



國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

紫米花青素在乙醇溶液中顏色表現之研究

Color Phenomena of Black Rice Anthocyanin

in Ethanolic Solutions

張家銘

Chia-Ming Chang

指導教授：吳瑞碧 博士

Adviser: James Swi-Bea Wu, Ph. D.

中華民國一零二年七月

July, 2013



謝誌

本論文承蒙恩師 吳瑞碧教授之悉心指導，並於論文撰寫期間詳加批閱，使順利完成。碩士兩年期間，無論在研究或待人處事方面，老師皆給予學生諸多指導與鼓勵，尤其每次實驗遇到瓶頸時，老師的許多寶貴意見總是能切中要點，讓學生獲益良多，師恩浩瀚，永誌不忘。

文稿初成，復蒙 陳雪娥教授、吳明昌教授、柯文慶教授及沈賜川副教授於學位口試中不厭其煩的給予指正與支持，並惠予寶貴的意見，讓論文更臻完善，特此致謝。也要特別感謝施明智老師、裕泰學長、秉博學長與基彰學長於實驗技巧的傳授，並常和我討論實驗方向和數據的分析，幫助我完成論文的撰寫。

在 R305 的實驗室生活中，有快樂、有悲傷也有辛苦，最先要感謝的是一路相陪的好同學們，甄雯、斌雁和小柏，我們一起拚實驗、一起偷閒喝下午茶、一起密謀慶生、一起在台灣各地留下足跡，因為有妳們讓我的碩士生活更多采多姿。感謝基彰、瑞雯、恆叡、弘典和雅筑，在我剛進實驗室還懵懵懂懂的時候適時地給予我協助。感謝培挺學長、馨云學姊、佩芬學姊、文昌學長在生活與實驗上的關心及指導，幫助我解決了大大小小的問題。感謝淑親、明勳、彥伶和勤巧，常帶給實驗室很多的歡笑，讓我在做實驗的時候並不孤獨。感謝大學時的好友們依舊支持我，琪茗在我沮喪時的陪伴和關懷，宸旻、芄芄、祝任、蔥花、嘟嘟、老鼠、金針菇的關心與打氣。雖然大家各奔東西，但我們所擁有的美好回憶，讓我們的友情緊緊連繫。

最後要感謝深愛我的家人，在精神上與學業上給予我最大的支持與鼓勵，讓我在碩士的這兩年可以順利的畢業，並且成長許多。

張家銘 謹誌於
國立臺灣大學 食品科技研究所
中華民國 一百年七月

中文摘要



紫米又稱為黑糯米，營養價值較一般白米高，外觀呈紫黑色，其良好的抗氧化性可能與種皮含有豐富的花青素有關。本研究以紫米為試驗材料，並以紫米花青素萃取液配製模式溶液，利用簡單的模式系統探討紫米花青素在乙醇溶液中的變化，主要在於以反應動力學探討不同乙醇濃度 (10–50%) 及酸鹼值 (1–8) 對於花青素穩定性及呈色之影響。期望對於酒精飲料的品質提升與顏色的保存有助益。

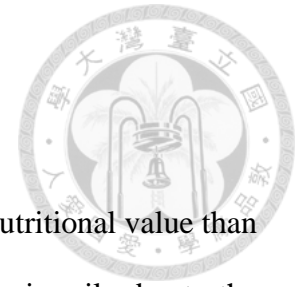
實驗結果顯示，紫米花青素於乙醇溶液中之降解屬於一級反應，在 40 °C 及 55 °C 時，反應速率常數隨著乙醇濃度提高而減少，而在 25 °C 時則是隨著乙醇濃度提高而增加，其半衰期介於 2.97–184 天之間；於 55 °C 環境下，酸鹼值越高花青素降解速率越快，其半衰期介於 6.76–100 天之間。

在呈色方面，55 °C 儲藏過程中，不同乙醇濃度及不同酸鹼值的紫米花青素模式溶液皆由紅色向淡黃色轉變，且 Hunter's *L* 值及 Hunter's *b* 值、花青素裂解指數上升，Hunter's *a* 值及色澤密度下降。

在花青素型態方面，紫米花青素於酸鹼值 1.0 下之聚合型態高達 95.70%，而隨著酸鹼值的提高，聚合型態花青素的比例逐漸減少，單體型態逐漸增加。在總抗氧化能力及 DPPH 自由基清除能力試驗中，紫米花青素 40% 乙醇模式溶液於酸鹼值 3.0–6.0 的抗氧化能力較佳。

關鍵字：紫米、花青素、乙醇、反應動力學、顏色表現、抗氧化能力

Abstract

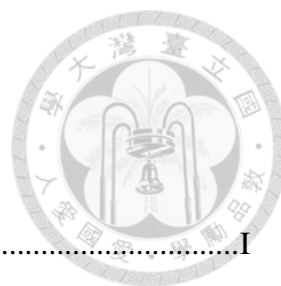


Black glutinous rice is also known as black rice. It has higher nutritional value than polished rice. Its dark purple color and anti-oxidative activities are primarily due to the presence of anthocyanin in the bran. This study was to investigate the effect of ethanol concentration and pH value on the stability of black rice anthocyanin and color phenomena in ethanolic model solutions. In the experiments, pH 1 – 8 model solutions of 10 – 50 % ethanol containing black rice anthocyanin were used.

The results revealed that the degradation rate of black rice anthocyanin in ethanolic solutions follows apparent first-order kinetics, and the rate constant is decreased with the increase of ethanol concentration at 40 °C and 55 °C but increased at 25 °C. The half-life of anthocyanin degradation in 10 – 50 % ethanolic solutions are between 2.97 – 184 day, respectively. The degradation rate constant is decreased with the increase of pH value at 55 °C and the half-life are between 6.76 – 100 day at 40 % ethanol concentration, respectively.

During 55 °C storage of model solutions at different ethanol concentrations and pH values, the degradation index, Hunter's *L* and *b* values increased while *a* value and color density decreased. In pH 1.0 model solution, polymeric anthocyanin content reached 95.70 %. When the pH value increased, the polymeric anthocyanin content decreased and monomeric anthocyanin increased. The TEAC and DPPH radical scavenging ability of various black rice anthocyanin ethanolic model solutions was highest at pH 3.0 – 6.0.

Key words : black rice, anthocyanin, ethanol, reaction kinetics, color phenomena, antioxidant capacity



目 錄

| | |
|-------------------|-----|
| 中文摘要..... | I |
| 英文摘要..... | II |
| 目 錄..... | III |
| 圖 次..... | IX |
| 表 次..... | XII |
| 第一章 前言..... | 1 |
| 第二章 文獻整理..... | 2 |
| 第一節 紫米..... | 2 |
| 一、紫米之簡介..... | 2 |
| 二、有色米中花青素的種類..... | 3 |
| 第二節 浸漬酒..... | 5 |
| 一、浸漬酒的定義..... | 5 |
| 二、浸漬酒的種類..... | 5 |
| 三、影響浸漬酒品質之因素..... | 6 |
| 第三節 花青素..... | 8 |
| 一、花青素之結構..... | 8 |
| 二、影響花青素之因子..... | 9 |
| (一) 結構效應..... | 9 |
| (二) 濃度效應..... | 12 |



| | |
|------------------------|----|
| (三) pH 值..... | 12 |
| (四) 溫度..... | 12 |
| (五) 氧氣和光線..... | 14 |
| (六) 醣類..... | 14 |
| (七) 酵素..... | 15 |
| (八) 金屬離子..... | 15 |
| (九) 抗壞血酸..... | 16 |
| (十) 二氧化硫..... | 16 |
| 第四節 花青素之共呈色及聚合作用 | 18 |
| 一、共呈色作用之定義與特性..... | 18 |
| 二、共呈色作用的種類與發生機制..... | 18 |
| 三、共呈色作用特性與影響因子..... | 24 |
| 四、聚合作用 | 25 |
| 第五節 花青素於乙醇溶液中相關研究..... | 28 |
| 第六節 降解動力學分析..... | 29 |
| 一、反應速率常數..... | 29 |
| 二、半衰期與活化能..... | 30 |



| | |
|-----------------------------|----|
| 第三章 材料與方法..... | 31 |
| 第一節 實驗材料..... | 31 |
| 第二節 實驗試藥..... | 31 |
| 第三節 儀器設備..... | 32 |
| 第四節 實驗架構..... | 32 |
| 第五節 實驗方法..... | 34 |
| 一、紫米之前處理..... | 34 |
| 二、紫米花青素之萃取流程..... | 34 |
| 三、紫米花青素萃取之最適條件探討..... | 34 |
| 四、紫米花青素模式溶液之製備..... | 35 |
| 五、乙醇系統下花青素反應動力學分析..... | 35 |
| 六、儲藏期間紫米花青素乙醇溶液顏色品質之變化..... | 35 |
| 第六節 分析方法..... | 38 |
| 一、pH 值..... | 38 |
| 二、總花青素含量分析..... | 38 |
| 三、花青素裂解指數測定..... | 39 |
| 四、光譜分析..... | 39 |
| 五、色澤分析..... | 39 |
| 六、彩度..... | 39 |



| | |
|------------------------------------|----|
| 七、色澤密度 | 39 |
| 八、花青素型態測定 | 40 |
| 九、總酚類化合物 | 40 |
| 十、DPPH 自由基清除能力測定 | 40 |
| 十一、總抗氧化能力測定 | 41 |
| 第七節 資料處理及數據分析 | 42 |
| 一、統計分析 | 42 |
| 二、繪圖 | 42 |
| 第四章 結果與討論 | 43 |
| 第一節 以反應曲面法 (RSM) 探討萃取之最適條件 | 43 |
| 第二節 花青素於乙醇溶液中降解反應動力學之探討 | 48 |
| 一、花青素模式溶液降解反應級數之探討 | 48 |
| 二、花青素模式溶液之降解反應速率常數 | 51 |
| (一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之降解反應速率常數 | 51 |
| (二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之降解反應速率常數 | 56 |
| 三、花青素模式溶液之半衰期與反應活化能 | 60 |
| (一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之半衰期與反應活化能 | 60 |
| (二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之半衰期 | 60 |



| | |
|---|----|
| 第三節 花青素於乙醇溶液中顏色表現..... | 62 |
| 一、花青素模式溶液之光譜..... | 62 |
| (一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之光譜..... | 62 |
| (二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之光譜..... | 62 |
| 二、花青素模式溶液之 Hunter's L, a, b 值..... | 65 |
| (一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液之 Hunter's L, a, b 值..... | 65 |
| (二) 不同 pH 值花青素模式溶液之 Hunter's L, a, b 值..... | 71 |
| 三、花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化..... | 74 |
| (一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化..... | 74 |
| (二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化..... | 74 |
| 四、花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化..... | 77 |
| (一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化..... | 77 |
| (二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化..... | 77 |
| 五、花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化..... | 80 |
| (一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化..... | 80 |
| (二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化..... | 80 |
| 六、花青素模式溶液儲藏期間呈色變化之相關性分析..... | 83 |
| 第四節 不同 pH 值花青素模式溶液之花青素型態變化..... | 85 |



| | |
|--------------------------------------|----|
| 第五節 不同 pH 值花青素模式溶液之抗氧化能力 | 86 |
| 一、不同 pH 值花青素模式溶液之總抗氧化能力 | 86 |
| 二、不同 pH 值花青素模式溶液之 DPPH 自由基清除能力 | 86 |
| 第五章 結論 | 88 |
| 第六章 參考文獻 | 90 |



圖 次

| | |
|--|----|
| 圖 2-1. 花青素之基本結構。 | 10 |
| 圖 2-2. 常見之花青素鹽基分子。 | 10 |
| 圖 2-3. 花青素結構隨 pH 值轉變及降解機制。 | 13 |
| 圖 2-4. 花青素於 pH 3.7 下受熱降解途徑。 | 14 |
| 圖 2-5. 維生素 C 與花青素形成無色之產物。 | 17 |
| 圖 2-6. 花青素共呈色作用 (A) 自體聚集作用 (B) 分子內共呈色作用 (C) 金屬離子複合物 (D) 分子間共呈色作用。 | 20 |
| 圖 2-7. 花青素分子內共呈色作用之機制圖。 | 21 |
| 圖 2-8. 金屬花青素的構造。 | 22 |
| 圖 2-9. 花青素 delphinidin-3-glucoside 與 rutin 藉由分子間共呈色作用形成之複 合物 (A) 平面複合物 (B) 立體堆疊複合物。 | 23 |
| 圖 2-10. 共呈色作用之濃色效應及向長波長偏移現象。 | 27 |
| 圖 3-1. 紫米花青素萃取最適化之實驗架構。 | 33 |
| 圖 3-2. 紫米花青素在乙醇溶液中顏色表現之實驗架構。 | 33 |
| 圖 4-1(A). 浸漬 6 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之 反應曲面圖。 | 45 |
| 圖 4-1(B). 浸漬 21 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之 反應曲面圖。 | 46 |
| 圖 4-1(C). 浸漬 36 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之 反應曲面圖。 | 47 |
| 圖 4-2. 紫米花青素於乙醇模式溶液中之殘留率變化。 | 49 |
| 圖 4-3. 紫米花青素於乙醇模式溶液之一級降解反應動力學。 | 50 |
| 圖 4-4. 乙醇濃度對模式溶液中紫米花青素殘留率之影響。 | 53 |



| | |
|---|----|
| 圖 4-5. 乙醇濃度對模式溶液中紫米花青素降解速率之影響。..... | 54 |
| 圖 4-6. pH 值對模式溶液中紫米花青素殘留率之影響。..... | 57 |
| 圖 4-7. pH 值對模式溶液中紫米花青素降解速率之影響。..... | 58 |
| 圖 4-8. 乙醇模式溶液中紫米花青素含量之 Arrhenius 線性迴歸。..... | 61 |
| 圖 4-9. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液光譜之影響。..... | 63 |
| 圖 4-10. pH 值對紫米花青素模式溶液光譜之影響。..... | 64 |
| 圖 4-11. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響 | 67 |
| 圖 4-12. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's L 值變化之影響。..... | 68 |
| 圖 4-13. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's a 值變化之影響。..... | 69 |
| 圖 4-14. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's b 值變化之影響。..... | 70 |
| 圖 4-15. pH 值對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響。..... | 72 |
| 圖 4-16. 紫米花青素乙醇模式溶液在 pH 1–8 之呈色。..... | 73 |
| 圖 4-17. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 裂解指數變化之影響。..... | 75 |
| 圖 4-18. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間裂解指數變化 之影響。..... | 76 |
| 圖 4-19. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 色澤密度變化之影響。..... | 78 |



圖 4-20. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間色澤密度變化
之影響。79

圖 4-21. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間
彩度變化之影響。81

圖 4-22. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間彩度變化之影響。82



表 次

| | |
|--|----|
| 表 2-1. 萃取條件對柿子酒化學成分與感官品評之影響..... | 7 |
| 表 2-2. 常見 23 種花青素基團結構..... | 11 |
| 表 3-1. 三變數-三層階反應曲面設計之操作條件變數及層階..... | 36 |
| 表 3-2. 三變數-三層階之中心旋轉組合設計..... | 37 |
| 表 4-1. 不同浸漬條件下酒液中總花青素含量變化..... | 44 |
| 表 4-2. 乙醇濃度對花青素模式溶液降解反應速率常數 (k)、半衰期 ($T_{1/2}$) 及反應活化能 (E_a) 之影響..... | 55 |
| 表 4-3. pH 值對花青素模式溶液降解反應速率常數 (k) 及半衰期 ($T_{1/2}$) 之影響..... | 59 |
| 表 4-4. 乙醇模式溶液於儲藏期間總花青素含量及呈色表現之相關性分析..... | 84 |
| 表 4-5. 不同酸鹼值對乙醇模式溶液之花青素型態及抗氧化能力影響..... | 87 |

第一章 前言



花青素 (anthocyanin) 為自然界中廣泛存在且色彩鮮豔的植物色素之一，它可清除因環境壓力所形成的自由基，減低疾病的發生率與致死率 (Wang *et al.*, 1997)。近年來由於健康飲食的提倡，富含花青素的酒精飲料因具有良好的抗氧化能力與降低心血管疾病發生的機率而備受注目。酒的顏色表現常被當作品質指標，而花青素的含量與酒液顏色表現息息相關 (Wrolstad *et al.*, 2005)。

以往對於花青素之研究，均著重於水溶液中之物化特性分析。只有少數的報告探討乙醇對花青素呈色之影響。市面上酒類產品眾多，如紅葡萄酒 (10 – 14 %, v/v)、波特酒 (18 – 22 %, v/v) 及水果浸漬酒 (25 – 50 %, v/v) 等，上述酒品中之乙醇濃度差異甚大但與其花青素之呈色及穩定性有關之研究卻不多，乙醇對花青素之影響的確值得深入探討。

本研究以國產紫米為試驗材料萃取出花青素，以此萃取液配製成模式溶液，利用簡單的模式系統探討紫米花青素在乙醇溶液中的變化，主要在於以反應動力學探討不同乙醇濃度 (10 – 50 %) 及酸鹼值 (1 – 8) 對於花青素穩定性及呈色之影響。期望對於酒精飲料的品質提升與顏色的保存有助益。

第二章 文獻整理



第一節 紫米

一、紫米之簡介

紫米 (*Oryza sativa* L.) 為禾本科稻屬，是一種有色米 (colored rice)，因外層富含花青素，外觀呈紫黑色，又稱為黑米、黑糯米、補血米、長壽米等，其色素層主要分佈於穎果皮 (pericarp) 或種皮 (seed coat) (Juliano, 1985 ; Ryu *et al.*, 1998)。紫米之碾白 (milling) 大多是去除稻殼成糙米 (brown rice)，含胚芽 (embryo)、米糠層 (bran)、胚乳 (endosperm)，紫米的營養價值較一般白米高，含蛋白質、必需胺基酸、維生素B1、鐵、鋅、錳、磷等礦物質 (Ha *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2004)，深受中國、台灣、日本、越南等國家之消費者喜歡。紫米近年來成為美食、營養之重要研究素材，在亞洲許多國家常會混合紫米與白米一起烹煮，來增加其香氣、風味及營養價值，也常做成各式米食製品如：飯糰、壽司、各式甜點、紫米粥以及即時沖泡粉 (Chen and Tsai, 2010)。


紫米中含有可清除自由基的抗氧化物質，Hu *et al.* (2003) 發現紫米中的花青素可以保護 DNA，使其不受氫氧自由基攻擊而產生缺口，也可避免其受到過氧自由基的破壞而斷裂。此外，有研究指出紫米的米糠內含有大量三烯生育醇 (tocotrienol)，具抗氧化及抗發炎功能 (Qureshi *et al.*, 2001)；而米糠之水抽出物可降低人體高血糖 (hyperglycemia)，米糠纖維則可降低人體高脂血症 (hyperlipidemia) (Qureshi *et al.*, 2002)。在動物試驗中，Ling *et al.* (2002) 發現紅米及紫米可抑制兔子動脈粥狀斑塊 (atherosclerotic plaque) 之生成，主要是由於米糠層提供了抗氧化的功能。Xia *et al.* (2003) 發現紫米可抑制小鼠動脈粥狀硬化症 (atherosclerosis)，其主要是改善膽固醇的累積和減少氧化逆境及發炎。由以上文獻可知，紫米的成分的確可以有效抵抗一些逆境所造成的氧化傷害。



二、有色米中花青素的種類

Reddy *et al.* (1995) 分析具紫色植株的水稻品種 Purpleputtu，以了解不同部位花青素含量的多寡。Purpleputtu 植株各部位的顏色分別為葉環（紫色）、葉鞘（紫色）、葉耳（紫色）、節間（紫色）、劍葉（紫色）、葉舌（紫紅色）、葉尖（紅色）、稻殼（紫色）及穎果皮（紫黑色），發現水稻植株紫色或紅色的組織中均含有花青素，其中最主要的成分為 cyanidin，次要為 peonidin。而花青素含量最多的部位是穎果皮，cyanidin 及 peonidin 的含量分別為 401 及 292.9 μM ，而後依序為稻殼、葉尖、葉舌、劍葉、節間、葉耳、葉鞘，含量最少為葉環（cyanidin 及 peonidin 的含量分別為 121.3 及 1.2 μM ）；其中穎果皮 cyanidin 及 peonidin 的含量比其他大部分的組織約多 5 倍。

學者進一步利用 HPLC 測定不同顏色穎果皮的水稻品種，以了解不同顏色穎果皮的花青素種類。分析品種包括紫黑色穎果皮、褐色穎果皮及白色穎果皮三種。萃取方面，Ryu *et al.* (1998) 利用 95 % 乙醇（含有 0.5 % trifluoroacetic acid）萃取紫黑色及白色穎果皮的穀粒，並以 Sephadex LH-20 column 純化萃取液，而 Reddy *et al.* (1995) 利用 1 % 的酸化甲醇萃取紫黑色及白色穎果皮，褐色穎果皮則利用 90 % 的甲醇萃取。分析結果，褐色及白色穎果皮的水稻品種並未測到任何的花青素，但大部分紫黑色穎果皮的品種含有 cyanidin-3-glucoside 及 peonidin-3-glucoside 這二種花青素，且以前者為主要成分，後者的含量較少，而顏色愈深的穎果皮含有愈多的花青素。褐色穎果皮雖然沒有測到花青素，但將萃取液經酸化水解後，利用分光光度計及 TLC 分析發現含有 cyanidin 及 peonidin。Reddy *et al.* (1995) 推論可能是花青素合成的過程中花青素合成酶 (anthocyanidin synthase) 的氧化活性受到阻礙，因此 leucocyanidin 無法轉變成 cyanidin，所以褐色穎果皮的色素是由原花青素 (proanthocyanidin) 所構成。原花青素是由 flavan-3-ols (catechins) 及 leucoanthocyanidin 所聚合而成的類黃酮，具有比維生素 E 高 50 倍、比維生素 C 高 20 倍的抗氧化能力，而且還可抵抗自



由基對人體細胞的破壞，降低低密度膽固醇 (LDL) 及減少心血管疾病 (Tsuda *et al.*, 1996)。此外，蔡等人 (1996) 將購自超市的黑糯米浸泡於含有 1% HCl 的甲醇中，利用 Bio-Gel P-2 管柱純化花青素，再以 FAB-mass、¹H-NMR 及紫外光-可見光光譜分析並鑑定水解產物結構，結果發現黑糯米中的色素也是由 cyanidin-3-β-O-glucoside 及 peonidin-3-β-O-glucoside 所構成。綜合以上研究結果得知，紫黑色米粒穎果皮的色素是以 cyanidin-3-glucoside 及 peonidin-3-glucoside 為主，褐色穎果皮的色素則是由原花青素所構成。



第二節 浸漬酒 (liqueur)

一、浸漬酒的定義 (胡，1991；趙，2005)

浸漬酒是一種再製酒，常是含酒精、浸出液、香料物質、糖及色素的混合物。該種酒類常使用蒸餾酒或高純度的食用酒精為基酒，將原料中之香味或成分溶解於其中而成，此點與一般酒類必須經過酵母發酵的過程不同，因此，再製酒的風味特性來自其所溶解之物質。

二、浸漬酒的種類 (胡，1991)

浸漬酒因浸漬或調配的原料來源不同而產生許多種類，其分類大致如下：

- (一) 水果類：以水果成分命名，如梅酒、櫻桃酒、桑椹酒、荔枝酒。
- (二) 種子類：用種子或豆類製成，如杏仁酒、咖啡酒、核果酒。
- (三) 香草類：用香辛植物或多種花草、茶葉製成，如薄荷酒。
- (四) 果皮、樹皮類：以橘皮、樟樹皮等製成，像是產於法國之 Macvin 為含樟樹皮的再製酒。
- (五) 動物類：以鹿茸、虎骨等浸泡之藥酒。
- (六) 乳脂、蛋類：如義大利的 Vov (蛋黃酒)，愛爾蘭的 Waterford Cream (奶油酒)。
- (七) 其他類：例如以糖漿、蜂蜜等其他原料製作而成者。

三、影響浸漬酒品質之因素

Gorinstein *et al.* (1993) 在柿子浸漬酒的研究中指出酚類化合物會造成酒的混濁而影響酒的品質；其中表 2-1 顯示柿子酒中的酚類化合物會隨萃取時間延長而增加，而固液比對其含量影響較不顯著；乙醇濃度高者對柿子中的蛋白質與氮之萃取能力較差，但對酚類化合物會有較強的萃取能力。經官能品評，以 50 % 乙醇濃度、固液比 1：1、浸漬 20 天有一最佳結果。Vacca *et al.* (2003) 在 myrtle liqueur 的儲藏研究中發現，有遮光的酒液，其花青素及抗氧化能力均較無遮光者高，顯示遮光的與否亦會影響酒液於儲存時的品質。趙 (2005) 在玫瑰花浸漬酒實驗中發現玫瑰花瓣於乾燥後，可降低浸漬過程中的酵素性褐變情形，有效維持玫瑰浸漬酒液的色澤，且乾燥後之花瓣能萃出之花青素亦較鮮花來的多，並且可大幅減少原料的重量及體積，減少運輸及貯藏的成本。由文獻中得知影響浸漬酒品質之因素包含：固液比、酒精濃度、浸漬時間、萃出物質含量、遮光與否、原料處理方式等。



表 2-1. 萃取條件對柿子酒化學成分與感官品評之影響

Table 2-1. Effect of extraction conditions on the chemical and sensory characteristics of persimmon extracts

| Sample No. ^a | Extraction (days) | Fruit:Alcohol (Solid:solvent) (w/v) | Nitrogen content | Protein (%) | Phenolic compounds (% dry substrate) | Taste score | Aroma score |
|-------------------------|-------------------|-------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
| 1 | 10 | 1:1 | 0.30 | 0.02 | 1.2 | 6.70 | 5.31 |
| 2 | 10 | 1:1.5 | 0.30 | 0.02 | 1.2 | 6.70 | 5.31 |
| 3 | 10 | 1:2 | 0.25 | 0.01 | 1.2 | 6.40 | 5.20 |
| 4 | 10 | 1:3 | 0.25 | 0.01 | 1.2 | 6.40 | 5.20 |
| 5 | 20 | 1:1 | 0.40 | 0.03 | 1.3 | 7.00 | 6.80 |
| 6 | 20 | 1:1.5 | 0.35 | 0.02 | 1.3 | 6.80 | 6.65 |
| 7 | 20 | 1:2 | 0.35 | 0.02 | 1.3 | 6.60 | 6.30 |
| 8 | 20 | 1:3 | 0.35 | 0.02 | 1.3 | 6.60 | 6.20 |
| 9 | 30 | 1:1 | 0.40 | 0.03 | 1.5 | 7.00 | 6.70 |
| 10 | 30 | 1:1.5 | 0.38 | 0.03 | 1.5 | 6.80 | 6.60 |
| 11 | 30 | 1:2 | 0.36 | 0.03 | 1.5 | 6.60 | 6.20 |
| 12 | 30 | 1:3 | 0.29 | 0.02 | 1.5 | 6.40 | 6.10 |
| 1' | 10 | 1:1 | 0.43 | 0.05 | 0.9 | 7.80 | 7.63 |
| 2' | 10 | 1:1.5 | 0.43 | 0.05 | 0.8 | 7.80 | 7.50 |
| 3' | 10 | 1:2 | 0.38 | 0.04 | 0.9 | 7.60 | 7.42 |
| 4' | 10 | 1:3 | 0.38 | 0.04 | 0.9 | 7.45 | 7.23 |
| 5' | 20 | 1:1 | 0.57 | 0.06 | 1.0 | 8.72 | 8.72 |
| 6' | 20 | 1:1.5 | 0.59 | 0.06 | 1.0 | 8.62 | 8.49 |
| 7' | 20 | 1:2 | 0.47 | 0.05 | 0.9 | 8.40 | 8.33 |
| 8' | 20 | 1:3 | 0.45 | 0.05 | 0.9 | 8.15 | 8.22 |
| 9' | 30 | 1:1 | 0.64 | 0.08 | 1.1 | 8.54 | 8.47 |
| 10' | 30 | 1:1.5 | 0.62 | 0.07 | 1.0 | 8.52 | 8.40 |
| 11' | 30 | 1:2 | 0.59 | 0.07 | 1.0 | 8.22 | 8.04 |
| 12' | 30 | 1:3 | 0.57 | 0.07 | 1.0 | 8.05 | 7.93 |

^a Sample 1-12 are extracted at room temperature with 95% vol. alcohol.

