

Nghiên cứu gốc

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ CHIẾT XUẤT LÁ LÚA NON GIỐNG HUYẾT RỒNG VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG

Nguyễn Phú Thọ[✉], Nguyễn Hữu Thanh

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm mục đích phân tích một số thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của chiết xuất ethanol lá lúa non giống Huyết Rồng.

Phương pháp: Bột lá lúa non giống Huyết Rồng được đo hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số và chlorophyll tổng số. Khả năng chống oxy hóa của bột lá lúa non được xác định bằng năng lực khử sắt (RP), hiệu quả loại bỏ gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) và 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để xét nghiệm khả năng kháng khuẩn chống lại các vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. Các thành phần hóa học trong bột lá lúa non được xác định bằng GC-MS.

Kết quả: Hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số và chlorophyll tổng số trong bột lá lúa non lần lượt là $3,15 \pm 0,43$ mg GAE/g, $0,86 \pm 0,03$ mg QE/g, và $1,29 \pm 0,11$ mg/g. Hoạt tính chống oxy hóa trong bột lá lúa non được xác định bằng DPPH, ABTS và RP cho thấy giá trị IC_{50} lần lượt là $344,52 \pm 5,22$ μ g/mL, $789,63 \pm 7,56$ μ g/mL và $493,25 \pm 5,96$ μ g/mL. Bột lá lúa non có hoạt tính kháng khuẩn chống lại vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. Kết quả phân tích trên GC-MS cho thấy, các hợp chất chính trong bột lá lúa non là 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (91,75 %), tiếp theo là phytol (2,25 %), stigmasterol (1,29 %).

Kết luận: Bột lá lúa non là nguồn cung cấp các hợp chất hóa học thực vật có giá trị, có thể được ứng dụng làm chất bổ sung vào các loại thực phẩm chức năng.

Từ khóa: Chlorophyll, chất chống oxy hóa, flavonoid, GC-MS, polyphenol.

STUDY FOR DETAMINATION OF YOUNG LEAF EXTRACTED BIOACTIVES FROM RICE VARIETY HUYET RONG AND APPLICABILITY

ABSTRACT

Aims: This study aims to analyze the phytochemical compounds, antioxidant and antibacterial activities of the ethanol extract obtained from young rice leaves of Huyet Rong variety.

Methods: Young rice leaf extract powder of Huyet Rong variety was measured for total phenolic content, total flavonoid content and total chlorophyll content, and tested for antioxidant activities in reducing power (RP), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assays.

[✉] Tác giả liên hệ: Nguyễn Phú Thọ
Email: nptho@agu.edu.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/634

Nhận bài: 21/9/2023
Chấp nhận đăng: 18/10/2023

Chỉnh sửa: 16/10/2023
Công bố online: 22/10/2023

Agar well diffusion method was used to test antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The phytochemical compounds in young rice leaf powder were determined by GC-MS.

Results: The extract contained a total content of 3.15 ± 0.43 mg GAE/g, 0.86 ± 0.03 mg QE/g, and 1.29 ± 0.11 mg/g of polyphenols, flavonoids, and chlorophyll, respectively. The antioxidant activity of the rice extract was evaluated using DPPH, ABTS, and RP assays, which yielded IC_{50} values of 344.52 ± 5.22 μ g/mL, 789.63 ± 7.56 μ g/mL, and 789.63 ± 7.56 μ g/mL, respectively. Additionally, the extract exhibited antibacterial effects against both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. According to GC-MS analysis, the primary phytochemical compounds present in the extract were 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (91.75%), followed by phytol (2.25%) and stigmasterol (1.29%).

Conclusion: The young rice leaf extracts could serve as a valuable source of phytochemical compounds that could be utilized as supplements in various functional food applications.

