

Analysis of Antioxidant Activity of Three Rice Varieties

Ali Maleki¹,
Mohamad Taghi Karbalaii²,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh³

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Amol, Iran

³ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 12, 2018 Accepted October 31, 2018)

Abstract

Background and purpose: Rice (*Oryzasativa* L.) is one the most important staple food in the world. There is an increasing interest for pigmented varieties, due to their antioxidant properties. In this research, the antioxidant activities in different parts of three varieties of rice were studied.

Materials and methods: White rice, brown rice, husk, and bran of Fajr, Hashemi and KB13 were extracted by maceration method using methanol as a solvent. Antioxidant capacity was assessed by three different methods. The total phenolic and flavonoid contents were also determined. Ferulic acid and p-coumaric acid were detected by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Results: KB13 rice bran showed the highest amount of total phenolics (319.83 ± 15.21 mgGAE) and flavonoid contents (77.58 ± 3.8 mgQE). The Hashemi crude bran extract was significantly different from other extracts in DPPH radical scavenging activity ($P < 0.001$). The barn of three rice varieties showed the highest activity in nitric oxide radical scavenging activity ($P < 0.001$). The bran of Hashemi and KB13 showed the highest amount of ferulic acid (26.21 mg/g extract) and p-Coumaric acid (3.66 mg.g extract), respectively.

Conclusion: The Iranian Fajr, Hashemi and KB13 rice varieties were found to have significantly higher antioxidant activities and total phenolic and flavonoid contents compared with other foreign samples reviewed.

Keywords: antioxidant, phenol, flavonoids, rice, bran, ferulic acid, coumaric acid

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (167): 71-82 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: zadeh20@gmail.com)

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی در سه رقم برنج

علی کربلایی آقاملکی^۱
محمد تقی کربلایی آقاملکی^۲
محمدعلی ابراهیمزاده^۳

چکیده

سابقه و هدف: برنج یکی از منابع غذایی مهم در دنیا می باشد. امروزه توجه به واسطه خواص آنتی اکسیدانی به ارقام رنگی برنج معطوف شده است. در این مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی در بخش های مختلف سه گونه برنج مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: عصاره گیری از برنج سفید، برنج قهوه ای، سبوس نرم و سبوس خام سه رقم برنج فجر، هاشمی و KB13 با روش ماسیراسیون، با کمک متانول انجام شد. محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی اکسیدانی با سه روش ارزیابی شد. میزان فرولیک اسید و پارا کوماریک اسید با کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا تعیین گردید.

یافته ها: عصاره سبوس خام برنج KB13 با $319/83 \pm 15/2$ mgGAE و $77/58 \pm 3/8$ mgQE در گرم عصاره بالاترین مقدار فنل و فلاونوئید تام را از خود نشان داد. درصد به دام اندازی رادیکال DPPH توسط عصاره های سبوس خام برنج های مختلف از بقیه اجزای برنج به طور معنی داری بالاتر بود. بیش ترین میزان مربوط سبوس خام هاشمی بود. درصد به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره های سبوس خام برنج های مختلف از بقیه اجزای برنج به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0/001$). نتایج HPLC نشان داد که سبوس خام هاشمی بیش ترین مقدار فرولیک اسید (۲۶/۲۱) و سبوس خام KB13 بیش ترین مقدار پارا-کوماریک اسید را با مقدار $3/66$ mg/g extract دارا می باشند.

استنتاج: رقم های فجر، هاشمی و KB13 از ایران به طور قابل ملاحظه ای دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی بالاتری نسبت به نمونه های خارجی مرور شده در این بررسی دارد.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، ترکیبات فنلی، فلاونوئید، برنج، سبوس، فرولیک اسید، کوماریک اسید.

مقدمه

رادیکال های آزاد در واکنش های بیولوژیک مهمی شرکت دارند اما تنها زمانی مفید هستند که در زمان و مکان درستی تولید شوند، در غیر این صورت می توانند مضر باشند، چون بسیار فعال بوده و به مولکول های نزدیک به خود حمله می کنند. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که از اثر این رادیکال ها جلوگیری می کنند. گیاهان منبع

بسیاری از بیماری های مزمن مرتبط با افزایش سن می باشند که این امر می تواند در اثر استرس اکسیداتیو باشد. این فرآیند ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد یا ضعف سیستم دفاعی می باشد. از جمله این بیماری ها می توان به تصلب شرائین، سکته مغزی، بیماری های عصبی و بیماری التهابی مزمن اشاره نمود (۱).

مؤلف مسئول: محمدعلی ابراهیمزاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

E-mail: zadeh20@gmail.com

۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، موسسه تحقیقات برنج کشور، آمل، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۳/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۹

که برخی مطالعات بر روی دانه‌ی کامل برنج و برنج قهوه‌ای (۷)، برخی بر روی سبوس (۸) و برخی تنها بر روی قسمت آندوسپرم مطالعه انجام داده‌اند (۹). مهم‌ترین گروه فیتو کیمیکال یافت شده در دانه‌های کامل فنول‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین E، لینگان‌ها و اینولین‌ها هستند (۱۰). در مجموع عمده مطالعات انجام شده روی فنولیک اسید بوده و مطالعات کمی بر روی فلاونوئید برنج و قسمت‌های سبوس، هاسک و جنین برنج و برنج‌ها با رنگ‌های متفاوت انجام شده است. اثرات آنتی‌توموری (۱۱) و اثرات ضد التهابی (۱۲) سبوس برنج سیاه گزارش شده است. این تحقیق به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دوازده نمونه (۳ رقم برنج سفید و قهوه‌ای فجر، هاشمی و KB13 و سبوس‌های خام و نرم هر کدام)، طراحی و اجرا شده است. در نهایت نمونه‌ها بر مبنای دو اسید فنولیک (فرولیک اسید و پاراکوماریک اسید) با HPLC تعیین مقدار شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برنج: ارقام و لاین‌های برنج تولید شده در موسسه تحقیقات برنج مازندران-آمل توسط دکتر کر بلائی آقاملکی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور عصاره‌گیری از متانول استفاده شد. روش انتخابی برای عصاره‌گیری، خیساندن بود. در این روش، ابتدا ۱۵۰ گرم از دانه‌ها و سبوس برنج با ۴۰۰ میلی‌لیتر از متانول مخلوط شد. مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی جدا و مجدداً متانول جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار شد. در روز سوم، مجموعه حلال‌ها توسط دستگاه روتاری (تبخیرکننده چرخان) حذف گردید. مجموعه به منظور حذف کامل آب و تهیه پودر، توسط فریز درایر خشک گردید.