Sample 1'-12' are extracted at room temperature with 50% vol. alcohol.

(Gorinstein, 1993)




第三節 花青素

花青素 (anthocyanin) 是一種廣泛存在於植物界中的水溶性色素，為許多花卉、蔬菜及水果鮮艷顏色的主要來源，依結構特性不同能呈現紅、藍、紫等色澤，目前自然界中已經發現超過四百種以上之花青素 (Kong *et al.*, 2003)。花青素因具有許多相類似的共振結構且帶有共軛雙鍵，可見光最大吸收波峰分佈在 500–550 nm 之間，因而在肉眼呈現紅色 (Rein and Heinonen, 2004)。花青素在食品工業上用途極廣，除了做為天然著色劑用於酒、果汁或果醬等加工產品以外，亦可作為良好之抗氧化物質。花青素分子極不穩定且容易降解，其穩定性受到自身結構、濃度、pH、溫度、酵素、光、氧氣、溶劑以及其他化合物如類黃酮類、醣類、抗壞血酸、二氧化硫及金屬離子等之影響。

一、花青素之結構

花青素屬於類黃酮化合物的一種，主要以 $C_6C_3C_6$ 芳香環為結構骨架，是 flavylium cation 的衍生物，由花青素配醣基 [anthocyanidins (aglycone)]、醣基 (sugar group) 及醯基 (acyl group) 三部份構成 (圖 2-1)。在芳香環上 3、5、7、3' 及 4' 位置接氫氧基 (hydroxyl) 或甲氧基 (methoxy group) 進而構成不同的 anthocyanidins，目前植物中常見的花青素配醣基約 23 種 (表 2-2)，而又以矢車菊素 (cyanidin, Cy)、牡丹素 (peonidin, Pn)、花翠素 (delphinidin, Dp)、錦葵色素 (malvidin, Mv)、天竺葵素 (pelargonidin, Pg)、牽牛花素 (petunidin, Pt) 等六種衍生物較常見於食品中。

由於 flavylium cation 缺乏電子，使游離的花青素配醣基相當不穩定，故在自然界中一般不以游離的形式存在，而是通常由花青素配醣基與各類醣分子進行醣基化 (glycosylation)，反應則多發生於 3、5、7 的位置上，使花青素分子於水溶液中溶解度及安定性增加 (Rein *et al.*, 2004)，醣基一般以單醣為主，如葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (galactose) 及阿拉伯糖 (arabinose) (Markakis, 1982)。



醯化作用 (acylation) 使醯基以酯鍵鍵結在醣化之 anthocyanidins 上，主要發生於醣基之 6 的位置。花青素之醯基可分為兩大類，一類是芳香族酸 (aromatic phenolic acids) (如：coumaric acid、caffeic acid、ferulic acid 等)，另一類是脂肪族酸 (aliphatic carboxyl acid) (如：acetic acid、malonic acid、succinic acid 及 oxalic acid 等) (圖 2-2) (Rein *et al.*, 2004)。

二、影響花青素穩定性及呈色之因子

(一) 結構效應

因花青素具有共振結構且帶有高度反應性之陽離子 flavylium cation，使花青素分子具有吸光的特性，卻也使得分子極度不穩定，容易受到環境或其他因子影響而降解成無色或褐色產物，明顯影響花青素的顏色表現。結構中的氫氧基、甲氧基、醣基、醯基之種類及數目對花青素的穩定性及顏色皆有明顯的影響。當 B 環上氫氧基增加時，花青素的顏色由紅轉藍，亦即向藍效應 (hypsochromic shift)，若由甲氧基取代氫氧基時，則顏色由藍轉紅，產生向紅效應 (bathochromic shift) (Shi *et al.*, 1992)；接兩個醣基比接一個醣基時穩定；醣基上接醯基 (acyl group) 時對光與熱較穩定，其安定性隨醣基與醯基數量增加而提高 (Markakis, 1982)。蔡和陳 (1992) 研究中分離出紅鳳菜之花青素，發現接有兩個以上的醯基，於中性溶液仍能具有良好的顏色表現，因 flavylium cation 上下各有一個醯基與之重疊，造成三明治型疊合 (sandwich-type stacking)，產生立體結構障礙，使因 pH 提高時之加水去氫反應不易進行，穩定了花青素分子之結構。

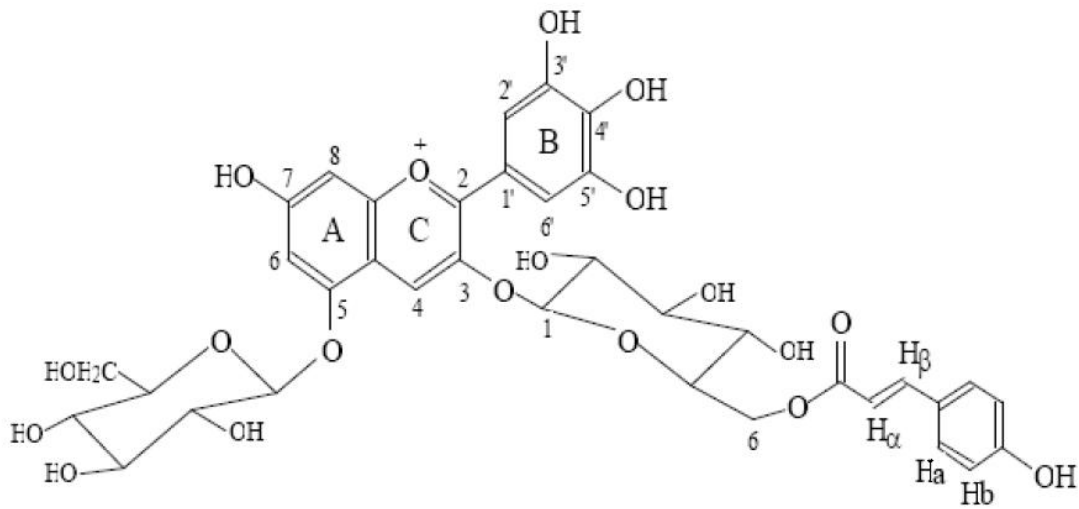


圖 2-1. 花青素之基本結構。

Fig. 2-1. The basic structure of anthocyanin.

(Hrazdina *et al.*, 1974)

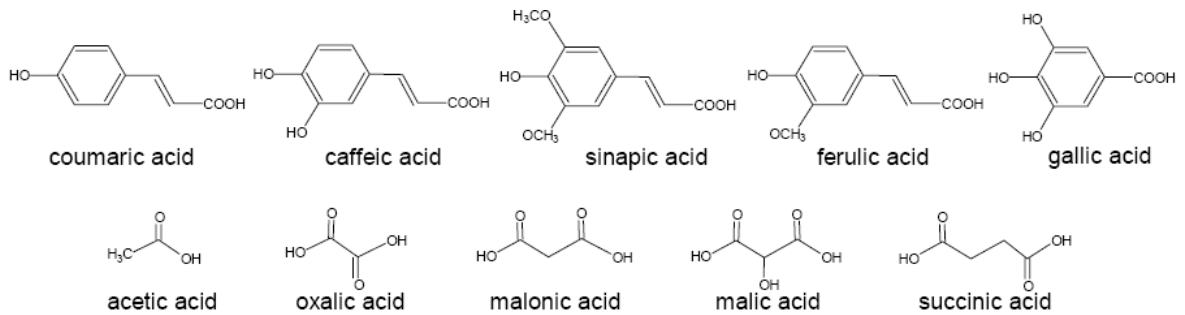


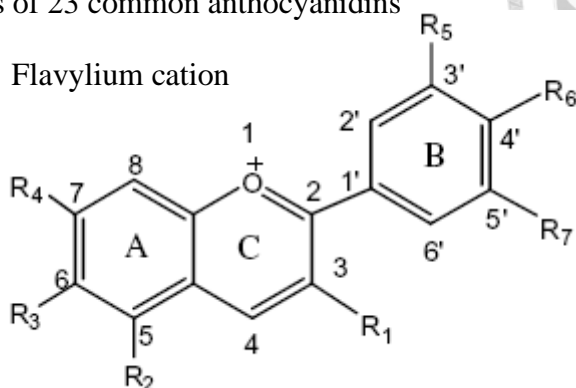
圖 2-2. 常見之花青素醯基分子。

Fig. 2-2. The most common acyl units of anthocyanins.

(Rein *et al.*, 2004)

表 2-2. 常見 23 種花青素基團結構

Table 2-2. The basic structures of 23 common anthocyanidins



| Name | Abbreviations | Substitution pattern | | | | | | | Colour |
|---------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | |
| Apigeninidin | Ap | H | OH | H | OH | H | OH | H | |
| Arrabidin | Ab | H | H | OH | OH | H | OH | OMe | |
| Aurantidin | Au | OH | OH | OH | OH | H | OH | H | |
| Capensinidin | Cp | OH | OMe | H | OH | OMe | OH | OMe | Blue-red |
| Carajurin | Cj | H | H | OH | OH | H | Ome | OMe | |
| Cyanidin | Cy | OH | OH | H | OH | OH | OH | H | Blue-red |
| Delphinidin | Dp | OH | OH | H | OH | OH | OH | OH | Blue-red |
| Europinidin | Eu | OH | OMe | H | OH | OMe | OH | OH | Blue-red |
| Hirsutidin | Hs | OH | OH | H | OMe | OMe | OH | OMe | Blue-red |
| 30-HydroxyAb | 3'OHAb | H | H | OH | OH | OH | OH | OMe | |
| 6-HydroxyCy | 6OHCy | OH | OH | OH | OH | OH | OH | OH | Red |
| 6-HydroxyDp | 6OHDp | OH | OH | OH | OH | OH | OH | OH | Blue-red |
| 6-HydroxyPg | 6OHPg | OH | OH | OH | OH | OH | OH | H | |
| Luteolin | Lt | H | OH | H | OH | OH | OH | H | |
| Malvidin | Mv | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OMe | Blue-red |
| 5-MethylCy | 5-MCy | OH | OMe | H | OH | OH | OH | H | Orange-red |
| Pelargonidin | Pg | OH | OH | H | OH | H | OH | H | Orange-red |
| Peonidin | Pn | OH | OH | H | OH | OMe | OH | H | Orange-red |
| Petunidin | Pt | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OH | Blue-red |
| Pulchellidin | Pl | OH | OMe | H | OH | OH | OH | OH | Blue-red |
| Riccionidin A | RiA | OH | H | OH | OH | H | OH | H | |
| Rosinidin | Rs | OH | OH | H | OMe | OMe | OH | H | Red |
| Tricetinidin | Tr | H | OH | H | OH | OH | OH | OH | Red |

(Araceli *et al.*, 2009)



(二) 濃度效應

花青素濃度的增加能有效提高顏色的穩定度 (Giusti and Wrolstad, 2003)。
Skrede *et al.* (1992) 在草莓糖漿色澤穩定性試驗中發現提高總花青素濃度有助於顏色穩定性。濃度效應的提升通常伴隨色澤強度的增加。Asen *et al.* (1972) 指出當矢車菊素 (cyanidin) 由濃度 10^{-4} M 增加至 10^{-2} M 時, 色澤強度將增加 300 倍。較高的花青素的濃度有助於 self-association 作用而提高其穩定性 (Brouillard, 1982)。

(三) pH 值

花青素會隨溶液中 pH 值影響而造成結構及顏色上的變化, 如圖 2-3, 在 pH 1.0 時, 主要以紅色 flavylium cation 形式存在 (圖 2-3 A), 隨著 pH 逐漸提升, flavylium cation 轉變成藍紫色的 quinonoidal base (圖 2-3 B – D), 當 pH 達 5.0 – 6.0 時, 轉變成無色的 carbinol pseudobase (圖 2-3 E) 及黃色的 chalcone (圖 2-3 F), 而 pH 大於 7.0 時, chalcone 結構開始降解而破壞, 無法再回復成紅色的 flavylium cation (圖 2-3 degradation reaction), 花青素在溶液中呈色即與上述四種化合物在平衡狀態下之相對濃度有關 (Araceli *et al.*, 2009)。一般而言, 花青素於酸性環境主要以 flavylium cation 存在, 其安定性較佳, 但隨著 pH 上升安定性下降 (Brouillard *et al.*, 1982)。學者研究將六種帶醣基之花青素 (Pg、Cy、Pn、Dp、Pt、Mv-3-glucosides) 於 pH 1.0 – 12.0 溶液中儲藏 60 天, 發現 pH 1.0 – 3.0 時, 皆具有較深的紅色, 且於儲存期間相當穩定 (Cabrita *et al.*, 2000)。

(四) 溫度

花青素極易受到溫度的影響, 許多研究顯示在加工及儲藏期間, 溫度上升會加速花青素的降解。圖 2-4 為 pH 3.7 下花青素經熱破壞後可能的降解途徑。
Shrikhande *et al.* (1976) 指出, 當溫度以算術級數增加時, 花青素的裂解會呈現幾

何級數的上升。Cemeroglu *et al.* (1994) 發現酸櫻桃濃縮汁儲存在 -18°C 或 5°C 下，經過 160 天，尚保留 80% 之花青素含量，而儲藏在 37°C 時，經過 39 天即測不到花青素含量。但溫度對花青素亦有正面之影響，Kalt *et al.* (1999) 研究發現新鮮水果如草莓 (strawberry) 與覆盆子 (raspberry) 以高於 0°C 儲存 8 天可以提高花青素含量。Wang and Strech (2001) 亦發現蔓越莓存放在 15°C 三週的時間可以提高花青素的含量。

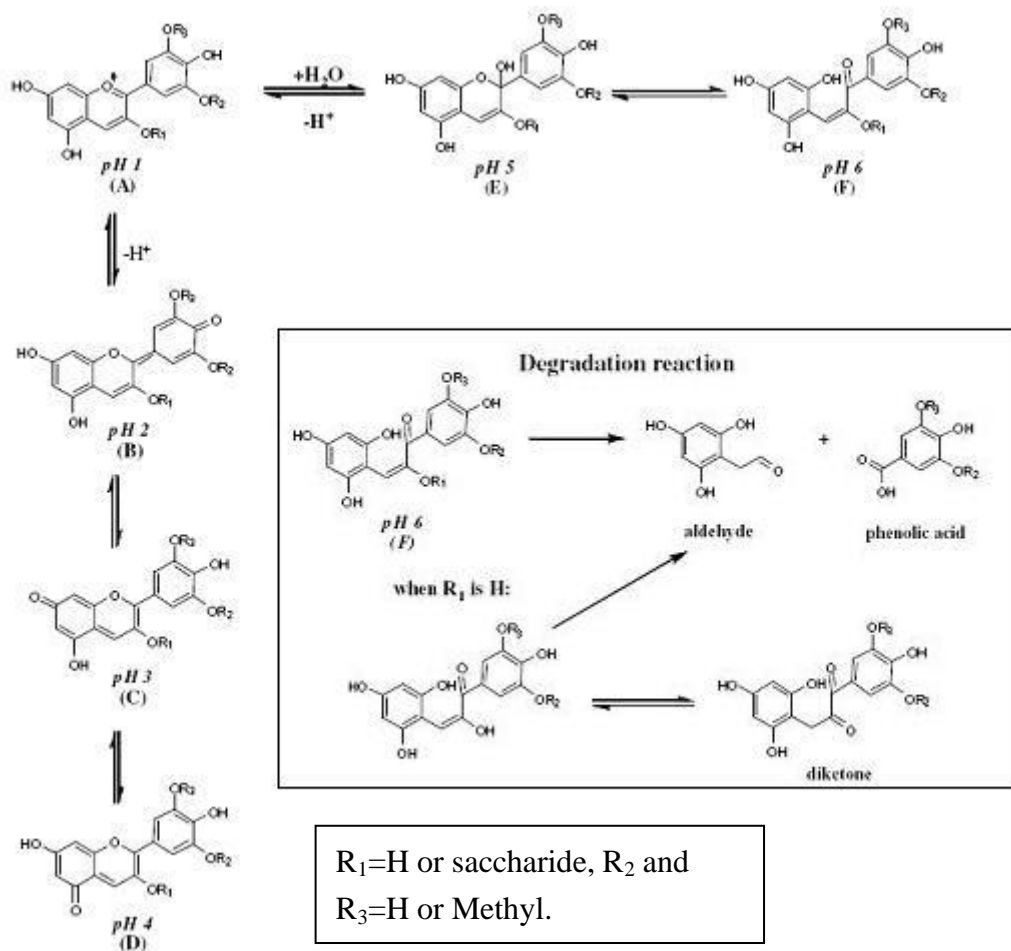


圖 2-3. 花青素結構隨 pH 值轉變及降解機制。

Fig. 2-3. Anthocyanins chemical forms depending on pH and degradation reaction.

(Araceli *et al.*, 2009)

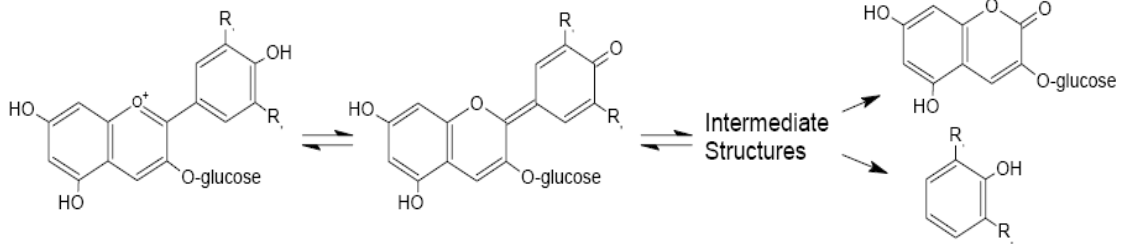


圖 2-4. 花青素於 pH 3.7 下受熱降解途徑。

Fig. 2-4. Degradation of anthocyanin at pH 3.7 accelerated by heat.

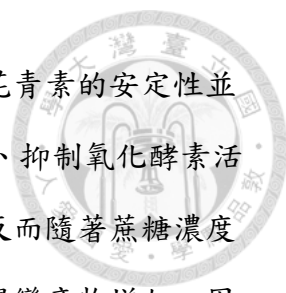
(Rein *et al.*, 2004)

(五) 氧氣和光線

Daravingas and Cain (1968) 指出氧氣對花青素是不利的因子，因氧的直接氧化作用或其氧化產物（如 H_2O_2 等）的間接氧化作用，均會促使花青素進行降解反應。勵 *et al.* (2002) 指出將楊梅果汁充入氮氣長時間儲藏時，總花青素含量是有氧環境條件時的兩倍。光線是促進植物花青素生合成的重要因子，但是花青素一旦自植物組織中被萃取出或以果汁或其他飲品型態存在時，光線會加速花青素裂解 (Markakis, 1982)。Kearsly and Rodriguez (1981) 將 pH 2.3 之花青素溶液照光及暗室組分別置於室溫下 24 小時，結果顯示暗室組之花青素含量高於照光組。

(六) 醣類

Debicki-Pospisil *et al.* (1983) 針對不同醣類對花青素降解之研究指出在酸性環境中，fructose、lactose、arabinose 相較於其他醣類更容易促進花青素降解，因 fructose 較易發生梅納反應，形成呋喃醛 (furfural) 及羥甲基呋喃醛 (hydroxymethylfurfural, 簡稱 HMF) 等反應性強的化合物，進而與花青素結合，加



速褪色。亦有研究指出未經加熱處理下，添加蔗糖有助於單體花青素的安定性並產生濃色效應 (hyperchromic effect)，其機制可能與降低水活性、抑制氧化酵素活性有關，且隨著濃度提昇效果越明顯；反之，若經加熱處理，反而隨著蔗糖濃度增加，產生呋喃醛及羥甲基呋喃醛或與胺基酸形成梅納反應之褐變產物增加，因而加速花青素的降解，反而變成不利的因子 (蔡，2004)。Tsai *et al.* (2004) 指出，蔗糖可降低花青素系統中水的移動性；隨著蔗糖的濃度增加，被束縛的水分子比例增加，降低水分參與花青素裂解的機會，因此較高濃度的糖，對花青素有較明顯的保色效果。在酒精溶液中，吳等人 (2006) 發現添加 12.5 % glucose 的桑椹浸漬酒，相較於添加 25 % glucose 及 25 % sucrose 於浸漬過程中所呈現的色澤較佳，且酒液褐變程度較低。

(七) 酵素

植物組織中含有某些酵素會影響花青素的穩定性，例如 glycosidase 及 polyphenoloxidase (PPO)。Glycosidase 會水解花青素上的糖苷鍵，形成不穩定之花青素配糖基，降低花青素在水溶液中的穩定性；PPO 則是會把酚類氧化成醌 (quinone) 後，再與花青素結合，此反應導致花青素降解並形成褐色物質 (Pifferi *et al.*, 1974)。因此，如能在加工過程中有效抑制酵素的活性，則可以減少花青素的分解，提高穩定性 (Garcia-Palazon *et al.*, 2004)。

(八) 金屬離子

多價金屬離子常會與 B 環上具有鄰位羥基之花青素 (如 cyanidin、petunidin、delphinidin) 結合形成錯鹽，而使花青素發生向紅效應 (bathochromic shift)，造成最大吸收波長向長波長偏移。Asen *et al.* (1972) 指出花青素與鋁或鐵等金屬離子形成複合物 (complexes) 時，在 pH 值 4.0 – 6.0 間仍能保持其穩定的紅色，而銅、鉀和錫等離子亦有相似的效果。Markakis (1982) 研究發現，花青素溶液中添加

Ca²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺ 等金屬離子形成共色複合物後，可以增加小紅莓汁中花青素的顏色穩定性。另外，Nebesky *et al.* (1969) 發現有銅離子存在下，會催化抗壞血酸的氧化，所產生之過氧化氫會加速花青素的裂解。Francis (1989) 指出鈣、鐵、鋁等金屬離子對蔓越莓汁中花青素具有保護作用，但和單寧形成之藍褐色錯鹽，其色澤掩蓋花青素的顏色，反而變成不利因子。因此金屬離子對花青素的影響依照不同環境及金屬種類而異。

(九) 抗壞血酸

抗壞血酸 (維生素 C) 廣泛存在於蔬果中，並且在加工上常被作為營養添加劑及抗氧化劑使用，但其存在會影響花青素穩定。Poei-Langston and Worlstad (1981) 研究發現，不論是否有氧氣的存在，抗壞血酸會直接與花青素在 C₄ 位置進行縮合反應，導致花青素褪色 (圖 2-5)。Debicki-Plstital *et al.* (1983) 指出，抗壞血酸在無氧的環境下會轉變成糠醛 (furfural) 促進 cyanidin-3-glucoside 褪色，並形成縮合物，造成花青素顏色消失。Garcia-Viguera *et al.* (1999) 發現在紅酒中添加 cysteine 或 thiourea 可以抑制抗壞血酸的氧化，因而減緩花青素的降解速率。

(十) 二氧化硫

在蔬果加工上，二氧化硫是常見的漂白及抑菌劑，於紅酒釀造過程中亦經常在發酵前添加亞硫酸鹽來抑制雜菌生長及多酚氧化酶的活性，且在熟成期間藉由可逆性的褪色反應，可以穩定花青素的顏色。其作用機制是攻擊花青素 C₂ 或 C₄ 位置，使花青素轉變為黃色，減少受外在因素影響而破壞，進一步加工時，以加熱或酸化去除二氧化硫，即可恢復花青素的顏色 (張 *et al.*, 1997)。Markakis (1982) 指出添加 30 ppm 的二氧化硫在櫻桃果汁中可以使多酚氧化酶失去作用，且可增強花青素上糖苷鍵的鍵結。Bakker *et al.* (1998) 研究指出，在紅酒熟成過程中，添加二氧化硫者能降低褐變反應。

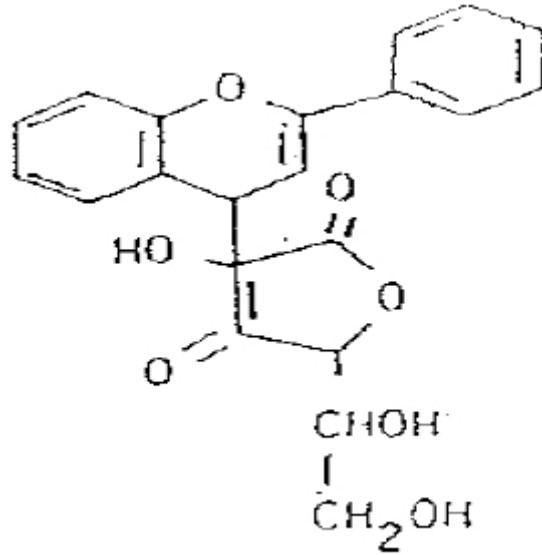


圖 2-5. 維生素 C 與花青素形成無色之產物。

Fig. 2-5. Colorless product from condensation of flavylum with ascorbic acid.

