

Extraction of Anthocyanin from Grape Peel: Studies of Extraction Conditions and Linear Relationship

Tzu-Ching Wang¹, Jen-Chieh Tseng², and Chi-Ching Yang^{2,*}

¹ Department of Hospitality Management, Meiho University, Pingtung, 91202, Taiwan

² Department of Food Science and Technology, National Pingtung University of Science and
Technology, Pingtung, 91201, Taiwan

*E-mail: yangcc.tw@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of extraction conditions on the grape peel anthocyanin. The results showed that several extraction factors affected the extraction yield and speed, including pretreatment, solvent multiple, time and temperature. More anthocyanin can be extracted from fresh grape peel than from those of freeze-drying and hot air drying. The maximum amount of anthocyanin can be extracted from the grape peel when treated with 20-fold acidic ethanol at 60°C for 75 minutes. The simplified degradation index of anthocyanin increased with the increase of extraction time and solvent multiple. A positive influence of the extraction temperature and solvent multiple on the anthocyanin extraction rate was found by simple linear regression.

Key Words: Grape peel, Anthocyanin, Extraction.



* Corresponding author: yangcc.tw@gmail.com

DOI : 10.6159/IJSE.2017.(7-2).04

葡萄皮花青素萃取：萃取條件及線性關係之研究

王子慶¹、曾仁傑²、楊季清^{2,*}

¹美和科技大學餐旅管理系

²國立屏東科技大學食品科學系

摘要

本研究目的是探討萃取條件對葡萄皮花青素的影響，結果顯示，有幾個萃取因素會影響萃取產量，包括預處理、溶劑倍數、時間和溫度。新鮮的葡萄皮可以提取更多的花青素而非冷凍乾燥和熱空氣乾燥者，當使用 20 倍酸性乙醇在 60°C 下處理 75 分鐘，可從葡萄皮中萃取出最大量之花青素，而花青素的降解指數則會隨著萃取時間和溶劑倍數的增加而增加，經簡單線性回歸則發現花青素萃取速度會受到萃取溫度與萃取溶劑倍數之正向影響。

關鍵字：葡萄果皮、花青素、萃取



1. 前言

包括水果、蔬菜、穀類、花卉等許多植物之所以能夠展現繽紛艷麗色彩，主要歸功於花青素(anthocyanin) (Peña-Sanhueza *et al.*, 2017)，近年來研究更指出，花青素由於無毒與具有強大的抗氧化能力，而被視為潛在的食品色素來源及其可能之保健素材而受到青睞(Kuspradini *et al.*, 2016)，但有多種因素會影響花青素之穩定性，包括 pH (Smith, 2016)、溫度(Rienth *et al.*, 2017)、光線(Lee, 2017)、氧氣(Edo-Roca *et al.*, 2014)、金屬離子(Rustioni, 2015)、二氧化硫(Bellincontro *et al.*, 2017)及維生素 C (Brenes *et al.*, 2005)等。

葡萄皮富含花青素(Costa *et al.*, 2014)，釀酒後的葡萄皮廢棄物，更可以作為花青素的重要來源，如台灣的釀酒用黑后(Black queen)葡萄，該品種葡萄樹勢生長強健，結果良好，適合製酒，果皮紫黑色，花青素含量極高，釀製之紅酒品質優良(張，2007)。近年來，因開放民間製酒，以致私人酒莊林立，再加上消費市場上之需求，遂間接帶動新品種釀酒葡萄的研發(張等，2009；2013)，然黑后葡萄仍為臺灣大宗釀造紅酒之葡萄品種。

有關葡萄皮花青素的萃取方法有諸多研究，包括固液比、顆粒、時間、溫度、萃取溶劑(Rajha *et al.*, 2014)、酸類(Spagna *et al.*, 2003)與超音波(Bosiljkov *et al.*, 2017)等，唯可能受限於品種、產區、產季或實驗方法，故結果尚未能趨於一致(Miraje *et al.*, 2015)。在臺灣，對黑后葡萄皮花青素之研究不多，且是以具有毒性之甲醇萃取(張，1977)，可能具有食用上之疑慮，故本研究擬改以酸性酒精進行萃取，以評估不同萃取條件下對黑后葡萄皮中花青素萃取之影響。

2. 材料與方法

2.1 葡萄皮前處理

本研究所採用之黑后葡萄的外皮部分，向二林鎮篤實之葡萄果農購買當日採收之葡萄，並立即運回實驗室，清洗乾淨後，將皮肉分離，取其果皮備用。本試驗採用三種不同方式做為葡萄皮之前處理，分別為不做任何處理之新鮮葡萄皮(Fresh, F)、遮光並進行冷凍結乾燥之葡萄皮(Freeze-drying, FD)及以 50°C 熱風乾燥 3 小時之葡萄皮(Hot air drying, HA)，並測得三者之水分含量分別為 82.8%、10.5%與 12.4%。