Key words: Chlorophyll, antioxidants, flavonoids, GC-MS, polyphenols

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những loại cây lương thực chính được trồng phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long và việc trồng lúa hiện nay chủ yếu để thu hoạch hạt hoặc sử dụng sinh khối cho chăn nuôi, rất ít khi sử dụng lá lúa như nguồn nguyên liệu sản xuất các hoạt chất sinh học. Nhiều nghiên cứu cho thấy, trong lá lúa non có chứa nhiều các hợp chất sinh học có giá trị như polyphenol và chlorophyll với khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, hỗ trợ tiêu hóa và tăng cường miễn dịch [1,2]. Vì vậy, lá lúa non có thể được khai thác làm nguyên liệu tiềm năng cho các sản phẩm thực phẩm chức năng.

Polyphenol và chlorophyll là những thành phần hóa học từ thực vật có lợi cho sức khỏe được quan tâm trong những thập kỷ gần đây. Ngày càng có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng việc sử dụng những thành phần hóa học từ thực vật này hiệu quả tích cực đối với sức khỏe thông qua việc điều chỉnh quá trình

trao đổi chất, cân nặng, bệnh mãn tính và tăng sinh tế bào [3, 4]. Các nghiên cứu trên động vật, trên người và dịch tễ học cho thấy polyphenol và chlorophyll có đặc tính chống oxy hóa và kháng viêm nên có tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh tim mạch, rối loạn thoái hóa thần kinh, ung thư và béo phì [5,6]. Ngoài tính chất chống oxy hóa, chiết xuất thực vật chứa chlorophyll và polyphenol còn thể hiện tính chất kháng vi khuẩn gây bệnh [7].

Sự có mặt của các hợp chất hóa học từ thực vật có thể có tác dụng đồng thời về khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn [8]. Vì vậy, việc xác định đặc tính và thành phần hóa học trong thực vật là cần thiết. Một số kỹ thuật phân tích như sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS), cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS) được sử dụng để định lượng và xác định các hợp chất hóa học từ thực vật [9,10]. Trong số các kỹ thuật này, GC-MS được xem là

một trong những nền tảng phân tích đáng tin cậy được sử dụng rộng rãi nhất với độ nhạy cao [11]. Hiện nay, nghiên cứu về thành phần các hợp chất hóa học thực vật trong bột lá lúa non còn hạn chế. Do đó, việc phân tích các thành phần này cung cấp ý tưởng cho các nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính sinh học và các ứng dụng tiềm năng của chiết xuất từ lá lúa non.

Việc bổ sung thực phẩm với các thành phần tăng cường sức khỏe tự nhiên có thể giúp người tiêu dùng chống lại

các bệnh liên quan đến chế độ ăn uống vì chúng chứa nồng độ cao các hợp chất có hoạt tính sinh học, chẳng hạn như các chất chuyển hóa thực vật thứ cấp. Những hợp chất này đóng vai trò chính trong việc thúc đẩy sức khỏe tổng thể [12]. Do đó, việc khai thác và xác định các hợp chất sinh học của bột lá lúa non để sử dụng chúng như thành phần chất bổ sung vào thực phẩm chức năng và các sản phẩm chức năng khác sẽ là nghiên cứu đầy hứa hẹn giúp tăng giá trị từ cây lúa.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Lá lúa giống Huyết Rồng ở giai đoạn 3 tuần tuổi được trồng trong điều kiện không sử dụng phân bón và thuốc trừ sâu. Quá trình chiết xuất được thực hiện như mô tả của Tamprasit et al. (2019) [1] sử dụng 80% ethanol làm dung môi. Dung dịch sau chiết xuất được cô quay đuổi

dung môi ở nhiệt độ dưới 45°C trước khi sấy đông khô. Bột chiết xuất lá lúa thu được sau đông khô được bảo quản ở âm 18 độ C và được sử dụng để xác định các thành phần hóa học, chất chống oxy hóa và khả năng kháng khuẩn.