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای ترکیبات فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد (۱۳). غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از هر

خوبی برای کشف آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. ترکیبات فنلی (از جمله فلاونوئیدها) موجود در گیاهان اثرات پذیرفته شده‌ای در این خصوص دارند (۲). غلات بیش از ۶۰ درصد تولیدات کشاورزی جهان را به خود اختصاص می‌دهند. بیش از ۹۰ درصد برنج جهان در آسیا کشت و مصرف می‌گردد. برنج (*Oryza sativa*) از خانواده Poaceae پس از گندم، دومین غله پرمصرف در جهان و از مهم‌ترین غلات و اقلام غذایی جهان است. نیمی از جمعیت جهان، به برنج به عنوان یک غذای اصلی وابسته هستند. برنج تامین‌کننده و منبع اصلی پروتئین در قاره آسیا می‌باشد (۳). مبدا اصلی برنج اهلی هنوز به‌طور قطعی مشخص نیست، ولی ارقام وحشی آن امروزه در آسیا و آفریقا به‌طور فراوان وجود دارند. به نظر می‌رسد برنج به‌طور مستقل در کشورهای چین، هند و اندونزی اهلی شده و به این ترتیب دو نژاد برنج به‌طور مستقل به وجود آمده‌اند که عبارتند از برنج‌های ایندیکا *O. sativa indica* و ژاپونیکا *O. sativa japonica* (۴). از تاریخ مصرف برنج در ایران حداقل ۲۵۰۰ سال می‌گذرد. موطن اصلی برنج سرزمین چین بوده و از آنجا به هندوستان و سپس به ایران آورده شده است. ده‌ها هزار نوع برنج در جهان وجود دارد که در همین دو زیرگونه جای می‌گیرند (۵). دانه‌های برنج پوسته سختی به نام husk دارد که در درون خود از هسته نگه‌داری می‌کند. پس از حذف پوسته، محصول باقی مانده برنج قهوه‌ای است. پس از حذف سبوس و جنین، آندوسپرم باقی مانده به عنوان برنج جلا داده شناخته می‌شود که به‌طور سنتی از همین برنج برای مصرف خوراکی استفاده می‌شود. با این حال بخش سبوس برنج که حذف می‌شود، حاوی مقادیر فراوان فیبر، فیتو کیمیکال‌های زیستی از جمله توکوفرول‌ها، توکو ترینول‌ها، اریزانول‌ها، فیبرهای رژیمی، ویتامین‌ها و ترکیبات فنلی هستند که برای سلامت و تندرستی انسان‌ها بسیار مفیدند (۶). ترکیبات شیمیایی به فرم‌های آزاد و متصل در قسمت‌های آندوسپرم، سبوس و جنین دانه کامل برنج توزیع شده‌اند

ت و BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC₅₀ به معنی غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاکسازی شوند، برای عصاره‌ها تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

A_B = جذب بلانک، A_S = جذب نمونه یا استاندارد (۱۵، ۱۴).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

غلظت‌های ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۵ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید [K₃Fe(CN)₆] مخلوط شد. در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار دادند. پس از اتمام این مرحله ۰/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلراید (FeCl₃) به آن اضافه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار شد (۱۴، ۱۵).

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید

به این منظور سدیم نیترو پروساید (۱۰ میلی‌مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره که جداگانه در آب حل شده بودند مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همان مخلوط واکنش بدون عصاره مورد (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک به کار گرفته شد. بعد از سپری

عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد و سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵ درصد) اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان شد، به این صورت که میانگین جذب حاصل در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد (۱۳). میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی ارزیابی شد (۱۳). غلظت ۰/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر هم به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی - ماوراءبنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش شد (۱۳).

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

برای انجام این آزمایش از رادیکال‌های پایدار DPPH استفاده شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول قرائت شد. ویتامین

به کار رفت. نتایج با احتمال $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت های مربوطه به دست آمد.

یافته ها

بخش های سبوس خام، سبوس نرم، برنج سفید و برنج قهوه ای ۳ رقم برنج فجر، هاشمی و KB13 در حالت ماده اولیه و پس از عصاره گیری توزین شدند و درصد بازده هر کدام اندازه گیری شد که در جدول شماره ۱ آمده است. به طور کل سبوس نرم گونه های مختلف برنج بیش ترین درصد بازده تولید عصاره و برنج سفید گونه های مختلف کم ترین میزان بازده را داشتند.