(Markakis, 1982)



第四節 花青素之共呈色及聚合作用


一、共呈色作用之定義與特性

花青素與有機分子或與其本身相互作用後，可能顏色加深且較為穩定，此現象稱為共呈色效應 (copigment effect) (Davies and Mazza, 1993)。參與作用的有機分子稱為共色素 (copigment)，該物質本身不一定具有顏色，包括：類黃酮、多酚化合物、生物鹼、胺基酸、有機酸等。學者指出花青素與其他共色物質形成之共呈色作用是植物體中顏色穩定的主要機制，比花青素單獨存在時，能呈現較深且穩定的顏色 (Mazza and Brouillard, 1990)。

二、共呈色作用的種類與發生機制

花青素共呈色作用依照作用的分子可以分成四類 (圖 2-6)，當共色物質為該花青素本身或其他花青素分子時，就會形成自體聚集作用 (self-association) 及分子內共呈色作用 (intramolecular copigmentation) (圖 2-6 A 及 B)；當作用分子為金屬離子時，就會形成金屬複合物 (metal complex) (圖 2-6 C)；而與含有未共用電子對之分子作用時，就會發生分子間共呈色現象 (intermolecular copigmentation) (圖 2-6 D)。共呈色作用最主要的作用機制為分子內共呈色及分子間共呈色 (Rein and Heinonen, 2004)，以下將針對這兩種進行說明。

花青素分子內共呈色作用，主要與花青素本身的結構有關，其參與共呈色的是花青素結構上所帶有的基團，如有機酸。Brouillard (1983) 認為在立體的空間中，花青素醞基部份的芳香族基與花青素 flavylum cation 的 C 環 (pyran ring) 產生了摺疊現象，將花青素分子包覆在其中，形成三明治型態的立體結構 (圖 2-7)，避免了 flavylum cation 上 C₂ 及 C₄ 位置因受到水分子的親核性攻擊，而轉變成無色的型態，因此提高花青素的穩定性。另有學者指出金屬花青素 (圖 2-8) 亦屬於分子內共呈色的一種 (Goto and Kondo, 1991)。



花青素分子間共呈色作用，主要是由花青素和共色物質間以微弱的力量結合而成，這些物質包含類黃酮、胺基酸、酚類、有機酸、生物鹼 (Boulton, 2001)。研究指出分子間共呈色作用的產生係因花青素的氫氧基與共色物質的芳香族氫氧基形成氫鍵，藉由這些氫鍵的產生，降低花青素與水或其他溶劑產生親核反應，因此提高花青素的穩定性，除了氫鍵外，花青素和共色分子在空間中相互堆疊 (如圖 2-9 A)，彼此產生吸引力(疏水性作用力、離子作用)，有助於共色作用的形成 (Chen and Hrazdina, 1981 ; Maccarone *et al.*, 1985)。Davies and Mazza (1993) 指出花青素本身的分子內共色作用因共價鍵結會比分子間共色作用更能有效地抵抗花青素受水分子攻擊而造成褪色的情形。

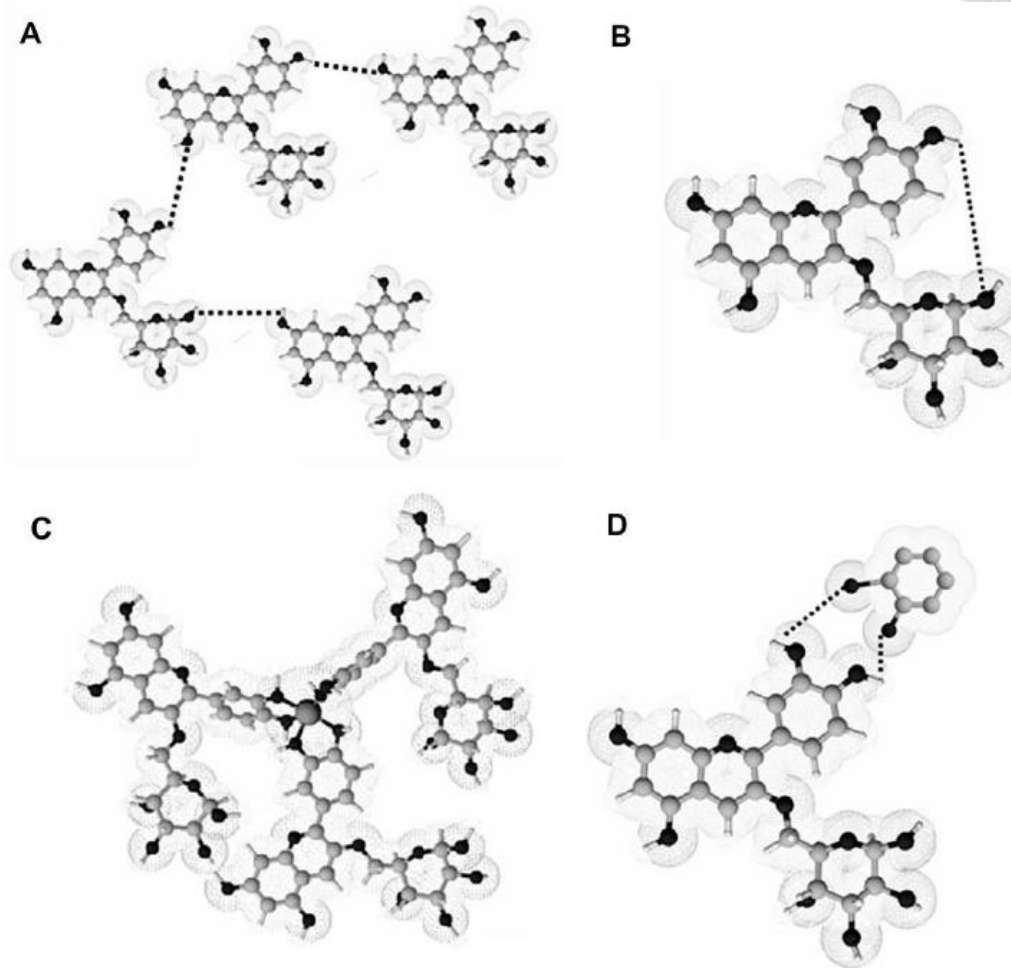


圖 2-6. 花青素共呈色作用 (A) 自體聚集作用 (B) 分子內共呈色作用 (C) 金屬離子複合物 (D) 分子間共呈色作用。

Fig. 2-6. Anthocyanins interaction (A) self-association, (B) intramolecular copigmentation, (C) metal complex, (D) intermolecular copigmentation.

(Araceli *et al.*, 2009)

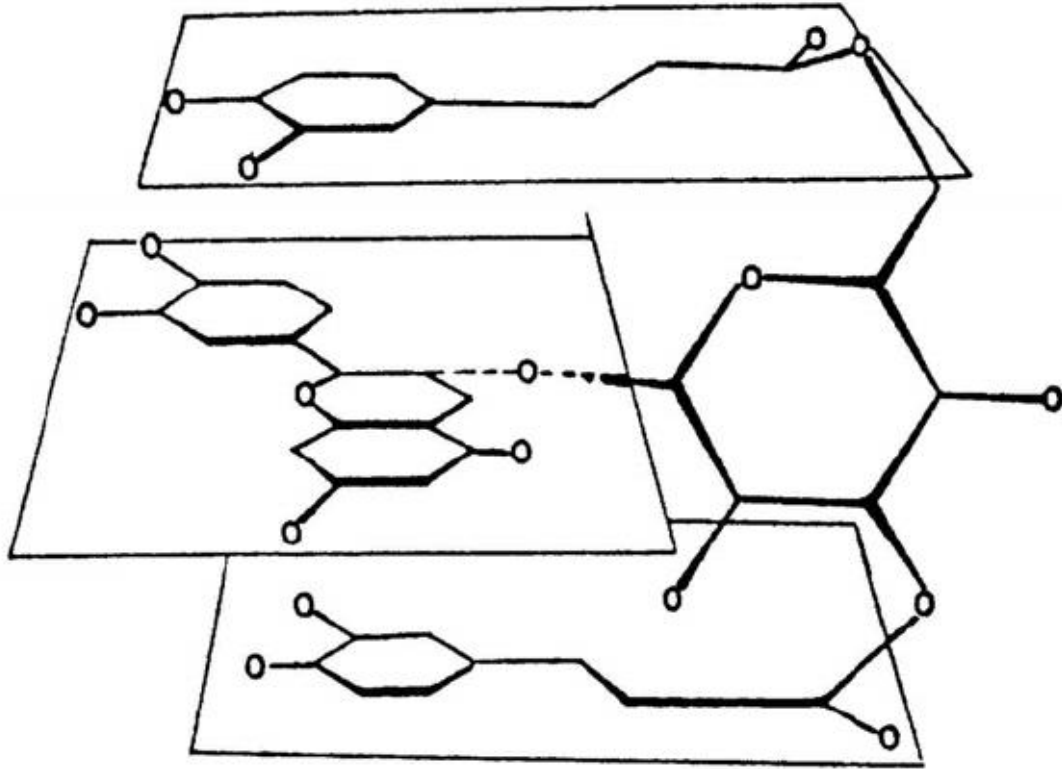


圖 2-7. 花青素分子內共呈色作用之機制圖。

Fig. 2-7. Model of intramolecular copigmentation.

(Brouillard *et al.*, 1983)

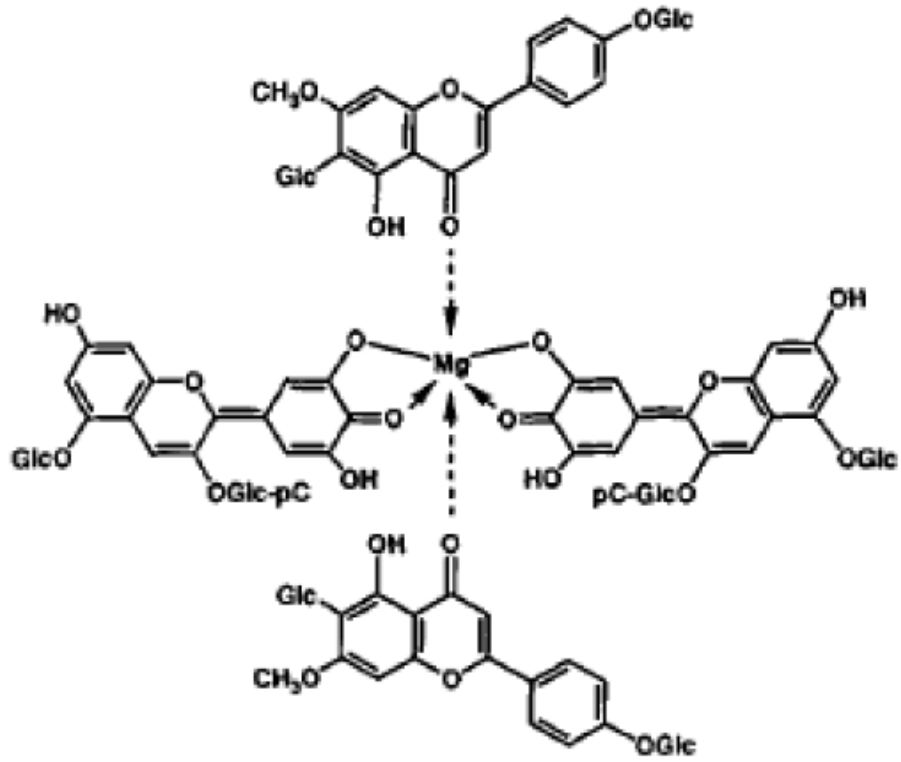


圖 2-8. 金屬花青素的構造。

Fig. 2-8. Structure of metalloanthocyanin.

(Goto and Kondo, 1991)

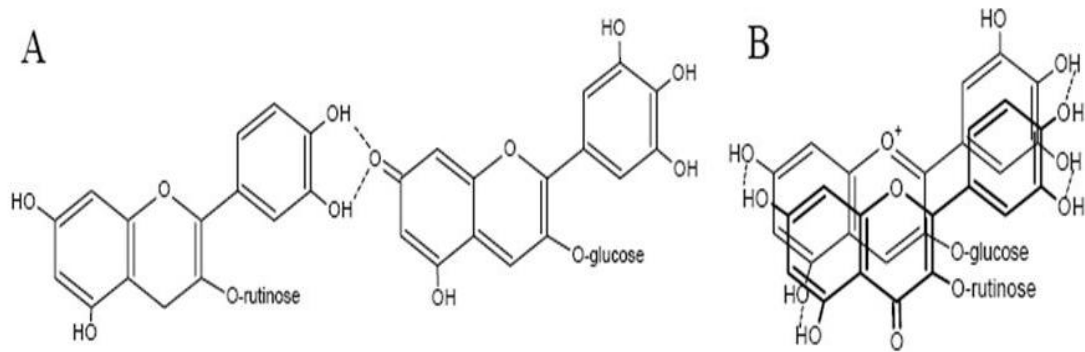


圖 2-9. 花青素 delphinidin-3-glucoside 與 rutin 藉由分子間共呈色作用形成之複合物 (A) 平面複合物 (B) 立體堆疊複合物。

Fig. 2-9. Two complex formations through intermolecular interactions between delphinidin-3-glucoside and rutin. (A) parallel complex and (B) interlocked complex.

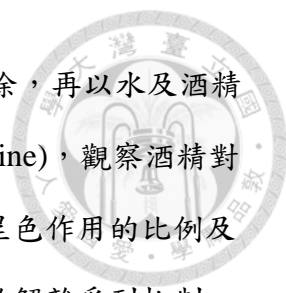
(Rein and Heinonen, 2004)



三、共呈色作用特性與影響因子

花青素共呈色作用是富含電子的系統，藉與共色物質形成 $\pi-\pi$ 複合物改變了 flavylum cation 的吸光特性，造成可見光範圍吸光值增加的濃色效應 (hyperchromic effect) 及最大吸收波長向長波長偏移 (bathochromic shift) (圖 2-10)，導致呈色的改變 (Brouillard *et al.*, 1989)。Brenes *et al.* (2005) 發現在葡萄汁模式中溶液中添加共色物質 rosmarinic acid 可使最大波長吸光值增加 178%，最大波長向右偏移 23 nm，有效提高溶液色澤之紅色度，且經添加 rosmarinic acid 的葡萄汁在貯存期間可保有較多之花青素。


影響共呈色作用的因子包含花青素的種類及濃度、共色物質的種類與濃度、pH 值及溶劑等，而影響花青素的因子同時也會影響共呈色作用。可以與花青素進行共呈色的分子很多，包含類黃酮、生物鹼、胺基酸、有機酸、核酸、多醣類、金屬甚至是花青素本身，但並非參與共呈色作用的共色物質對所有花青素皆有效，而是只對某一些花青素有作用但是對另外一些花青素卻可能無作用，且不同之花青素對同一個共色物質會有不同程度的反應，亦有研究指出 cyanidin-3-glucoside 的濃度是共呈色作用的限制因子，當濃度低於 3.5×10^{-5} M 時，就不會發生共呈色現象 (Robinson and Robinson, 1931； Scheffeldt and Hrazdina, 1978)。共色物質與花青素的莫耳濃度比例對於共呈色的影響很大，研究發現葡萄花青素添加 rutin，在 pH 3.2 時有共呈色作用發生，而且隨著莫耳濃度比例的增加，其共呈色作用效果越明顯，顯示共呈色作用可隨著花青素的濃度與共色物質對花青素的莫耳濃度比例增加而增加，但是當超過某一範圍時，可能會有飽和或反效果產生，導致吸光值下降，故並不是無限制增加 (Markakis, 1982)。另外，pH 對共呈色作用影響亦相當顯著，不同的花青素發生共呈色作用之最適 pH 亦不同，研究發現含 3-monoglucoside 的花青素最適 pH 在 3.5–4.2 之間，含 3,5-diglucoside 及 3-glucoside-5-glucoside 最適 pH 在 3.1 左右，而 3-acylglucoside 則在 pH 4.0–4.5 之間 (Williams and Hrazdina, 1979； Wilska-Jeszka and Korzuchowska, 1996)。



Gutierrez (2003) 將釀造好的紅酒減壓濃縮，將酒精完全蒸發移除，再以水及酒精還原成原本的體積，製備成 0–22 % 的還原酒 (reconstituted wine)，觀察酒精對共呈色作用之影響。結果發現隨著還原酒酒精濃度的增加，共呈色作用的比例及色澤皆隨之下降，作者認為當酒精含量增加時，溶液中氫離子的解離受到抑制，使 pH 值隨酒精增加而增加，因而抑制共呈色現象發生。此外，高濃度的酒精也可能會分解部分由共呈色作用形成之聚合物，而使得色澤較一般葡萄酒淺 (Tseng, 2006)，所以一般的酒精強化酒色澤較淺可能係由此而來。Kunsági-Máté *et al.* (2009) 實驗中發現在 0–20 % 酒精溶液中，共呈色複合物在 8 % 以下較易形成，隨著酒精度升高，溶液中酒精分子會包覆花青素分子，降低 flavylium cation 之水合作用，並使共呈色複合物所需的活化能增加而提高形成的困難度，相對之下穩定花青素單體的結構安定性，若在酒精濃度 8 % 以下先形成共呈色複合物，則隨酒精度上升而可穩定其結構。因此顯示酒精溶劑對花青素共呈色作用亦有著多方面的影響。

四、聚合作用 (polymerization)

學者提出，某些花青素與酚類物質如兒茶素 (catechin) 等結合會產生無色之聚合物，此聚合物很不穩定，是導致花青素顏色變淡的原因 (Markakis, 1982)。在果汁中，酚類化合物的減少有可能是因為殺菌過程使花青素受熱而降解、花青素與酚類化合物行共呈色作用或是花青素自身聚合因而導致含量的下降 (陳, 1992)。目前對於花青素聚合的研究多半來自於葡萄酒的呈色。Markakis (1982) 在實驗中發現葡萄酒色澤的穩定性決定於花青素與單寧的濃度比，當花青素含量多於單寧時，單寧本身的聚合反應進行較慢，反之當環境中有大量的單寧存在時，單寧的聚合會導致色澤偏向橙色，因此掩蓋了花青素本身的紅色。而當花青素與單寧進行縮合反應後，所產生之聚合物，對於環境中 pH 值降低及二氧化硫增加的影響較具安定作用，使酒液顏色由紅轉變為黃色的速率減緩，並且同時指出在葡



葡萄酒中，若單寧含量不足時，僅會有一小部分的花青素與單寧結合，反而會造成其他花青素單體不安定並加速裂解，而使酒液色澤呈現黃色，因此單寧與花青素的含量多寡亦會影響紅酒色澤之穩定。在一般水果組織當中所含的單寧以縮合單寧為主 (Joslyn and Goldstein, 1964)。縮合單寧為 flavan-3-ol (如 catechin 等) 或 flavan-3,4-diols (如無色花青素 leucoanthocyanidins 等) 以 C₄-C₈ 鍵結縮合而成的聚合物質 (Roux, 1972)。

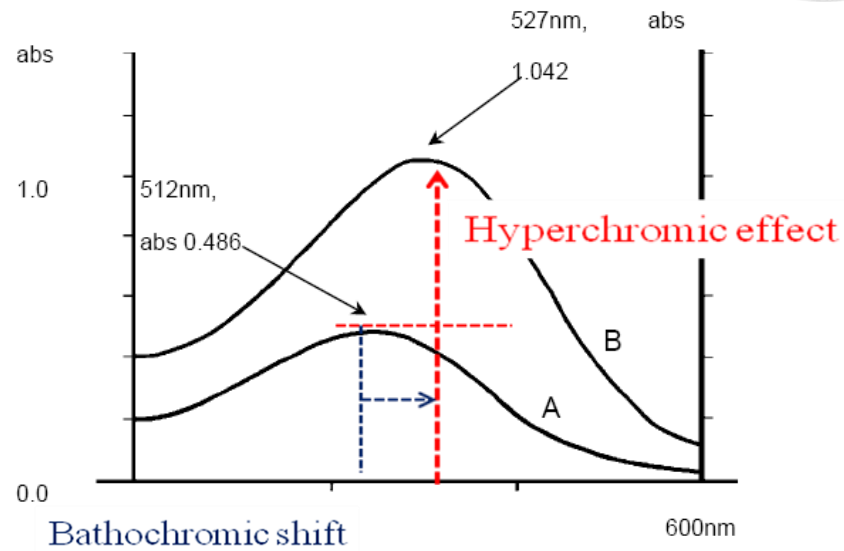


圖 2-10. 共呈色作用之濃色效應及向長波長偏移現象。

Fig. 2-10. Copigmentation as hyperchromic effect and bathochromic shift

(A) Cyanidin 3-glucoside, (B) Cyanidin 3-glucoside + rosmarinic acid.

(Wilska-Jeszka *et al.*, 1996)



第五節 花青素於乙醇溶液中相關研究

Mateus and Freitas de (2001) 實驗發現，波特酒 (port wines) 於熟成期間，主要的花青素：malvidin-3-glucoside、malvidin-3-acetylglucoside、malvidin-3-coumaroylglucoside 及其衍生色素 anthocyanin-pyruvic acid 之降解皆為一級反應。同時，花青素減少的情形比多酚物質降解更為明顯 (Bakker and Timberlake, 1986)。研究指出，50 mg malvidin-3-glucoside/L 模式溶液於 0、10、30、50 % 酒精濃度中之降解為一次反應 (first-order reaction)，同時降解速率隨著酒精濃度與反應溫度提高而增加 (Tseng *et al.*, 2006)。

酒液色澤方面，於乙醇模式系統中，花青素分子間會進行 self-association，彼此以 π - π 鍵結為立體堆疊複合物，使顏色強度增加 (Hoshino *et al.*, 1981)。新酒熟成期間，共呈色作用會加速色素的聚合反應並保護花青素避免氧化，造成酒中色素的濃縮與酒液增色現象；同時乙醇存在可促進向紅效應的發生。相較於酸性水的環境，花青素於酸化乙醇環境中，最大吸收波長有向長波長位移 25 nm 的趨勢 (Boulton, 2001)。Canals *et al.* (2005) 探討乙醇濃度對於葡萄酒熟成的影響，結果發現酒精濃度越高越有助於葡萄皮中花青素的萃取，但可能會分解部分由共呈色作用形成之聚合物，造成色澤強度下降。趙 (2005) 指出玫瑰浸漬酒於浸漬期間，影響色澤最重要的是花青素，於浸漬第二日便溶出大部分的花青素，之後隨著浸漬時間延長，酒的顏色品質反而下降，且褐變明顯，可能與多酚氧化酵素有關；若在高乙醇濃度 (55 – 60 %) 進行浸漬，則可得到較高花青素含量，且能降低褐變程度。



第六節 花青素降解之動力學分析

一、反應速率常數

降解動力學常用來研究特定成分於食品加工過程中之變化。目前為止已有許多文獻探討花青素之降解，結果顯示花青素於不同加工體系中，其降解動力學不盡相同。主要可分為：零級反應 (Tiwari *et al.*, 2009)、一級反應 (Cemerog̃lu *et al.*, 1994; Garzo ́n *et al.*, 2002)、二級反應 (Ozkan *et al.*, 2005)，當中又以一級反應佔大多數。而一般動力學的反應速率可用反應物濃度 [c] 配合時間 t 及反應級數 m 構成 (Labuza *et al.*, 1982; Ramaswamy *et al.*, 1989; Boekel, 1996)，式子如下：

$$-d [C]/d t = k [C]^m \dots\dots\dots(1)$$

若根據文獻指出花青素降解為一級反應時，可將 (1) 式表示為下列式子

$$\ln (C_t/C_0) = -kt \dots\dots\dots(2)$$

C_0 ：花青素起始濃度

C_t ：反應 t 時間後之花青素濃度

t：反應時間

k：反應速率常數



二、半衰期與活化能

(一) 半衰期

半衰期為反應物濃度降至初始濃度一半時的時間，由 (2) 式可得知：

$\ln 0.5 = -k T_{1/2}$ ，或：

$$T_{1/2} = -\ln 0.5 k^{-1} \dots\dots\dots(3)$$

(二) 活化能

反應速率常數與活化能之間的關係可由 Arrhenius 方程式描述：

$$k = Ae^{-Ea/RT} \dots\dots\dots(4)$$

k ：溫度 T °K 時的反應速率常數

A ：指數前因子 (pre-exponential factor)

Ea ：活化能 (kcal/mol)

R ：氣體常數 (1.987 cal/mol °K 或 8.314 J/mol °K)

T ：絕對溫度 (°K)

將不同反應溫度下之反應速率常數取自然對數後 ($\ln k$) 對反應的絕對溫度的倒數 ($1/T$) 作圖，該直線之斜率為 $-Ea/R$ ，並可計算出活化能 Ea 。

第三章 材料與方法



第一節 實驗材料

1. 紫米：由台南市永康區宜立禾米舖購買之秈糯品種糙紫米，外觀呈現紫黑色，長度約 7.0 mm，長寬比為 4.2，屬於細長型。
2. 精製酒精 (95 % vol.)：食用級，購自台灣菸酒公司林口酒廠。

第二節 實驗試藥

1. Absolute ethanol for analysis、Acetaldehyde、Hydrochloric acid、Potassium Chloride、Potassium Persulphate、Sodium Acetate、Sulfuric acid、Trolox 購自德國 Merck 公司。
2. ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]、Acetic acid for analysis、Ascorbic acid、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、Folin-Ciocalteu phenol reagent、Gallic acid、Sodium Carbonate 購自美國 Sigma 公司。
3. Sodium Hydroxide 購自日本林純製藥工業株式會社。



第三節 儀器設備

1. 酸鹼測定儀 (Hi 9017 Microprocessor pH Meter, HANNA Instruments, Singapore)
2. 分光光度計 (Model Helios Alpha, Spectronic Unicam, Cambridge, England)
3. 高速離心機 (RC-5C-Plus, Sorvall, Newtown, U.S.A.)
4. 純水製造裝置 (Synergy, Millipore, Molsheim, France)
5. 手持式糖度曲折計 (N1, Atago, Tokyo, Japan)
6. 色差儀 (Model TC-1500 DX color and color difference meter ZE2000, Nippon Denshoku industries Co., Ltd., Tokyo, Japan)
7. 天平 (BJ1500S, Sartorius, Gottingen, Germany)
8. 微量天平 (TB-214, Denver Instrument, Gottingen, Germany)
9. 電熱式培養箱 (YIH DER, LM-590R, Taiwan)

第四節 實驗架構

實驗架構主要分成兩部分，第一部分先以反應曲面法探討紫米花青素萃取之最適條件範圍。試驗設計以浸漬乙醇濃度 (X1)、pH 值 (X2) 及浸漬時間 (X3) 為操作條件之三變數。根據三變數三階層因子的中心旋轉組合設計，共有 15 個實驗組，含中心點 3 個重複，試驗後分析總花青素含量，其結果經統計軟體分析，探討最適條件範圍。第二部分則參考第一部分之最適條件，調配不同乙醇濃度 (10 %、20 %、30 %、40 % 及 50 %) 及不同酸鹼值 (1、2、3、4、5、6、7、8) 的紫米花青素乙醇溶液，觀察在不同溫度下 (25 °C、40 °C 和 55 °C) 對花青素穩定性及呈色表現於儲藏期間之影響。

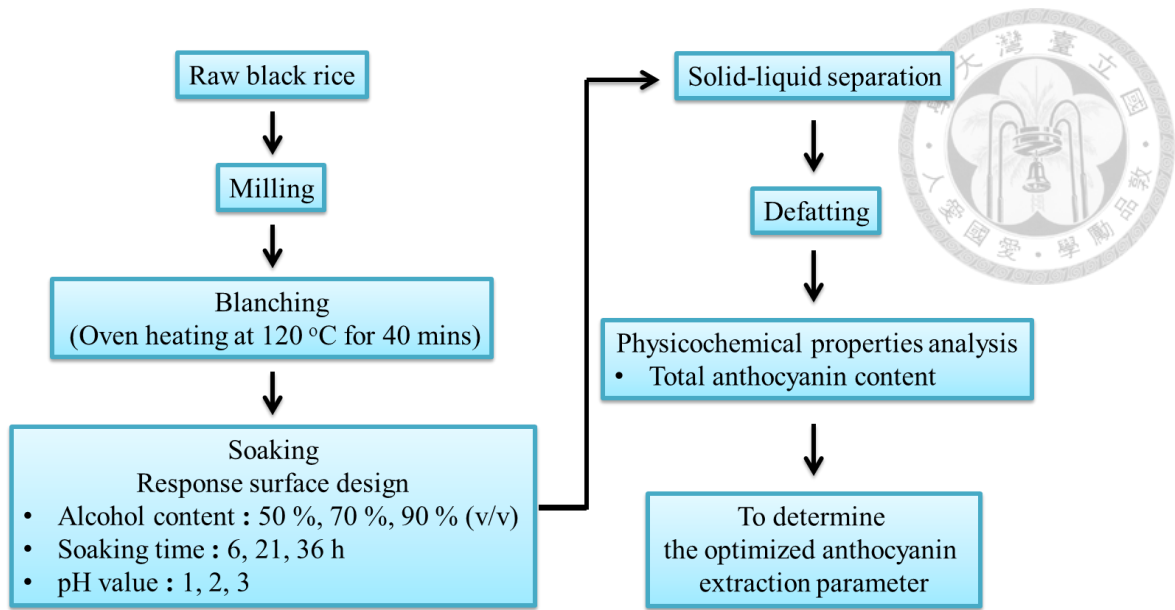


圖 3-1. 紫米花青素萃取最適化之實驗架構。

Fig. 3-1. Experiment design for the extraction optimization of black rice anthocyanin.

