

흑미의 도정분획 메탄올 추출물의 항산화 성분 및 항산화 효과

공수현 · 최용민 · 이선미 · 이준수[†]

충북대학교 식품공학과

Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts from Milling Fractions of Black Rice

Suhyun Kong, Youngmin Choi, Seon-Mi Lee, and Junsoo Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

The colored rice, particularly black rice, has been well characterized to possess antioxidant properties. Rice bran, a by-product of the rice milling process, contains high levels of several phytochemicals which have antioxidant activities as well as health-beneficial properties. The purposes of this study were to evaluate the antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions and whole grain of two black rice cultivars. Whole black rice of the two cultivars were milled into rice bran and endosperm using the gradual milling system. These were evaluated for antioxidative activities by DPPH and ABTS radical scavenging activities. To determine the antioxidant compounds in the methanolic extract from the milling fractions, the content of polyphenolics, flavonoids, anthocyanins and γ -oryzanol were measured by spectrophotometric methods and vitamin E analysis was carried out by HPLC. The yield of whole black rice, rice bran, and endosperm were 3.1, 15.3, and 0.9% for Heugjinjubyeo and 2.7, 15.5, and 1.1% for Heugkwangbye, respectively. The methanolic extracts from rice bran showed generally higher antioxidant activities than the extracts from whole grain and endosperm. In addition, antioxidant compounds distributed much higher contents in rice bran extract than in the extracts from whole grain and endosperm. A significant correlation was also noted between free radical scavenging activity and polyphenolic compounds. The results of this study show that notable antioxidant activity in black rice bran are considered to have significant health benefits.

Key words: black rice, rice bran, antioxidant activity, antioxidant compounds

서 론

쌀은 세계적으로 주요한 당질 급원으로 식품에서 중요한 주요산물이다. 최근 들어 쌀의 1차 기능인 에너지 공급원으로서 뿐만 아니라 생리적 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 흑미, 적미, 녹미, 고아미, 거대배아미 등 다양한 특수미가 개발되었다(1,2). 이중 흑미는 특유의 색과 향으로 인하여 다양한 형태의 식품으로 가공되고 있으며 소비 또한 증가하고 있다(3). 뿐만 아니라 이전 연구에 의하면 흑미는 비교적 강한 free radical 제거능 및 항산화 효과가 있는 것으로 보고되었으며(4) 천연 항산화제의 중요한 자원으로 각광받고 있다. 흑미에는 polyphenolics, flavonoids, anthocyanins, vitamins, γ -oryzanol 등 기능성 성분들을 함유하고 있으며 이러한 생리활성 성분들은 체내에서 항산화 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(5). 특히 이러한 항산화 화합물들은 singlet oxygen, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals을 포함한 활성산소

종(reactive oxygen species)을 효과적으로 제거한다고 보고되어 있다(5-7). 산화적 스트레스는 신진대사와 관련된 질병과 연관되어 있고 이를 예방하는 생리활성물질들은 쌀의 외피를 구성하는 겨층과 배아부분에 집중되어 존재하는 것으로 알려져 있으며 *in vitro* 상태에서 높은 항산화 작용을 나타내어 혈중 콜레스테롤 저하 효과 및 항돌연변이 등의 생리활성이 보고되었다(8,9). 또한 흑미의 겨층에는 다른 곡류에 비하여 flavonoid, anthocyanin과 같은 색소성분이 풍부하며 이들의 다양한 생리활성이 보고되어 있다(10). 그 중 흑미의 겨층에 존재하는 색소물질로 다양한 생리활성이 알려진 anthocyanin의 주된 구성물질인 peonidin 3-glucoside와 cyanidin 3-glucose의 항염증, 항진이작용이 연구되었다(11).

본 연구에서는 국내 두 품종(흑진주벼와 흑광벼)의 흑미 도정분획별 메탄올 추출물의 항산화 물질을 분석하고 항산화력을 측정하여 이를 비교·분석하고자 하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 흑진주벼(*Oryza sativa* cv. *Heugjinju-byeo*)와 흑광벼(*Oryza sativa* L. *Heugkwangbyeo*)는 수원 농촌진흥청에서 제공받아 사용하였다. 항산화 성분분석과 활성측정에 사용된 (+)-catechin 및 gallic acid, ABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Folin-Ciocalteu reagent는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 tocopherol과 tocotrienol은 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

