu nguyên liệu nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả phân tích. Các số liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2021. Kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD).

Các đường chuẩn được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn và giá trị hấp thụ quang học (OD). Độ phù hợp của mô hình hồi quy được đánh giá thông qua hệ số xác định (R^2).

3. Kết quả và thảo luận

Để đánh giá hàm lượng các hợp chất hoạt tính sinh học chủ yếu trong cây ngò gai, nghiên cứu tiến hành xác định phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và saponin tổng số (TSC). Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, cây ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) chứa đồng thời các hợp chất phenolic, flavonoid và saponin với hàm lượng tương đối cao.

Các phương trình đường chuẩn đều có hệ số xác định (R^2) lớn hơn 0,99, cho thấy mối tương quan tuyến tính cao giữa nồng độ chất chuẩn và giá trị hấp thụ quang học. Kết quả này chứng tỏ các phương pháp phân tích được sử dụng có độ tin cậy tốt trong khoảng nồng độ khảo sát.

Bảng 1. Hàm lượng phenolic, flavonoid và saponin tổng số trong cây ngò gai

Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị biểu thị	Phương trình đường chuẩn và hệ số R^2	Hàm lượng (Mean $\pm$ SD, $n = 3$)
Phenolic tổng số (TPC)	mg GAE/g chất khô	$y = 0,0102x + 0,015$ ($R^2 = 0,992$)	31,82 $\pm$ 1,85
Flavonoid tổng số (TFC)	mg QE/g chất khô	$y = 0,0185x + 0,006$ ($R^2 = 0,993$)	12,64 $\pm$ 0,91
Saponin tổng số (TSC)	mg OAE/g chất khô	$y = 0,0112x + 0,009$ ($R^2 = 0,991$)	42,37 $\pm$ 2,76

Trong các phương trình hồi quy tuyến tính, y biểu thị giá trị mật độ quang đo được (OD) ở bước sóng đặc trưng; x biểu thị nồng độ tương ứng của chất chuẩn ($\mu\text{g/mL}$).

Hàm lượng phenolic tổng số đạt 31,82 mg GAE/g chất khô cho thấy ngò gai là nguồn nguyên liệu chứa hàm lượng phenolic tương đối cao. Polyphenol là nhóm hợp chất được quan tâm rộng rãi do khả năng tham gia vào cơ chế chống oxy hóa thông qua việc cho proton hoặc electron để trung hòa các gốc tự do (Singleton et al., 1999). Kết quả thu được trong nghiên cứu này cao hơn giá trị phenolic tổng số được Singh et al. (2013) ghi nhận trên lá ngò gai tại Ấn Độ. Sự khác biệt giữa các nghiên cứu có thể liên quan đến nguồn gốc nguyên liệu, điều kiện canh tác, bộ phận thực vật sử dụng, giai đoạn sinh trưởng,

phương pháp làm khô, dung môi trích ly và điều kiện phân tích. Ngoài ra, nghiên cứu hiện tại sử dụng toàn bộ cây ngò gai (lá và thân) trong khi nhiều nghiên cứu trước đây chỉ tập trung khảo sát riêng phần lá.

Kết quả TPC trong nghiên cứu hiện tại cũng cao hơn tổng hàm lượng các hợp chất phenolic riêng lẻ được Leitão et al. (2023) xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên dịch chiết lá ngò gai vùng Amazon. Sự khác biệt này là phù hợp do phương pháp Folin-Ciocalteu phản ánh tổng các hợp chất có khả năng khử quy đổi theo acid gallic, trong khi HPLC chỉ định lượng các hợp chất phenolic riêng lẻ đã được nhận diện. Vì vậy, các giá trị thu được từ 2 phương pháp không hoàn toàn tương đương và cần được diễn giải thận trọng khi so sánh.

Đối với flavonoid tổng số, hàm lượng đạt $12,64 \pm 0,91$ mg QE/g chất khô cho thấy ngò gai là nguồn cung cấp flavonoid đáng kể. Kết quả này cao hơn giá trị được Singh et al. (2013) công bố trên mẫu lá ngò gai tươi. Sự khác biệt có thể xuất phát từ việc sử dụng nguyên liệu khô, điều kiện trích ly và phương pháp phân tích. Bên cạnh đó, quá trình trích ly hỗ trợ bằng siêu âm được cho là góp phần nâng cao hiệu suất thu hồi flavonoid thông qua hiện tượng xâm thực (cavitation), làm tăng khả năng tiếp xúc giữa dung môi và mô thực vật, từ đó cải thiện quá trình chuyển khối của các hợp chất hòa tan vào dung môi (Chemat et al., 2017).