تعیین مقدار فنول و فلاونوئید

با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید، محتوای تام فنولی و با استفاده از منحنی استاندارد، کوئرستین محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره های برنج به دست آمد. نتایج حاصله از محتوای تام فنولی و محتوای تام فلاونوئیدی از بخش های ارقام برنج در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱: محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره های متانولی رقم های مختلف برنج

عصاره	بازده به درصد	معادل میلی گرم اکی والان گالیک اسید در گرم عصاره	معادل میلی گرم اکی والان کوئرستین در گرم عصاره
سبوس خام فجر	۱/۵	۲۵۳/۸۸ ± ۱۳/۳	۶۲/۳۴ ± ۱/۵
سبوس خام هاشمی	۱/۴۱	۲۷۶/۷۲ ± ۱۰/۸	۴۳/۵۹ ± ۰/۷
سبوس خام KB13	۲/۲۸	۳۱۹/۸۳ ± ۱۵/۳***	۷۷/۵۸ ± ۳/۸***
سبوس نرم فجر	۳/۷۳	۱۱۴/۵۷ ± ۸/۶	۷/۶۶ ± ۰/۶
سبوس نرم هاشمی	۹/۸۱	۱۰۸/۱۹ ± ۱۱/۹	۲۳/۲۸ ± ۰/۶
سبوس نرم KB13	۷/۰۱	۱۴۱/۸۱ ± ۱۰/۲	۲۴/۰۶ ± ۱/۹
برنج سفید فجر	۱/۱۴	۱۵۰/۰۰ ± ۱۲/۰	۷/۲۶ ± ۰/۸
برنج سفید هاشمی	۰/۵۸	۱۱۶/۳۸ ± ۷/۱	۸/۰۵ ± ۰/۷
برنج سفید KB13	۰/۳۲	۱۷۴/۱۴ ± ۱۶/۶	۵/۷۰ ± ۱/۰
برنج قهوه ای فجر	۱/۰۶	۱۳۲/۷۶ ± ۹/۴	۶/۰۹ ± ۱/۱
برنج قهوه ای هاشمی	۰/۹۴	۱۱۶/۳۸ ± ۸/۷	۹/۶۱ ± ۰/۴
برنج قهوه ای KB13	۱/۱۳	۱۶۶/۸۱ ± ۱۴/۲	۱۴/۶۹ ± ۲/۳

*** $p < 0.001$

عصاره حاصل از سبوس خام برنج KB13 با $319/83 \pm 15/2$ میلی گرم اکی والان گالیک اسید و $77/58 \pm 3/8$ میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره

شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر واکنشگر گریس (شامل سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱ درصد در اسید فسفریک ۲ درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانومتر در مقابل بلانک (آب) قرائت شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و میانگین آن ها گزارش شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام اندازی هم طبق فرمول زیر محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره ها بیان شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B} \right) \times 100$$

A_B = جذب بلانک، A_S = جذب نمونه یا استاندارد (۱۶).

طریقه تهیه فاز متحرک در HPLC

فاز متحرک شامل حلال A (آب ۹۱ درصد - استیک اسید ۹ درصد) و حلال B استونیتیل

طریقه آماده سازی نمونه برای تزریق به HPLC

ابتدا محلول متانولی از هر عصاره (۵ میلی گرم عصاره بر ۱۰ میلی لیتر متانول، ۵۰۰ ppm) تهیه شد و پس از عبور از فیلتر میلی پور ۰/۲ میکرون (میکرومتر)، به دستگاه تزریق شد.

روش آنالیز

عمل جداسازی با استفاده از فاز متحرک، در طول موج ۳۲۰ nm با سرعت جریان ۰/۸۵ میلی متر بر دقیقه صورت پذیرفت. برنامه ریزی ترکیب درصد حلال بدین صورت بود که تا دقیقه ۱۵ از ۹۵ درصد حلال A و ۵ درصد حلال B و از دقیقه ۱۵ تا ۳۰ از ۸۵ درصد A و ۱۵ درصد B استفاده شد (۱۷).

آنالیز آماری

تمامی اندازه گیری ها ۳ بار تکرار شده و کلیه اطلاعات به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) برای مقایسه میانگین ها

میزان به دام اندازه‌ی رادیکال نیتریک اکساید نتیجه حاصله از اندازه‌گیری فعالیت رادیکال آزاد نیتریک اکساید در عصاره‌های یاد شده در جدول شماره ۳ آمده است. میزان درصد به دام اندازه‌ی رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره‌های سبوس خام برنج‌های مختلف از بقیه اجزای برنج به طور معنی‌داری بالاتر بود. در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین میزان فعالیت مربوط به سبوس خام KB13 و سبوس خام هاشمی بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$) اما به طور معنی‌داری با فعالیت سایر عصاره‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.001$). فعالیت عصاره برنج قهوه‌ای فجر و برنج قهوه‌ای KB13 از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$) اما از فعالیت سایر عصاره‌های برنج‌ها بالاتر بود ($p < 0.001$). در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین میزان مربوط به سبوس خام KB13 بود، اما اختلاف آن با سبوس خام فجر، سبوس خام هاشمی، عصاره برنج قهوه‌ای فجر و KB13 از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). فعالیت این ۵ عصاره به‌طور قابل ملاحظه‌ای از سایر عصاره‌ها بالاتر بود ($p < 0.001$).

میزان قدرت احیاکنندگی

نتیجه حاصله از تست میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌های ارقام برنج در نمودار شماره ۱ آمده است. در

بالاترین مقدار فنل فلانونوئید تام را از خود نشان داد. این میزان از نظر آماری با تمامی مقادیر تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.001$).