Methanol 추출물의 제조

두 종류 흑미의 왕겨를 제현기로 분리하여 whole grain (현미)를 만들고 이를 다시 도정기로 도정(도정율 92%)하여 rice bran(미강) 및 endosperm(배유) 시료를 제조하였다. 이를 다시 분쇄하여 80-mesh체를 통과시켰고 lipase의 불활성화를 위해 100°C에서 30분간 열처리하였다. 준비된 시료 10 g에 methanol-water(80:20, v/v) 400 mL를 가한 뒤 상온에서 24시간 교반하면서 추출하였다. 추출 후 고형분은 Toyo No.2 여과지를 이용하여 분리하였고 상징액은 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C이하에서 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 잔존하는 물은 동결건조하였다. 수율을 측정된 후 추출물은 methanol로 재용해하였다. 각 추출물은 질소 충전 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 polyphenol 함량 측정

총 polyphenol의 함량은 각 추출액 100 µL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가하고 3분 방치한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가하였다. 30분 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고 표준물질로 gallic acid를 사용하였다(12).

총 flavonoid 함량 측정

총 flavonoid의 함량은 각 추출액 250 µL에 증류수 1.25 mL를 가하고 5% NaNO₂ 용액 75 µL를 가하였다. 6분 방치 후 10% AlCl₃·6H₂O 용액을 150 µL 가하고 5분 방치하였다. 위의 반응액에 1 M의 NaOH 500 µL와 증류수 275 µL 가한 후 흡광도값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 (+)-catechin을 사용하였다(13).

Anthocyanin 분석

메탄올 추출물의 총 anthocyanin 함량은 Tüker와 Erdoğan(14)의 방법에 따라 pH differential method를 이용하여 측정하였다. 각 methanol 추출물 일정량에 0.025 M potassium chloride buffer(pH 1.0)와 0.4 M sodium acetate buffer(pH

4.5)를 각각 혼합하여 반응액의 흡광도 값을 510 nm와 700 nm에서 측정하였다. 총 안토시아닌 함량(mg/L)은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수($\epsilon=26,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Anthocyanin content (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times V}$$

A (absorbance) = (A₅₁₀ - A₇₀₀)_{pH1.0} - (A₅₁₀ - A₇₀₀)_{pH4.5}

MW (molecular weight of cyanidine-3-glucoside) = 449.2

DF (dilution factor) = 시료의 희석배수

ϵ (cyanidin-3-glucoside molar absorbance) = 26,900 M⁻¹cm⁻¹

V = 추출물의 부피

Tocopherol과 tocotrienol의 분석

추출물의 tocopherol과 tocotrienol의 분석은 methanol 추출물 일정량을 질소가스를 이용하여 증발시킨 후 다시 동량의 이동상으로 재용해하여 순상 HPLC로 분석하였다(15). HPLC 장치로는 solvent delivery pump M930(Young Lin Instrument Inc., Korea)과 형광검출기(LC305, Thermo Separation Products Inc., CA, USA)를 이용하였으며, 분석 컬럼은 Merck사로부터 LiChrosphere[®] Diol 100 column (250×4 mm, i.d. 5 µm, Hibar Fertigsäube RT, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 형광검출기의 excitation wavelength는 290 nm, emission wavelength는 330 nm를 이용하였고 이동상은 1.2% isopropanol을 함유한 *n*-hexane을 사용하였으며 유속은 0.9 mL/min이었다.

γ -Oryzanol 함량 측정

총 γ -oryzanol의 측정은 Lilitchan 등(16)의 방법을 이용하여 측정하였다. 표준물질로는 γ -oryzanol을 사용하였으며 calibration curve는 3~20 µg/mL 사이의 값을 사용하였다.

ABTS radical을 이용한 총 항산화력의 측정

총 항산화력의 측정은 Re 등(17)의 방법에 의해서 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS·⁺을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 몰 흡광계수($\epsilon=1.6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 methanol로 희석하였다. 희석된 ABTS·⁺용액 1 mL에 추출액 50 µL를 가하여 흡광도의 변화를 정확히 30분 후에 측정하였다. Trolox[®]를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 시료의 항산화력(TEAC, Trolox[®] equivalent antioxidant capacity)을 계산하였다.