2.2 化學藥品

藥品包括 Folin-Ciocalteu reagent 及 Gallic acid (台灣 Merck)，95%乙醇 (臺灣菸酒股份有限公司)，Potassium chloride、Sodium acetate 與 Sodium carbonate 等皆為試藥一級藥品。

2.3 萃取溶劑之種類與花青素之降解指數

取葡萄皮與酸性乙醇(pH 1.0)均質 30 秒，酸性乙醇倍數分別為葡萄皮之 5 倍(5X)、

10 倍(10X)與 20 倍(20X) (w/v)，均質後，移至水浴槽中進行振盪萃取(100 rpm, 1 hr)，以濾紙過濾後得之萃取液，並花青素破壞之測定。即將上述萃取液分別以 pH 1.0 KCl-HCl 與 pH 4.5 Sodium acetate-HCl 緩衝液做等倍數之稀釋，遮光靜置 2 小時後，以分光光度計測定其在 535 nm 之吸光值(Optical density, O.D.)，分別得到 O.D._{pH1.0} 與 O.D._{pH4.5} 後，將之代入公式，並以降解指數(Simplified degradation index; DI_{simp.})表示，當 DI_{simp.} 值越大，表示花青素分解越嚴重(Fulki & Francis, 1968)，公式如下：

$$DI_{simp.} = TO.D._{pH 1.0} / \Delta O.D.$$

TO.D._{pH 1.0}：為 pH1.0 時之總 O.D. 值

$\Delta O.D$ ：O.D._{pH 1.0}-O.D._{pH 4.5}

2.4 萃取溫度與花青素萃取之關係

稱取 100 克葡萄皮於已裝有酸性乙醇之均質瓶中，均質 30 秒後，將各均質瓶分別置於 30、40、50 與 60°C 之水浴槽中進行花青素之萃取，每隔一定之時間(15、30、45、60 與 75 min)取出，以濾紙過濾後，精確定量濾液體積(V)，並從濾液中吸取 2 mL 試樣，經適當稀釋，以濃鹽酸及氫氧化鈉溶液(1 N)分別調整 pH 至 1.0 及 4.5，並以分光光度計測定其在 535 nm 的吸光值 A1 (pH 1.0 者)與 A2 (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克樣品中所含總花青素之毫克素(Fulki & Francis, 1968)：

$$\text{總花青素含量(mg 花青素/100g 樣品)} = [(A1 - A2) \times F \times MW \times V \times 100] / (\epsilon \times \omega)$$

MW：花青素分子量以 Cyanidin 之分子量 340 計

V：總萃取液體積 (mL)

F：稀釋倍數

ϵ ：以花青素之莫爾吸光係數(Molecular extinction coefficient) 246000 計算

ω ：樣品總重(g)

2.5 統計分析

將各部分之實驗樣品經三或四重複分析試驗，所得數據經 SAS 統計軟體進行變異數分析及其平均值，再進一步以 Duncan 法比較各組差異。之後，再以線性回歸(linear regression equation)來驗證與探討相關因子間之關係。

3. 結果與討論

3.1 萃取條件

3.1.1 萃取溶劑倍數對萃取量之影響

當在進行未取操作時，萃取溶劑(Lucimara *et al.*, 2009)與 pH (Rockenbach *et al.*, 2011)均有可能影響花青素萃取效果，較低的 pH 值則可以維持較高的總花青素含量(Piakong, 2016)，且萃取倍數亦會左右萃取效果(練, 2009)。當以不同倍數之酸性乙醇對葡萄皮進行花青素之萃取，5X、10X 與 20X 之萃取量分別為 0.1597、0.3103 與 0.3845 % (圖一)，

可以看出花青素之萃取量與會隨著酸性乙醇的倍數增加而增加，類似的結果亦發現於前人之研究(Thao *et al.*, 2015)。

3.1.2 溫度對萃取量與萃取速度之影響

花青素之萃取量會隨著萃取溫度的提高而增加(圖二 A)，即由 30°C 之 1.7999、1.9404 及 2.6599 分別增加至 60°C 之 2.4656、2.6580 及 3.6437 mg/100 g dry base，略高於前人(葉等, 1989)之研究；而花青素之萃取速度亦會隨著萃取溫度之升高而增加，即由 30°C 之 24.0、25.9 及 35.5 分別增加至 60°C 之 32.9、35.4 及 48.6 mg/min (圖二 B)。學理上，溫度每升高 10°C，化學反應速率約增為 2 倍，唯此為理想狀態，實際操作上，破碎後之葡萄皮顆粒的大小與一致性等，均會左右與萃取溶劑之接觸面積，進而影響到花青素自葡萄皮顆粒中移動至萃取溶劑中的速度(Rajha *et al.*, 2014)。本研究證實，溫度的確會影響萃取效果包括萃取量與萃取速度，此與前人研究相同(Bener *et al.*, 2016)。