میزان به دام اندازه‌ی رادیکال DPPH

نتیجه حاصله از اندازه‌گیری فعالیت رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های برنج در جدول شماره ۲ آمده است. میزان درصد به دام اندازه‌ی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های سبوس خام برنج‌های مختلف عموماً از بقیه اجزای برنج به طور معنی‌داری بالاتر بود. در غلظت ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین میزان مربوط به سبوس خام هاشمی بود. درصد مهار در این عصاره مانند سبوس خام فجر و سبوس خام KB13 بود و از نظر آماری اختلافی بین این عصاره‌ها وجود نداشت ($p > 0.05$)، اما به طور قابل ملاحظه‌ای از سایر عصاره‌ها بالاتر بود ($p < 0.001$). فعالیت عصاره برنج قهوه‌ای فجر به طور معنی‌داری از سایر برنج‌ها بالاتر بود ($p < 0.001$). در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین میزان مربوط به سبوس خام هاشمی بود. درصد مهار در این عصاره مانند سبوس خام فجر و سبوس خام KB13 و برنج قهوه‌ای KB13 بود و از نظر آماری اختلافی بین این عصاره‌ها وجود نداشت ($p > 0.05$) اما به طور قابل ملاحظه‌ای از سایر عصاره‌ها بالاتر بود ($p < 0.001$).

جدول شماره ۲: میزان درصد به دام اندازه‌ی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های متانولی انواع برنج در غلظت‌های مختلف

عصاره	غلظت (µn/ml)				
	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰
سبوس خام فجر	۶۸/۸۰ ± ۳/۲***	۴۶/۸۸ ± ۲/۶***	۲۵/۳۱ ± ۳/۹***	۱۲/۸۳ ± ۰/۲	۸/۲۰ ± ۰/۱
سبوس خام هاشمی	۷۱/۲۰ ± ۳/۸***	۴۹/۳۸ ± ۴/۸***	۳۰/۳۰ ± ۴/۵***	۱۸/۳۶ ± ۱/۲***	۱۱/۰۵ ± ۰/۴***
سبوس خام KB13	۶۵/۹۵ ± ۴/۱***	۴۴/۵۶ ± ۵/۰***	۲۴/۶۰ ± ۲/۸***	۱۲/۶۶ ± ۰/۹	۷/۸۴ ± ۰/۳
سبوس نرم فجر	۴۷/۷۷ ± ۱/۹	۲۴/۹۶ ± ۱/۳	۱۲/۸۳ ± ۰/۵	۶/۲۴ ± ۱/۰	۳/۹۲ ± ۰/۱
سبوس نرم هاشمی	۴۹/۰۲ ± ۲/۳	۲۷/۹۹ ± ۲/۱	۱۴/۲۶ ± ۱/۳	۶/۹۵ ± ۰/۶	۴/۶۳ ± ۰/۲
سبوس نرم KB13	۲۴/۹۶ ± ۳/۶	۱۱/۲۳ ± ۲/۰	۵/۵۲ ± ۰/۶	۳/۳۹ ± ۰/۲	۱/۹۶ ± ۰/۱
برنج سفید فجر	۳۰/۶۶ ± ۱/۸	۱۹/۲۵ ± ۱/۱	۱۱/۵۹ ± ۱/۴	۸/۲۰ ± ۰/۱	۶/۴۲ ± ۰/۵
برنج سفید هاشمی	۲۸/۵۲ ± ۰/۹	۱۸/۰۰ ± ۰/۷	۱۱/۰۵ ± ۰/۷	۶/۷۷ ± ۰/۳	۳/۵۶ ± ۰/۱
برنج سفید KB13	۳۷/۷۹ ± ۲/۵	۲۱/۹۲ ± ۳/۳	۱۵/۵۰ ± ۱/۰	۷/۱۳ ± ۰/۲	۵/۱۷ ± ۰/۳
برنج قهوه‌ای فجر	۴۵/۶۳ ± ۲/۰	۲۵/۱۳ ± ۲/۰	۱۳/۹۰ ± ۲/۳	۹/۹۸ ± ۰/۵	۴/۹۹ ± ۰/۱
برنج قهوه‌ای هاشمی	۳۲/۶۲ ± ۱/۴	۱۹/۹۶ ± ۰/۵	۱۲/۱۲ ± ۱/۲	۹/۸۰ ± ۰/۴	۷/۱۳ ± ۰/۵
برنج قهوه‌ای KB13	۴۶/۷۰ ± ۱/۰	۲۸/۳۴ ± ۳/۲	۲۳/۷۱ ± ۲/۷***	۱۰/۷۰ ± ۱/۱	۶/۲۴ ± ۰/۱

$p < 0.001$ ***

فرولیک اسید و پاراکوماریک اسید تعیین مقدار شده‌اند. در این بررسی، سبوس خام هاشمی بیشترین مقدار فرولیک اسید را با مقدار ۲۶/۲۱ mg/g extract و سبوس خام KB13 بیشترین مقدار پارا-کوماریک اسید را با مقدار ۳/۶۶ mg/g extract دارا بودند.

جدول شماره ۴: میزان فرولیک اسید و پارا-کوماریک اسید در

عصاره های برنج

عصاره	مقدار پارا-کوماریک اسید (mg/g extract)	مقدار فرولیک اسید (mg/g extract)
سبوس خام فجر	۲/۵۷	۲/۲۸
سبوس خام هاشمی	۱/۱۰	۲۶/۲۱
سبوس خام KB13	۳/۶۶	۲/۶۲
سبوس نرم فجر	۰/۳۰	۰/۸۲
سبوس نرم هاشمی	۰/۱۹	۰/۱۹
سبوس نرم KB13	۰/۲۳	۰/۷۳
برنج سفید فجر	۰/۸۰	۰/۲۳
برنج سفید هاشمی	۰/۵۵	۰/۸۱
برنج سفید KB13	۰/۲۱	۰/۱۴
برنج قهوه ای فجر	۰/۴۳	۰/۱۴
برنج قهوه ای هاشمی	۰/۱۸	۰/۴۸
برنج قهوه ای KB13	۰/۳۸	۰/۴۴