DPPH radical을 이용한 총 항산화력의 측정

DPPH radical 제거능은 Kim 등(18)의 방법을 변형하여 실행하였다. DPPH 용액 0.2 mM, 1 mL에 추출액 50 µL를 가하여 흡광도의 변화를 520 nm에서 정확히 30분 후에 측정하였으며 표준물질로서 Trolox[®]를 동량 첨가하였다. DPPH radical 제거능은 ABTS radical 제거능과 동일한 방식에 의해 계산되었으며 TEAC값으로 항산화력을 나타내었다.

Table 1. Antioxidant compounds and extraction yields of the methanolic extracts from the milling fractions and whole grains of two black rice cultivars

Cultivar	Fraction	Yield (%)	Polyphenolics ¹⁾	Flavonoid ²⁾	Anthocyanin ³⁾	γ -Oryzanol ⁴⁾
Heugjinju byeo	Whole grain	3.1	659.8±40.4	222.6±3.4	173.2±11.9	24.5±0.8
	Endosperm	0.9	35.9±2.2	12.2±0.1	16.4±1.5	0.5±0.1
	Rice bran	15.3	5051.1±287.1	1405.8±28.8	1104.7±80.4	356.7±68.3
Heugkwang byeo	Whole grain	2.7	408.3±21.1	126.6±4.5	83.6±7.4	68.1±0.8
	Endosperm	1.1	31.7±1.1	7.9±0.4	6.7±0.1	1.8±0.02
	Rice bran	15.5	3287.9±129.7	1039.1±36.2	639.1±60.1	336.4±12.6

¹⁾Mean of triplicate determinations expressed as mg gallic acid equivalents per 100 g of sample (wet weight basis).

²⁾Mean of triplicate determinations expressed as mg (+)-catechin equivalents per 100 g of sample (wet weight basis).

³⁾Mean of triplicate determinations expressed as mg cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g of sample (wet weight basis).

⁴⁾Mean of triplicate determinations expressed as mg per 100 g of sample (wet weight basis).

결과 및 고찰

메탄올 추출물의 항산화 성분

각 메탄올 추출물의 항산화 성분은 시료 100 g에 해당하는 항산화 물질을 mg 수준으로 나타내었다. 각 시료의 수율은 Table 1에 나타난 것과 같이 rice bran, whole grain, endosperm의 순서로 흑진주벼가 15.3, 3.1, 0.9%를 나타냈으며 흑광벼는 15.5, 2.7, 1.1%로 두 종류의 벼 모두 rice bran에서 높은 값의 수율을 보였다. 항산화력의 측정에 있어서 추출물의 수율은 중요한 요소로 작용하고 있다. 곡류에서의 항산화 성분들의 추출은 이들 항산화 성분들의 용매에 대한 용해도 차이로 인해 차이가 있을 수 있다. 이전 연구에 의하면 메탄올을 추출용매로 사용하였을 경우 그 추출물의 높은 항산화 활성과 항산화 성분 함량을 보고하였다(19). 따라서 본 연구에서는 메탄올을 추출용매로 선택하였다. 도정분획별 메탄올 추출물의 수율 및 항산화 성분 함량은 Table 1과 2에 나타내었다.

곡류에 함유되어 있는 항산화 물질 중 polyphenolic 화합물들은 우수한 항산화력을 가지는 것으로 알려져 있으며 이는 free radical을 안정화시킬 수 있는 phenolic ring의 존재 때문인 것으로 보고되어져 있다(20). 본 실험에서는 rice bran, whole grain, endosperm의 순서로 흑진주에서 5051.1, 659.8, 35.9 mg/100 g sample이 측정되었다. 흑광벼에서는 각각 3287.9, 408.3, 31.7 mg/100 g sample로 도정된 rice bran층의 polyphenol 함량이 whole grain보다 7~8배 높은 것으로 측정되었다. 품종에 있어서 흑진주벼가 흑광벼보다 높은 polyphenol 함량을 나타냈으며 Zhou 등(21)의 연구에서 보고된 현미의 총 polyphenol 함량과 비교하였을 때 흑미의 그 함량은 매우 우수하였다. 총 flavonoid 함량은 rice bran, whole grain, endosperm의 순서로 흑진주벼에서 1405.8, 222.6, 12.2 mg/100 g sample, 흑광벼에서 1039.1, 126.6, 7.9 mg/100 g sample로 rice bran 층의 flavonoid 함량은 endosperm의 함량보다 약 115~130배의 차이를 보였다. 이전 연구에 의하면 flavonoid는 활성산소와 nitric oxide 제거력에 있어 복합적인 특성(22)이 있는 것으로 보고되었는데 흑미의 rice bran층에 존재하는 높은 flavonoid 함량 또한 이와 같은 작용을 할 것으로 예상된다. 총 anthocyanin의