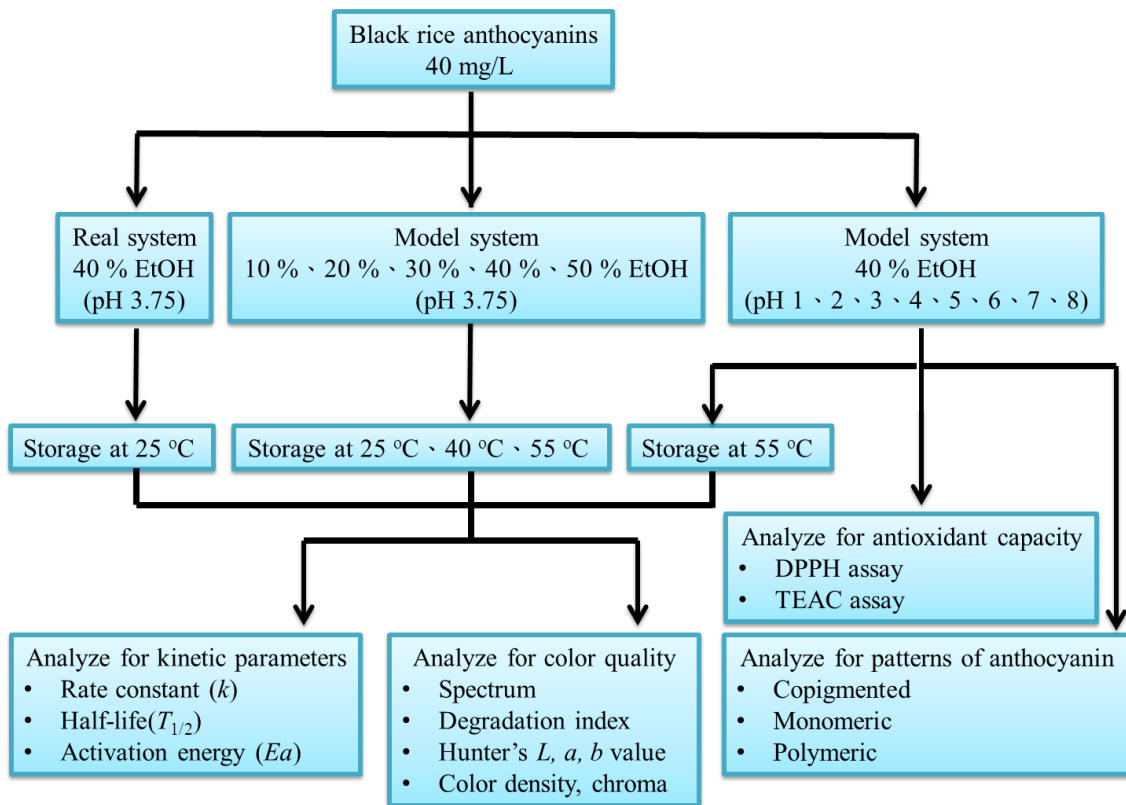


圖 3-2. 紫米花青素在乙醇溶液中顏色表現之實驗架構。

Fig. 3-2. Experimental design for color phenomena of black rice anthocyanin in ethanolic solutions.



第五節 實驗方法

一、紫米之前處理

將糙紫米碾白後保留米糠 (經過精米後的紫米呈現乳白色)，隨即用熱風乾燥 (120°C, 40 分鐘) 對米糠進行殺菁提升儲藏安定性 (鍾, 2007)，並分裝密封於夾鏈袋中 (500 g/包)，置於 -20 °C 冷凍庫備用。

二、紫米花青素之萃取流程

紫米花青素萃取之流程如圖 3-1，將經過前處理的紫米米糠，依照米糠重：乙醇溶液重為 1：3 於室溫下進行浸漬，接著進行離心、過濾 (Whatman No. 1 filter paper)，將固液分離後，製成紫米花青素萃取液，裝入褐色瓶避光貯存於 -20 °C 備用。

三、紫米花青素萃取之最適條件探討

試驗設計使用反應曲面法 (response surface methodology, RSM)，以浸漬乙醇濃度 (X1)、pH 值 (X2) 及浸漬時間 (X3) 為操作條件之三變數。根據三變數三階層因子的中心旋轉組合設計 (表 3-1)，共有 15 個實驗組，含中心點 3 個重複 (表 3-2)，試驗後分析各組合之總花青素含量及色澤表現，其結果經統計軟體分析，探討最適條件範圍。其結果以 SAS (statistic analysis system) 電腦套裝軟體中 RSREG (response surface regression) 程式進行反應曲面分析 (Giovanni, 1983)，以浸漬乙醇濃度 (X1)、pH 值 (X2) 及浸漬時間 (X3) 為條件變數，而總花青素含量 (Y1) 為反應曲面性狀，求出如下列之三變數二次多項式：

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

(a 表示各項次之係數)

並進行變異數分析 (ANOVA) 以得到總迴歸係數 (R^2)、欠合度 (lack of fit) 顯著性、複迴歸方程式之各項係數及各因子對反應觀測值之顯著程度，再將求得之迴歸方程式利用統計與繪圖軟體繪製反應曲面圖，以探討紫米花青素最適之萃取條件。

四、紫米花青素模式溶液之製備

利用絕對酒精、紫米花青素萃取液、NaOH、HCl 配製成不同乙醇濃度 (10 %、20 %、30 %、40 % 及 50 %) 之 pH 3.75 花青素模式溶液 (40 mg anthocyanin/L) 及不同 pH (1、2、3、4、5、6、7、8) 之 40 % EtOH 之花青素模式溶液 (40 mg anthocyanin/L)。

五、乙醇系統下花青素反應動力學分析

紫米花青素模式溶液製備後，分裝於 4.5 mL 的褐色瓶中，以附有鐵弗龍墊片的蓋子旋緊密封，避免乙醇蒸發，接著於 25 °C、40 °C 和 55 °C 烘箱中儲存進行安定性試驗，並定期取樣分析，利用酸鹼度差額法 (pH - differential method) (Fuleki *et al.*, 1968) 測定總花青素含量 (圖 3-2)。

六、儲藏期間紫米花青素乙醇溶液顏色品質之變化

紫米花青素模式溶液製備後，分裝於 15 mL 的褐色瓶中，以附有鐵弗龍墊片的蓋子旋緊密封，避免乙醇蒸發，接著於 25 °C、40 °C 和 55 °C 烘箱中儲存進行安定性試驗，並定期取樣分析，觀察儲藏期間紫米花青素乙醇溶液之色澤安定性，以找出適當之儲存條件。分析項目包含花青素裂解指數 (degradation index)、Hunter's L, a, b 值、全波長掃描、色澤密度 (color intensity)、彩度 (chroma)、花青素型態 (anthocyanin patterns) 等 (圖 3-2)。



表 3-1. 三變數-三層階反應曲面設計之操作條件變數及層階

Table 3-1. Process variables and levels in the three variables – three levels response surface design

| Variable | Symbol | Coded-variable level | | |
|------------------|--------|----------------------|----|----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| Ethanol (vol. %) | X1 | 50 | 70 | 90 |
| pH | X2 | 1 | 2 | 3 |
| Time (hr) | X3 | 6 | 21 | 36 |



表 3-2. 三變數-三層階之中心旋轉組合設計

Table 3-2. Three variables-three levels of rotatability central composite design arrangement.

| Runs | Response value | | | Code value | | |
|------|---------------------|----|--------------|------------|----|----|
| | Ethanol (vol. %) | pH | Time (hr) | X1 | X2 | X3 |
| 1 | 50 | 1 | 21 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | 90 | 1 | 21 | 1 | -1 | 0 |
| 3 | 70 | 1 | 36 | 0 | -1 | 1 |
| 4 | 70 | 1 | 6 | 0 | -1 | -1 |
| 5 | 50 | 2 | 36 | -1 | 0 | 1 |
| 6 | 90 | 2 | 36 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | 90 | 2 | 6 | 1 | 0 | -1 |
| 8 | 50 | 2 | 6 | -1 | 0 | -1 |
| 9 | 70 | 2 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 70 | 2 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 70 | 2 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 50 | 3 | 21 | -1 | 1 | 0 |
| 13 | 90 | 3 | 21 | 1 | 1 | 0 |
| 14 | 70 | 3 | 36 | 0 | 1 | 1 |
| 15 | 70 | 3 | 6 | 0 | 1 | -1 |



第六節 分析方法

一、pH 值

利用 pH meter (Hi 9017 Microprocessor pH Meter, HANNA Instruments, Singapore) 於室溫下測定。

二、總花青素含量分析 (total anthocyanin content analysis)

參照 Fuleki *et al.* (1968) 的酸鹼度差額法並加以修改。

(一) 緩衝溶液之配置

pH 1.0 buffer : 0.2 N KCl - 0.2 N HCl (25 : 67, v/v)

pH 4.5 buffer : 1 N sodium acetate – 1 N HCl – water (100 : 60 : 90, v/v/v)

(二) 操作方法

待測樣品經離心後，取兩份 2.5 mL 上清液以緩衝溶液做適當稀釋，並調整 pH，使一溶液 pH 為 1.0，另一溶液為 pH 4.5，兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A_1 (pH 1.0) 與 A_2 (pH 4.5)，再以下列公式計算酒液中所含總花青素含量 (mg/100 mL)：

$$\frac{[(A_1 \times F_1 - A_2 \times F_2) \times 1000 / V \times M_w]}{\epsilon}$$

F：稀釋體積 (F_1 : 50 mL ; F_2 : 25 mL)

M_w ：花青素分子量以 cyanidin-3-glucoside (484 g/mol) 計算

ϵ ：花青素之莫耳吸光係數 (2.96×10^4)

V：樣品體積 (2.5 mL)



三、花青素裂解指數測定 (degradation index, 簡稱 DI)

取樣品適量，以分光光度計 (UV/VIS 8500 double-beam spectrophotometer, LabAlliance) 測得波長 420 nm 及 520 nm 之吸光值，由 A_{420}/A_{520} 求得 DI 值，代表花青素裂解指數 (Sistrunk and Gascoigne, 1983)。

四、光譜分析 (spectrum analysis)

樣品以分光光度計 (UV/VIS 8500 double-beam spectrophotometer, LabAlliance) 進行光譜掃描分析，測定其在 380 – 700 nm 之吸收光譜。

五、色澤分析

利用色差儀 (Model TC-1500 DX color and color difference meter, Tokyo, Denshoku Co., LTD., Tokyo, Japan) 測定樣品之 Hunter's L, a, b 值。穿透式標準白板是 $X: 90.85$ 、 $Y: 92.85$ 、 $Z: 103.12$ 。(L: 表示亮度, 100 為最亮; +a: 表示紅色度; -a: 表示綠色度; +b: 表示黃色度; -b: 表示藍色度)。

六、彩度 (chroma)

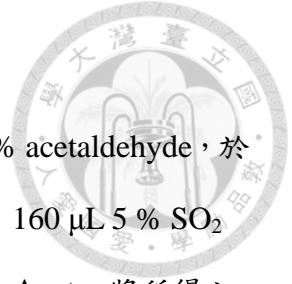
利用色差儀測定並由公式計算 $\text{Chroma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$ 得知。彩度可描述酒液顏色的鮮明程度，其值越大表示顏色越具飽和色彩。

七、色澤密度 (color density)

參考 Wrolstad (1976) 之方法。將樣品經適當稀釋並混合均勻後，以分光光度計測定波長 420 nm、700 nm 與最大吸收波長之吸光值，經下列公式計算求得色澤密度：

$$\text{Color density} = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})$$

該數值可表示色澤的濃厚或深淺程度，當色澤密度越高，表示樣品的色澤較深。



八、花青素型態測定 (anthocyanin patterns analysis)

參照 Boulton (1998) 的方法，取樣品 2 mL 加入 20 μ L 10 % acetaldehyde，於室溫下靜置 45 分鐘，測 A_{520} 即 A_{acet} 。另取樣品 2 mL 加入 160 μ L 5 % SO_2 (w/v)，測 A_{520} 即 A_{SO_2} 。另外再直接測花青素樣品之 A_{520nm} 即 A_{ext} 。將所得之吸光值經由以下公式計算，求得 copigmented、monomeric 及 polymeric 花青素之百分比：

$$\% \text{ copigment} = [(A_{acet} - A_{ext}) / A_{acet}] \times 100$$

$$\% \text{ monomeric} = [(A_{ext} - A_{SO_2}) / A_{acet}] \times 100$$

$$\% \text{ polymeric} = [A_{SO_2} / A_{acet}] \times 100$$

九、總酚類化合物 (total phenol content analysis)

參考 Sato *et al.* (1996) 之方法予以修飾。取 100 μ L 樣品或不同濃度 (50 – 800 μ g/mL) 之 gallic acid 作為標準品，加入 400 μ L 的 7.5 % Na_2CO_3 溶液混合均勻，再加入 500 μ L Folin & Ciocalteu's phenol reagent 振盪混合，室溫下靜置 30 分鐘後，以分光光度計檢測波長 760 nm 下之吸光值。將測試樣品的吸光值代入標準曲線的迴歸方程式中，換算每毫升樣品中所含 gallic acid 之毫克數。當吸光值愈高代表樣品所含總酚類化合物含量愈多。

十、DPPH 自由基清除能力測定 (DPPH radical scavenging activity)

參考 Blois (1958) 之方法予以修飾。取不同濃度 (31.25 - 125 μ M) 之正控制組 ascorbic acid 或 200 μ L 樣品，分別加入 200 μ L 現配製的 150 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 乙醇溶液，振盪後於暗室靜置 30 分鐘，以分光光度計檢測波長 517 nm 下之吸光值。當吸光值愈低代表樣品捕捉 DPPH 自由基之能力愈強，即具有良好的提供氫原子之效力。

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = [1 - (\text{樣品的 } A_{517} / \text{未添加樣品之控制組的 } A_{517})] \times 100$$

十一、總抗氧化能力測定 (trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

參考 Miller *et al.* (1993) 所提出的方法予以修飾。以 PBS 配製 ABTS⁺ 離子溶液(系統內 ABTS 及 potassium persulphate 濃度分別為 7 mM 與 2.45 mM) 混合均勻後，於室溫置於暗室反應 16 小時 (用力搖勻至少 2 小時)，使其產生安定藍綠色之 ABTS⁺ 陽離子自由基。然後再以 40 % 乙醇稀釋使其成為在分光光度計 734 nm 下之吸光值為 0.75 ± 0.05 的 ABTS⁺ 離子溶液。取 100 μ L 樣品或不同濃度 (0.3 – 1.2 mM) 之標準品 Trolox 乙醇溶液，加入 2 mL ABTS⁺ 離子溶液，混勻後進行反應 6 分鐘，以分光光度計檢測波長 734 nm 下之吸光值。將測試樣品的吸光值代入標準曲線的迴歸方程式中，換算相當於 Trolox (mM) 之濃度。當吸光值愈低代表樣品清除自由基之能力愈強，抗氧化效果越佳。

第七節 資料處理及數據分析

一、統計分析

本實驗數據藉由 SAS (statistical analysis system) 之套裝軟體進行變方分析 (the analysis of variance, ANOVA) 與鄧肯式多變域分析 (Duncan's multiple range test) 比較各組間的差異，以 $p < 0.05$ 為達顯著差異。

二、繪圖

所有圖形皆以 Sigmaplot 10.0 軟體描繪。



第四章 結果與討論

第一節 以反應曲面法 (RSM) 探討萃取之最適條件

本實驗以三變數三階層因子探討紫米花青素萃取之最適條件範圍，以浸漬乙醇濃度、pH 值及浸漬時間為條件變數，各變數各階層所對應之總花青素含量如表 4-1 所示，而後以統計軟體 SAS (statistic analysis system) 中的 RSREG (response surface regression) 程式進行反應曲面分析，依迴歸分析所得之結果，求出下列之三變數二次多項方程式：

$$\begin{aligned} \text{Total anthocyanin (mg/100 mL)} = & \\ & 33.407 - 6.952 X_1 - 3.109375 X_2 + 3.237375 X_3 - 0.665 X_1X_2 + 8.1155 X_1X_3 \\ & - 0.63775 X_2X_3 - 5.017625 X_1^2 + 9.054625 X_2^2 - 3.911375 X_3^2 \end{aligned}$$

圖 4-1(A) 至 4-1(C) 為浸漬紫米米糠中乙醇濃度與 pH 值對總花青素含量之反應曲面圖，其結果顯示當浸漬時間由 6 小時提升到 21 及 36 小時，花青素的含量並無明顯的差異，萃取的效果變化並不大，這代表浸漬 6 小時就已經能將紫米米糠中大部分的花青素萃取出來，故在紫米花青素萃取效果最佳的前提下，建議將紫米米糠與乙醇依 1:3 (g/mL) 比例於室溫下浸漬 6 小時，且乙醇濃度為 63.2–64.4%，pH 值為 1.78–1.88，預期可得到紫米花青素含量 43.27–45.35 mg/100 mL。



表 4-1. 不同浸漬條件下酒液中總花青素含量變化

Table 4-1. The change of total anthocyanin content with various soaking conditions

| Runs | Ethanol (vol. %) | pH | Time (hr) | Anthocyanins (mg/100 mL) |
|------|---------------------|----|--------------|-----------------------------|
| 1 | 50 | 1 | 21 | 37.70 ± 0.82 ^b |
| 2 | 90 | 1 | 21 | 28.90 ± 0.75 ^d |
| 3 | 70 | 1 | 36 | 42.50 ± 1.06 ^a |
| 4 | 70 | 1 | 6 | 43.50 ± 0.87 ^a |
| 5 | 50 | 2 | 36 | 36.90 ± 0.81 ^b |
| 6 | 90 | 2 | 36 | 25.80 ± 0.66 ^e |
| 7 | 90 | 2 | 6 | 0.43 ± 4.91 ^f |
| 8 | 50 | 2 | 6 | 38.03 ± 0.80 ^b |
| 9 | 70 | 2 | 21 | 35.90 ± 0.50 ^b |
| 10 | 70 | 2 | 21 | 37.30 ± 0.35 ^b |
| 11 | 70 | 2 | 21 | 37.60 ± 0.64 ^b |
| 12 | 50 | 3 | 21 | 36.20 ± 0.87 ^b |
| 13 | 90 | 3 | 21 | 25.10 ± 1.25 ^e |
| 14 | 70 | 3 | 36 | 32.10 ± 1.20 ^c |
| 15 | 70 | 3 | 6 | 36.00 ± 1.37 ^b |

^{a-f} letters within the same column differed significantly ($p < 0.05$)

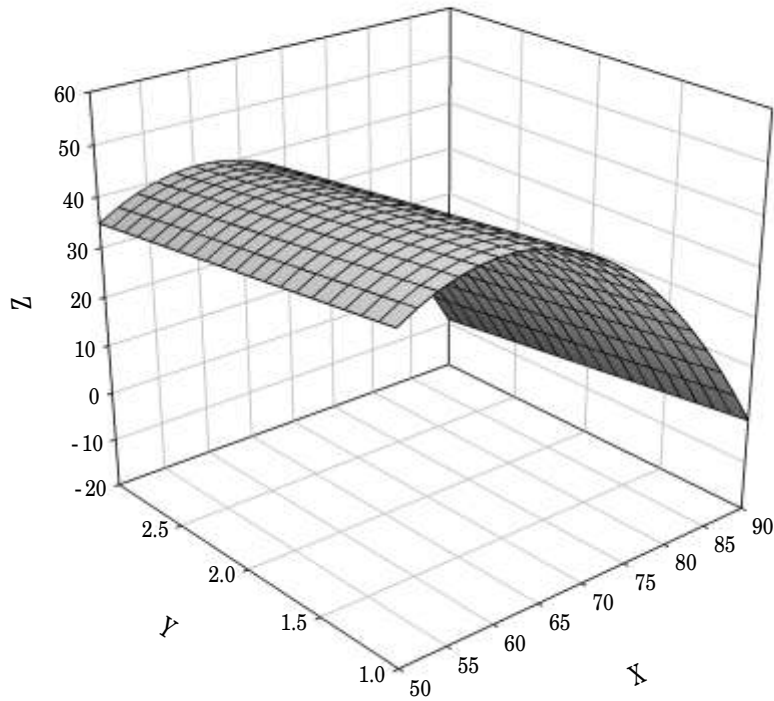


圖 4-1(A). 浸漬 6 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之反應曲面圖。

Fig. 4-1(A). The response surface plot for total anthocyanins at various ethanol concentrations and pH values after soaking for 6 hours.

[X = alcohol content (vol. %), Y = pH value, Z = total anthocyanins (mg/100 mL)]

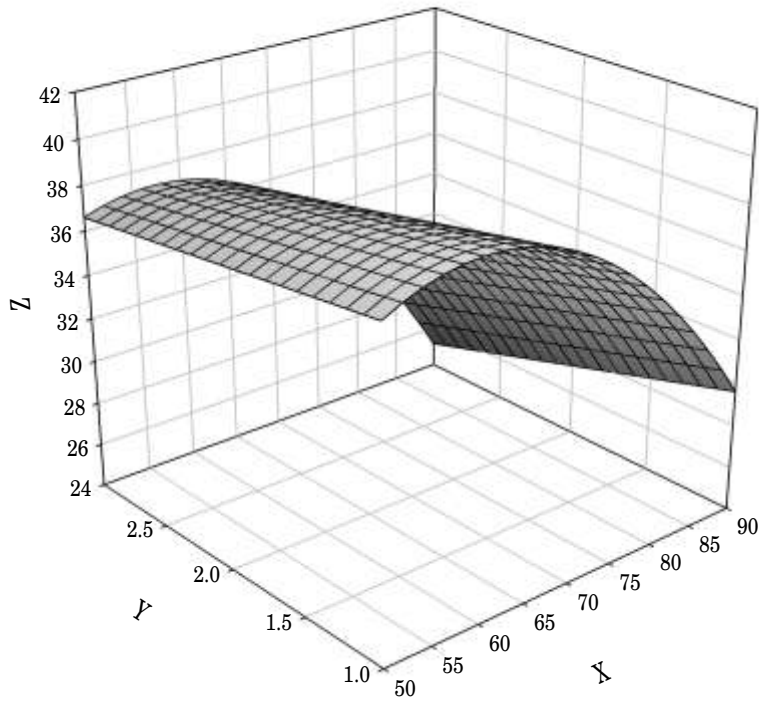


圖 4-1(B). 浸漬 21 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之反應曲面圖。

Fig. 4-1(B). The response surface plot for total anthocyanins at various ethanol concentrations and pH values after soaking for 21 hours.

