

以皂苷元分析技術進行優質國產無患子母樹之篩選

成果報告

一、研究背景

人工合成清潔劑未研發應用之前，無患子果實因其果皮富含皂素，早期就已作為肥皂替代品，以洗滌身體、器具或衣物，而本草綱目中亦有記載「無患子子皮主治澀垢、面黣（附方）洗頭去風、洗面去黣，子中仁去口臭（附方）牙齒腫痛」，可知無患子除了可作為清潔劑之外，同時也具有療效。在這個合成清潔劑充斥的時代，無患子所含有的皂素容易於自然環境下分解，對環境衝擊較低。因此，無患子具有潛力成為另一種天然清潔劑之選擇。

為增加無患子的效益與產量，選定優良無患子之種源成為了一項重要的課題。若從研究基因序列鑑定或生化合成路徑中或許可得到無患子之皂素確切的合成的來源與定量。然而，這樣的方法需要長時間的建立與分析也不符合成本上需求，因此皂苷元分析技術成為簡便且準確之分析方法。

皂素普遍存在於植物界中，僅少量於海星等動物身上具有皂素的成分。而皂素根據配醣基 (aglycone) 的不同大致上可分為 Steroidal 與 Triterpene group 兩種 (Oleszek, 2002)(Fig 2.)。根據 Huang 等人(2003)所分析的結果台灣的無患子果皮(*Sapindus mukorossi*) 主要成分之結構為齊敦果類 (屬 Triterpene group)於 R 位置接上 Rhamnose、Xylose、Glucose 或以 H 取代 (Fig1.)。

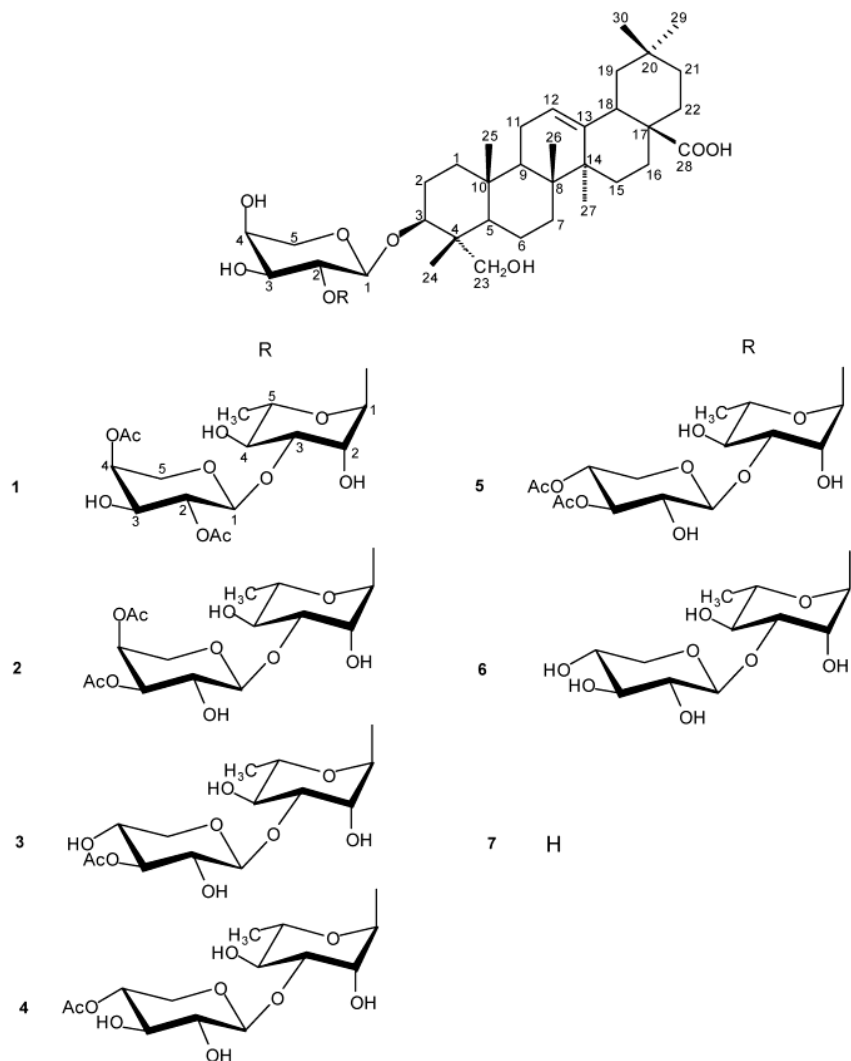
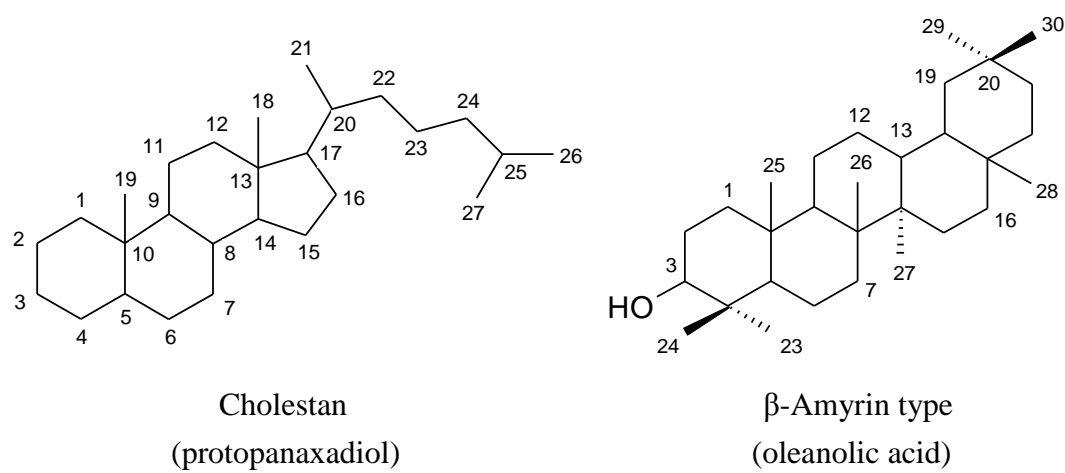