2.2. Xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid và chlorophyll tổng

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu như mô tả của Tamprasit et al. (2019) [1], kết quả được biểu thị bằng mg axit gallic tương đương (GAE) trên một gam bột lá lúa non. Hàm lượng chlorophyll tổng được xác định bằng

cách đo độ hấp thụ ở các bước sóng 645 và 663 nm trên máy đo quang phổ [1]. Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Djeridane et al. (2006) [13], kết quả được biểu thị bằng mg quercetin tương đương (QE) trên một gam bột lá lúa non.

2.3. Xác định khả năng chống oxy hóa

Năng lực khử sắt (RP), hiệu quả loại bỏ gốc tự do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) và 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được xác định

theo Thepthanee et al. (2022) [14]. Kết quả được biểu thị bằng giá trị IC₅₀, nồng độ mẫu ức chế được 50% gốc tự do. Tocopherol và axit ascorbic được sử dụng làm chất chuẩn để so sánh.

2.4. Xác định khả năng kháng khuẩn

Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để xét nghiệm khả năng kháng khuẩn của bột lá lúa non đối với các vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* ATCC6538 và *Escherichia coli* ATCC8739[15]. Vi khuẩn được nuôi

tăng sinh ở 37°C qua đêm trong môi trường Luria-Bertani. Các đĩa thạch dinh dưỡng được trải đều với 0,1 mL huyền phù vi khuẩn (7×10^5 CFU/mL). Bổ sung 50 µL dịch chiết xuất từ bột lá lúa non ở nồng độ 3000 µg/mL vào các lỗ

giếng có đường kính 0,5 cm. Sử dụng dimethyl sulfoxide (DMSO) nồng độ 30% và kháng sinh ampicillin nồng độ 10 µg/mL làm đối chứng âm và đối

chứng dương tương ứng. Các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được biểu thị bằng đường kính (mm) vùng ức chế.

2.5. Phân tích một số thành phần hóa học trên hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC-MS)

Chiết xuất ethanol của lá lúa non được chuẩn bị như phương pháp QuEChERS Dispersive Kit (Agilent Technologies, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một số thành phần hóa học trong bột lá lúa non được xác định trên hệ thống GC-MS 7890B (Agilent Technologies, Mỹ), sử dụng cột Agilent 122-5532G (40 m x 250 µm x 0,25 µm). Nhiệt độ lò cột ban đầu đặt ở 70 °C, sau đó tăng 25 °C/phút đến 150 °C,

tiếp tục tăng 10 °C/phút đến 200 °C, sau cùng tăng 15 °C/phút đến 280 °C với thời gian giữ là 5 phút. Mẫu đã pha loãng (1µL) được bơm vào ở nhiệt độ 280 °C và áp suất 15 psi, tốc độ dòng 1,2 mL/phút, vận tốc trung bình 34,908 cm/giây. Tổng thời gian phân tích một mẫu trên GC-MS là 52 phút. Các hợp chất được phát hiện bằng cách so sánh với thư viện khối phổ NIST05.

2.6. Phân tích thống kê

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để xử lý số liệu thô, tính các số liệu thống kê như giá trị trung bình. Sử dụng

phần mềm STATGRAPHICS để phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Duncan các trung bình nghiệm thức.

III. KẾT QUẢ

3.1. Hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số, và chlorophyll tổng số trong bột lá lúa non

Sử dụng phương pháp Folin-Ciocalteu để xác định polyphenol tổng số, hàm lượng flavonoid tổng số được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin và hàm lượng chlorophyll tổng số được xác định bằng

máy đo quang phổ. Kết quả phân tích ghi nhận cho ta biết được hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số và chlorophyll tổng số trong bột lá lúa non (Bảng 1).