3.1.3 萃取時間對萃取量之影響

萃取量會受到前述溫度的影響外，同時也會受到萃取時間長短的影響(Sakamoto *et al.*, 2015)。本研究選擇 60°C 作為探討比較添加不同倍數之酸性乙醇對葡萄皮花青素萃取量變化情形(圖三)，由圖中可知，取 5X 與 10X 者相比較，在萃取的前 45 分鐘其花青素之萃取量呈現一緩慢上升之趨勢，而在 45 分鐘後呈現持平的現象；若再比較 10X 與 20X 者相比較，則可以發現在萃取的前 15 分鐘，二者之花青素萃取量極為接近，而後隨著萃取時間的增加，其花青素之萃取量則會快速增加，20X 者並於 75 min 時達到最高。

3.1.4 前處理對 DIsimp. 及萃取率之影響

本研究亦對黑后葡萄皮之不同前處理可能對降解指數、花青素萃取率等之影響作一探討，發現熱風處理對樣品本身具有一定程度之破壞，即 HA 組之 DIsimp. 為 1.32，高於 FD 組之 1.18 與 F 組之 1.19 者(表一)，由於溫度是造成花青素降解的重要原因之一(Han *et al.*, 2015; Takahama *et al.*, 2013)，故推測是因為熱風處理使水分逸失後，葡萄皮中花青素與空氣中的氧氣接觸機會增大，進而造成花青素的降解，而 FD 組之 DIsimp. 略高於 F 組者之原因則可能是凍乾與解凍過程中所造成之花青素之破壞或流失所致，唯二者之間無顯著差異。

三組不同前處理之花青素萃取率如圖四所示，由圖中可以發現以 20X 乙醇萃取之 F 組所得到的花青素萃取率最高(71%)，且遠高於其他各組者，推測可能是因為花青素為極性分子(Hosseini *et al.*, 2016)，當 F 組葡萄皮之中相對大量且同屬強極性的水與酸性乙醇互溶後，相對提高萃取溶劑之極性，並拉近其與花青素之極性差距，進而提高其萃取效果。

3.2 線性回歸

3.2.1 溫度對萃取速度與萃取量之影響

利用簡單線性回歸可以瞭解到農產品中所要探討因子間之關係(梁等, 2015)。本研究取前述20X酸性乙醇萃取F組之花青素萃取量為代表, 進行開根號取方根之處理, 並將所得到之數據進行線性回歸, 所得之迴歸方程式 $Y=mX+C$ 中, 其中斜率(m)可以用來作為判別萃取速度是否增快之一個參考部分; 而截距(C)的部分, 代表萃取時間0時之花青素萃取量, 但在實際上時間不可能為0, 故在此將之視為花青素之瞬間萃取量。由圖五可知, 斜率會隨著溫度的升高而增加, 斜率由30°C之0.1949, 快速增加至60°C之0.2271, 表示萃取速度隨著溫度的增加而增快; 同樣地, 在花青素之瞬間萃取量的部分(截距 C), 也是呈現出隨著溫度的升高而增加的趨勢, 此證據印證了前述溫度的增加不但會增加花青素萃取量亦會提高其萃取速度。

3.2.2 萃取溶劑倍數對萃取速度與萃取量之影響

續以前述60°C者為例, 比較添加倍數不同酸性乙醇對其萃取速度之影響, 當在萃取酸性乙醇為5X及10X的情形下, 對斜率之影響差異不大(分別為0.1120與0.0902), 但當劑量提高為20X時, 卻有超過的二倍(0.2271)以上的差異出現(圖六); 相反地, 在花青素之瞬間萃取量的部分(截距 C), 此三者間的差異甚小。此結果表示在該60°C溫度之下, 萃取溶劑倍數會影響增加花青素萃取速度但對萃取量之影響不大。

3.2.3 不同萃取溫度與萃取溶劑倍數對斜率之影響

不同萃取溫度與萃取溶劑添加量對斜率之影響如圖七所示, 由圖中可以發現在萃取溶劑10倍以下時, 隨著萃取溫度的升高, 其斜率呈現上升之趨勢但變化不穩定, 當萃取溶劑的倍數增加至10倍以上時, 則隨著萃取溫度的上升其斜率也會隨之上升, 此結果印證前兩節所述花青素萃取速度會受到萃取溫度與萃取溶劑倍數之正向影響, 此結果與前人(Thao *et al.*, 2015)所述者相符。

4. 結論

本研究發現, 花青素萃取量會受到萃取之溶劑倍數、溫度與時間之影響, 花青素萃取量之方根會與溫度成正比, 而萃取率亦會受到前處理之影響, 簡單線性回歸的研究則發現到花青素萃取速度會受到萃取溫度與萃取溶劑倍數之正向影響。