Fig. 1 Saponins isolated from pericarp of *Sapindus mukorossi*. (Huang *et al.*, 2003)



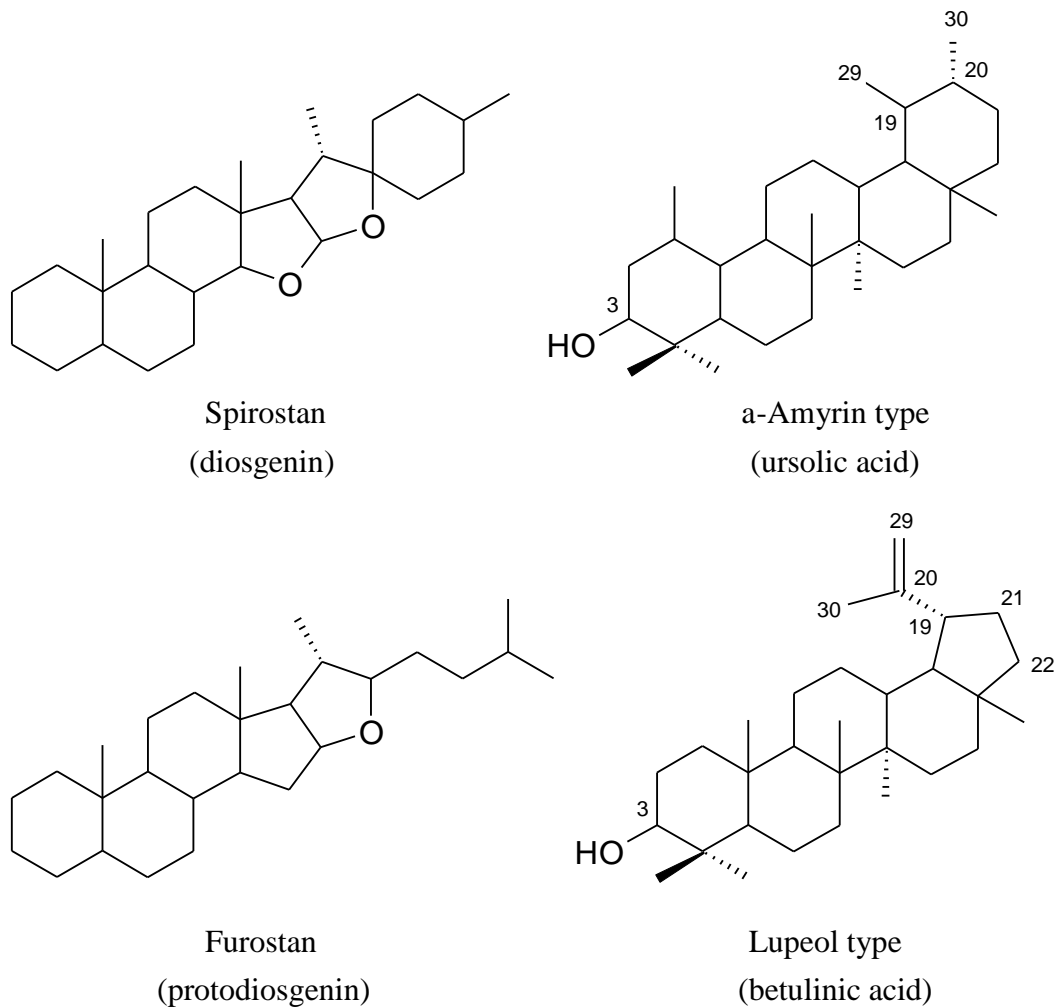


Fig 2. Basic sapogenin skeletons—steroidal (left column) and triterpene (right column) (Oleszek and Bialy, 2006).

為確立目前台灣各地之野生無患子之三萜類皂苷元(Triterpene sapogenin)的含量作為母樹選定中的一項重要指標，重新評估現今常用之兩種比色法 (Colorimetric assay)與皂苷元分析技術進行比較定量之結果。所謂皂苷元分析技術係為常見酸水解定量方法之改良方法，其原理利用皂素(Saponin)經水解過後，糖分子與皂苷元分離不溶於水之特性。在反應過後，皂苷元會懸浮(Suspension)在水中經膜分離後，回溶於甲醇中定量分析。

目前，皂素定量方法中有兩種主要的比色法可粗略定出樣品皂素含量，其一為香草醛硫酸法(vanillin-sulfuric acid assay) (Hiai *et al.*, 1976)，其二為五氯化銻法