함량을 측정된 결과 흑진주벼의 rice bran 층에서 높은 함량(1,104 mg/100 g sample)을 확인할 수 있었다. 이것은 흑광벼의 rice bran 층의 함량보다 약 1.7배 높은 함량이다. 풍부한 anthocyanin을 함유하고 있는 blackberry(23)와의 함량을 비교하였을 때 흑미 rice bran의 함량은 매우 뛰어나며 천연 항산화제로써 좋은 급원이 될 것으로 생각한다. 최근 연구에 의하면 흑미는 다량의 anthocyanin계 색소를 함유하고 있으며 그 중 cyanidin-3-glucoside와 peonidin-3-glucoside는 주된 구성 성분으로 peroxy radical과 hydroxy radical에 의해 발생하는 DNA손상을 저해하고 low-density lipoprotein의 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다(7).

본 실험에서 tocopherol과 tocotrienol 함량은 순상 HPLC를 통해 8가지 유도체를 분리하였다. 실험에서 측정된 각각의 tocopherol과 tocotrienol 함량은 Table 2에 나타내었다. 실험결과 rice bran 층의 추출물에서 endosperm 추출물보다 높은 함량의 tocopherol과 tocotrienol이 측정되었다. 흑광벼 rice bran 층의 총 vitamin E 함량은 15.25 mg/100 g sample로 흑진주벼보다 높은 함량을 보였다. 흑미의 총 vitamin E의 함량은 백미나 현미에 비해 그 함량이 우수한 것으로 보고되어 있으며(2) 본 실험결과 embryo(배아)를 포함한 rice bran 층의 총 vitamin E 함량이 뛰어난 것으로 측정되었다. 주 추출용매로 *n*-hexane을 사용한 Lee 등(24)의 연구에서 측정된 흑미의 vitamin E 함량과 비교하였을 때 본 실험에서는 낮은 함량이 측정되었다. 이것은 vitamin E가 대표적인 지용성 비타민이기 때문에는 극성성질이 강한 메탄올에서는 추출정도가 낮은 것으로 생각한다. γ -Oryzanol은 cholesterol의 흡수를 줄이고 linoleic acid와 cholesterol의 산화를 저해하는 것으로 보고되어 있다(25,26). 본 실험에서는 rice bran, whole grain, endosperm의 순서로 흑진주벼에서 각각 356.7, 24.5, 0.5 mg/100 g sample이 측정되었으며 흑광벼에서 336.4, 68.1, 1.8 mg/100 g sample이 측정되었다. Rice bran 층에서 endosperm보다 높은 함량의 γ -oryzanol이 측정되었다. 이전 연구(16)에 의하면 rice bran에는 약 3.67 mg/g sample의 γ -oryzanol이 함유되어 있으며 Iqbal 등(27)의 연구에서 rice bran의 hexane 추출물에서 약 0.5~0.8 mg/g sample의 γ -oryzanol 함량을 보고하였다.

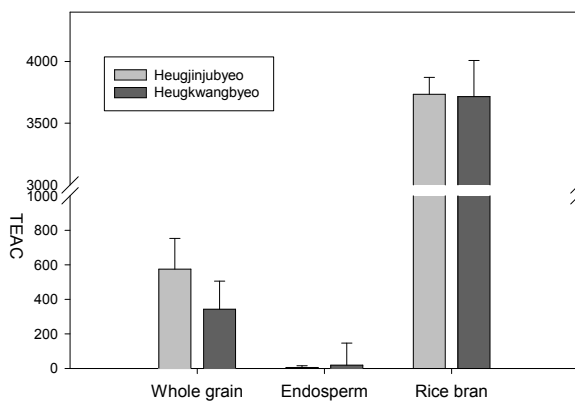
Table 2. Tocopherol and tocotrienol contents in the methanolic extracts from the milling fractions and whole grains of two black rice cultivars¹⁾

Cultivar	Fraction	α -T ²⁾	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3	Total
Heugjinju byeo	Whole grain	1.50	0.08	0.45	- ³⁾	1.35	-	3.67	0.47	7.51
	Endosperm	-	0.01	0.10	-	0.49	-	1.26	0.10	1.96
	Rice bran	1.30	-	-	-	0.81	-	6.47	-	8.85
Heugkwang byeo	Whole grain	0.65	0.07	0.28	-	0.36	-	3.16	0.48	5.00
	Endosperm	0.05	-	0.12	-	0.39	-	1.58	0.18	2.32
	Rice bran	1.42	0.18	0.45	-	2.61	-	9.62	0.97	15.25

¹⁾Mean of duplicate determinations expressed as mg per 100 g of sample.