5. 參考文獻

- [1] 梁佑慎、方信秀、柯立祥。不同荔枝品種果皮褐化過程的生理變化。台灣農學會報, vol.16, no.4, pp.311-328。2015。
- [2] 張致盛(2007)。台灣栽培葡萄品種之特性。臺中區農業專訊, vol.58, pp.3-6。2007。
- [3] 張致盛、陳怡靜、張林仁、葉漢民(2009)。釀酒葡萄新品種‘臺中 2 號’。臺中區農業改良場研究彙

- 報，vol.104，pp.39-47。2009。
- [4] 張致盛、劉惠菱、葉文彬、張林仁、葉漢民。釀葡萄酒新品種‘台中4號’。臺中區農業改良場研究彙報，vol.121，pp.25-34。2013。
- [5] 張榮如。黑后葡萄花青素之研究。中國園藝，vol.23，no.1，pp.32-38。1977。
- [6] 葉漢民、蔣青華、何妙齡、何聖典。釀酒葡萄深色品種色素之萃取與穩定性之研究。菸試彙報，vol.35，pp.79-82。1989。
- [7] 練怡伶。洛神葵花青素萃取條件及儲存安定性之探討(未出版之碩士論文)。國立中興大學食品暨應用生物科技學系。台中市。2009。
- [8] Bellincontro, A., Catelli, C., Cotarella, R., & Mencarelli, F. “Postharvest ozone fumigation of *Petit Verdot* grapes to prevent the use of sulfites and to increase anthocyanin in wine,” *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2017, DOI: 10.1111/ajgw.12257.
- [9] Bener, M., Shen, Y., Xu, Z., & Apak, M. R. “Changes of the anthocyanins and antioxidant properties of Concord grape (*Vitis labrusca*) pomace after acid hydrolysis,” *Records of Natural Products*, vol. 10, no. 6, pp. 794-799. 2016.
- [10] Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. “Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 102, pp. 195-203. 2017.
- [11] Brenes, C. H., Del Pozo-Insfran, D., & Talcott, S. T. “Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 1, pp. 49-56. 2005.
- [12] Costa, E., Cosme, F., Jordão, A. M., & Mendes-Faia, A. “Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions,” *OENO One*, vol. 48, no. 1, pp. 51-62. 2014.
- [13] Edo-Roca, M., Nadal, M., Sánchez-Ortiz, A., & Míriam Lampreave, M. “Anthocyanin composition in Carignan and Grenache grapes and wines as affected by plant vigor and bunch uniformity,” *OENO One*,

- vol. 48, no. 3, pp. 201-217. 2014.
- [14] Fulki, T., & Francis, F. J. "Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice," *Journal of Food Science*, vol. 33, no. 5, pp. 78-83. 1968.
- [15] Han, K. H., Kitano-Okada, T., Seo, J. M., Kim, S. J., Sasaki, K., Shimada, K. I., & Fukushima, M. "Characterisation of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity," *Journal of Functional Foods*, vol. 14, pp. 692-701. 2015.
- [16] Hosseini, S., Gharachorloo, M., Ghiassi-Tarzi, B., & Ghavami, M. "Evaluation of the organic acids ability for extraction of anthocyanins and phenolic compounds from different sources and their degradation kinetics during cold storage," *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 66, no. 4, pp. 261-269. 2016.
- [17] Kuspradini, H., Rosiarto, A. M., Putri, A. S., & Kusuma, I. W. "Antioxidant and toxicity properties of anthocyanin extracted from red flower of four tropical shrubs," *Nusantara Bioscience*, vol. 8, no. 2, pp. 135-140. 2016.
- [18] Lee, J. "Light exclusion influence on grape anthocyanin," *Heliyon*, vol. 3, no. 2, e00243. 2017.
- [19] Lucimara, S., Vanini, L. S., Hirata, T. A., Kwiatkowski, A., & Clemente, E. "Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.)," *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 12, no. 3, pp. 213-219. 2009.
- [20] Miraje, S. Y., Amlepatil, N. M., Sahoo, A. K., & Mote, G. V. "Anthocyanin extraction from winery waste material: A Review," *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 218-221. 2015.
- [21] Peña-Sanhueza, D., Inostroza-Blancheteau, C., Ribera-Fonseca, A., & Reyes-Díaz, M. "Anthocyanins in berries and their potential use in human health. Chapter 8 in **"Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine"**, Edited by Shiomi N. and Waisundara V.," ISBN 978-953-51-2942-4, Print ISBN 978-953-51-2941-7, Published: February 22, 2017 under CC BY 3.0 license. pp. 155-172.
- [22] Piakong, N. A. B. "Effects of processing and storage on color, total phenolics, total anthocyanin, total