(antimony pentachloride colorimetric assay) (Hanzas and Barr, 1969)。比色法的優點有試驗步驟簡易、定量結果之呈現快速。然而，比色法中的樣品未經一定程度的分離或處理則容易干擾定量的結果，在後續試驗結果會以香草醛硫酸法與皂苷元分析技術比較。

現今的分析技術當中，以HPLC最為普遍且快速準確。然而，在分析天然物過程中，前處理過程仍然非常重要，因為天然物中往往含有相當多種化合物蘊含其中，直接注入HPLC不僅會對管柱產生傷害且分析效率及準確度亦會大幅下降。根據Huang等人(2009)所採用的方法，利用乙醇、甲醇、水等極性較高的溶劑萃取無患子中的皂素，經減壓濃縮後的萃取物溶於水中以去除雜質，再以親脂性溶劑如苯、正己烷或乙醚等進行兩相之液相-液相分配 (liquid-liquid partition)，油脂或色素等脂溶性雜質轉溶於親脂性溶劑，與水層中的皂素分離。繼續以親水性強的正丁醇和水層進行兩相萃取，親水性強的雜質包括醣類留在水層，與溶於正丁醇的皂素分離，將正丁醇層減壓濃縮後即得皂素粗萃取物。而皂素粗萃取物的分離純化方法有有機溶劑沉澱法、鉛鹽沉澱法、膽固醇沉澱法、氧化鎂法和常用的管柱層析法。上述方法可得較純之皂素，然而過程相當繁複且耗時，僅用於定量方法時並不實用，且有部份皂素在各溶劑分層損失之疑慮致使定量不甚準確。本計劃之期末報告將各傳統分析方法與皂苷元分析方法比較，並將此分析方法用於全台各地無患子皂苷元含量之測定。

二、重要工作項目

1. 將全省各地（台北芝山岩、南投 151 縣道 1 公里與 3 公里處、台南大內鄉、台南左鎮三處、高雄、花蓮光復與林田山林業園區、台東東河鄉 3 處與大武鄉大鳥國小）選定之無患子母樹進行衛星定位與拍照。
2. 以 Hederagenin (Extrasynthese co., France) 作為標準品並以 HPLC 確立層析圖譜，並且訂定檢量線(Standard curve)。
3. 以去年所採集之台南後壁鄉、屏東獅子鄉及台東東河鄉地區之無患子先行以

皂苷元分析技術進行分析。

4. 傳統比色法與皂苷元分析技術比較並說明其優點。
5. 利用皂苷元分析技術比較成熟與未成熟無患子之差異性。
6. 各月份不同地區母樹皂苷元含量分析與同株母樹各個月份含量變化分析之結果。
7. 各月份之各株母樹含量排序結果與優良母樹選定。

三、執行程序

1. 全省各母樹之衛星定位與拍照

於台北芝山岩、台中、台南、高雄、屏東、花蓮光復與台東東河鄉等地以手持式 GPS (Garmin VISTA C) 定出經緯度座標。另以數位相機記錄母樹外觀與生長情形。

2. 訂定 Hederagenin 標準品層析圖譜與檢量線

秤取 5 mg 之 Hederagenin 標準品並溶於光譜級甲醇 (Acros co.) 中定量至 5 mL，則此標準品之濃度為 1.0 mg/mL。於濃度 1.0 mg/mL 之 Hederagenin 甲醇溶液中分別取 0.8 mL、0.5 mL、0.3 mL 及 0.1 mL 並各自加入甲醇定量至 1.0 mL 而使濃度分別為 0.8 mg/mL、0.5 mg/mL、0.3 mg/mL 與 0.1 mg/mL。將此五種不同濃度之 Hederagenin 溶液以 Nylon membrane (Pore size = 0.45 μ m) 過濾後打入 HPLC，Pump 是採用日本 Jasco 公司的 PU-1580 及 PU-980，分離管柱採用 μ Bondapak 之 C18 column，3.9 mm X 300 mm，以 Hitachi 所生產的 L-3000 Photo Diode Array Detector 並將光源設在 Wavelength 為 206 nm 進行含量分析。流速為 1 mL / min，沖提比例為 40/60 = Acetonitrile/H₂O，至 30 分鐘為 60/40 = Acetonitrile/H₂O。

將各不同濃度之標準品成分峰積分，積分值與濃度作線性迴歸之方程式與 R Square 值。R Square 越接近於 1 則表示濃度與積分值呈現高度相關。爾後則可用此迴歸方程式估計樣品的濃度。

3. 去年之台南、屏東及台東地區之無患子皂素含量檢測

a. 無患子果皮採收後之前處理

- (1) 將不同母樹來源之無患子果實外皮置於溫溼度穩定之環境中，使之含水率達到氣乾的含水率。
- (2) 將氣乾後之果實外皮依照大略上顏色之不同作分類。
- (3) 取各分類之少部份無患子果實外皮秤重（氣乾重），再置於 105°C 烘箱 24H，取出後再次秤重並記錄重量後放回烘箱，反覆數次直至果實外皮重量無明顯變化，此時之重量為絕乾重，隨即計算各分類無患子果實外皮之濕量基準含水率。
- (4) 將各分類之無患子果皮以高速粉碎機至粉末狀，分別以夾鏈袋保存並詳細記錄母樹來源、採集月份、果皮之外觀顏色，平日置於電子式乾燥箱避免受到微生物分解且變質。
- (5) 取無患子各分類之 10g 絕乾粉末與去離子水 40ml 充分混合並置於 shaker (160rpm) 中 72H。
- (6) 萃取後的無患子果實粉末之水萃液以 Nylon membrane 進行過濾，過濾後之水萃液依照各分類裝入分析用之 Vial 中，瓶上詳細標明母樹來源、採集月份以及果皮之顏色外觀，平日置於 4°C 低溫冷藏箱避免變質與真菌之寄生。