[X = alcohol content (vol. %), Y = pH value, Z = total anthocyanins (mg/100 mL)]

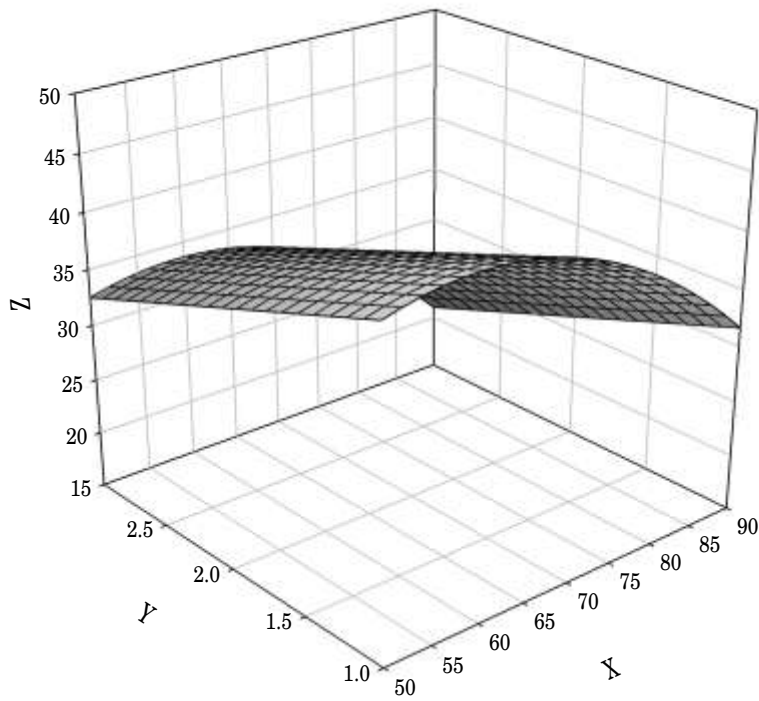


圖 4-1(C). 浸漬 36 小時後乙醇濃度與酸鹼值對總花青素含量之反應曲面圖。

Fig. 4-1(C). The response surface plot for total anthocyanins at various ethanol concentrations and pH values after soaking for 36 hours.

[X = alcohol content (vol. %), Y = pH value, Z = total anthocyanins (mg/100 mL)]



第二節 花青素於乙醇溶液中降解反應動力學之探討

一、花青素模式溶液降解反應級數之探討

反應動力學可以用來預測花青素在食品加工過程或是儲存過程中損失的速率，對於維持良好的食品品質十分重要。藉由動力學分析所得的反應速率常數 (rate constant, k)、半衰期 ($T_{1/2}$) 與反應活化能 (activation energy, E_a)，可了解花青素於不同濃度乙醇溶液中降解的情形。

本實驗根據 RSM 試驗設計之最適條件 (63.8 % EtOH, pH 1.83, 6 hr) 所萃取得到的紫米花青素，分別配製不同乙醇濃度之花青素模式溶液 (10 %、20 %、30 %、40 %、50 % EtOH, pH 3.75, 40 mg black rice anthocyanin/L)，儲存於 55 °C 進行加速試驗，觀察紫米花青素於乙醇溶液中之降解情況。圖 4-2 為不同乙醇濃度之花青素模式溶液儲藏於 55 °C 下 0 至 10 天的花青素殘留率變化。由實驗結果得知，隨著儲藏時間的增加，紫米花青素含量減少，殘留率隨著乙醇濃度的不同而有差異，大致上是隨著乙醇濃度的提高而增加。接著將花青素相對含量取自然對數後與反應時間作圖，得一直線 (圖 4-3)。因此推測在 10–50 % 乙醇模式溶液中，紫米花青素之降解為一級反應 (first-order reaction)。目前有許多研究報告指出花青素於水相系統中的降解屬於一級反應 (Cemeroglu *et al.*, 1994; Mateus *et al.*, 2001; Garzón *et al.*, 2002)，而於乙醇系統中亦屬於一級反應 (Markakis, 1982; Tseng, 2006; Hsiao, 2011)，本實驗的結果與上述文獻類似。

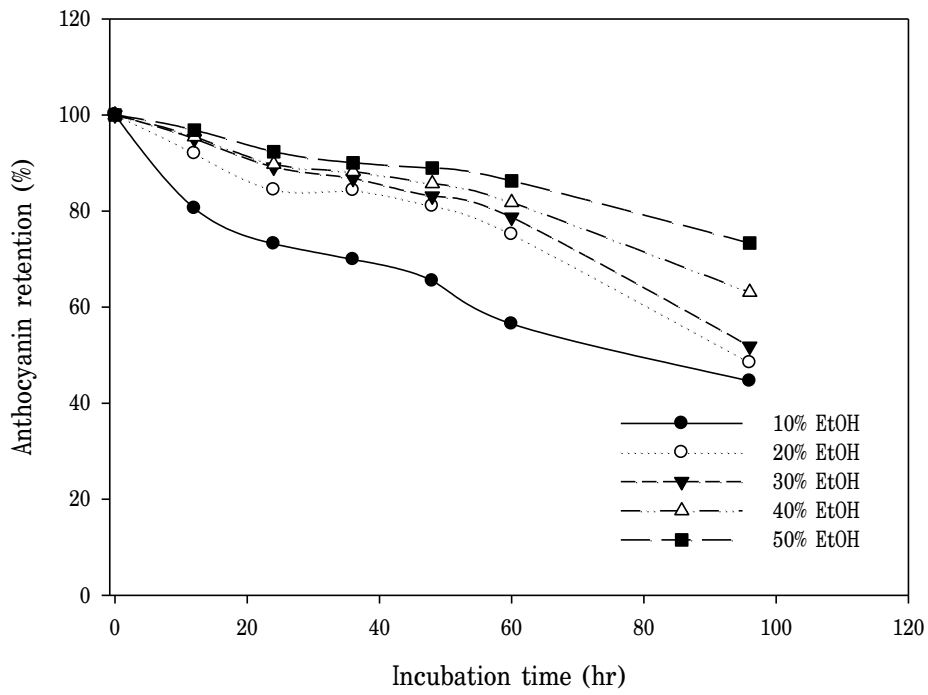


圖 4-2. 紫米花青素於乙醇模式溶液中之殘留率變化。

Fig. 4-2. The retention of black rice anthocyanin in ethanolic solutions (pH 3.75) during incubation at 55 °C.

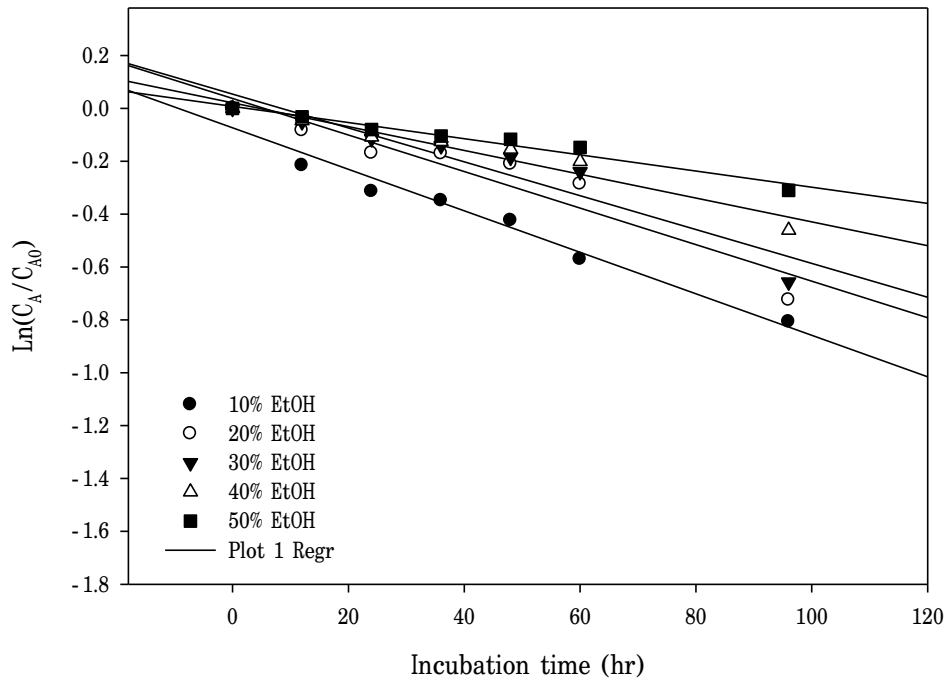
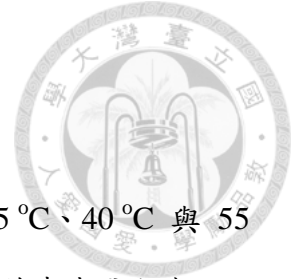


圖 4-3. 紫米花青素於乙醇模式溶液之一級降解反應動力學。

Fig. 4-3. The first-order kinetics plots for the degradation of black rice anthocyanin in ethanolic solutions (pH 3.75) during incubation at 55 °C.



二、花青素模式溶液之降解反應速率常數

(一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之降解反應速率常數

圖 4-4(A) 至 4-4(E) 為不同乙醇濃度之模式溶液儲藏於 25 °C、40 °C 與 55 °C 之紫米花青素殘留率變化。由實驗結果得知，儲藏溫度越高花青素殘留率越低。紫米花青素在乙醇系統下之降解為一級反應，將不同溫度下所得之花青素相對含量取自然對數後與反應時間做圖，得到的直線其斜率即為此降解反應之速率常數 (rate constant, k)，如圖 4-5(A) 至 4-5(E)。當斜率越大，表示 k 越大，而花青素降解也越快速。

由實驗結果得知，10–50 % 的乙醇模式溶液於 55 °C 的環境儲藏下，花青素降解反應速率常數較 40 °C 及 25 °C 時還高，表示溫度越高花青素降解越快。由於溫度升高導致分子運動的速度加快，較快的速度具有較高的動能，使得有效碰撞的比例提高，而加快反應速率。此結果與許多學者的實驗結果相似 (Adams, 1973; Palamidis and Markakis, 1975; Cao, 2009)，顯示溫度是影響花青素安定性的一個重要因子。

表 4-2 顯示，模式溶液於不同儲藏溫度下，乙醇造成水活性不同程度之降低會對花青素降解速率產生影響，在 55 °C 及 40 °C 時，降解反應速率常數隨著乙醇濃度提高而減少 (50 % EtOH < 40 % EtOH < 30 % EtOH < 20 % EtOH < 10 % EtOH)；而在 25 °C 時，則是隨著乙醇濃度提高而增加 (50 % EtOH > 30 % EtOH > 10 % EtOH)。Bronnum-Hansen *et al.* (1985) 指出 elderberry 花青素 (55 °C, pH 3.0) 會隨著水活性之提高，而加速降解反應，當水活性到達 0.5 以上時，花青素降解更加明顯。Garzón *et al.* (2001) 以甘油模式系統 (25 °C, pH 3.4) 證明，pelargonidin-3-glucoside、pelargonidin-3-sophoroside 及其醯化衍生色素之降解速率均隨著水活性之提高而增加。上述文獻的結論皆與 55 °C 及 40 °C 時乙醇模式溶液中紫米花青素的反應速率常數變化趨勢相同，隨著水活性提高，而加速花青素

降解。Tseng (2006) 以甘油及乙醇模式系統 (95 °C, pH 3.5) 研究顯示，葡萄花青素的降解速率隨著水活性降低而增加，此結論與 25 °C 時乙醇模式溶液中紫米花青素的反應速率常數變化趨勢相同，隨著水活性降低，花青素降解速率加快。綜合上述結果，花青素受溫度及乙醇濃度的影響程度可能因花青素種類而異。

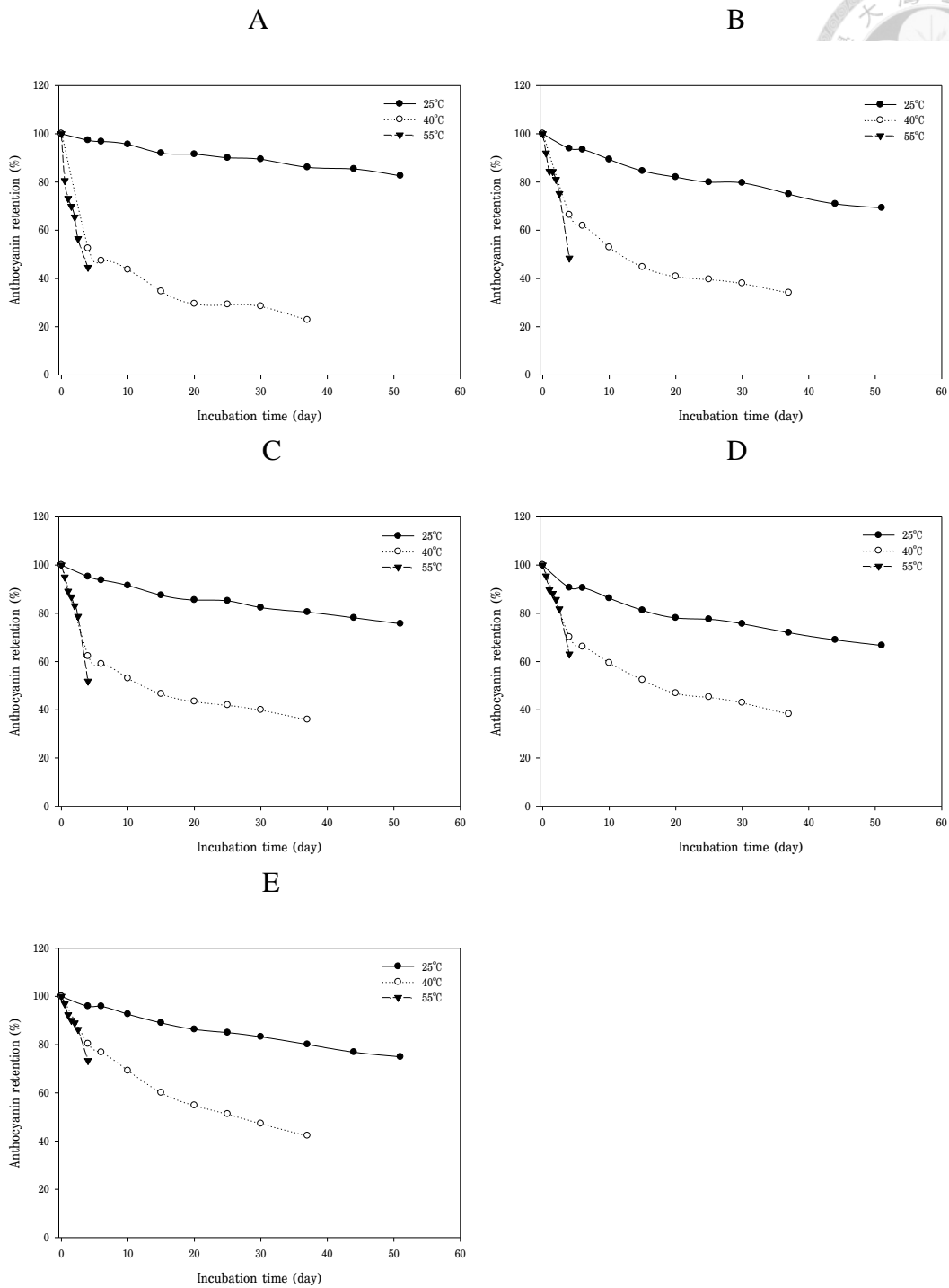


圖 4-4. 乙醇濃度對模式溶液中紫米花青素殘留率之影響。

Fig. 4-4. The retention of black rice anthocyanin in ethanolic model solutions (pH 3.75) containing (A) 10 % EtOH, (B) 20 % EtOH, (C) 30 % EtOH, (D) 40 % EtOH, and (E) 50 % EtOH.

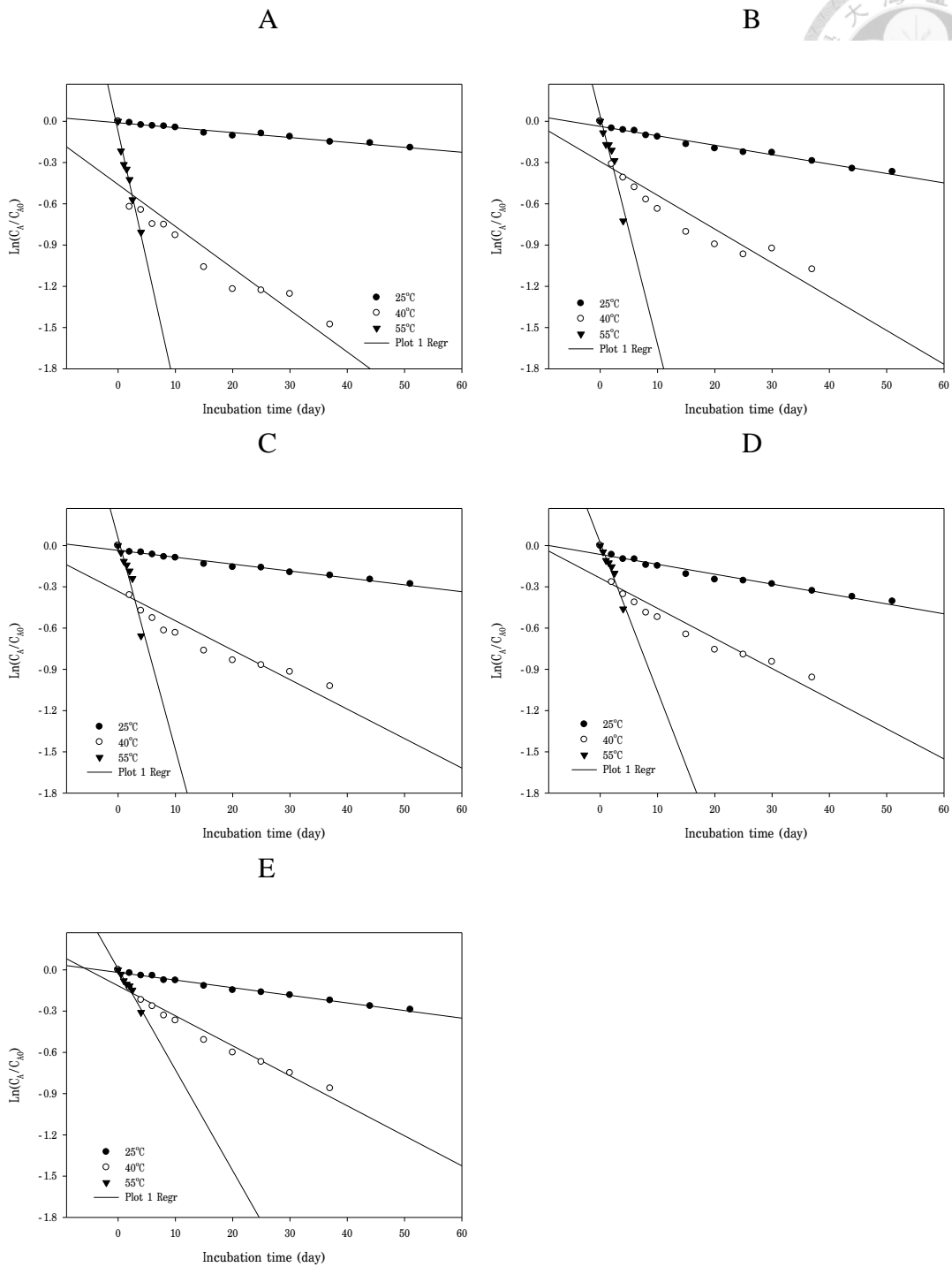


圖 4-5. 乙醇濃度對模式溶液中紫米花青素降解速率之影響。

Fig. 4-5. Effect of ethanol concentration on the degradation rate of black rice anthocyanin in the model solution (pH 3.75) containing (A) 10 % EtOH, (B) 20 % EtOH, (C) 30 % EtOH, (D) 40 % EtOH, and (E) 50 % EtOH.



表 4-2. 乙醇濃度對花青素模式溶液降解反應速率常數 (k)、半衰期 ($T_{1/2}$)
及反應活化能 (E_a) 之影響

Table 4-2. Effect of ethanol concentration on the degradation rate constant (k), half-life ($T_{1/2}$) and activation energy (E_a) of anthocyanins in ACN model solution (pH 3.75)

| Ethanol concentration (%) | Temperature (°C) | Rate constant (day ⁻¹) | $T_{1/2}$ (day) | E_a (kcal/mol) |
|---------------------------|------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 10 | 25 | 0.004 ± 0.000 ^c | 184.43 ± 15.26 ^a | 29.93 ± 3.37 ^a |
| | 40 | 0.060 ± 0.002 ^a | 11.45 ± 0.45 ^d | |
| | 55 | 0.233 ± 0.003 ^a | 2.97 ± 0.08 ^d | |
| 20 | 25 | 0.007 ± 0.000 ^b | 93.02 ± 8.56 ^b | 19.17 ± 3.27 ^b |
| | 40 | 0.045 ± 0.002 ^b | 15.31 ± 0.84 ^c | |
| | 55 | 0.143 ± 0.007 ^b | 4.84 ± 0.44 ^c | |
| 30 | 25 | 0.007 ± 0.000 ^b | 88.38 ± 6.72 ^b | 20.97 ± 3.36 ^b |
| | 40 | 0.043 ± 0.002 ^b | 15.79 ± 0.91 ^c | |
| | 55 | 0.121 ± 0.008 ^c | 5.73 ± 0.51 ^c | |
| 40 | 25 | 0.010 ± 0.000 ^a | 67.06 ± 1.02 ^c | 15.19 ± 3.36 ^c |
| | 40 | 0.036 ± 0.001 ^c | 18.92 ± 0.82 ^b | |
| | 55 | 0.095 ± 0.002 ^d | 7.26 ± 0.19 ^b | |
| 50 | 25 | 0.010 ± 0.000 ^a | 66.35 ± 6.25 ^c | 17.08 ± 3.90 ^c |
| | 40 | 0.027 ± 0.002 ^d | 25.21 ± 2.13 ^a | |
| | 55 | 0.069 ± 0.003 ^e | 10.07 ± 0.33 ^a | |

^{a-c} letters within the same column differed significantly ($p < 0.05$)

(二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之降解反應速率常數

圖 4-6 為不同 pH 值之模式溶液儲藏於 55 °C 之紫米花青素殘留率變化。實驗結果，在 pH 1.0 於 55 °C 環境下儲存 10 天後，花青素含量仍保留了高達 90 %；在 pH 2.0–6.0，還殘留約 60–70 % 左右；而 pH 7.0–8.0，只剩下大約 50 % 的花青素含量，得知 pH 值越高花青素殘留率越低，而 pH 1.0 可以有效保護花青素使其不被熱降解。

由圖 4-7 得到的直線其斜率即為降解反應速率常數 (rate constant, k)。當斜率越大，表示降解反應速率常數越大，而花青素降解也越快速。表 4-3 顯示，pH 1.0 之紫米花青素模式溶液其降解反應速率常數為 0.007 day^{-1} ，隨著 pH 值提高至 8.0，降解反應速率常數則增加至 0.102 day^{-1} ，環境的 pH 值越高，花青素降解的速率越快。

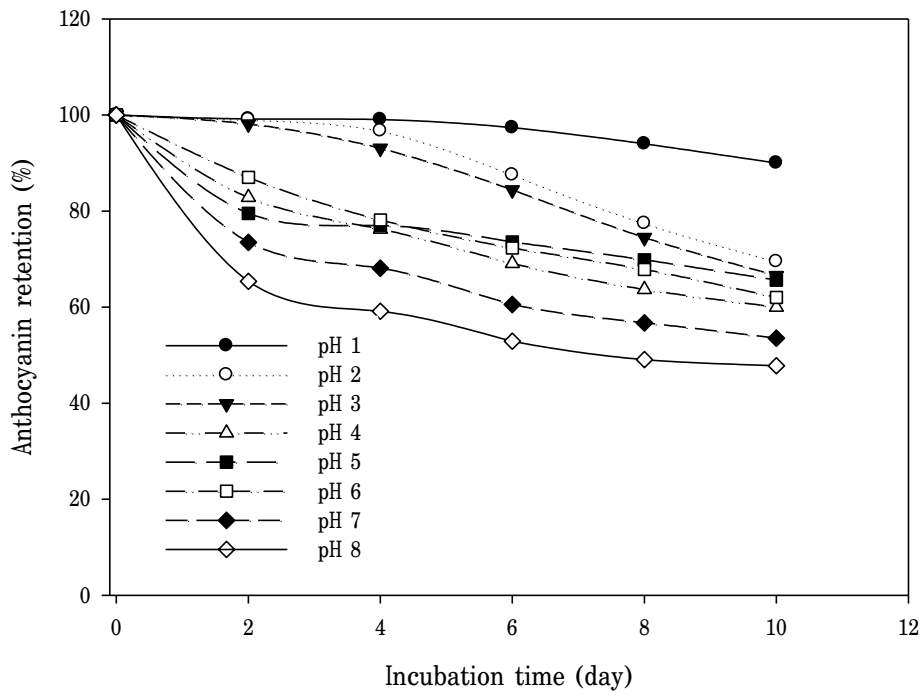


圖 4-6. pH 值對模式溶液中紫米花青素殘留率之影響。

Fig. 4-6. The retention of black rice anthocyanin for pH 1 – 8 ethanolic model solutions (40 % EtOH).

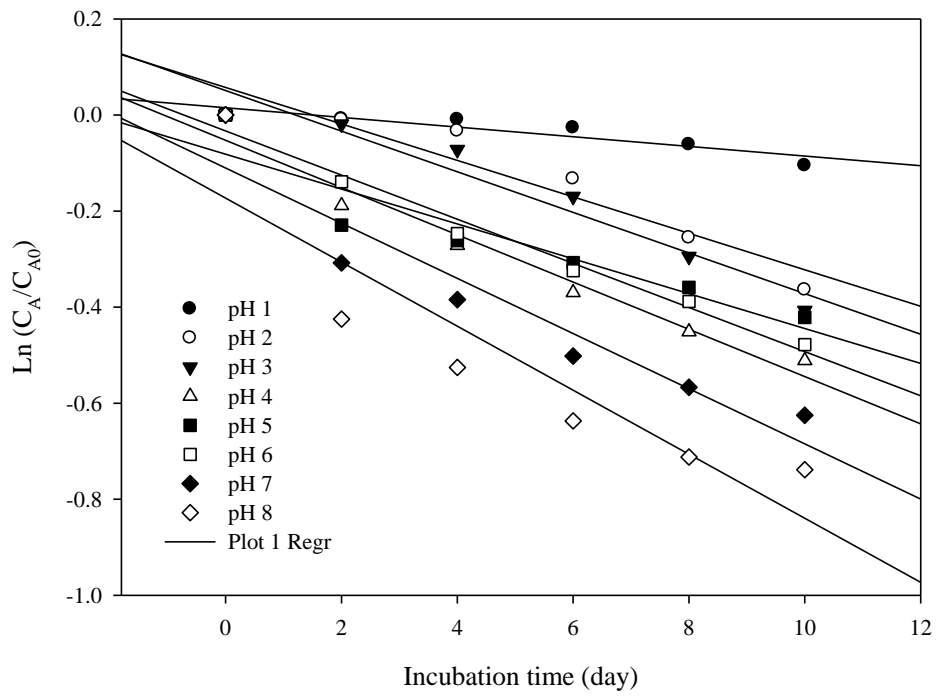


圖 4-7. pH 值對模式溶液中紫米花青素降解速率之影響。

Fig. 4-7. Effect of pH value on the degradation rate of black rice anthocyanin in ethanolic model solutions (40 % EtOH).