Bảng 1. Hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học trong bột lá lúa non giống Huyết Rồng

Thành phần	Hàm lượng
Polyphenol tổng số	3,15 ± 0,43 mg GAE/g
Flavonoid tổng số	0,86 ± 0,03 mg QE/g
Chlorophyll tổng số	1,29 ± 0,11 mg/g

3.2. Khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn của bột lá lúa non

Khả năng chống oxy hóa của bột lá lúa non được xác định theo phương pháp DPPH, ABTS, RP và kết quả được biểu thị qua giá trị IC50. Kết quả nghiên cứu

cho thấy chiết xuất lá lúa non có tính chất chống oxy hóa (Bảng 2). Tuy nhiên, giá trị IC50 của bột lá lúa non cao hơn so với axit ascorbic và tocopherol trong ba

thử nghiệm. Bột lá lúa non có các giá trị IC₅₀ lớn hơn 340 µg/mL trong khi giá trị này ở axit ascorbic và tocopherol được ghi nhận nhỏ hơn 100 µg/mL. Điều đó

có nghĩa là hoạt tính chống oxy hóa của bột lá lúa non thấp hơn so với axit ascorbic và tocopherol.

Bảng 2. Khả năng chống oxy hóa của bột lá lúa non giống Huyết Rồng

Chất chống oxy hóa	IC ₅₀ (µg/mL)*		
	DPPH	ABTS	RP
Bột lá lúa non	344,52 ^a ± 5,22	789,63 ^a ± 7,56	493,25 ^a ± 5,96
Axit ascorbic	6,12 ^c ± 0,07	42,65 ^c ± 1,22	36,8 ^b ± 1,78
Tocopherol	14,27 ^b ± 0,23	87,72 ^b ± 1,89	5,24 ^c ± 0,08

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Ngoài khả năng chống oxy hóa, bột lá lúa non còn có khả năng chống lại các vi khuẩn gây bệnh. Theo kết quả ở Bảng 3, bột lá lúa non có hoạt tính kháng cao đối với vi khuẩn gram dương như *S. aureus* với đường kính vùng ức chế

13,67 mm, trong khi tác dụng thấp hơn đối với vi khuẩn gram âm như *E. coli*, đường kính vùng ức chế 9,45 mm. So với chuẩn ampicillin, chiết xuất lá lúa non có hoạt tính kháng khuẩn thấp hơn đáng kể (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng kháng khuẩn của bột lá lúa non giống Huyết Rồng

Thành phần	Đường kính vùng ức chế (mm)*	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Bột lá lúa non	13,67 ^b ± 1,15	9,45 ^b ± 0,33
Ampicillin	31,67 ^a ± 1,15	15,01 ^a ± 0,58
DMSO	0	0

*Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

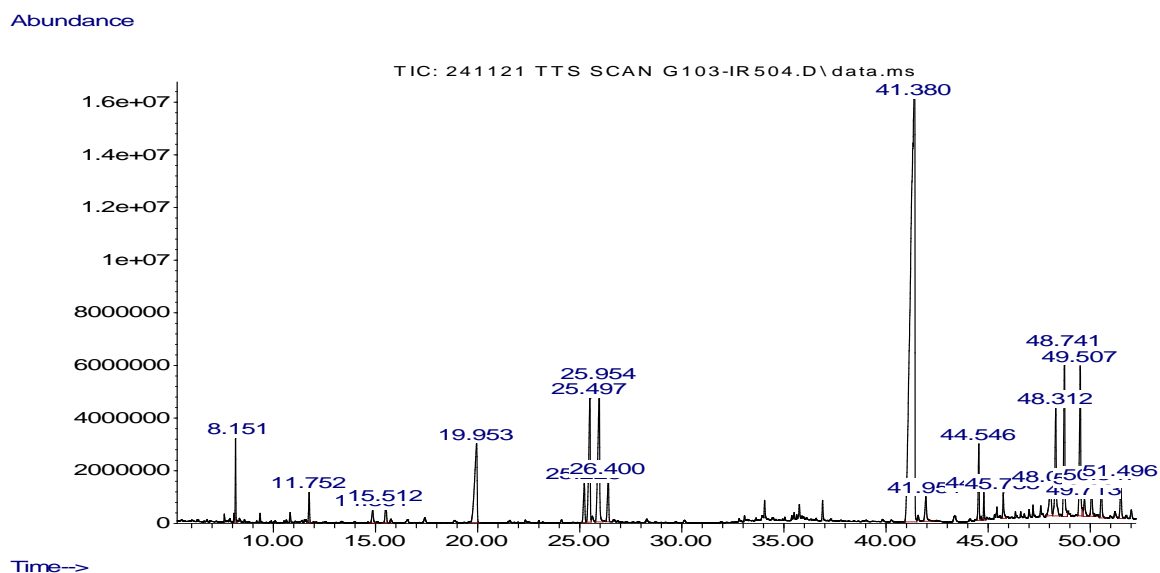
Bột lá lúa non được sử dụng ở nồng độ 3000 µg/mL; sử dụng DMSO ở nồng độ 30% làm đối chứng âm; ampicillin