Hàm lượng saponin tổng số đạt $42,37 \pm 2,76$ mg OAE/g chất khô cho thấy, cây ngò gai chứa lượng saponin tương đối cao. Đây là nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp được quan tâm trong nhiều nghiên cứu hóa thực vật do liên quan đến nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng của thực vật. Tuy nhiên, phương pháp vanillin-acid sulfuric chỉ cho phép xác định hàm lượng saponin tổng số quy đổi theo oleanolic acid mà chưa cung cấp thông tin về cấu trúc hoặc thành phần saponin cụ thể. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại như HPLC hoặc LC-MS để định danh thành phần saponin và đánh giá sâu hơn vai trò sinh học của nhóm hợp chất này trong ngò gai. Hàm lượng TSC tương đối cao thu được trong nghiên cứu cũng cho thấy saponin có thể là một trong những nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp đáng chú ý của cây ngò gai và cần được ưu tiên khảo sát trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả phân tích hàm lượng saponin tổng số ghi nhận cho thấy, cây ngò gai chứa lượng saponin tương đối cao. Điều này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo hóa thực vật đặc trưng của chi *Eryngium*, vốn là nhóm thực vật có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy mạnh mẽ các triterpene saponin mạch vòng (đặc biệt là khung oleanane) nhằm thực hiện chức năng phòng vệ sinh học. Việc sử dụng nhiệt độ sấy 45°C có thể góp phần hạn chế sự biến đổi của các hợp chất nhạy nhiệt trong quá trình chuẩn bị mẫu, giúp bảo toàn nguyên vẹn các liên kết glycoside kém bền của saponin, tránh hiện tượng thủy phân nhiệt thường gặp ở các phương pháp phơi sấy truyền thống. Tuy nhiên, do phương pháp vanillin-acid sulfuric dựa trên phản ứng tạo màu của toàn bộ khung triterpenoid, giá trị này mang tính chất định lượng tổng số quy đổi theo oleanolic acid. Đây là tiền đề quan trọng gợi mở cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC/LC-MS) để phân tách và định danh chính xác các phân đoạn saponin quý trong cây ngò gai.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được hàm lượng phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC) và saponin tổng số (TSC) trong cây ngò gai (*Eryngium foetidum* L.) bằng các phương pháp đo quang phổ UV-Vis. Hàm lượng TPC, TFC và TSC lần lượt đạt $31,82 \pm 1,85$ mg GAE/g chất khô, $12,64 \pm 0,91$ mg QE/g chất khô và $42,37 \pm 2,76$ mg OAE/g chất khô.

Kết quả cho thấy, ngò gai là nguồn nguyên liệu chứa hàm lượng đáng kể các hợp chất hoạt tính sinh

học có tiềm năng khai thác trong lĩnh vực thực phẩm và dược liệu. Dữ liệu thu được góp phần bổ sung cơ sở khoa học về thành phần hóa thực vật của loài *Eryngium foetidum*, đồng thời là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về tối ưu hóa quá trình trích ly, định danh thành phần hóa học bằng các kỹ thuật sắc ký hiện đại, đánh giá hoạt tính sinh học và phát triển các sản phẩm giá trị gia tăng từ nguồn nguyên liệu này■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Erdem, S. A., Nabavi, S. F., Orhan, I. E., Daglia, M., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2015). Blessings in disguise: A review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 53. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0136-3>
- Leitão, D. S. T. C., Siqueira, F. C., Sousa, S. H. B., Mercadante, A. Z., Chisté, R. C., & Lopes, A. S. (2023). Extracts of *Eryngium foetidum* leaves from the Amazonia: Phenolic composition and antioxidant properties. *Antioxidants*, 12(5), 1112. <https://doi.org/10.3390/antiox12051112>
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). *Plant secondary metabolites*. Humana Press.
- Rodrigues, T. L. M., Silva, M. E. P., Gurgel, E. S. C., Oliveira, M. S., & Lucas, F. C. A. (2022). *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae): A literature review of traditional uses, chemical composition and pharmacological activities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2896895. <https://doi.org/10.1155/2022/2896895>
- Singh, S., Singh, D. R., Banu, S., & Salim, K. M. (2013). *Determination of bioactives and antioxidant activity in Eryngium foetidum L.: A traditional culinary and medicinal herb*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 83(3), 453-460. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0141-y>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)