بحث

ترکیبات فنولی متابولیت‌های ثانویه ای هستند که تقریباً در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از پروسه‌های فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، جوانه زنی دانه و رسیدن میوه نقش دارند. از خصوصیات مهم این ترکیبات، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده که به آن‌ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد (۱۷، ۱۶). پلی‌فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق از خود نشان می‌دهند (۱۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد (۱۹). در تست تعیین مقدار فنول در مطالعه حاضر نتیجه بین ۱۰۸/۱۹ الی ۳۱۹/۸۳ mg GAE/g بود که سبوس برنج KB13 با بیشترین مقدار و سبوس نرم هاشمی کمترین مقدار را در بین ۱۲ نمونه داشتند. در مطالعات مشابه از کالیفرنیا، از برنج سفید مقدار فنول ۲۱۰/۱، برنج قرمز و سیاه

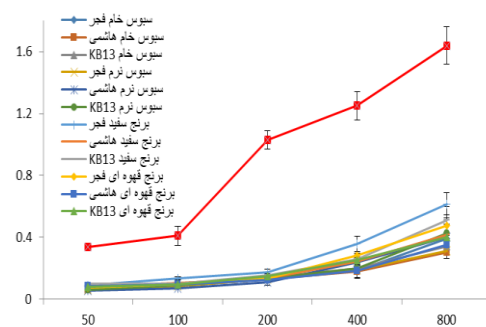
تست احیاکنندگی، در غلظت ۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر اختلاف معنی داری بین عصاره‌های برنج وجود نداشت ($p > 0/05$). عصاره مربوط به برنج سفید فجر در تمامی غلظت‌های ۱۰۰ تا ۸۰۰ میکرو لیتر بر میلی لیتر بالاترین فعالیت را از خود نشان داد که از نظر آماری از تمامی عصاره‌های برنج دیگر قوی تر بود ($p < 0/001$)، گرچه این اثر به مراتب از ویتامین ث ضعیف تر بود ($p < 0/001$). عصاره مربوط به تمامی سبوس‌ها اثر ضعیفی از خود نشان دادند. از نظر آماری تفاوتی بین فعالیت عصاره‌های سبوس‌های مختلف به دست نیامد ($p > 0/05$).

جدول شماره ۳: میزان به دام اندازی نیتریک اکساید توسط

عصاره‌های متانولی انواع برنج در غلظت‌های مختلف

عصاره	غلظت (µn/ml)		
	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰
سبوس خام فجر	۱۷/۲۹ ± ۲/۳	۱۵/۸۵ ± ۱/۳	۱۴/۷۸ ± ۰/۷
سبوس خام هاشمی	۱۸/۶۲ ± ۱/۸	۱۶/۲۳ ± ۱/۵	۱۳/۸۷ ± ۰/۹
سبوس خام KB13	۱۹/۳۸ ± ۱/۳ ^{ns}	۱۹/۳۲ ± ۱/۳ ^{ns}	۱۹/۲۶ ± ۱/۳ ^{***}
سبوس نرم فجر	۴/۲۷ ± ۰/۲	۴/۲۲ ± ۰/۷	۳/۷۱ ± ۰/۴
سبوس نرم هاشمی	۷/۹۱ ± ۰/۵	۷/۵۷ ± ۰/۶	۷/۰۹ ± ۰/۲
سبوس نرم KB13	۲/۶۴ ± ۰/۲	۲/۴۷ ± ۰/۱	۲/۱۶ ± ۰/۱
برنج سفید فجر	۰/۹۳ ± ۰/۱	۰/۷۷ ± ۰/۴	۰/۶۲ ± ۰/۲
برنج سفید هاشمی	۸/۸۴ ± ۰/۴	۶/۳۴ ± ۰/۳	۴/۳۱ ± ۰/۱
برنج سفید KB13	۹/۹۲ ± ۱/۷	۸/۶۶ ± ۰/۱	۶/۴۷ ± ۰/۱
برنج قهوه ای فجر	۱۶/۵۹ ± ۰/۵	۱۳/۱۴ ± ۰/۶	۱۰/۰۲ ± ۰/۳
برنج قهوه ای هاشمی	۱/۶۰ ± ۰/۱	۱/۵۶ ± ۰/۳	۱/۵۴ ± ۰/۴
برنج قهوه ای KB13	۱۶/۲۸ ± ۱/۳	۱۱/۹۰ ± ۰/۷	۷/۸۶ ± ۰/۵

$p > 0/05$: ns, $p < 0/001$: ***



نمودار شماره ۱: مقایسه قدرت احیاکنندگی تمامی عصاره‌ها با ویتامین ث (که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت)

نتایج HPLC

نتایج حاصله از تست HPLC در عصاره‌های برنج در جدول شماره ۴ آمده است که در آن دو اسید فنولیک،