- carotenoid and antioxidant activity of some tropical fruit jams,” *Master thesis*. Department of Horticulture, National I-Lan University. 2016.
- [23] Rajha, H. N., Darra, N., Hobaika, Z, Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. “Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid- liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process,” *Food and Nutrition Sciences*, vol. 5, no. 4, pp. 397-409. 2014.
- [24] Rienth, M., Torregrosa, L., Sarah, G., Ardisson, M., Brillouet, J. M., Romieu, C. “Temperature desynchronizes sugar and organic acid metabolism in ripening grapevine fruits and remodels their transcriptome,” *BMC Plant Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 164-186. 2016.
- [25] Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., de Souza Schmidt Gonçalves, A. E., Genovese, M. I., Fett, R. “Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking” *Food Research International*, vol. 44, no. 4, pp. 897-901. 2011.
- [26] Rustioni, L. “The effect of copper ions on colour in extracts of *Cabernet sauvignon* and *sangiovese* skins under wine-like conditions,” *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 36, no. 3, pp. 389-392. 2015.
- [27] Sakamoto, W., Kanehira, T., Hongou, H., Asano, K. “Polyvinylalcohol stabilizes anthocyanins of red wine in the solid phase but not in the aqueous phase,” *Advances in Biological Chemistry*, vol. 5, no. 5, pp. 215-223. 2015.
- [28] Smith, M. J. “Implications of anthocyanin instability and metabolism: impact on discovery of intake biomarkers and in vitro mechanisms of action,” *Doctoral thesis, University of East Anglia*. 2016.
- [29] Spagna, G., Barbagallo, R. N., Todaro, A., Durante, M. J., Pifferi, P. G. “A method for anthocyanin extraction from fresh grape skin,” *Italian Journal of Food Science*, vol. 15, no. 3, pp. 337-346. 2003.
- [30] Takahama, U., Yamauchi, R., Hirota, S. “Isolation and characterization of a cyanidin-catechin pigment from adzuki bean (*Vigna angularis*),” *Food Chemistry*, vol. 141, no. 1, pp. 282-288. 2013.
- [31] Thao, N. L., Dao, T. K. T., Le, P. T., Than, T. U. X., DSM Nguyen, T. N. T. “Effect of ethanol on the

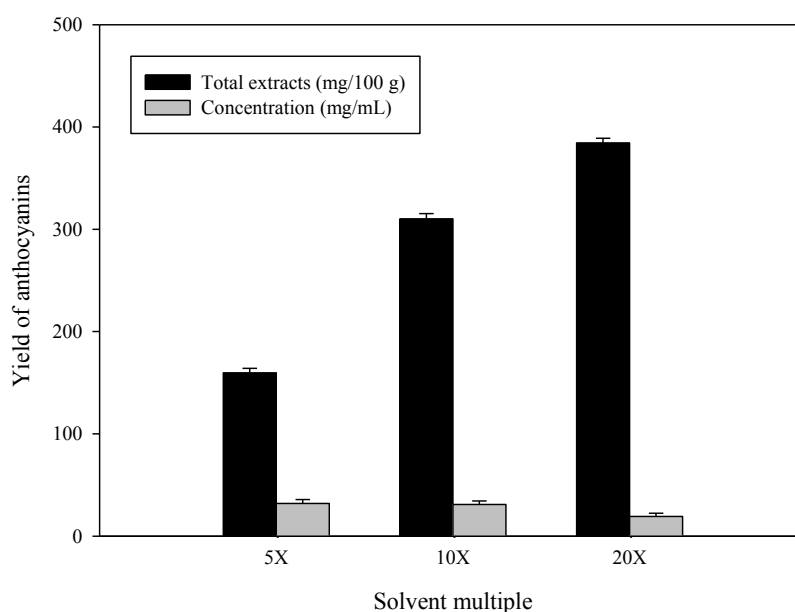
anthocyanin extraction from the purple rice of Vietnam,” *Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 3, no. 1-2, pp. 45-48. 2015.



表一 添加 20 倍酸性乙醇對不同前處理葡萄皮花青素分解指數之影響

| Disimp. | Pre-process | | |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Fresh | Freeze-drying | Hot air-drying |
| | 1.18 ^b | 1.19 ^b | 1.32 ^a |