nồng độ 100 µg/mL làm đối chứng dương.

3.3. Thành phần một số hợp chất hóa học trong bột lá lúa non

Kết quả phân tích bột lá lúa non trên GC-MS cho thấy, có 17 hợp chất hóa học (Bảng 4 và Hình 1). Trong đó, hiện diện các hợp chất được phát hiện phổ biến trong thực vật như phytol, stigmasterol, campesterol. Những hợp chất này như đã báo cáo có các đặc tính sinh học có lợi như khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa, tăng cường miễn

dịch và kháng nấm. Các dẫn xuất phthalate như 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester chiếm tỷ lệ lớn nhất (91,75%) trong bột lá lúa non.



Hình 1. Sắc ký đồ GC-MS của bột xuất lá lúa non giống Huyết Rồng

Bảng 4. Thành phần hợp chất hóa học trong bột lá lúa non giống Huyết Rồng

STT	Tên hợp chất hóa học	Trọng lượng phân tử (Dalton)	Diện tích pic (%)	Thời gian lưu (phút)
1.	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	206,167	0,205	8,065
2.	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-	138,141	0,481	15,489
3.	1,4-Eicosadiene	278,297	0,167	17,41
4.	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl tridecyl ester	376,301	0,181	24,102
5.	Phytol	296,308	2,246	25,845
6.	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	0,162	35,744
7.	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (Số phân loại: 168521)	390,277	0,329	39,836
8.	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (Số phân loại: 168519)	390,277	91,751	41,448
9.	13-Docosenamide, (Z)-	337,334	0,394	42,054
10.	Ergosterol	396,339	0,274	48,038
11.	Campesterol	400,371	0,592	48,267
12.	Stigmasterol	412,371	1,286	48,678
13.	Eicosane	282,329	0,181	48,987
14.	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	0,568	49,444
15.	3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 4-methyl-	124,089	0,331	50,038
16.	Spinasterone	410,355	0,564	50,53
17.	Stigmast-4-en-3-one	412,371	0,288	51,467

IV. BÀN LUẬN

Bột lá lúa non giống Huyết Rồng trong nghiên cứu này có hàm lượng polyphenol (3,15 mg GAE/g), flavonoid (0,86 mg QE/g) và chlorophyll (1,29 mg/g) cao. Kết quả phân tích này phù hợp với nghiên cứu của Khanthapok et al. (2015) khi tiến hành khảo sát trên 14 giống lúa *O. Sativa* kết quả ghi nhận hàm lượng polyphenol tổng số trong chiết xuất của các giống lúa màu dao động từ 1,9– 4,3 mg GAE/g trong khi giá trị này ở các giống lúa gạo trắng thay đổi trong khoảng 1,50 – 2,14 mg GAE/g [2]. Trong khi đó, Bocco et al. (2017) đã báo cáo rằng hàm lượng flavonoid tổng trong các giống lúa khác nhau dao động từ 0,014 đến 0,043 mg QE/g trọng lượng khô của lá [16].