²⁾Corresponding tocopherols (T) and tocotrienols (T3).

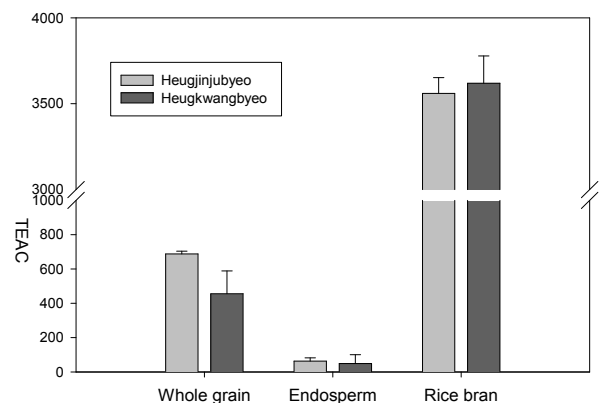
³⁾Not detected.

**Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of the methanolic extracts from the milling fractions and whole grains of two black rice cultivars.**

메탄올 추출물의 항산화활성

생체 내의 free radical은 반응성이 강하고 여러 생체물질과 쉽게 화학반응을 일으켜 노화나 DNA 변성을 일으킨다. 메탄올 추출물의 총 항산화력을 비교한 결과(Fig. 1) 흑진주벼에서 rice bran(3734.2 TEAC), whole grain(575.0 TEAC), endosperm(7.4 TEAC)이 측정되었고 흑광벼에서는 각각 3715.2, 343.1, 19.6 TEAC이 측정되었다. TEAC의 값이 가장 높은 흑진주벼 rice bran의 경우 3734.2 TEAC로 표현되는데 이것은 흑미의 rice bran 100 g당 Trolox[®] 3734.2 mg과 동일한 항산화력을 지니는 것으로 해석할 수 있다. Oki 등(28)의 연구에서 흑미의 메탄올 추출물은 백미의 메탄올 추출물보다 DPPH radical을 이용한 측정에서 높은 활성을 나타내었다. Villano 등(29)은 polyphenolic 화합물 중 flavonoid 계열 화합물의 DPPH radical을 이용한 항산화력에서의 우수함을 보고하였다. 본 실험결과 측정된 흑미 rice bran 층의 우수한 DPPH radical을 이용한 전자공여능 결과는 rice bran에 다량 존재하는 flavonoid 계열의 생리활성과 연관이 있을 것으로 생각한다.

ABTS radical을 이용한 총 항산화력의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS^{·+} free radical이 추출물 내의 항산화력 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정방법이다. 측정결

**Fig. 2. ABTS radical scavenging activities of the methanolic extracts from the milling fractions and whole grains of two black rice cultivars.**

과(Fig. 2) rice bran, whole grain, endosperm의 순으로 흑진주벼에서 3540.7, 674.0, 60.5 TEAC가 측정되었고 흑광벼에서는 각각 3591.4, 470.5, 47.1 TEAC가 측정되었다. 이 결과 흑광벼의 rice bran 100 g당 Trolox[®] 3591.4 mg, 흑진주벼의 rice bran 100 g당 Trolox[®] 3540.7 mg에 해당하는 높은 항산화력이 측정되었다. Polyphenolic 화합물과 ABTS radical 제거활성과의 높은 연관성을 보고한 연구(6)에서와 같이 본 실험에서 또한 많은 양의 polyphenolic 화합물이 존재하는 rice bran 층에서 높은 활성을 보였다. 또한 Seo 등의 연구(2)에서는 ABTS radical을 이용한 총 항산화력 측정에서 흑미는 697.3 AEAC(mg ascorbic acid equivalent per 100 g sample)로 특수미 중 흑미의 우수한 항산화력을 보고하였으며 본 연구의 whole grain 추출물의 함량과 유사한 값을 나타내었다.