b. 皂苷元分析技術執行步驟

- (1) 將各分類之水萃液稀釋 20 倍並加入 100 μ L 的 98 % H₂SO_{4(aq)} 高濃度水溶液，再將樣品放置於滅菌釜中加熱 2 小時以加速皂素進行酸水解的反應。
- (2) 加熱後，取部份樣品進行離心，可見其水不可溶部，去掉上清液取不溶水的部份並置於布氏過濾器抽氣乾燥至呈現乾燥之粉末狀後溶於甲醇 (HPLC grade)，再以 Nylon membrane 過濾雜質。
- (3) 將此 20 μ L 樣品打入 HPLC，將 Photo Diode Array Detector 並將光源設在

Wavelength 為 206 nm 進行含量分析。同樣以流速為 1 mL / min，沖提比例為 40/60 = Acetonitrile/H₂O，至 30 分鐘為 60/40 = Acetonitrile/H₂O。以上述步驟之 Hederagenin 標準品作為比對，其 peak 會在 27-28 分鐘出現並與樣品進行比對定量。

4. 進行 7~10 月份各地採收無患子之定量與統計之差異性顯著分析。

四、執行成果

I. 搜尋國內外相關分析技術文獻

a. 皂素之特性及定義

皂素 (Saponins) 為一種非揮發且具有介面活性 (Surface-active) 的分子，廣泛分布於自然界，其中以植物界為最大宗 (Lasztity *et al.*, 1998; Oleszek, 2002)。而 Saponin 這個是由自於拉丁文中的 Sapo 即英文中 Soap 一詞，因為其所具有類似於肥皂的發泡特性。另外，皂素味道甜中帶澀 (Grenby, 1991; Kitagawa, 2002; Heng *et al.*, 2006)，除了有發泡劑的功能外亦具有乳化油脂的效果 (Price *et al.*, 1987)，在藥理特性上則具有溶血的特性 (Oda *et al.*, 2000; Sparg *et al.*, 2004)，因其之介面活性會破壞紅血球表面之細胞膜所導致。除此之外，皂素對於殺菌、殺蟲與殺螺也有一定程度的效果 (Sparg *et al.*, 2004)。在食品、飲料與化妝品都有其添加的成分。

b. 皂素之化學結構

皂素像其他種天然物一樣，都有複雜的化學結構。然而，皂素之所以特別是由配醣基與醣類所組成，這兩個部份之極性有很大之差異，也造成其具有介面活性之特性。而無患子當中所含的皂素配醣基主要由三萜類化合物 (Triterpenoid) 所構成，由於三萜類化合物之取代基具有多種可能 (-H, -COOH, -CH₃)，使得在自然界中的皂素結構具有相當的多樣性產生 (Oleszek and Bialy, 2006)。

c. 苷鍵裂解之分析方法

(1) Smith 降解

過碘酸鈉可以在不影響其他鄰位官能基團的情況下選擇性氧化鄰二羥基。皂素分子含有鄰二羥基的糖部分在過碘酸鈉下生成二醛中間體。此二醛利用硼氧化鈉還原，在室溫下用酸處理及得到含鄰二羥基糖片段的皂苷元，此法稱之為 Smith 降解 (Smith *et al.*, 1965)。Smith 降解之條件非常溫和，許多在酸水解條件下不穩定的皂素都可採用 Smith 降解獲得真正的皂苷元。

(2) 酵素降解

糖苷酶 (Glycosidase) 是一類催化糖苷生物合成的酵素，在合適的條件下也能催化糖苷的分解。由於酵素幾乎與生物體中相同條件下催化基質的化學反應，採用糖苷酶可以大幅減少反應過程中皂苷元的化學變化。另外，酵素對於反應的基質有高度的專一性，必須選用合適的酵素才可使糖苷鍵徹底水解。

在進行皂素之酵素分解時，可將含有皂素與糖苷酶的水溶液在 37°C 條件下保存數天，並可以利用薄層層析法 (Thin layer chromatography) 檢測水解反應的進行情況。水解反應完全後，可用 EtOAc 萃取水液已獲得皂苷元，經簡單的色譜純化，甚至不用純化即可進行分析測試。萃取後的水液可用於進一步的醣類之種類、結構與定量的分析。

(3) 酸水解

苷鍵是縮醛的一部分，易為酸所水解。酸水解反應速度與醣和苷元之結構有關。去氧糖的水解速度較快，Furanose 較 Pyranose 快，五碳糖較六碳糖水解速度快。另外，水解速度亦與醣與苷元連接之位置有相當的關係。

酸水解的一般方法是將皂素溶於 HCl 或 H₂SO₄ 溶液中 (加入甲醇等有機溶劑助溶) 並加熱一段時間，然後減壓濃縮蒸去有機溶劑，水溶液用有機溶劑萃取出皂苷元或過濾收集所析出的皂苷元沉澱。