آروماتیک ۱۵۲/۶ و ۳۲۸/۹ و در برنج سیاه هنگ کنگی ۳۱۸/۳ mg GAE/g گزارش شده است (۲۰). نتایج حاصل از ۷ رقم برنج از چین نشان داد که مقدار فنولیک اسید برای برنج سفید، قرمز و سیاه به طور میانگین در هر یک به ترتیب ۲/۴۰۳-۲/۵۳۰-۲/۸۳۰ mg GAE/g بوده و تمامی موارد سبوس خام بیش‌ترین مقدار فنولیک اسید را دارا بود (۲۱). در مقاله‌ای از ۳ رقم برنج قرمز، سیاه و سفید از ایتالیا، مقدار فنل نام را به ترتیب ۳۶۰/۹۳، ۴۴۵/۴۶ و ۴۱۲/۵۴ mg GAE/g گزارش شده است (۲۲). در نمونه‌ای دیگر از چین، مقدار فنل در سبوس برنج ۳۴/۳۲ در برنج سفید ۱/۰۵ و در برنج قهوه‌ای ۶/۴۳ mg GAE/g of DW گزارش شده است (۲۳). در ۲ گونه برنج قرمز و سیاه تهیه شده از برزیل، مقدار فنول برای اجزای مختلف برنج سیاه را بین ۱/۶۰ تا ۱۳/۷۰ و برای اجزای مختلف قرمز ۰/۳۵ تا ۱۳/۱۰ mg GAE/g of DW گزارش شده است (۲۴). میزان فنل برای ارقام برنج سفید، قرمز، سیاه و سبز از ژاپن، به ترتیب ۱/۲۴، ۷/۲۵، ۶/۸۷ و ۱/۵۹ mg GAE/g به صورت میانگین گزارش شده است (۲۵). قاسم زاده و همکاران ۱۶ رقم برنج (از برنج سفید، قرمز و سیاه) را از مالزی تهیه کردند. در این مقاله مقدار فنول بین ۲/۶۹ تا ۱۲/۱۴ mg GAE/g گزارش شده که بیش‌ترین مقدار مربوط به سبوس برنج سیاه و کم‌ترین مقدار مربوط به سبوس برنج سفید بود (۲۶). از سبوس ۲ رقم برنج سازندگی و زاینده رود که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شده بود، مقدار فنول ۴۰/۳۴ برای سبوس رقم سازندگی و ۲۶/۵۱ ppm GAE/g برای سبوس رقم زاینده رود گزارش شده است (۲۷). فلاونوئیدها نیز به‌طور گسترده در سلسله گیاهان توزیع داشته و تقریباً نیمی از حدود ۸۰۰۰ فنول‌های شناسایی شده را تشکیل می‌دهند (۲۸). فلاونوئیدها ترکیباتی هستند که مسئول ایجاد رنگ در گل‌ها و میوه‌ها هستند. به عنوان محصولات متابولیسم ثانویه در گیاهان، این ترکیبات به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع داروئی

و غذایی مورد توجه هستند (۲۹). مکانسیم عمل فلاونوئیدها به دام اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون‌ها می‌باشد (۳۰). فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری کننده در پیشرفت سرطان و بیماری‌های قلبی شناخته شدند (۳۱،۳۰).

در مطالعه حاضر مقدار فلاونوئید ۵/۷۰ الی ۷۷/۵۸ mg QE/g برای تمامی عصاره‌های مورد استفاده گزارش شد که سبوس خام برنج KB13 بیش‌ترین مقدار و برنج سفید KB13 کم‌ترین مقدار را داشتند. در تحقیقی که در ایتالیا انجام شد، مقدار فلاونوئید برای رقم سیاه ۱۵۶ و برای رقم قرمز ۱۸/۱ μg QE/g گزارش شد (۲۲). در گزارشی از چین مقدار فلاونوئید را ۳/۹۱ mg CAE/g گزارش کردند (۳۲). بر اساس گزارشی از برزیل مقدار فلاونوئید ۰/۴۹ mg QE/g بود (۳۳). بر اساس گزارشی از ایران، مقدار فلاونوئید بین ۰/۴۰ تا ۸/۲۳ mg QE/g گزارش شد که بیش‌ترین مقدار مربوط به سبوس برنج سیاه و کم‌ترین مربوط به سبوس برنج سفید بود (۲۶). مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به‌طور گسترده برای ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تست، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها به صورت کاهش یا ناپدید شدن رنگ ارغوانی به رنگ زرد بیان می‌شود. این واکنش به سرعت انجام می‌شود (۱۹).

در مطالعه حاضر، میزان درصد به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH بین ۲۴/۹۶ الی ۷۱/۳۰ در بالاترین غلظت نمونه‌های عصاره‌های برنج گزارش شد. در تحقیقی که در کالیفرنیا آمریکا انجام شد، مقدار EC₅₀ فعالیت رهاسازی رادیکال آزاد DPPH در ارقام سیاه بین ۰/۱۰-۰/۲۲ در رقم قرمز ۰/۳۲ و در رقم سفید برنج ۰/۵۷ mg/ml گزارش شده است (۲۰). در نمونه‌های چینی این مقدار را ۲۲/۷ μmole TE/g (۳۲) و در تحقیقی دیگر بین ۰/۰۵-۵/۶۹ μm TE/g گزارش شده که بیش‌ترین مقدار مربوط به برنج سیاه و کم‌ترین مقدار مربوط

به برنج سفید بود (۳۴). در گزارشی از برزیل برای رقم سیاه برنج بین ۷/۴۲ الی ۸۱/۰۴ و برای قرمز ۲/۶۴ الی ۸۹/۴۸ $\mu\text{Mol TE/g of DW}$ گزارش شد (۳۲). در نمونه‌های چینی نتیجه تست برای رقم سفید ۶/۳-۱۶/۷، برای قرمز ۱۶۹/۹۶-۱۰۳۵/۱ و برای سیاه ۱۰۴/۶-۲۵۶/۷ $\mu\text{mol TE/100g}$ گزارش شد (۳۵). در تحقیقی که در ایران انجام شد، نتیجه تست را به صورت درصد اعلام کردند که نتیجه بین ۱۰/۷-۷۶/۱ درصد اعلام شد و بیشترین درصد مربوط به سبوس سیاه و کمترین درصد مربوط به برنج سفید بود (۲۶).