Trong nghiên cứu này, bột lá lúa non được ghi nhận có hoạt tính chống oxy hóa qua các thử nghiệm DPPH, ABTS và RP. Giống với nghiên cứu này, lá lúa đen (*Oryza sativa L.*) cũng được chứng minh khả năng chống oxy hóa [14]. Về đặc tính kháng khuẩn, hiện nay không có nghiên cứu nào về hoạt động kháng khuẩn của lá lúa được báo cáo trước đây. Thực tế cho thấy bột lá lúa non có hoạt tính chống lại *S. aureus* và *E. coli*. Tương tự như chiết xuất từ một số loài thực vật

được báo cáo là có hoạt tính chống lại những vi khuẩn này [17]. Bằng chứng chỉ ra rằng đặc tính kháng khuẩn được đặc trưng bởi sự hiện diện của các polyphenol, flavonoid, alkaloid, tannin, terpenoid, glycoside [18]. Những thành phần hóa học thực vật này cũng được tìm thấy trong lá lúa và có thể dẫn đến hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn.

Kết quả phân tích GC-MS đã tìm thấy 17 hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau trong bột lá lúa non. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh đặc tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của các hợp chất này bao gồm 1,2-benzadicyclohexane, diisooctyl ester [19], phytol [20], stigmasterol [21], 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester [22]. Như vậy, các hợp chất được xác định trong chiết xuất lá lúa non đã chứng minh cho hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn. Ngoài ra, flavonoid, polyphenol và chlorophyll trong bột lá lúa non là những hợp chất sinh học có đặc tính dinh dưỡng mang lại lợi ích sức khỏe chống lại các bệnh khác nhau [23]. Do đó, cần có những nghiên cứu sâu hơn để khai thác các hợp chất sinh học có ích này từ lá lúa.

V. KẾT LUẬN

Bột lá lúa non chứa các hợp chất hóa học thực vật bao gồm polyphenol (3,15 ± 0,43 mg GAE/g), flavonoid (0,86 ± 0,03 mg QE/g) và chlorophyll (1,29 ± 0,11 mg/g) có hoạt tính chống oxy hóa trong các thử nghiệm DPPH, ABTS và RP với giá trị các giá trị IC₅₀ tương ứng là 344,52 ± 5,22 µg/mL, 789,63 ± 7,56 µg/mL và 493,25 ± 5,96 µg/mL. Bột lá lúa non cũng thể hiện hoạt động kháng

khẩn chống lại *S. aureus* và *E. coli*. Các hợp chất hóa học tìm thấy trong bột lá lúa non chủ yếu là 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (91,75%), phytol (2,25%) và stigmasterol (1,29%). Đây là những hợp chất có nhiều chức năng sinh học với các lợi ích tăng cường sức khỏe, có thể được sử dụng trong các ứng dụng dược phẩm và thực phẩm chức năng.

Lời cảm ơn: Bài báo là một phần kết quả của Dự án Khoa học và Công nghệ thành phố Cần Thơ.