本次計畫所採用的皂苷元分析技術即為酸水解方法的一種，但在水解過程中不加入有機溶劑等易揮發性物質，原因是在加熱過程中，有機溶劑之易揮發特性會造成 H₂SO₄ 溶液之濃度上升造成水解條件不穩定，使皂苷元結構受到過於激烈的破壞而不利於結構或定量分析。故於水解後再利用過濾沉澱之皂苷元，再用甲醇溶解做進一部之化學分析 (如高效能液相層析儀、UV spectrum 及 NMR 等分析方法)。

d. 皂素含量測定之比色法

(1) 五氯化銻比色法 (CNS 9429)

取 125 mL 已去 CO₂ 之樣品，置於 250 mL 錐形瓶中，以水稀釋至 250 mL，加 2.5 mL 濃鹽酸，用磁製漏斗過濾，過濾時溶液中加 3.75 g 的助濾劑，且漏斗內預先鋪以 1.25 g 助濾劑以酸化之水沖洗沉澱，然後在 105°C 烘箱中乾燥 20 分鐘，以 8 mL 熱醋酸溶解，再加到 10 mL，取 1 mL 置於光電比色管中，加 7 mL 五氯化銻溶液，充分混合後靜置 10 分鐘（顏色呈現達最高峰），以冰醋酸取代樣品溶液，其他條件相同的情況下，做一空白試驗，以光電比色計在波長 535 nm 下測吸光度，用不同濃度純皂甘素溶液做標準曲線，以吸光度為橫軸，皂甘素為縱軸，由標準曲線決定樣品中皂甘素含量。

(2) 香草醛硫酸比色法 (劉知昱, 1998)

取 0.5 mL 含皂素之溶液，加入 0.5 mL 含 8% vanillin 之乙醇溶液，混合後置於冰浴中冷卻，在繼續冷卻下緩緩加入 5 mL 預冷之 77% 硫酸，混合均勻，移置於 60°C 水浴中加熱 20 分鐘，取出置入水中冷卻 5 分鐘後，以 544 nm 波長測其吸光值。另以商品皂素為標準品，依同樣方法呈色，測定後做標準曲線，以供求算總皂素含量。

上述兩種比色法作為檢驗皂素含量時，具有快速且簡便的特性。然而，無患子萃取液中含有許多的天然色素，若於萃取過程中無法有效去除色素，於分析過程中會干擾到皂素吸收的波長而影響到定量。本計劃的皂苷元分析技術之優點可排除其於化合物與色素等干擾進而真正檢測出皂素（三萜類）之含量。

II. 全省各地母樹之生長情形

a. 台北芝山岩 (北緯 25 度 06 分 10.7 秒，東經 121 度 31 分 49.7 秒)

本次計劃台北地區之無患子選定位於北投區的芝山岩公園附近的無患子。以目視估計此棵母樹之 DBH 約有 50 公分左右的大小 (Fig 4.)。由於受到今年天候

影響，雨季來得較往年慢，因此，目前本區的無患子才開始開花而尚未結果 (Fig 3.)，初步未成熟之無患子果實皂素含量分析需等到約八月份始得進行，並比較非成熟與成熟果實之皂素含量。



Fig 3. 台北芝山岩之無患子開花情形。



Fig 4. 芝山岩母樹之樹形。

b. 台中植物園 (北緯 24 度 09 分 26 秒，東經 120 度 40 分 7.4 秒)

台中地區母樹選定位於台中科學博物館旁的台中植物園，其中附近擁有 7 棵無患子，方便進行統計上變異性差異之分析，與其他地區一樣將進行三重複的實驗 (除台北芝山岩外)。此區域的無患子之 DBH 平均約為 25 公分 (Fig 6.)，高大細長且基部無明顯分枝，葉子集中於樹冠層。目前尚未開花，之後會進行期未成熟與成熟之無患子果實分析



Fig 5. 台中植物園之無患子尚未開花。



Fig 6. 台中植物園之無患子樹形。

c. 台南地區

(1) 大內鄉 (北緯 23 度 8 分 33 秒，東經 120 度 23 分 4.5 秒)

位於台南縣大內鄉的此棵野生無患子之生長情形良好，DBH 約在 45 至 48 公分，雖於基部上方就已分枝但整體樹形仍屬高大挺拔。目前已開始結果，於期末報告中會比較成熟與未成熟之皂素含量比較。



Fig 7. 台南大內鄉野生無患子之結果情形。



Fig 8. 台南大內鄉野生無患子之生長情形。

(2) 左鎮鄉

位於台南縣左鎮鄉境內具有多株野生無患子，生長情形皆良好，因附近有其它種大型樹木於颱風期間也不易受到危害，作為母樹相當合適。目前也都有青色的未成熟果實，於期末報告中會比較成熟與未成熟之皂素含量比較。



Fig 9. 左鎮鄉地點一 (北緯 23 度 3 分 44.5 秒，東經 120 度 24 分 4.2 秒)



Fig 10. 左鎮鄉地點二 (北緯 23 度 3 分 41.7 秒，東經 120 度 24 分 3.4 秒)



Fig 11. 左鎮鄉地點三 (北緯 23 度 3 分 6.3 秒，東經 120 度 24 分 21.6 秒)

d. 高雄原生植物園 (北緯 22 度 40 分 47.9 秒，東經 120 度 18 分 3.4 秒)

原生植物園之無患子雖不若台南地區之野生種高大，但此區域之無患子生長情形良好。已有未成熟果實，於之後會以皂苷元分析技術分析不同時期之皂素含量之多寡。



Fig 12. 原生植物園之無患子生長情形。



Fig 13. 原生植物園之無患子結果情形。

e. 屏東縣枋山鄉 (北緯 22 度 12 分 26.3 秒，東經 120 度 41 分 14.3 秒)