در گزارشی دیگر از ایران، نتیجه تست DPPH را با میزان IC_{50} ۲۸/۶۵ برای سبوس رقم سازندگی و ۲۹/۵ mg/ml برای سبوس رقم زاینده رود بیان کرده‌اند (۲۷). قدرت احیاکنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می‌رود (۳۰). در حالت کلی، حضور عوامل احیاکننده نقش اساسی در خاصیت احیاکنندگی ایفا می‌کند. این ترکیبات فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند. چنانچه ترکیبی دارای این ویژگی‌ها باشد، می‌تواند باعث کاهش میزان ترکیبات حد واسط اکسیده ساخته شده طی مراحل لیپید پراکسیداسیون شود. سنجش احیاکنندگی نمونه، ناشی از احیا آهن III به آهن II با اهداء الکترون می‌باشد. میزان کمپکس آهن با اندازه‌گیری میزان تشکیل آبی پروس در طول موج ۷۰۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۳۰).

در مطالعه حاضر سبوس خام فجر، بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی را در بین تمامی نمونه‌ها داشت. در گزارشی تست احیاکنندگی بر روی نمونه‌ی برنج سیاه انجام شد که نتیجه آن $1/38 \text{ mmole Fe/100g}$ بود (۳۲). در تحقیقی از چین، تست احیاکنندگی را بر روی عصاره‌های به دست آمده از حلال‌های متفاوت انجام شد که نتیجه ۰/۶۹ برای اتیل استات، ۰/۲۸ برای n-بوتانول، ۰/۱۸ برای آب و ۰/۰۲ $\text{EC}_{50} (\mu\text{g/ml})$ برای کلروفورم و n- هگزان بود (۳۶).

نیتریک اکساید نقش مهمی در عملکرد طبیعی فیزیولوژیک دارد. اختلالاتی مانند سکتته، سردرد، التهاب و آلزایمر به واسطه عملکرد این ترکیب رخ می‌دهد (۳۰). در سیستم عصبی، نیتریک اکساید به عنوان میانجی در یادگیری و حافظه نقش دارد (۳۷). تولید بیش از حد آن می‌تواند ایجاد استرس اکسیداتیو کند که منجر به تخریب DNA، تغییر عملکرد پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (۳). از مهم‌ترین عوامل آنتی‌اکسیدان و به دام اندازنده، پلی فنول‌ها به خصوص فلاونوئیدها هستند (۳۸).

در مطالعه حاضر، میزان درصد به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید ۰/۹۳ الی ۱۹/۳۸ در بالاترین غلظت بود که بیشترین درصد مربوط به سبوس خام KB13 و کمترین درصد مربوط به برنج سفید فجر بود. در گزارشی، به دام اندازی رادیکال آزاد NO را بین ۴ الی ۷۸ درصد گزارش کرده که بیشترین مقدار مربوط به سبوس برنج سیاه بود و کمترین مقدار مربوط به سبوس برنج سفید بود (۲۶).

در چند مقاله نیز برخی ترکیبات فنلی در بخش‌های گیاه برنج با HPLC تعیین مقدار شده بود که نتایج آن‌ها به‌منظور مقایسه با نمونه‌های موجود در این تحقیق، آورده شده است. در مطالعه حاضر، ۰/۰۸ تا ۳/۶۶ mg/g extract برای پارا-کوماریک اسید و ۰/۱۹ تا ۲۶/۲۱ mg/g extract برای فرولیک اسید به دست آمد که سبوس خام KB13 بیشترین مقدار را برای پارا-کوماریک اسید و سبوس خام هاشمی بیشترین مقدار را برای فرولیک اسید را داشتند. بر اساس گزارشی از کالیفرنیا آمریکا، مقدار پارا-کوماریک اسید را در برنج سفید، ۴۲۰/۵ برای برنج قرمز ۲/۷۷ و ۲/۳۰ mg/g extract برای برنج سیاه گزارش کرده‌اند. در همین گزارش، مقدار فرولیک اسید در برنج سفید ۱۳/۱۴ mg/g extract ، ۱۱/۱۵ mg/g extract در برنج قرمز و ۱۶/۶۳ mg/g extract در برنج سیاه گزارش شده است (۲۰). در نمونه‌های ایتالیایی مقدار پاراکوماریک را برای برنج قرمز ۰/۶۵، برای برنج سیاه

سبوس برنج سفید ۱۷/۷۹، برای سبوس برنج قرمز ۲۳/۸۳ و برای سبوس برنج سیاه ۲۸/۰۴ mg/g extract گزارش شده است (۲۶).

در بین ۱۲ عصاره مورد بررسی، بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برنج و سبوس برنج رقم KB13 مشاهده شد. نتایج نشان داد که به طور کلی سبوس‌ها محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی بیش‌تری نسبت به برنج‌ها داشتند. رقم‌های ایرانی نسبت به نمونه‌های خارجی محتوای تام فنلی و فلاونوئید بالایی داشتند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه رقم تست شده بالا بود.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان‌نامه دوره دکتری حرفه‌ای آقای علی ملکی در دانشکده داروسازی ساری می‌باشد. بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد طرح ۱۸۲۶) و موسسه تحقیقات برنج کشور در آمل تشکر می‌گردد.