表 4-3. pH 值對花青素模式溶液降解反應速率常數 (k) 及半衰期 ($T_{1/2}$) 之影響

Table 4-3. Effect of pH value on the degradation rate constant (k) and half-life ($T_{1/2}$) of anthocyanin in ACN model solution (40 % EtOH)

| pH | Rate constant (day ⁻¹) | $T_{1/2}$ (day) |
|----|---------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 0.007 ± 0.000 ^g | 99.78 ± 1.40 ^a |
| 2 | 0.027 ± 0.001 ^f | 25.88 ± 1.01 ^b |
| 3 | 0.034 ± 0.001 ^e | 20.69 ± 0.89 ^c |
| 4 | 0.059 ± 0.002 ^c | 11.74 ± 0.46 ^e |
| 5 | 0.051 ± 0.003 ^d | 13.49 ± 0.79 ^d |
| 6 | 0.062 ± 0.002 ^c | 11.18 ± 0.38 ^e |
| 7 | 0.082 ± 0.002 ^b | 8.47 ± 0.24 ^f |
| 8 | 0.102 ± 0.001 ^a | 6.76 ± 0.07 ^g |

^{a-g} letters within the same column differed significantly ($p < 0.05$)



三、花青素模式溶液之半衰期與反應活化能

(一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之半衰期與反應活化能

半衰期為反應物濃度變為原始濃度一半所需之時間。當半衰期越長，表示反應物降解的速率越慢。由表 4-2 的結果顯示不同乙醇濃度之紫米花青素模式溶液儲藏於 25 °C、40 °C 及 55 °C 時的半衰期，分別為 2.97 – 184 day (10 % EtOH)、4.84 – 93.0 day (20 % EtOH)、5.73 – 88.4 day (30 % EtOH)、7.26 – 67.1 day (40 % EtOH)、10.1 – 66.4 day (50 % EtOH)，儲藏溫度越高，半衰期越短。當化學反應發生時所需克服的能量障礙稱為活化能，可描述降解反應速率常數與溫度之間的關係，將降解反應速率常數取自然對數 ($\ln k$) 並與絕對溫度的倒數 ($1/T$) 進行迴歸後，可得 Arrhenius equation (圖 4-8)。藉由直線方程式之斜率 ($-Ea/R$) 可計算出花青素於不同乙醇濃度模式溶液中的反應活化能 (kcal/mol) (如表 4-2)，分別為 29.93 (10 % EtOH)、19.17 (20 % EtOH)、20.97 (30 % EtOH)、15.19 (40 % EtOH)、17.08 (50 % EtOH)。

(二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之半衰期

表 4-3 顯示不同 pH 值之紫米花青素模式溶液儲藏於 55 °C 時的半衰期。pH 的提高會導致半衰期的時間縮短，pH 1.0 之紫米花青素模式溶液其半衰期為 99.8 day，隨著 pH 值提高至 8.0，半衰期則縮短至 6.76 day，相較之下，兩花青素模式溶液於不同 pH 下的半衰期縮短比例約為 14.8 倍。

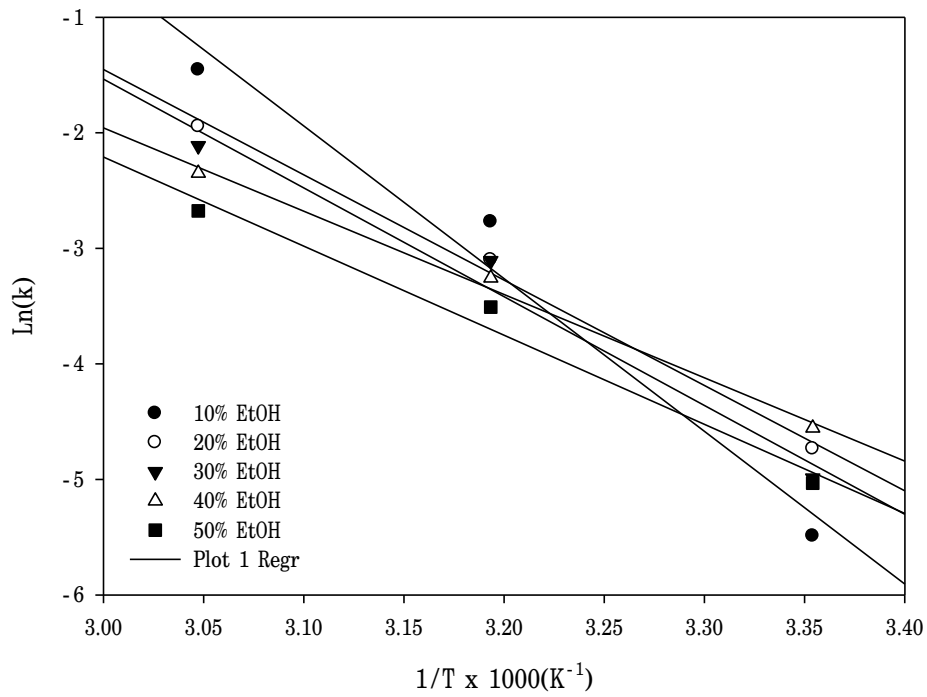


圖 4-8. 乙醇模式溶液中紫米花青素含量之 Arrhenius 線性迴歸。

Fig. 4-8. Arrhenius plots of black rice anthocyanin content in ethanolic model solutions (pH 3.75).



第三節 花青素於乙醇溶液中顏色表現

一、花青素模式溶液之光譜

(一) 花青素模式溶液於不同乙醇濃度之光譜

圖 4-9 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液光譜之影響。一般在水相系統中是以 520 nm 下之吸光值作為紅色度指標。但由實驗結果得知，當提高模式溶液之乙醇濃度時，其最大吸收波長 (λ_{\max}) 有明顯的向右偏移現象，產生向紅效應 (bathochromic shift)，使溶液看起來較偏紅色，且乙醇濃度越高偏移的程度越大。例如：10 % EtOH 之紫米花青素模式溶液其 λ_{\max} 為 520 nm，隨著乙醇濃度提高至 50 %，其 λ_{\max} 提高至 538 nm。

(二) 花青素模式溶液於不同 pH 值之光譜

圖 4-10 顯示 pH 值對紫米花青素模式溶液光譜之影響。實驗結果得知，在模式溶液 pH 1.0–3.0 的環境中，產生增色效應 (hyperchromic effect)，pH 值越低對吸光強度影響越大；在模式溶液 pH 7.0–8.0 的環境中，可以觀察到其最大吸收波長 (λ_{\max}) 有明顯的向左偏移現象，pH 7.0 之紫米花青素模式溶液其 λ_{\max} 為 497 nm，而 pH 8.0 之溶液其 λ_{\max} 則為 496 nm。Markakis (1982) 指出 pH 值同時影響著花青素之吸光特性及吸光強度。

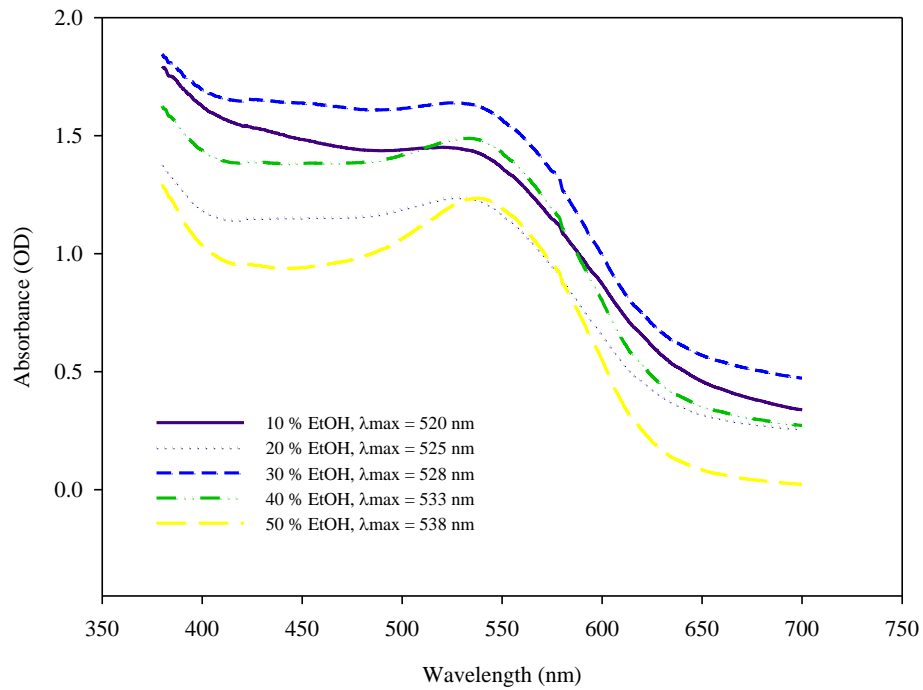


圖 4-9. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液光譜之影響。

Fig. 4-9. Effect of ethanol concentration on the UV-Visible spectra in black rice anthocyanin model solutions (pH 3.75).

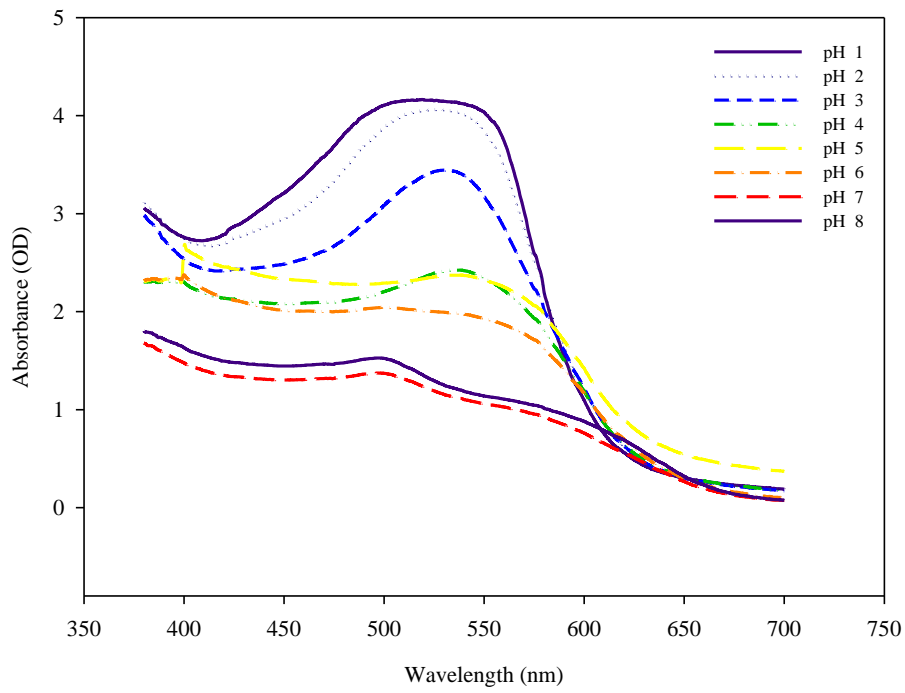


圖 4-10. pH 值對紫米花青素模式溶液光譜之影響。

Fig. 4-10. Effect of pH value on the UV-Visible spectra in black rice anthocyanin model solutions (40 % EtOH).



二、花青素模式溶液之 Hunter's L , a , b 值

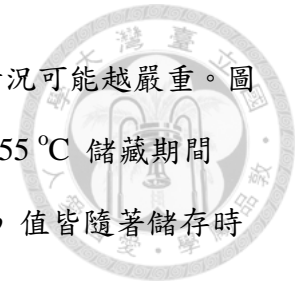
(一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液之 Hunter's L , a , b 值

圖 4-11 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響。實驗結果得知，隨著乙醇濃度增加， a 值逐漸增加。Berg *et al.* (1975) 研究指出，提高紅酒的乙醇濃度，可以增加酒液之紅色度。可能是因為乙醇分子會改變花青素分子彼此間的排列，而將原本無色的 carbinol base 及 chalcone base 轉變成有色的 flavylum cation 或 quinoidal base，造成主要呈色物質 flavylum cation 的比例增加 (Ribereau-Gayon, 1982; Asenstorfer *et al.*, 2003)。提高乙醇濃度亦會使花青素之 copigmentation 及 self-association 作用力減弱，因此釋放出更多的游離 flavylum cation 及 quinoidal base，改變花青素之結構分佈，進而影響花青素溶液之呈色 (Gutierrez, 2003; Tseng *et al.*, 2006)。

L 值代表模式溶液的明亮度，其值越高即表示溶液明亮度越高。圖 4-12 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's L 值變化之影響。隨著儲存時間的增加，不同乙醇濃度下的花青素模式溶液 L 值均有上升的趨勢。黃 (2001) 及簡 (2003) 皆指出，桑椹酒的 Hunter's a 值會隨著儲藏時間增加而降低，其顏色由紅色轉變成淡黃色，使得酒液的色澤密度下降，因而提高酒液的明亮度。Gutierrez (2005) 指出儲藏過程中酒液的亮度增加，主要是因為酒液中成分聚合沉澱造成。

a 值代表模式溶液的紅色度，與花青素的含量有關，數值越高顯示溶液紅色度越高，flavylum cation 的相對含量也越高 (Wrolstad, 2005)。圖 4-13 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's a 值變化之影響。實驗結果顯示，不同乙醇濃度下的花青素模式溶液 a 值隨著儲存時間的增加而有降低的趨勢。

b 值代表模式溶液的黃色度，溶液越偏向黃色，表示褐變情況可能越嚴重。圖 4-14 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's b 值變化之影響。不同乙醇濃度下的花青素模式溶液 b 值皆隨著儲存時間的增加而提高。



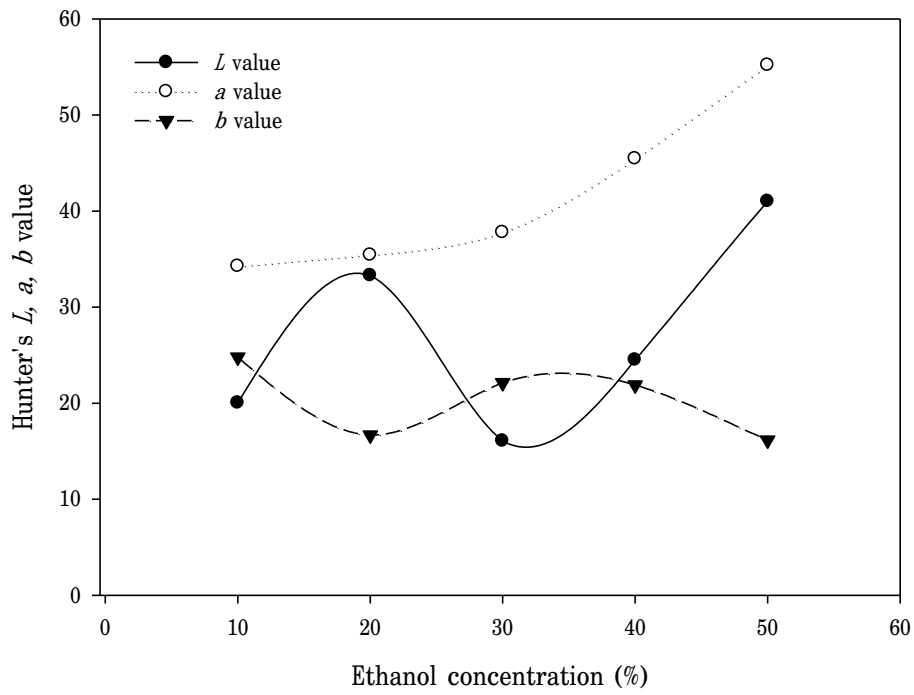


圖 4-11. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響。

Fig. 4-11. Effect of ethanol concentration on the Hunter's L , a , b values in black rice anthocyanin model solutions (pH 3.75).

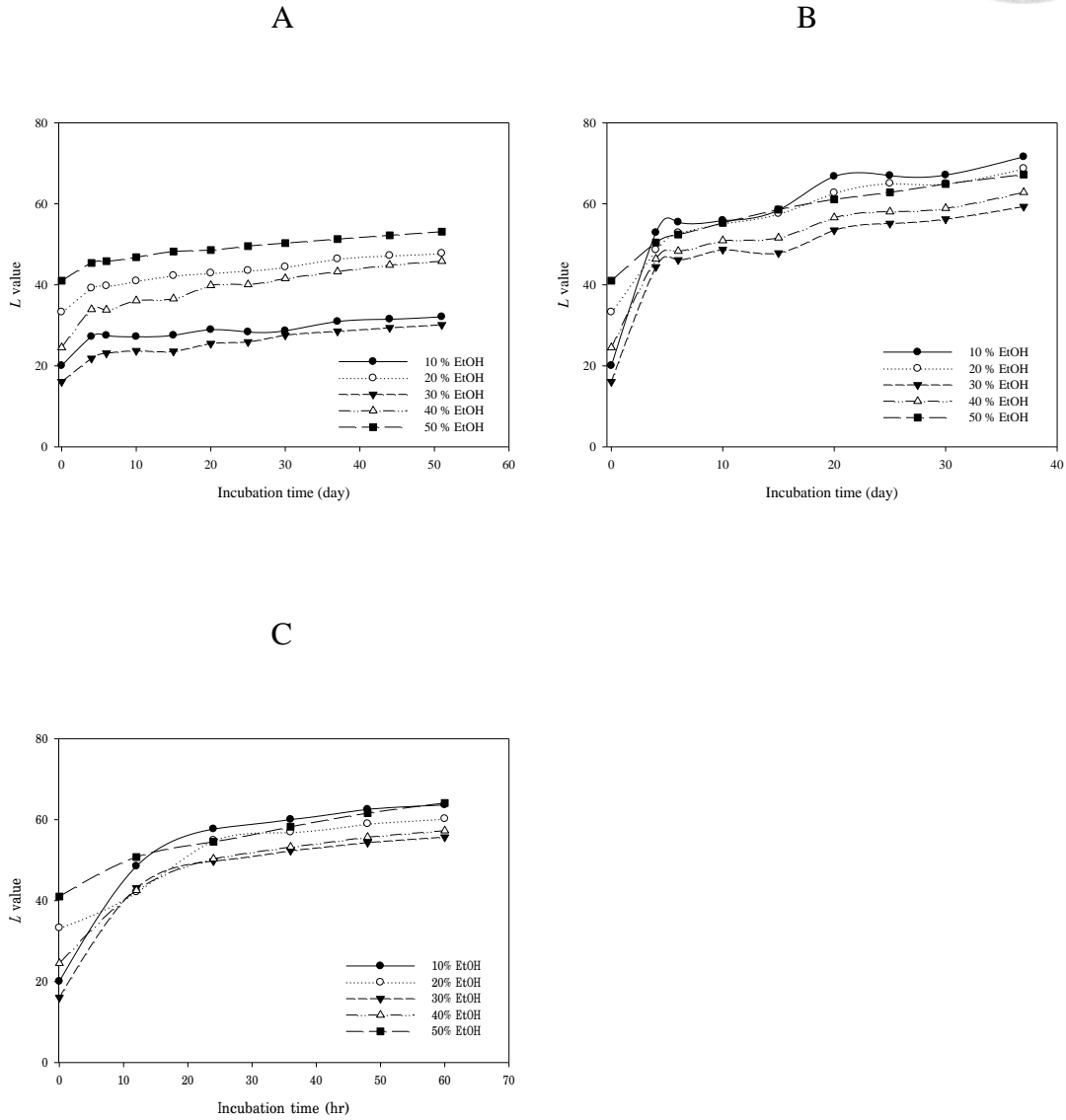


圖 4-12. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's L 值變化之影響。

Fig. 4-12. Effect of ethanol concentration on the Hunter's L value of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

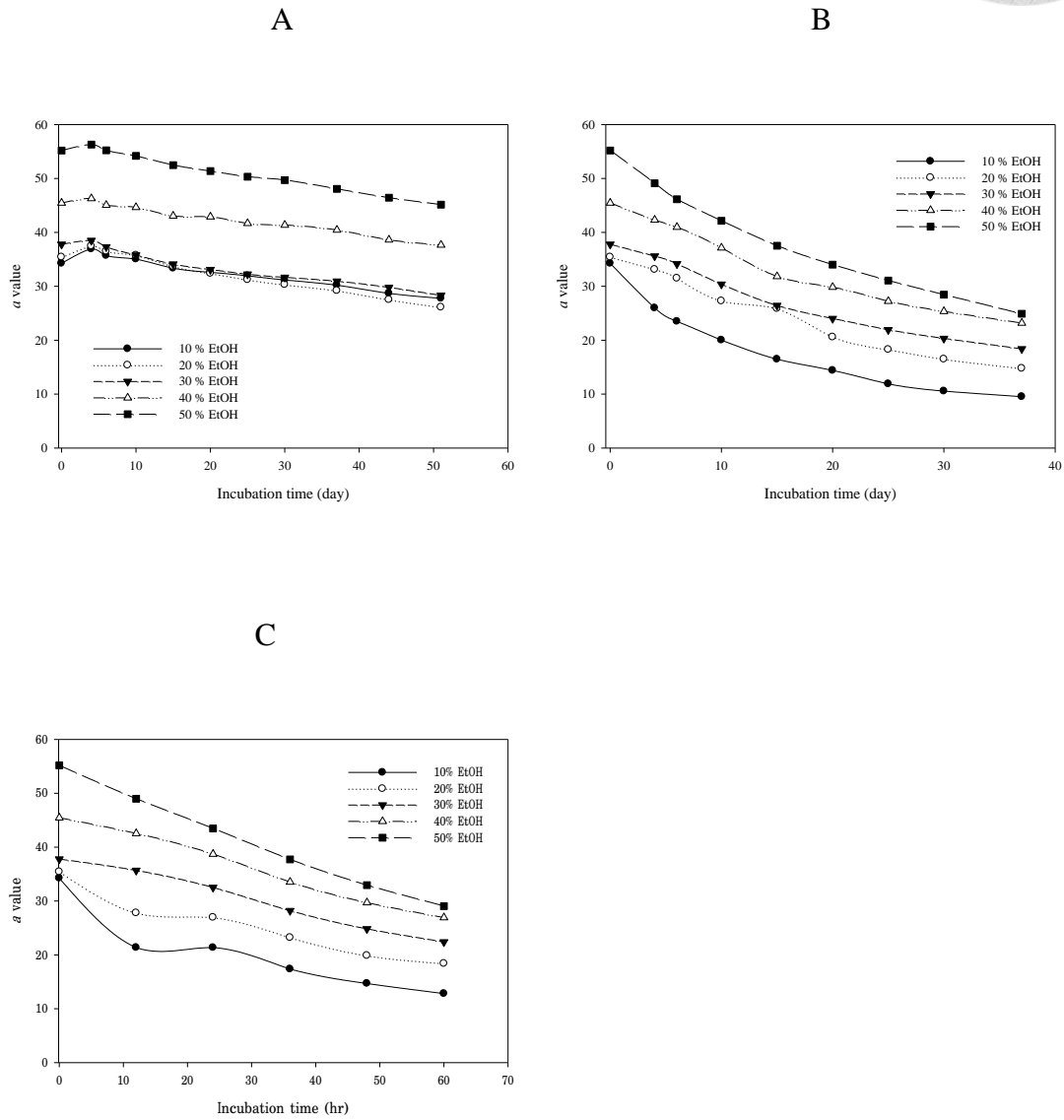


圖 4-13. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's *a* 值變化之影響。

Fig. 4-13. Effect of ethanol concentration on the Hunter's *a* value of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

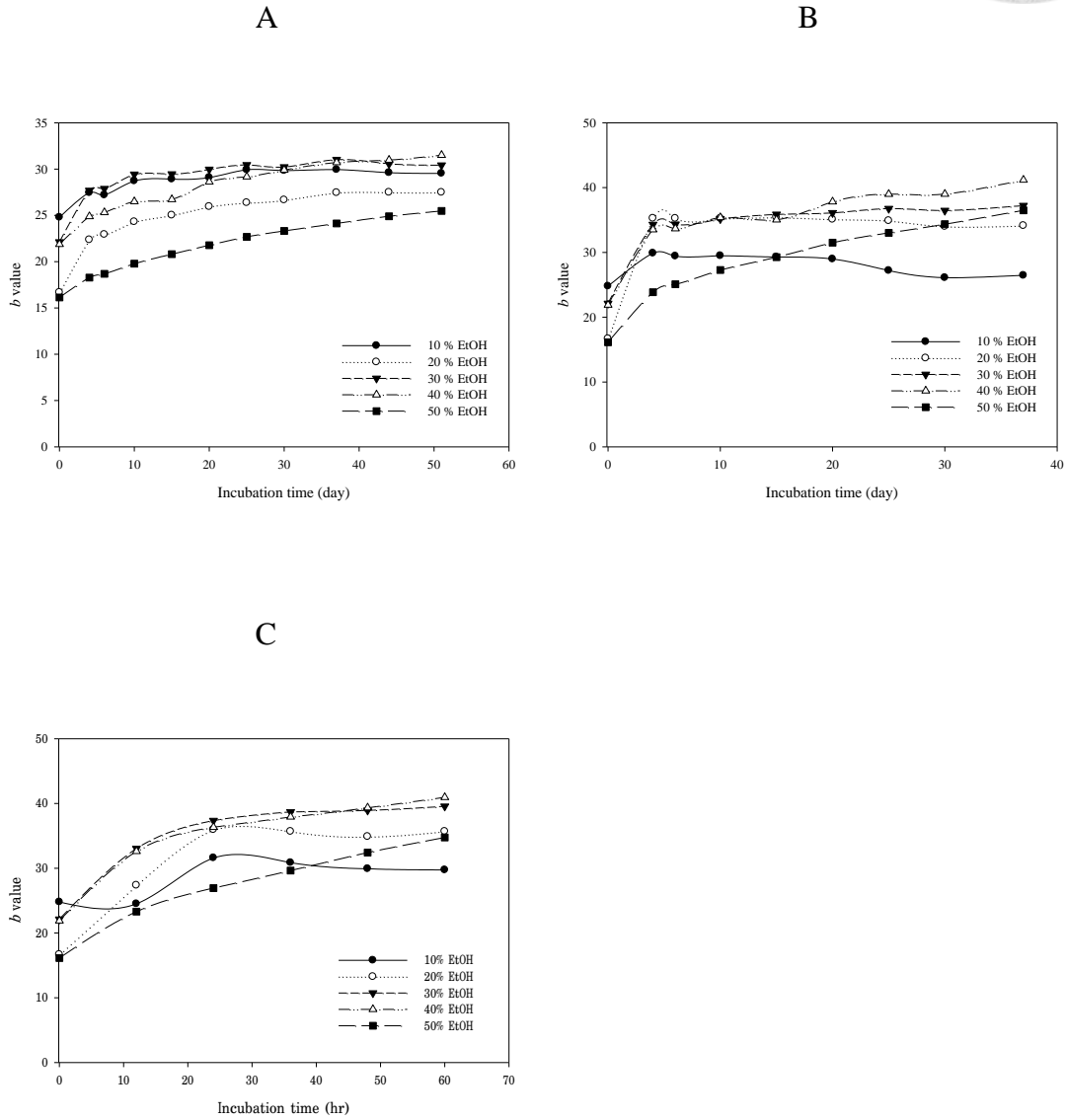


圖 4-14. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間 Hunter's *b* 值變化之影響。