Tài liệu tham khảo

1. Tamprasit K, Weerapreeyakul N, Sutthanut K, Thukhammee W, Wattanathorn J. Harvest age Effect on phytochemical content of white and black glutinous rice cultivars. *Molecules*.2019;24:E4432.
2. Khanthapok P, Muangprom A, Sukrong S. Antioxidant activity and DNA protective properties of rice grass juices. *ScienceAsia*. 2015;41:119.
3. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Frontiers in Nutrition*. 2018;5.
4. Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L. Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: A Comprehensive Review. *Molecules*.2023;28:5344.
5. Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*. 2011;41(10):1346-1359
6. Ebrahimi P, Shokramraji Z, Tavakkoli S, Mihaylova D, Lante A. Chlorophylls as natural bioactive compounds existing in food by-products: A critical review. *Plants*.2023; 12(7):1533
7. Dziędziński M, Kobus-Cisowska J, Powalowska D, Stuper K, Baranowska M. Polyphenols composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Pinus sylvestris* L. shoots extracts depending on different drying methods. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2020;32:229.
8. Chen X, Li H, Zhang B, Deng Z. The synergistic and antagonistic antioxidant interactions of dietary phytochemical combinations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;62(20):5658-5677.
9. Fiehn O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2016;114:31-34.
10. Peixoto Araujo NM, Arruda HS, dos Santos FN, de Moraes DR, Pereira GA, Pastore GM. LC-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in leaves, pulp and seed from *Eugenia calycina* Cambess. *Food Research International*. 2020;137:109556.
11. Choudhury F, Pandey P, Meitei R, Cardona D, Gujar A, Shulaev V. GC-MS/MS profiling of plant metabolites. In Shulaev, V. (eds) *Plant Metabolic Engineering. Methods in Molecular Biology*, vol 2396. Humana, New York:2022, 101-115.
12. Klopsch R, Baldermann S, Voss A, Rohn S, Schreiner M, Neugart S. Narrow-Banded UVB affects the stability of secondary plant metabolites in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) and pea (*Pisum sativum*) leaves being added to lentil flour fortified bread: A novel approach for producing functional foods. *Foods*.2019;8 (10):427.
13. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2006;97 (4):654-660.
14. Thepthanee C, Liu C-C, Yu H-S, Huang H-S, Yen C-H, Li Y-H, Lee M-R, Liaw E-T. Antioxidant activity and inhibitory effects of black rice leaf on the proliferation of human carcinoma cells. *BioMed Research International*. 2022;2022:1-17.
15. Mobeen S, Riazunnisa K. Data on GC-MS analysis, in vitro anti-oxidant and antimicrobial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. Data in Brief. 2020;29:105258.
16. Bocco R, Gandonou C, Gbaguidi F, Coffi A. Phytochemical screening and quantitative variation of some secondary metabolites in five cultivated rice varieties. *Journal of Applied Biosciences*.2017;113:11146-11157.
17. Zainal A, Salleh N, Wan Ahmad WAN, Rasudin S, Zaabar W, Ghafar N. Antioxidant properties and antimicrobial effect of zingiber officinale extract towards *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022;1102:012049.
18. Jafari Sales A, Nasiri R, Mahmoudi S. In-vitro antibacterial effects of methanolic extract of peppermint (*Mentha Piperita Lamiaceae*) on standard *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Jorjani Biomedicine Journal*. 2019;7:4-10.

19. Elghaffar RYA, Amin BH, Hashem AH, Sehim AE. Promising Endophytic *Alternaria alternata* from Leaves of *Ziziphus spinachristi*: Phytochemical Analyses, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022;194 (9):3984-4001.
20. Alonso A-M, Reyes-Maldonado OK, Puebla-Pérez AM, Arreola MP, Velasco-Ramírez SF, Zúñiga-Mayo V, Sánchez-Fernández RE, Delgado-Saucedo J-I, Velázquez-Juárez G. GC/MS analysis, antioxidant activity, and antimicrobial effect of *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae). *Molecules*. 2022; 27:3436.
21. Toh SC, Lihan S, Bunya S, Leong S. *In vitro* antimicrobial efficacy of *Cassia alata* (Linn.) leaves, stem, and root extracts against cellulitis causative agent *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2023;23.
22. Mishra V, Tomar S, Yadav P, Vishwakarma S, Singh M. Elemental analysis, phytochemical screening and evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer activity of *Pleurotus ostreatus* through *In Vitro* and *In Silico* approaches. *Metabolites*. 2022;12:821.
23. Thakur M, Singh K, Khedkar R. 11 - Phytochemicals: Extraction process, safety assessment, toxicological evaluations, and regulatory issues. In *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*, Prakash, B, Ed.; Academic Press: 2020, 341-361.