References

1. Nascimento-Souza MA, Paiva PG, Martino HSD, Ribeiro AQ. Dietary total antioxidant capacity as a tool in health outcomes in middle-aged and older adults: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58(6): 905-912.
2. Mozdastan Sh, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the impact of different extraction methods on antioxidant activities of myrtle (*Myrtus communis* L.). *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(127): 10-24 (Persian).
3. Yazdanpanah H, Rastegar H. Exposure assessment for some pesticides through rice consumption in IRAN using a multiresidue analysis by GC-MS (Winter 2018). *Iran J Pharm Res* 2018; 17(1):124-139 (Persian).
4. Silva F, Weisskopf A, Castillo C, Murphy C, Kingwell-Banham E, Qin L, et al. A tale of two rice varieties: Modelling the prehistoric dispersals of japonica and proto-indica rices. *The Holocene* 2018; 28(11): 0959683618788634.
5. Gross BL, Zhao Z. Archaeological and genetic insights into the origins of domesticated rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 2014; 111(17): 6190-6197.
6. Devi RR, Arumughan C. Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour Technol* 2007; 98(16): 3037-3043.
7. Tian S, Nakamura K, Kayahara H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *J Agric Food Chem* 2004; 52(15): 4808-4813.
8. Arab F, Alemzadeh I, Maghsoudi V. Determination of antioxidant component and

- activity of rice bran extract. *Scientia Iranica* 2011; 18(6):1402-1406.
9. Heinemann R, Fagundes P, Pinto E, Pentead M, Lanfer-Marquez U. Comparative study of nutrient composition of commercial brown, parboiled and milled rice from Brazil. *J Food Compos Anal* 2005; 18(4): 287-296.
 10. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A, Ashkani S. Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etlingera elatior* (Jack) RM Sm grown in different locations of Malaysia. *BMC Comp Alt Med* 2015; 15(1): 335.
 11. Pengkumsri N, Chaiyasut C, Saenjum C, Sirilun S, Peerajan S, Suwannalert P, (et al). Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. *Food Sci Technol* 2015; 35(2): 331-338.
 12. Moko E, Purnomo H, Kusnadi J, Ijong F. Phytochemical content and antioxidant properties of colored and non-colored varieties of rice bran from Minahasa, North Sulawesi, Indonesia. *Int Food Res J* 2014; 21(3): 1017-1023.
 13. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ehteshamnia A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, et al. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *J Med Plant Res* 2011; 5(7): 1128-1133.
 14. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of the bulb and aerial parts of *Ornithogalum sintenisii* L (Liliaceae) at flowering stage. *Trop J Pharm Res* 2010; 9(2): 141-148.
 15. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. *Pharmacologyonline* 2009; 2: 644-650.
 16. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami Sh. Antioxidant and free radical scavenging activities of culinary-medicinal mushrooms, golden chanterelle *Cantharellus cibarius* and angel's wings *Pleurotus porrigens*. *Int J Med Mushrooms* 2010; 12(3): 265-272.
 17. Khalili M, Ebrahimzadeh MA, Kosaryan M. In Vivo iron-chelating activity and phenolic profiles of the Angel's wings mushroom, *Pleurotus porrigens* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms* 2015; 17(9): 847-856.
 18. Falleh H, Ksouri R, Lucchessi ME, Abdely C, Magné C. Ultrasound-assisted extraction: effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Trop J Pharm Res* 2012; 11(2): 243-249.
 19. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Eslami B, Dehpour AA. Antioxidant and antihaemolytic activities of *Ferula foetida* regel (Umbelliferae). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15 (2): 157-164.
 20. Laokuldilok T, Shoemaker CF, Jongkaewwattana S, Tulyathan V. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans. *J Agric Food Chem* 2011; 59(1): 193-199.
 21. Pang Y, Ahmed S, Xu Y, Beta T, Zhu Z, Shao Y, Bao J. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. *Food Chem* 2018; 240: 212-221.
 22. Zaupa M, Calani L, Del Rio D, Brighenti F, Pellegrini N. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. *Food Chem* 2015; 187: 338-347.

23. Ti H, Zhang R, Zhang M, Wei Z, Chi J, Deng Y, et al. Effect of extrusion on phytochemical profiles in milled fractions of black rice. *Food Chem* 2015; 178: 186-194.
24. Paiva FF, Vanier NL, Berrios JD, Pinto VZ, Wood D, Williams T, et al. Polishing and parboiling effect on the nutritional and technological properties of pigmented rice. *Food Chem* 2016; 191: 105-112.
25. Chen XQ, Nagao N, Itani T, Irifune K. Antioxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. *Food Chem* 2012; 135(4): 2783-2788.
26. Ghasemzadeh A, Karbalaii MT, Jaafar HZ, Rahmat A. Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chem Cent J* 2018; 12(1):17.
27. Mokhtari F, Khan Ahmadi M, Askari B, Musharraf L, Alhami Ra A. Evaluation of antioxidant activity of extract extracts of rice bran under avon conditions and comparison with BHT. *J Agri Eng Res* 2014; 15(1): 55-66.
28. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 2004; 74(17): 2157-2184.
29. Paniwnyk L, Beaufoy E, Lorimer JP, Mason TJ. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonia*. *Ultrason Sonochem* 2001; 8: 299-301.
30. Khalili M, Ebrahimzadeh MA. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 24(120): 188-208 (Persian).
31. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk: ten year follow-up of the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1997; 349(9053): 699.
32. Tang Y, Cai W, Xu B. From rice bag to table: Fate of phenolic chemical compositions and antioxidant activities in waxy and non-waxy black rice during home cooking. *Food Chem* 2016; 191: 181-190.
33. Pedro AC, Granato D, Rosso ND. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chem* 2016; 191: 12-20.
34. Shao Y, Hu Z, Yu Y, Mou R, Zhu Z, Beta T. Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice. *Food Chem* 2018; 239: 733-741.
35. Shao Y, Xu F, Sun X, Bao J, Beta T. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. *Food Chem* 2014; 143: 90-96.
36. Jun H, Shin J, Song G, Kim Y. Isolation and identification of phenolic antioxidants in black rice bran. *J Food Sci* 2015; 80(2): 262-268.
37. Aliev G, Palacios HH, Lipsitt AE, Fischbach K, Lamb B, Obrenovich ME, et al. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. *Neurotox Res* 2009; 16(3): 293-305.
38. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53(20): 7749-7759.