Fig. 4-14. Effect of ethanol concentration on the Hunter's *b* value of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

(二) 不同 pH 值花青素模式溶液之 Hunter's L , a , b 值

圖 4-15 顯示 pH 值對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響。實驗結果得知，隨著 pH 值降低， a 值及 b 值逐漸增加，而 L 值則逐漸下降。Osawa (1982) 指出，花青素在酸性當中較為穩定，若能維持溶液在 pH 1.0 以下，則以穩定之 flavylium cation 鹽類形式存在而保持紅色。

圖 4-16 為紫米花青素乙醇模式溶液在 pH 1.0–8.0 之顏色變化。紫米花青素在 pH 1.0–3.0 為深紅色，隨著 pH 增加到 4.0，逐漸轉變為淡紅色，當 pH 在 5.0–6.0 時，轉變為橙色，當 pH 在 7.0–8.0 時，褪色的情形更為明顯。Markakis (1982) 指出大部分花青素在 pH 小於 4.0 時，以 flavylium cation 形式存在而呈紅色；當 pH 值提高至 4.0–5.0 時，顏色幾乎完全消失；而 pH 值到達 7.0–8.0 時，則呈現出深藍色。Cabrita *et al.* (2000) 利用六種帶醣基之花青素 (Pg、Cy、Pn、Dp、Pt、Mv-3-glucosides) 於 pH 1.0–12.0 溶液中反應，發現此六種花青素於 pH 1.0–3.0 時，具有較深的紅色，且在儲藏過程中相當穩定。蔡 (1992) 在葡萄和洛神花的研究中發現，花青素在 pH 小於 2.0 時呈紅色，隨著 pH 提高至 5.7 時，紅色即褪色而幾近無色。本研究結果和先前文獻相符，皆在 pH 1.0–3.0 呈現紅色。

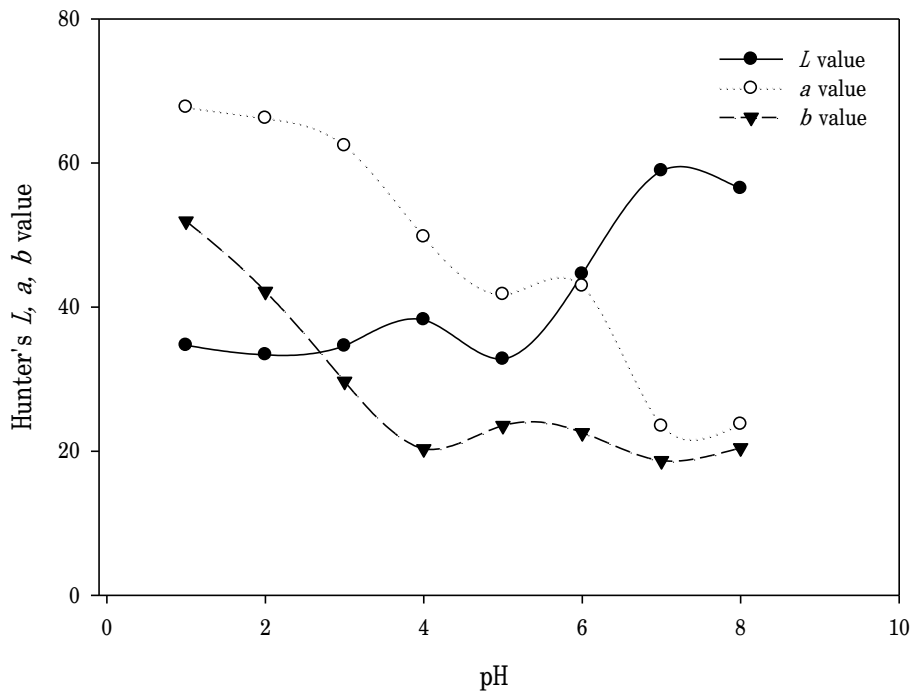


圖 4-15. pH 值對紫米花青素模式溶液 Hunter's L , a , b 值之影響。

Fig. 4-15. Hunter's L , a , b values in black rice anthocyanin model solution at different pH values (40 % EtOH).

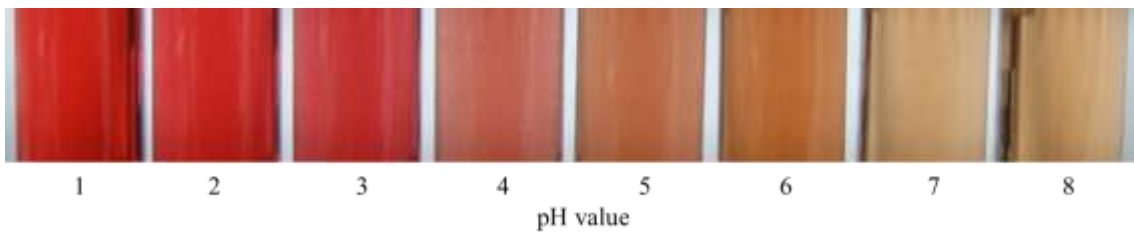


圖 4-16. 紫米花青素乙醇模式溶液在 pH 1 – 8 之呈色。

Fig. 4-16. Color of the ethanolic model solution of black rice anthocyanin in pH 1 – 8 (40 % EtOH).



三、花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化

(一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化

裂解指數 (degradation index, DI) 是指溶液在 420 nm 及 λ_{\max} 吸光值的比值，常用來表示紅酒及果汁的褐變程度，其數值越高表示色澤趨向黃褐色褐變程度越嚴重，亦被用以解釋花青素的裂解情形，比值越高代表溶液中花青素降解情況越嚴重 (Sistrunk and Gascoigne, 1983)。

圖 4-17 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間裂解指數變化之影響。不同乙醇濃度下的花青素模式溶液於儲存期間 DI 值均隨時間延長而逐漸提高；且隨著儲藏溫度的提高，DI 值上升的趨勢更為明顯。Tsai *et al.* (2004) 指出將洛神葵置於 pH 2.0 的環境且在 90 °C 下加熱，花青素的色澤密度隨加熱時間增加而減少，DI 值則隨加熱時間增加而增加，顏色由紅色轉變為褐色，本研究結果與之相符合。

(二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之裂解指數變化

圖 4-18 顯示 pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間裂解指數變化之影響。不同 pH 值下的花青素模式溶液於儲存期間 DI 值隨時間延長而有差異，當 pH 在 1.0–3.0 時，幾乎沒有變化；當 pH 在 4.0–6.0 時，DI 值略為上升；但當 pH 提升到 7.0–8.0 時，DI 值上升的趨勢相當明顯，推測此結果是由於 A_{520} 在 pH 7.0–8.0 時產生顯著下降而造成，pH 值越高的環境下會使得花青素降解的速率越快，與降解反應速率常數所推算出的結果相符。

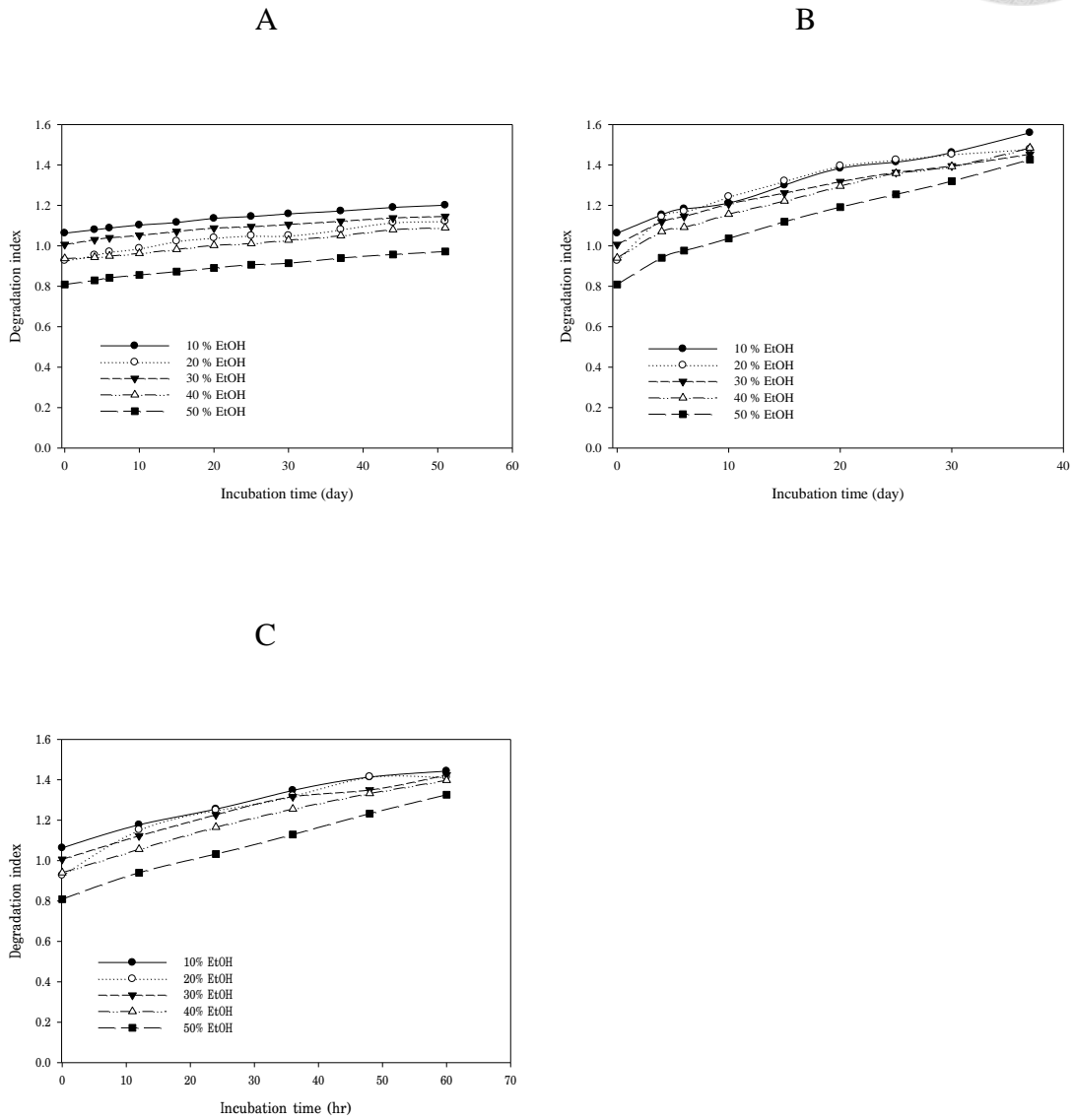


圖 4-17. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間裂解指數變化之影響。

Fig. 4-17. Effect of ethanol concentration on the degradation index of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

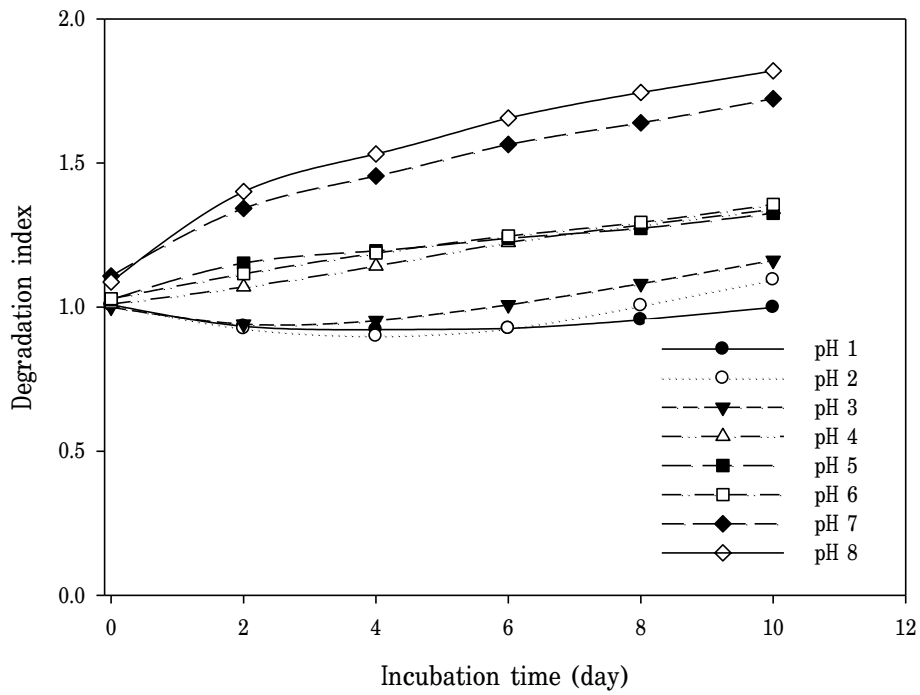


圖 4-18. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間裂解指數變化之影響。

Fig. 4-18. Effect of pH value on the degradation index of 40 % EtOH black rice anthocyanin model solution during incubation at 55 °C.



四、花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化

(一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化

色澤密度 (color density) 是指溶液在 420 nm 及 λ_{\max} 之吸光值，經由公式 $A_{420} + A_{\lambda_{\max}}$ 計算得到，可用來表示色澤的深淺程度，當色澤密度越高，表示溶液的色澤較深 (Wrolstad, 1976)。Wesche-Ebeling (2002) 指出，色澤密度變化主要受 monomeric anthocyanin、polymeric anthocyanin 及褐變色素的含量影響。圖 4-19 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間色澤密度變化之影響。實驗結果得知，於 40 °C 及 55 °C，模式溶液於儲藏初期的色澤密度均較高，但隨著儲藏時間與儲藏溫度的增加，而有下降的趨勢，表示受到溫度的影響會加速花青素降解。

(二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之色澤密度變化

圖 4-20 顯示 pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間色澤密度變化之影響。由實驗結果得知，在 pH 1.0 的環境下，模式溶液之色澤密度有些微下降的趨勢，但變化的幅度並不大；當 pH 2.0–8.0 時，隨著儲藏時間延長而緩慢下降，其中 pH 7.0–8.0 於儲藏初期的色澤密度就顯著較低。

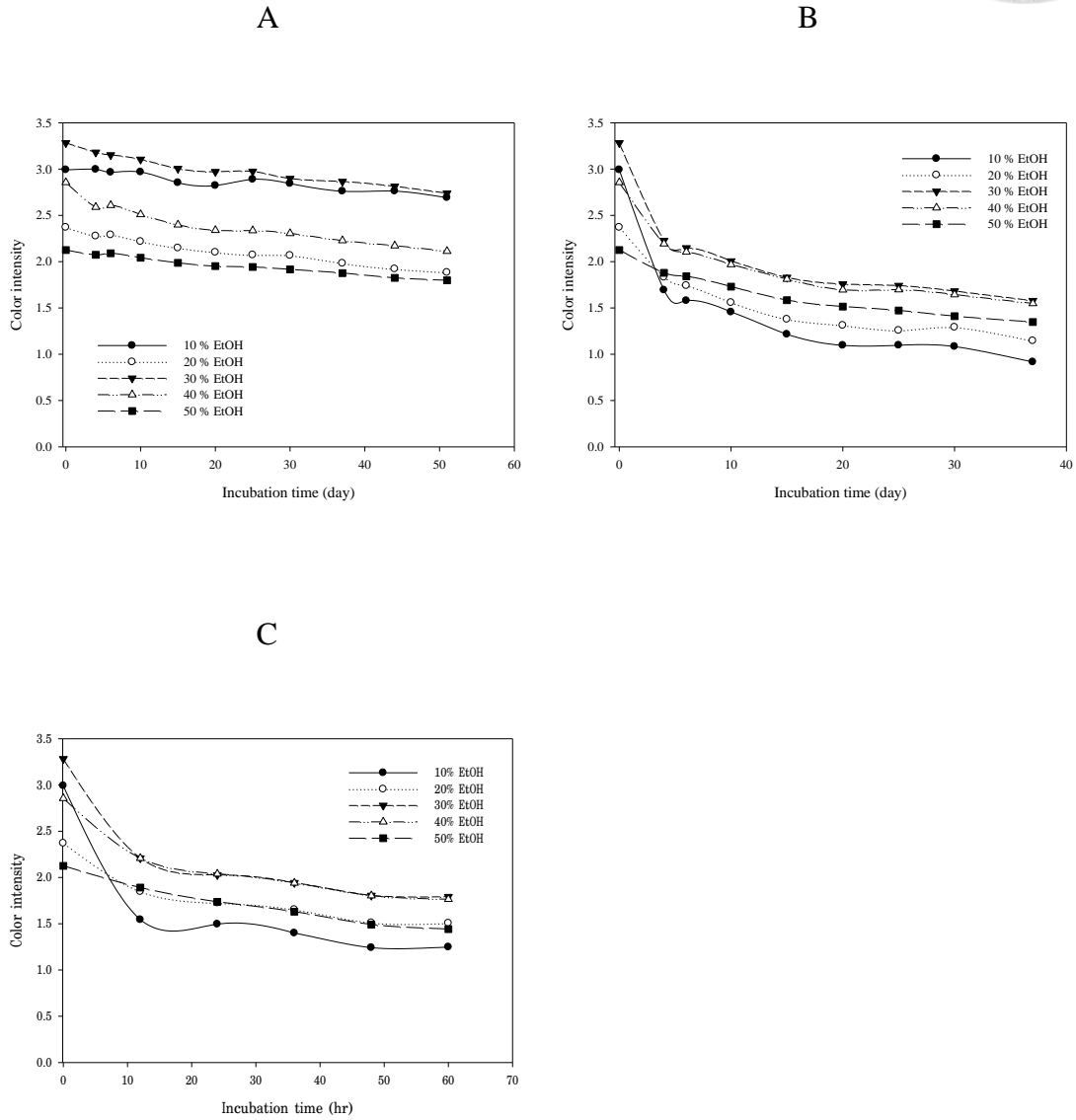


圖 4-19. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間色澤密度變化之影響。

Fig. 4-19. Effect of ethanol concentration on the color density of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

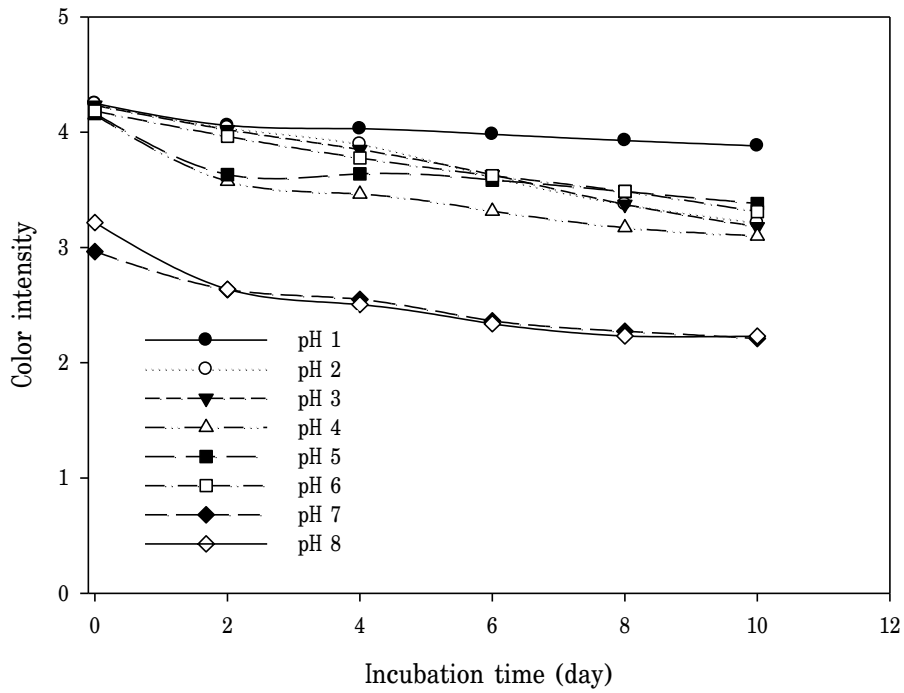
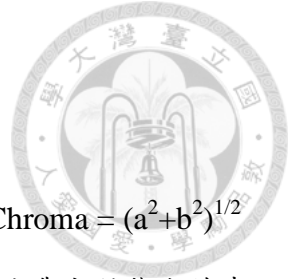


圖 4-20. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間色澤密度變化之影響。

Fig. 4-20. Effect of pH value on the color density of 40 % EtOH black rice anthocyanin model solution during incubation at 55 °C.



五、花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化

(一) 不同乙醇濃度花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化

彩度 (chroma) 可用來描述溶液顏色的鮮明程度，由公式 $\text{Chroma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$ 計算得到，當數值越大表示溶液越具飽和色彩。圖 4-21 顯示乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間彩度變化之影響。實驗結果得知，儲藏初期模式溶液的彩度略微上升，儲藏過程中則緩慢下降；在 40 °C 及 55 °C 下的 50 % EtOH 模式溶液之彩度隨著儲藏時間增加而逐漸降低。Bakker *et al.* (1993) 指出酒液於儲藏過程中彩度的下降主要是由於色澤中的 Hunter's *a* 值下降所致。

(二) 不同 pH 值花青素模式溶液於儲藏期間之彩度變化

圖 4-22 顯示 pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間彩度變化之影響。實驗結果顯示在儲藏初期，彩度可分為 pH 1.0 – 3.0, pH 4.0 – 6.0 及 pH 7.0 – 8.0 三個區間，pH 值越低彩度越高。55 °C 儲藏期間在不同 pH 值下模式溶液的彩度皆有上升的趨勢，推測此結果是由於儲藏過程中 Hunter's *b* 值變化的幅度逐漸加大而造成。

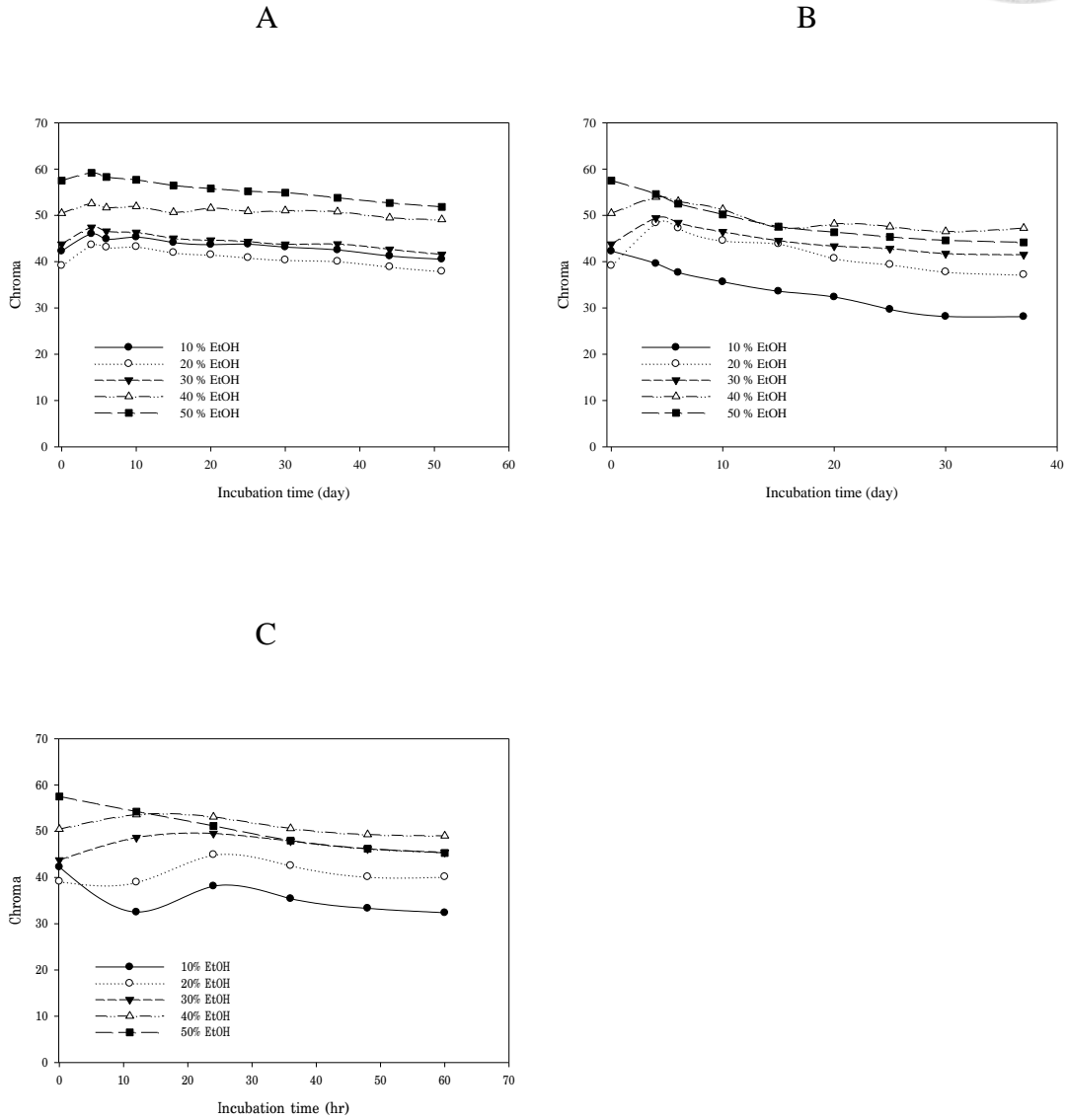


圖 4-21. 乙醇濃度對紫米花青素模式溶液於 25 °C、40 °C 與 55 °C 儲藏期間彩度變化之影響。

Fig. 4-21. Effect of ethanol concentration on the chroma of pH 3.75 black rice anthocyanin model solution during incubation at (A) 25 °C, (B) 40 °C, (C) 55 °C.