^{a,b} Values in raw followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

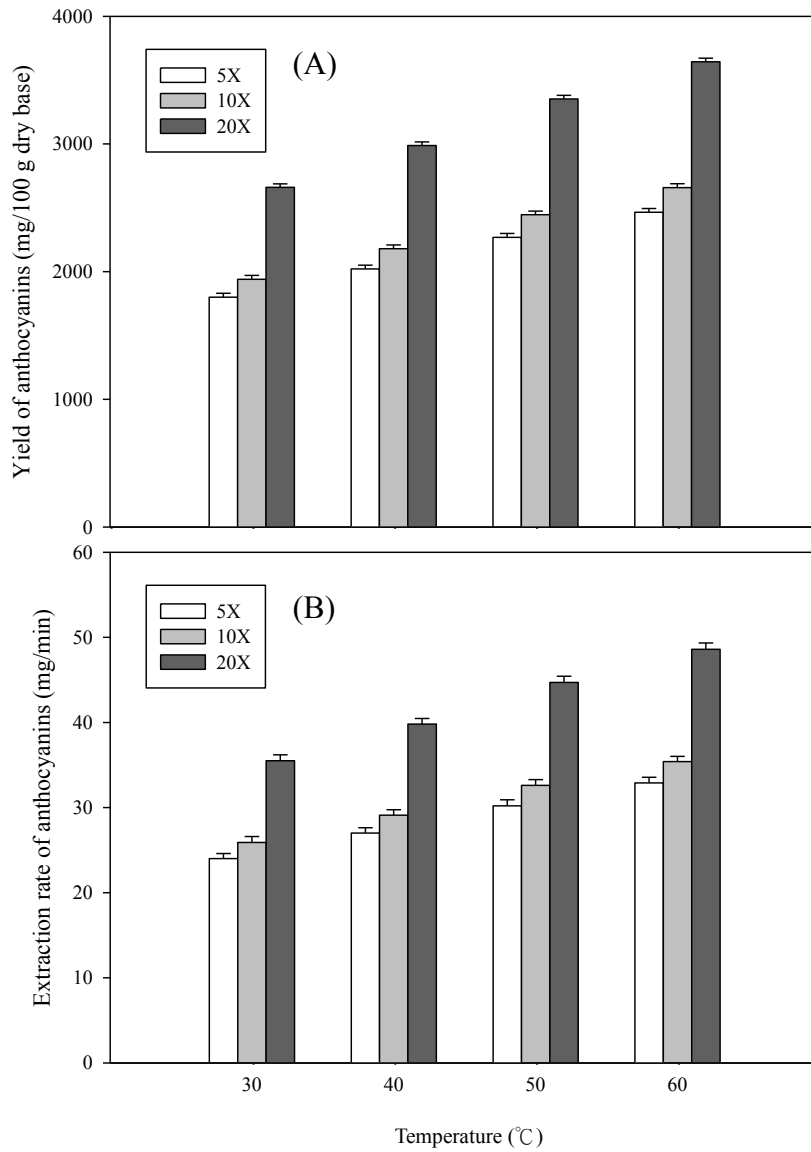


圖一 不同倍數之酸性乙醇對黑后葡萄皮花青素萃取之影響

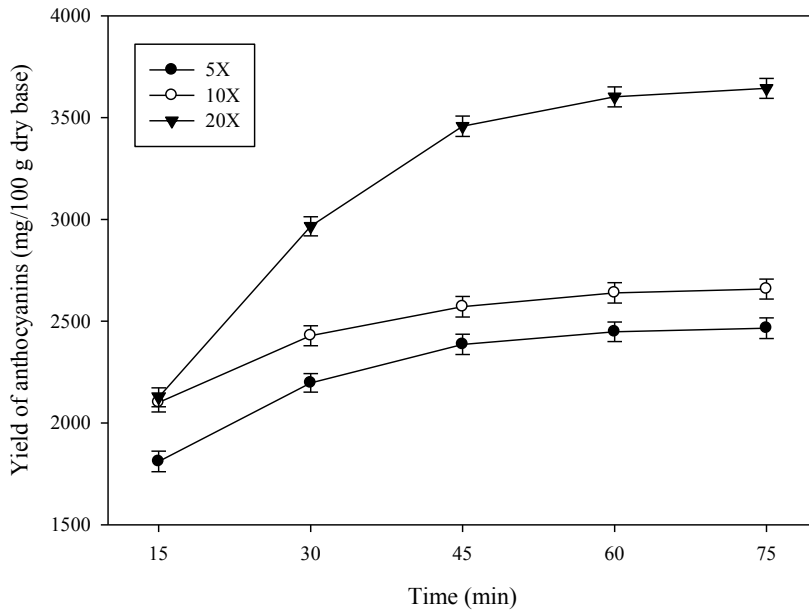
^{a,b,c} Means in column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^{v,w,x} Means in column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