此地之無患子位於濱海地區之山坡造林地，原有之造林地之野生無患子生長情形普通且樹齡普遍低於 10 年，目前尚未結果，推測應為此地雨水較少所致。



Fig 14. 枋山鄉造林地之野生無患子生長情形。



Fig 15. 枋山鄉造林地之野生無患子生長情形之二。

f. 台東縣東河鄉

在台東地區無患子於東河鄉選定了三個不同地點之無患子作為母樹篩選的鑑定。一是位於東河鄉海邊附近的無患子 (北緯 22.969651 度，東經 121.306234)(Fig 16.)，其 DBH 約為 40~45 公分左右，高大挺拔且葉子茂密從樹幹中段到樹冠層皆有生長。其二位於省道台二十三線路旁的無患子 (北緯 22.987149，東經 121.296153)(Fig 17.)，生長在具有坡度的山地上，生長情形不若上述無患子佳且葉子生長較為稀疏，DBH 約為 25~27 公分。其三位於泰源部落旁之無患子 (北緯 22.991003，東經 121.284133)(Fig 18.)，底部分支多但整體樹形寬大且葉子尚屬茂密，DBH 約為 28~32 公分左右。



Fig 16. 東河鄉鄰海區域之無患子生長情形。



Fig 17. 省道台 23 線旁之無患子生長情形。



Fig 18. 東河鄉泰源部落旁之無患子生長情形。

g. 花蓮縣光復鄉

花蓮縣境內屬光復鄉具有較多的無患子栽植區域。本次計畫於光復鄉尋找了兩個主要無患子分佈的地點，一是光復鄉的林業園區內（北緯 23 度 43 分 0.1 秒東經 121 度 23 分 54.3 秒)(Fig 19.)，樹形高大挺拔，葉子多集中於樹冠層且樹幹中段多分枝，DBH 約為 38~40 公分。另一地點為位於台 9 線花東公路旁的無患子路樹(北緯 23 度 39 分 29.4 秒東經 121 度 25 分 7.8 秒)(Fig 20.)，推測可能其樹齡較小因此樹高與 DBH (約 15~16 公分)都較上述其他地區之無患子小，惟樹葉生長尚屬茂密。



Fig 19. 光復鄉林業園區旁的無患子生長情形。



Fig 20. 花東公路旁之無患子生長情形。

III. 過去各產地之無患子之皂素含量分析結果 (與印度、越南比較)

由於天候的關係，無患子結果情形不如預期來的早，因此以過去所採收之無患子之皂素含量先行比較，待期末報告中展示今年各地無患子之皂素含量多寡之比較(上有成熟與未成熟以及顏色外關之差異比較)。