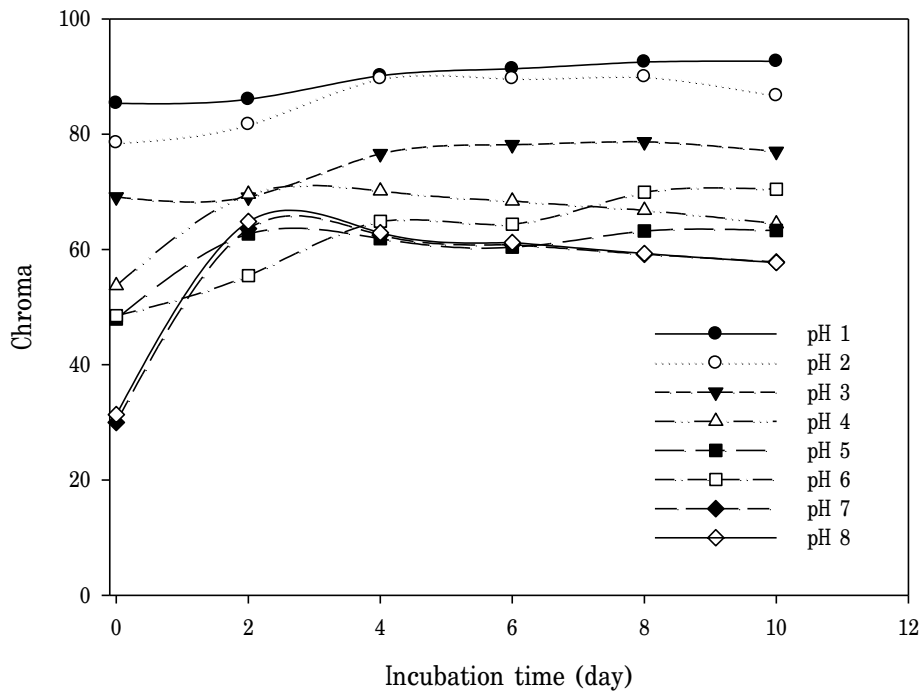


圖 4-22. pH 值對紫米花青素模式溶液於 55 °C 儲藏期間彩度變化之影響。

Fig. 4-22. Effect of pH value on the chroma of 40 % EtOH black rice anthocyanin model solution during incubation at 55 °C.

六、花青素模式溶液儲藏期間呈色變化之相關性分析

前述的實驗結果發現各項分析結果間可能有相關性存在，因此以 55 °C 下儲藏的 40 % EtOH 模式溶液為樣本，將總花青素含量、Hunter's *L, a, b* 值、DI 值、色澤密度及彩度之數據進行相關性分析，結果如表 4-4 所示。總花青素含量與 Hunter's *a* 值、色澤密度成顯著正相關 (相關係數分別為 0.907 與 0.998)；而總花青素含量、色澤密度與 DI 值呈現顯著負相關 (相關係數分別為 -0.953 與 -0.933)，顯示在儲存期間花青素含量減少，導致紅色度下降，產生褐變而使 DI 值上升，因此顏色由紅色轉變成淺黃色，明亮度及黃色度提高。此現象與 Wesche-Ebeling *et al.* (1996) 在梅子儲存實驗中所得結果，隨著儲藏時間的增加，梅子花青素的含量及色澤密度下降，DI 值上升之情況相仿。Perez-Magarino *et al.* (2004) 亦指出紅酒在熟成期間花青素含量減少，而伴隨著色澤密度之降低和 DI 值的增加。



表 4-4. 乙醇模式溶液於儲藏期間總花青素含量及呈色表現之相關性分析

Table 4-4. The correlation between total anthocyanin content and color phenomenon in ethanolic model solution during incubation at 55 °C

| | Total anthocyanin | Hunter's <i>L</i> | Hunter's <i>a</i> | Hunter's <i>b</i> | DI | Color density |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|---------------|
| Hunter's <i>L</i> | -0.997 | | | | | |
| Hunter's <i>a</i> | 0.907** | -0.881 | | | | |
| Hunter's <i>b</i> | -0.998** | 0.999 | -0.882 | | | |
| DI | -0.953*** | 0.935*** | -0.991*** | 0.935*** | | |
| Color density | 0.998*** | -0.997*** | 0.881*** | -0.998*** | -0.933*** | |
| Chroma | 0.305 | -0.253 | 0.672*** | -0.247*** | -0.569*** | 0.251*** |

** , *** : $p < 0.01$ and 0.001 , respectively

第四節 不同 pH 值花青素模式溶液之花青素型態變化

為瞭解乙醇模式溶液之 pH 值對紫米花青素型態的影響，依照 Boulton (1998) 的方法測定共色體花青素 (copigmented anthocyanin)、單體花青素 (monomeric anthocyanin) 和聚合體花青素 (polymeric anthocyanin) 的百分比。表 4-5 顯示不同 pH 值紫米花青素模式溶液之花青素型態組成。模式溶液中並無共色體型態產生，推斷可能是酚類含量太低，不足以形成共呈色作用所致，此結果與黃 (2001) 利用洛神葵及桑椹花青素模擬系統測定花青素型態時，觀察到的結果相似。紫米花青素於 pH 1.0 下，聚合型態高達 95.70%，隨著酸鹼值的增加，聚合型態的花青素逐漸減少，而單體型態逐漸增加，顯然花青素型態受酸鹼值的影響相當大。黃 (2005) 指出，在維生素 C 模擬系統下添加不同酚類化合物會使洛神葵花青素型態中單體百分比下降，而聚合體百分比則上升，此現象於 pH 2.0 較 pH 3.0 明顯，本研究結果與之相符合，在兩系統中花青素於 pH 值較低的環境主要反應皆為聚合作用。



第五節 不同 pH 值花青素模式溶液之抗氧化能力

一、不同 pH 值花青素模式溶液之總抗氧化能力

ABTS⁺ 為一種穩定自由基，溶於 phosphate-buffered saline (PBS) 中呈現藍綠色，於 734 nm 下有吸收波峰，當抗氧化物質加入後會清除 ABTS⁺ 自由基使吸光值下降。吸光值越低時，表示樣品清除自由基能力越強。一般以 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 來表示總抗氧化能力，樣品相對之 TEAC 濃度 (mM) 越高，表示該樣品的抗氧化能力越好。表 4-5 顯示不同 pH 值紫米花青素模式溶液於之總抗氧化能力。實驗結果顯示，模式溶液於 pH 3.0 – 6.0 的抗氧化能力較佳，約為 1.145 – 1.158 mM Trolox。

二、不同 pH 值花青素模式溶液之 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基乙醇溶液於 517 nm 處有吸收波峰。經由抗氧化劑所提供的氫質子將其還原後吸光值會下降，而吸光值越低表示樣品對 DPPH 自由基的清除效力 (DPPH radical scavenging activity) 越強。表 4-5 顯示不同 pH 值紫米花青素模式溶液之 DPPH 自由基清除能力。實驗結果顯示，模式溶液於 pH 3.0 – 8.0 的自由基清除率較高，達 97.77 – 99.86 %。



表 4-5. 酸鹼值對乙醇模式溶液之花青素型態及抗氧化能力之影響

Table. 4-5. The patterns and antioxidant capacity of black rice anthocyanin for pH 1 - 8 ethanolic model solutions

| pH value | Monomer (%) | Polymer (%) | TEAC* (mM) | DPPH (%) |
|----------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 1.44 ± 0.29 ^g | 95.70 ± 2.79 ^a | 0.827 ± 0.018 ^e | 96.07 ± 1.79 ^b |
| 2 | 27.38 ± 1.87 ^f | 72.08 ± 1.65 ^{bc} | 1.095 ± 0.014 ^b | 95.04 ± 0.98 ^b |
| 3 | 31.03 ± 1.89 ^e | 69.04 ± 1.39 ^{cd} | 1.145 ± 0.006 ^a | 97.77 ± 2.23 ^{ab} |
| 4 | 34.24 ± 1.46 ^d | 67.65 ± 1.60 ^d | 1.153 ± 0.003 ^a | 99.26 ± 1.58 ^a |
| 5 | 27.92 ± 2.21 ^f | 74.73 ± 1.96 ^b | 1.157 ± 0.002 ^a | 99.86 ± 1.26 ^{ab} |
| 6 | 41.60 ± 2.54 ^c | 63.83 ± 3.46 ^e | 1.158 ± 0.002 ^a | 99.47 ± 1.63 ^{ab} |
| 7 | 45.34 ± 1.37 ^b | 57.36 ± 2.44 ^f | 0.972 ± 0.008 ^d | 99.65 ± 0.98 ^a |
| 8 | 49.64 ± 1.44 ^a | 52.68 ± 1.44 ^g | 0.996 ± 0.015 ^c | 99.14 ± 4.19 ^a |

*Trolox equivalent antioxidant capacity

^{a-g} letters within the same column differed significantly (p < 0.05)

第五章 結論



- 一、將紫米米糠與乙醇依 1 : 3 (g/mL) 比例進行浸漬，從浸漬乙醇濃度、pH 值及浸漬時間探討紫米花青素萃取之最適條件範圍。結果發現乙醇濃度 63.2 – 64.4 %、pH 值 1.78 – 1.88、室溫下浸漬 6 小時為一適當之紫米花青素萃取條件，預期可得到紫米花青素含量 43.27 – 45.35 mg/100 mL。
- 二、紫米花青素於乙醇溶液中之降解屬於一級反應，在 55 °C 及 40 °C 時，降解反應速率隨著乙醇濃度提高而降低，而在 25 °C 時則是隨著乙醇濃度提高而增加。
- 三、10 % – 50 % 乙醇溶液中之紫米花青素在 25 °C、40 °C 及 55 °C 之半衰期介於 2.97 – 184.43 day 之間，儲藏溫度越高半衰期越短。不同乙醇濃度中花青素受溫度的影響程度不同；於 55 °C 環境下，pH 值提高花青素降解的速率越快半衰期縮短。
- 四、55 °C 儲藏過程中，不同乙醇濃度及不同 pH 值的紫米花青素模式溶液皆由紅色向淡黃色轉變，而 Hunter's *L* 值、Hunter's *b* 值及花青素裂解指數上升，Hunter's *a* 值及色澤密度下降。



五、紫米花青素於 pH 1.0 下，聚合型態所占比例高達 95.70%，而隨著 pH 值的增加，形成聚合型態的花青素逐漸減少，單體型態逐漸增加。總抗氧化能力及 DPPH 自由基清除能力試驗發現，紫米花青素乙醇模式溶液於 pH 3.0 – 6.0 的抗氧化能力較佳。

六、綜合實驗結果，建議在利用富含花青素之原料製作酒精性飲料時，可選用乙醇濃度較高之基酒進行短時間浸漬，讓原料中的花青素迅速溶出，再適當稀釋乙醇濃度，使花青素較不易降解，維持產品的顏色，並進行勾兌，調整 pH 值至一般市售產品之 3.0 – 4.0 區間，此時產品具有良好的抗氧化能力。

七、由紫米米糠抽取花青素，發展出天然食用紅色素甚具潛力，不僅可拓展米糠在食品加工上的應用，提高米糠之附加價值，而米糠中具有許多生理活性成分，還可增進國人身體健康，有效抵抗逆境所造成的氧化傷害。

第六章 參考文獻



- 江華洲。荔枝浸漬酒成分與色澤變化之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2001。
- 吳良哲、許明仁、戴三堡。浸漬條件對桑椹再製酒色澤安定性之影響。台灣園藝。2006。52，107-110。
- 施怡如、鄭統隆、曾東海、王強生。有色水稻中花青素的種類及其功能探討。中華農業研究。2004。53，221-228。
- 胡鳳授。水果再製酒之製造。製酒科技專論彙編。1991。10，139-147。
- 張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文。食品化學。1997。華香園出版社。台北。
- 陳彥婷。洛神葵再製酒製程之研究。輔仁大學食品科學系碩士論文。2007。
- 陳清泉。果汁非酵素褐變及其抑制方法。食品工業。1992。24，45-53。
- 曾國展。花青素在乙醇溶液中顏色變化之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。2006。
- 黃小萍。花青素聚合度與抗氧化能力關係之研究。國立屏東科技大學食品科學系碩士論文。2001。
- 黃愉婷。與酚類共色對花青素穩定性及抗氧化力之影響。國立屏東科技大學食品科學系碩士論文。2005。
- 趙鳳鼎。玫瑰浸漬酒顏色品質之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2005。
- 蔡正宗、陳中文、葉碧櫻。花青素安定性之研究-紅鳳菜花青素、葡萄花青素與洛神花萼花青素。東海學報。1992。33，1068-1100。
- 蔡正宗、陳中文。紅鳳菜花青素安定性之探討。食品科學。1992。19，310-323。

蔡正宗、陳叔鳳。黑糯米中兩種主要花青素之結構鑑定。 *食品科學*。 **1996**。 *23*，
444-452。

蔡嘉芝。紫色狼尾草花青素之穩定性及抗氧化活性。國立屏東科技大學食品科學
系碩士論文。 **2004**。

勵建榮、岑沛霖。楊梅汁內花色苷熱降解動力學研究。 *科技通報*。 **2002**。 *18*， 1-5。

鍾愛嵐。米糠安定性處理及其產品應用。 *烘焙工業*。 **2007**。 *204*， 20-23。

簡汎儒。桑椹浸漬酒加工過程中成分溶出之研究。國立台灣大學園藝學研究所碩
士論文。 **2003**。

Adams, J. B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the
3-glycosides of cyanidin in acidified aqueous solution at 100°C. *J. Sci. Food Agric.*
1973, *24*, 747-762.

Araceli, C. O.; Ma, L. P. H.; Rodríguez, J. A.; Carlos, A. G. V. Chemical studies of
anthocyanins : A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859-871.


Asen, S.; Stewart, S. N.; Norris, K. H. Copigmentation of anthocyanins in plant tissues
and its effect on color. *Photochem.* **1972**, *11*, 1139-1143.

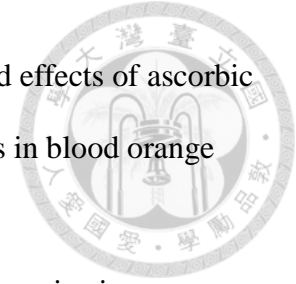
Bakker, J.; Timberlake, C. F. The mechanism of color changes in aging port wine. *Am. J.*
Enol. Viti. **1986**, *37*, 288-292.

Bakker, J.; Bridle, P.; Bellworthy, S. J.; Garcia, C.; Reader, H. P.; Watkins, S. J. Effect of
sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory
quality of table wine. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 297-307.

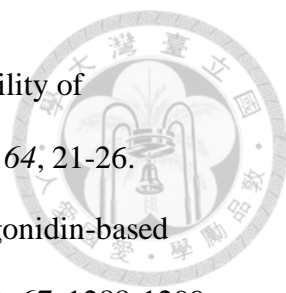
Blois, M. S. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature.* **1958**, *181*,
1199-1200.

Boekel, M. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *J. Food*
Sci. **1996**, *61*, 477-486.

- 
- Boulton, R. Estimation of copigmented anthocyanin content in red wines. *Personal correspondence*. **1998**.
- Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine : a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52, 67-87.
- Brenes, C.; H., Pozo-Insfran, D. D.; Talcott, S. T. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 49-56.
- Bronnum, H.; Flink J.M. Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.).3. Storage stability of the freeze dried product. *J. Food Tech.* **1985**, 20, 725-733.
- Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanin, in “Anthocyanins as Food Color” . Academic Press, New York, **1982**.
- Brouillard, R. The in vivo expression of anthocyanin color in plants. *Phytochem.* **1983**, 22, 1311-1323.
- Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gary, A. M.; Cheminat, A. The copigmentation reaction of anthocyanins : a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2604-2610.
- Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, O. M. Colour and stability of six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **2000**, 68, 101-107.
- Canals, A.; Laudy, M. C.; Valls, J.; Canls, J. M.; Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4019-4025.



- Cao, S. Q.; Liu, L.; Lu, Q.; Xu, Y.; Pan, S. Y.; Wang, K. X. Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugars on thermal degradation of anthocyanins in blood orange juice. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *228*, 975-983.
- Cemeroglu, B.; Velioglu, S.; Isik, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1216-1218.
- Chen, H. Y.; Tsai, Y. Z. Evaluation to the physicochemical properties of domestic black rice flour and starch. *J. Agri. Fore.* **2010**, *59*, 285-299.
- Chen, L. J.; Hrazdina, G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochem.* **1981**, *20*, 297-303.
- Daravingas, G.; Cain, R. F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model system. *J. Food Sci.* **1968**, *33*, 138-142.
- Davies, A. J.; Mazza, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 716-720.
- Debicki-Pospisil, J.; Lovric, R.; Trinajstic, N.; Sabljic, A. Anthocyanin degradation in the presence of furfural and 5-hydroxy methylfurfural. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 411-416.
- Fuleki, T.; Francis, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.* **1968**, *33*, 78-83.
- Francis, F. J. Food colorants : anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*, 273-314.
- Garcia-Palazon, A.; Suthanthangjai, W.; Kajda, P.; Zabetakis, I. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*). *J. Food Sci.* **2004**, *88*, 7-11.

- 
- Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. Influence of structure on the color stability of anthocyanins flavylium salts with ascorbic acid. *Food Chem.* **1999**, *64*, 21-26.
- Garzo ´n, G. A.; Wrolstad, R. E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 1288-1299.
- Garzo ´n, G. A.; Wrolstad, R. E. The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chem.* **2001**, *75*, 185-196.
- Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *J. Biochem. Eng.* **2003**, *14*, 217-225.
- Gorinstein, S.; Moshe, R.; Weisz, M. Effect of processing variables on the characteristics of persimmon liqueur. *Food Chem.* **1993**, *46*, 183-188.
- Goto, T.; Kondo, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins - flower color variation. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1991**, *30*, 17-33.
- Gutierrez, I. H. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4079-4083.
- Gutierrez, I. H.; Lorenzo, E.; Espinosa, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *92*, 269-283.
- Ha, T. Y.; Park, S. H.; Lee, C. H.; Lee, S. H. Chemical composition of pigmented rice varieties. *Korean J. Sci. Technol.* **1999**, *31*, 336-341.
- Hoshino, T.; Matsumoto, U.; Goto, Y. Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochem.* **1981**, *20*, 1971-1976.
- Hrazdina, G.; Franzese, A. J. Structure and properties of the acylated anthocyanins in *Vitis* species. *Phytochem.* **1974**, *13*, 225-229.

Hu, C.; Zawistowski, J.; Ling, W.; Kitts, D. Black rice (*Oryza sativa L. indica*) pigment fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5271-5277.

Joslyn, M. A.; Goldstein, J. L. Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Adv. Food Res.* **1964**, *13*, 179-217.

Juliano, B. O. Criteria and Test for Rice Grain Qualities. In *Rice Chemistry and Technology*, 2nd ed. Eagan, USA. **1985**, 443-517.

Kalt, W.; Forney, C. F.; Martin, A.; Prior, R. L. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4638-4644.

Kearsley, M. W.; Rodriguez, N. The stability and use of natural colors in foods: anthocyanin, β -carotene and riboflavin. *J. Food Technol.* **1981**, *16*, 421-431.


Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.* **2003**, *64*, 923-933.

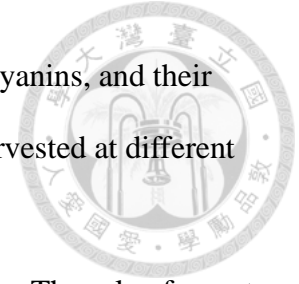
Kunsági-Máté, S.; Kumar, A.; Sharma, P.; Kollár, L.; Nikfardjam, M. P. Effect of molecular environment on the formation kinetics of complexes of malvidin -3-O-glucoside with caffeic acid and catechin. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 7468-7473.

Labuza, T. P.; Riboh, D. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.* **1982**, *36*, 66-74.

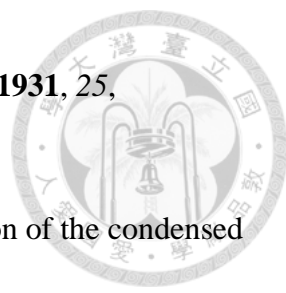
Ling, W. H.; Wang, L. L.; Ma, J. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 20-26.

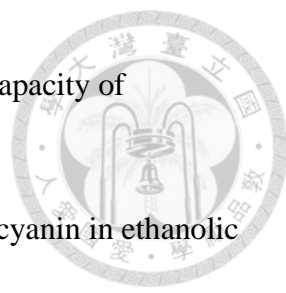
Maccarone, E.; Maccarone, A.; Rapisarda, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 901-908.

- 
- Markakis, P. Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press Inc. London, U.K. **1982**, 163-180.
- Markakis, P.; Jurd, L. Anthocyanins and their stability in foods. *Food Tech.* **1974**, *5*, 437-443.
- Mateus, N.; Freitas de, V. Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5217-5222.
- Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem.* **1990**, *29*, 1097-1102.
- Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinor Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4009-4017.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 326-328.
- Miller, N. J.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, M. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- Nebesky, E. A.; Esselen, W. B.; Mcconnel, J. E.; Fellers, C. R. Stability of color in fruit juice. *Food Res.* **1969**, *14*, 261-263.
- Ozkan, M.; Yemeniciolgu, A.; Cemeeroglu, B. Degradation of various fruit juice anthocyanins by hydrogen peroxide. *J. Food Res. Int.* **2005**, *38*, 1015-1021.
- Palamidis, N.; Markakis, P. Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *J. Food Sci.* **1975**, *40*, 1047-1049.



- Perez-Magarino, S.; Gonzalez-San, J. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivative during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1181-1189.
- Pifferi, P. G.; Wrolstad, R. E. Enzymatic degradation of anthocyanins : The role of sweet cherry polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* **1974**, *39*, 786-811.
- Poei-Langoston, M. S.; Wrolstad, R. E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 1718-1723.
- Qureshi, A. A.; Sami, S. A.; Khan, F. A. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus types I and II. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 175-187.
- Qureshi, A. A.; Salser, W. A.; Parmar, R.; Emeson, E. E. Novel tocotrienols of rice bran inhibit atherosclerotic lesions in C57BL/6 ApoE-deficient mice. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2606-2618.
- Ramaswamy, H. S.; Van de Voort, F. R.; Ghazala, S. An analysis of TDT and Arrhenius methods for handling process and kinetic data. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 1322-1326.
- Reddy, V. S.; Dash, S.; Reddy, A. R. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza Sativa L.*) : identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. *Thero. Appl. Genet.* **1995**, *91*, 301-312.
- Rein, M. J.; Heinonen, M. Stability and Enhancement of Berry Juice Color. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3106-3114.
- Ribereau-Gayon. Anthocyanins of grapes and wines. In *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press Inc. New York, USA. **1982**, 209-242.

- 
- Robinson, G. M.; Robinson, R. Survey of anthocyanins. *J. Biochem.* **1931**, *25*, 1687-1705.
- Roux, D. G. Recent advances in the chemistry and chemical utilisation of the condensed tannins. *Phytochem.* **1972**, *11*, 1219-1228.
- Ryu, S. N.; Park, S. Z.; Ho, C. T. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food Drug Anal.* **1998**, *6*, 729-736.
- Sato, M.; Ramarathnam, N.; Suzuki, Y. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 67-103.
- Scheffeldt, P.; Hrazdina, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 517-520.
- Shi, Z.; Francis, F. J.; Daun, H. Quantitative comparison of the stability of anthocyanins. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 768-770.
- Shrikhande, A. J. Anthocyanins in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1976**, *7*, 193-196.
- Sistrunk, W. A.; Gascoigne, H. L. Stability of color in Concord grape juice and expression of color. *J. Food Sci.* **1983**, *48*, 430-440.
- Skrede, G.; Wrolstad, R. E.; Lea, P.; Enersen, G. Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 172-177.
- Suzuki, M, T.; Kimura, K.; Yamagishi, H. Comparison of mineral contents in 8 cultivars of pigmented brown rice. *J. Jpn. Soc. Food Sci.* **2004**, *51*, 424-427.
- Tiwari, B. K.; O'donnell, C. P.; Patras, A. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. *J. Food Chem.* **2009**, *113*, 1119-1126.

- 
- Tsai, P. J.; Huang, H. P. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Res. Int.* **2004**, *37*, 313-318.
- Tseng, K. C.; Chang, H. M.; Wu, S. B. Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions. *J. Food Process. Pres.* **2006**, *30*, 503-514.
- Tsuda, T.; Shiga, K.; Ohshima, S. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharmacol.* **1996**, *52*, 1033-1039.
- Vacaa, V.; Piga, A.; Caro, A. D. Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage. *Nahrung Food*, **2003**, *47*, 442-447.
- Wang, H.; Cao, G. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 304-309.
- Wang, S. Y.; Stretch, A. W. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 969-974.
- Wesche-Ebeling, P.; Argaíz-Jamet, A.; Hernández-Porras, L. G.; López-Malo, A. Preservation factors and processing effects on anthocyanin pigments in plums. *Food Chem.* **1996**, *57*, 399-403.
- Williams, M.; Hrazdina, G. Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 66-68.
- Wilska-Jeszka, J.; Korzuchowska, A. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation. Influence on the color of strawberry and chokeberry juices. *Food Res. Tech.* **1996**, *203*, 38-42.
- Wrolstad, R. E. Color and pigment analysis in fruit products. *J. Ala. Aga. Exp. Sta. Bull.* **1976**, *45*, 624-628.

Wrolstad, R.E.; Robert, W.; Lee, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Tech.* **2005**, *16*, 423-428.

Xia, M.; Ling, W. H.; Ma, J. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. *J. Nutr.* **2003**. *133*, 744-751.

Zhang, M. W.; Guo, B. J. P. Genetic effect on Fe, Zn, Mn and P contents in *Indica* black pericarp rice and their genetic correlations with grain characteristics. *Euphytica*, **2004**. *135*, 315-333.