요약

본 연구에서는 흑미 두 품종(흑진주벼와 흑광벼)의 도정 분획별 메탄올 추출물의 항산화 성분과 항산화 활성을 비교·분석하고자 하였다. 흑미의 항산화 성분으로 polyphenolic, flavonoid, anthocyanin과 γ -oryzanol, tocopherol 및 tocotrienol 함량을 측정하였으며 항산화 활성은 DPPH와

ABTS radical 제거능을 측정하였다. 각 도정 분획별 메탄올 추출물에서 rice bran 층에서 약 15.3~15.5%의 가장 높은 수율을 보였으며 endosperm 메탄올 추출물에서 약 0.9~1.1%의 가장 낮은 수율을 보였다. 실험결과 rice bran의 추출물에서 endosperm, whole grain의 추출물보다 높은 함량의 항산화 성분이 분포함을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 항산화 성분이 다량 분포하는 rice bran 추출물의 우수한 항산화 화력을 측정할 수 있었다. 품종 간에는 흑진주벼의 rice bran 층의 항산화 성분이 흑광벼보다 높은 함량을 나타내었다. 본 연구결과 흑미의 rice bran은 기능성식품의 성분으로 활용가능성이 높을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 ITEP과 MOCIE의 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Clampett WS, Nguyen VN. 2002. The development and use of integrated crop management for rice production. Proceedings of the 20th session of the International Rice Commission. FAO, Bangkok, Thailand. p 135-144.
2. Seo SJ, Choi Y, Lee SM, Kong S, Lee J. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 129-135.
3. Rhee CO, Song SJ, Lee YS. 2000. Volatile flavor components in cooking black rice. *Korea J Food Sci Technol* 32: 1015-1021.
4. Ling WH, Wang LL, Ma J. 2002. Supplementation of the black rice outer fraction to rabbits decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status. *J Nutr* 132: 20-26.
5. Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR, Marqart L. 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70: 459S-463S.
6. Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem* 103: 130-138.
7. Hu C, Zawistowski J, Ling W, Kitts DD. 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J Agric Food Chem* 51: 5271-5277.
8. Kahlon TS, Saunders RM, Sayre RN, Chow FI, Chiu MM, Betschart AA. 1992. Cholesterol-lowering effects of rice bran and rice bran oil fractions in hypercholesterolemic hamsters. *Cereal Chem* 69: 485-489.
9. Nam SH, Choi SP, Kang MY. 2005. Antioxidative, anti-mutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem* 53: 816-822.
10. Chung YA, Lee JK. 2003. Antioxidative properties of phenolic compounds extracted from black rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 948-951.
11. Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, Chiou HL, Hsieh YS, Chu SC. 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression.

- Chem Biol Interact* 163: 218-229.
12. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117.
13. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and they scavenging effects on super-oxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
14. Türker N, Erdoğan F. 2006. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *J Food Eng* 76: 579-583.
15. Lee SM, Lee J. 2006. Tocopherol and tocotrienol contents of vegetable oils, margarines, butters, and peanut butters consumed in Korean diet. *Food Sci Biotechnol* 15: 183-188.
16. Lilitchan S, Tangprawatt C, Aryusuk K, Krisnangkura S, Chokmoh S, Krisnangkura K. 2008. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. *Food Chem* 106: 752-759.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 26: 1231-1237.
18. Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50: 3713-3717.
19. Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, Sato T. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J Agric Food Chem* 50: 7524-7529.
20. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci* 2: 152-159.
21. Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C. 2004. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chem* 87: 401-406.
22. Jovanovic S, Steenken S, Simic M, Hara Y. 1998. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron-transfer reactions of flavonoid radicals. In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans C, Packer L, eds. Dekker, New York. p 137-161.
23. Elisia I, Hu C, Popovich DG, Kitts DD. 2007. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chem* 101: 1052-1058.
24. Lee SM, Lee HB, Lee J. 2006. Comparison of extraction methods for the determination of vitamin E in some grains. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 248-253.
25. Rong N, Asuman LM, Nicolosi RJ. 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipides* 32: 303-309.
26. Xu Z, Hua N, Godber JS. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 49: 2077-2081.
27. Iqbal S, Bhangar MI, Anwar F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in pakistan. *Food Chem* 93: 265-272.
28. Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J Agric Food Chem* 50: 7524-7529.
29. Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230-235.