a. Hederagenin 之標準品檢量線暨層析圖

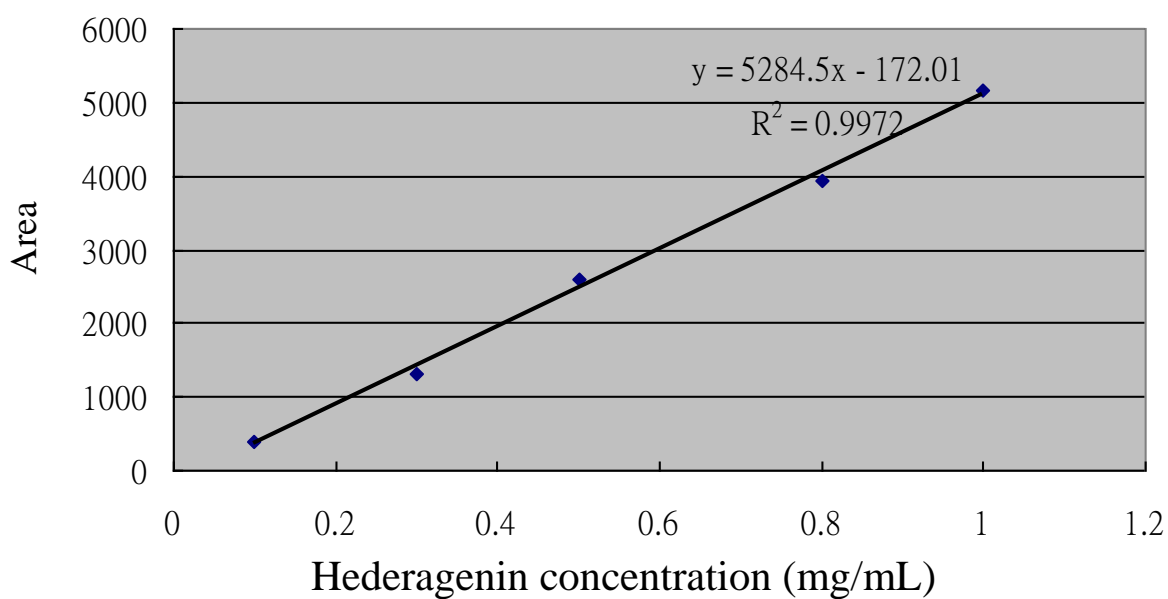


Fig 21. Hederagenin 濃度檢量線 (mg/mL)。

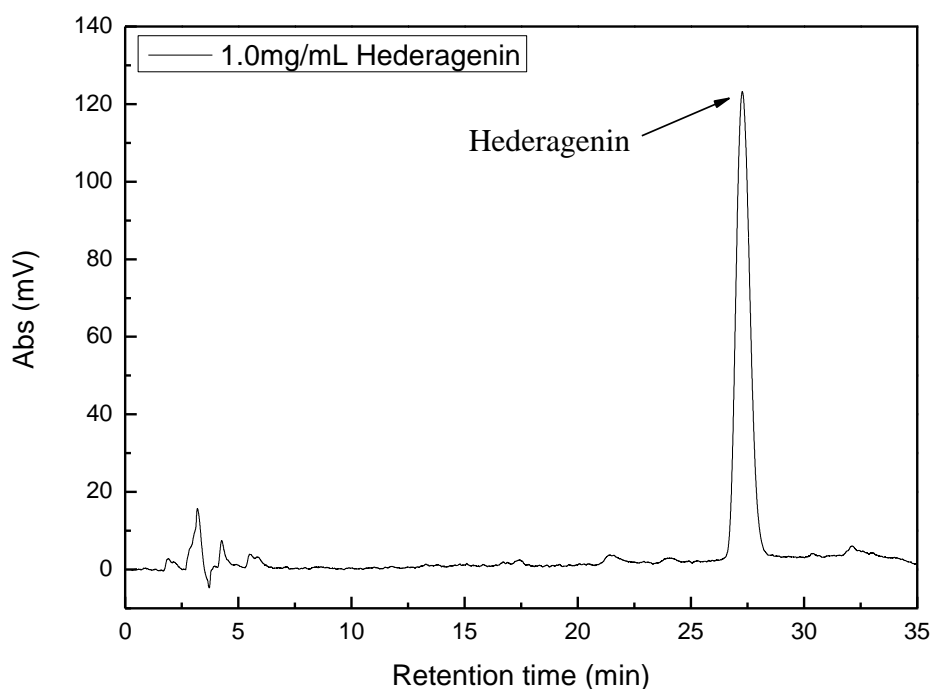


Fig 22. Hederagenin 層析圖 (Wavelength = 206nm, Acetonitrile/H₂O = 40/60 to 60/40 in 30 min) 。

b. 各產地水解前後之層析圖譜

以下之層析圖譜條件皆為，Wavelength = 206nm、Column 為 μ -Bondapak C18、Acetonitrile/H₂O = 40/60 to 60/40 in 30 min。綠色的曲線為水解前的情形，14 分鐘所出現之訊號峰為皂素，實際上無患子所萃取出之皂素結構多達十多種，因此訊號峰較為不尖銳與規則。鑒於分析上的便利，因此用 a-hederin 作為眾多皂素種類中的標準品。紅色的曲線為水解後，Hederagenin 為不含有醯基的皂苷元，分析 Hederagenin 的量及可推測原有的皂素含量。