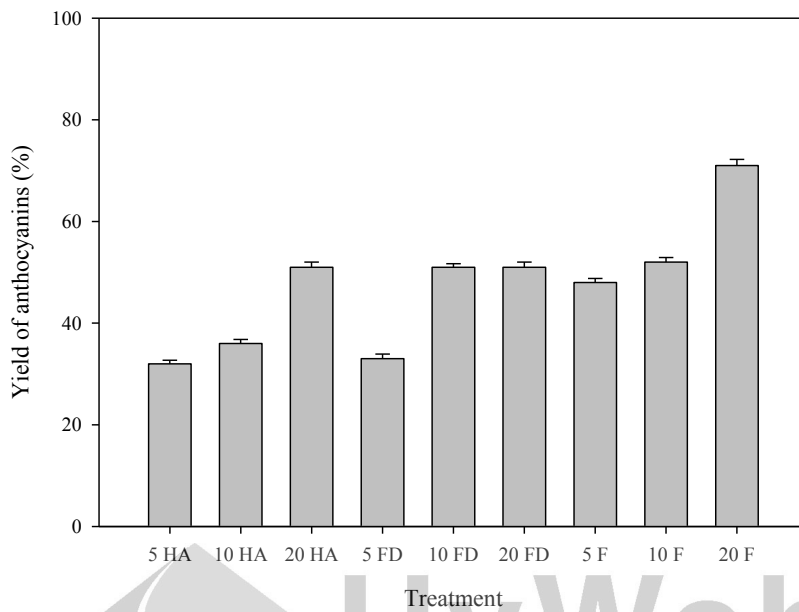




圖二 不同倍數之酸性乙醇於不同溫度下對黑后葡萄皮花青素萃取量(A)與萃取速度(B)之影響

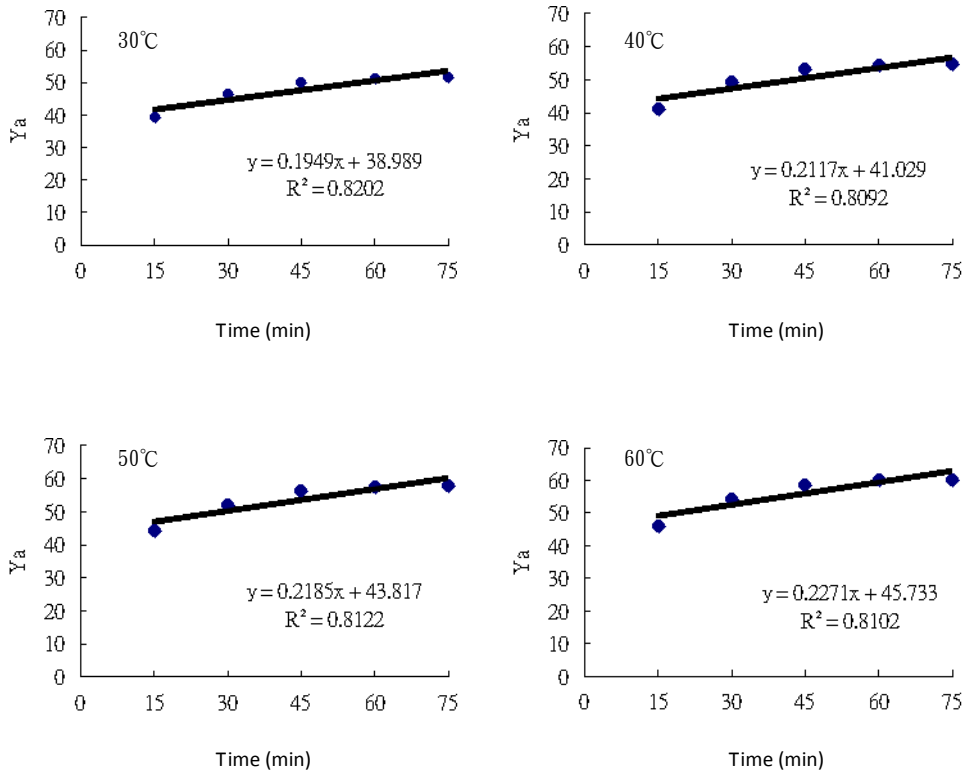


圖三 於 60°C 下添加不同倍數之酸性乙醇對黑后葡萄皮花青素萃取量之影響

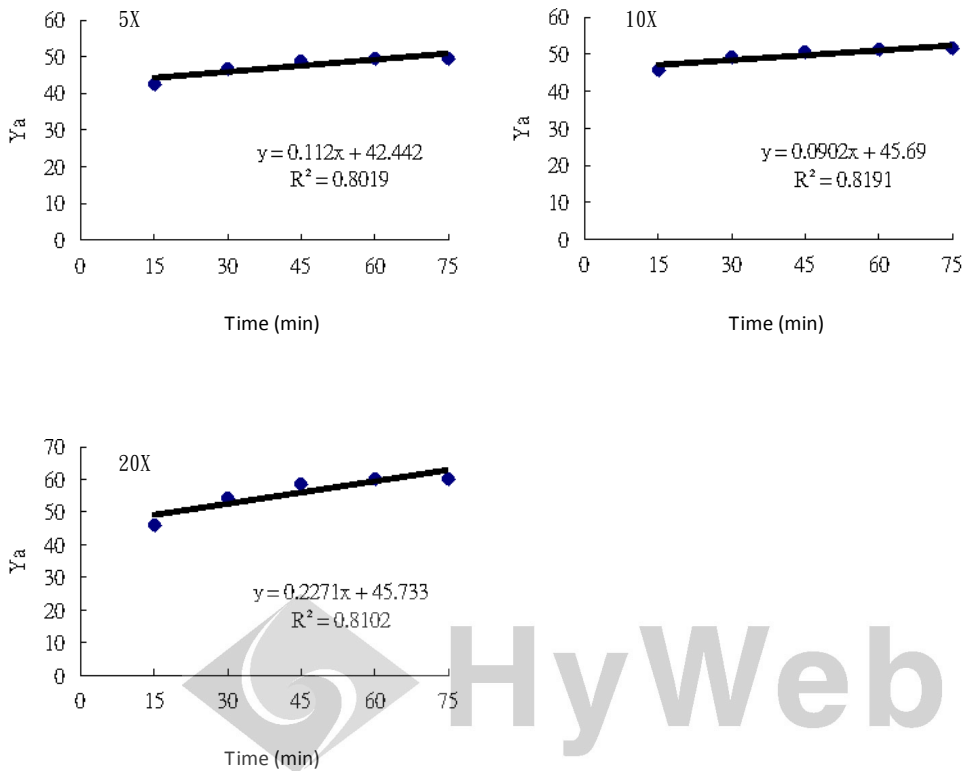


圖四 酸性乙醇對不同預處理之黑后葡萄皮花青素萃取率

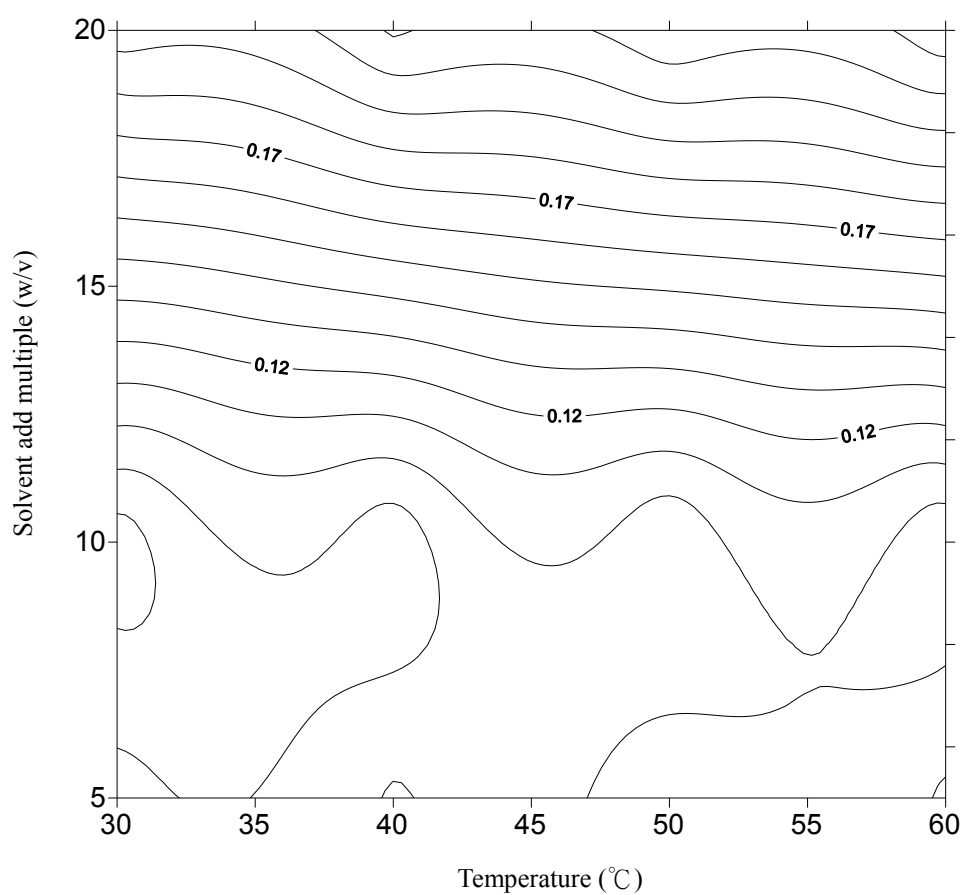
*F : Fresh. FD : Freeze-drying. HA : Hot air drying.



圖五 不同溫度對黑后葡萄皮花青素萃取量與萃取速度之影響
* Y_a mean anthocyanin extracts square root.



圖六 於 60°C 不同倍數酸性乙醇對黑后葡萄皮萃取量與萃取速度之影響
* Y_a mean anthocyanin extracts square root.



圖七 不同萃取溫度與不同倍數酸性乙醇對黑后葡萄皮花青素萃取斜率之影響