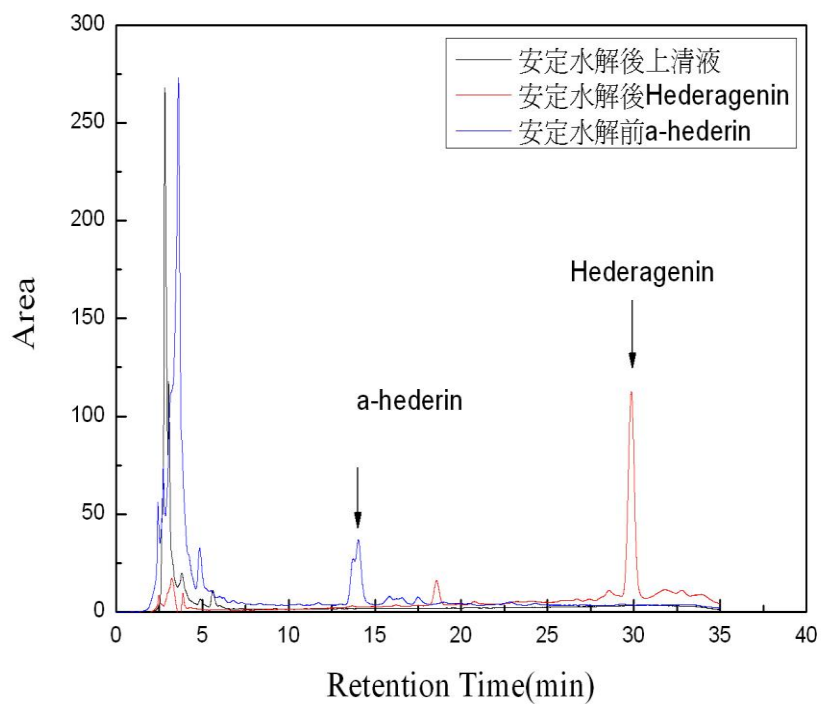


Fig 23. 台南縣安定鄉水解前後層析圖。

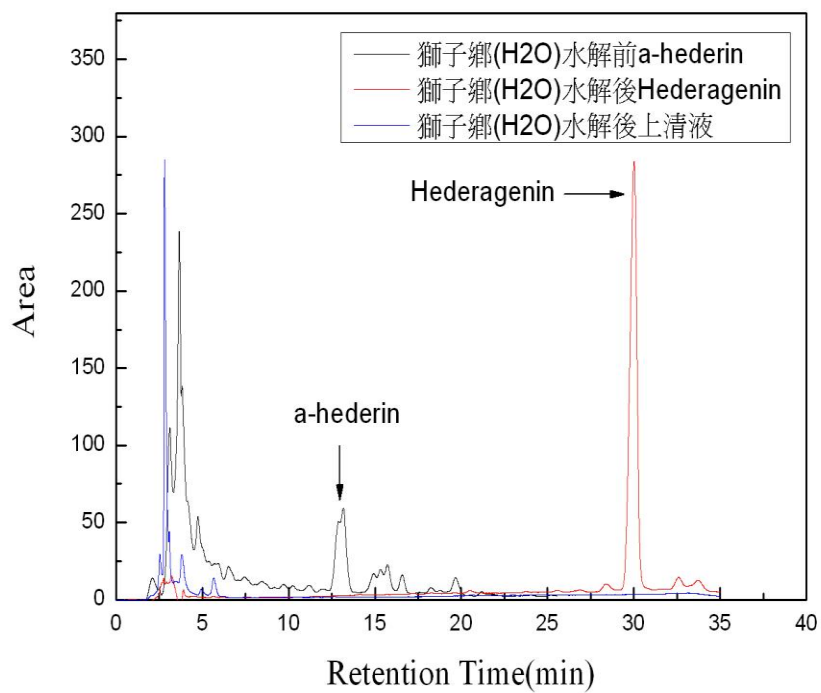


Fig 24. 屏東縣獅子鄉水解前後層析圖。

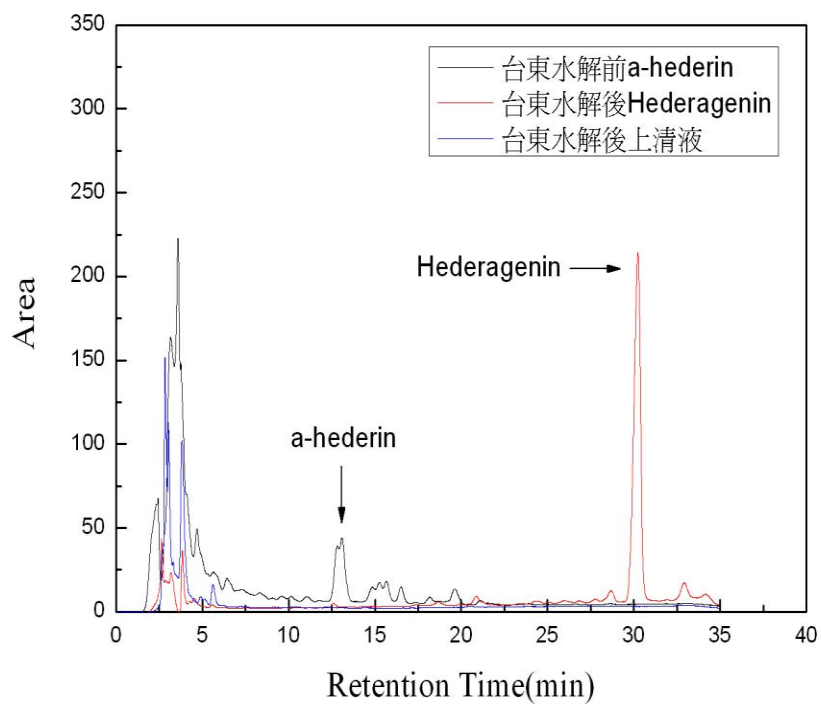


Fig 25. 台東地區水解前後層析圖。

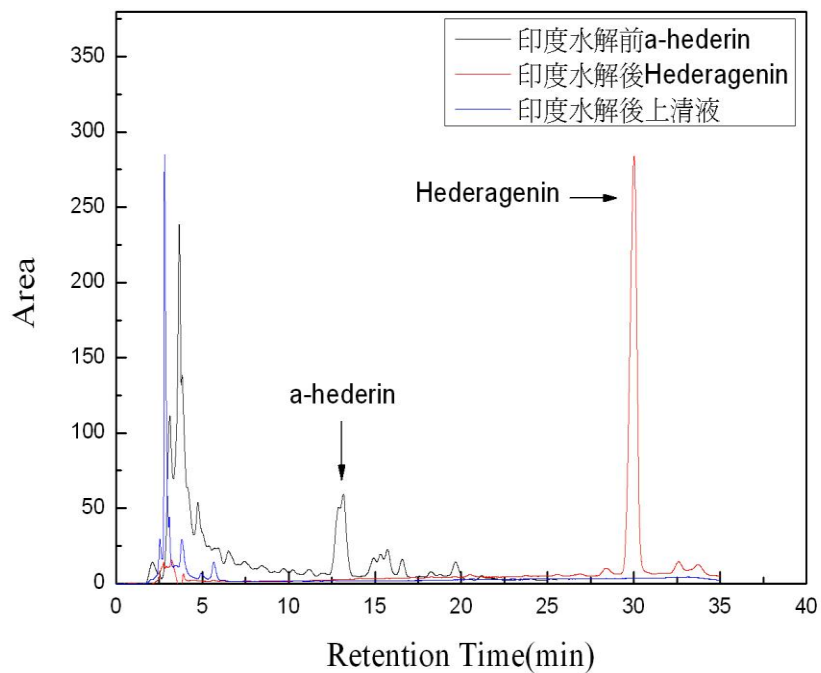


Fig 26. 印度地區水解前後層析圖。

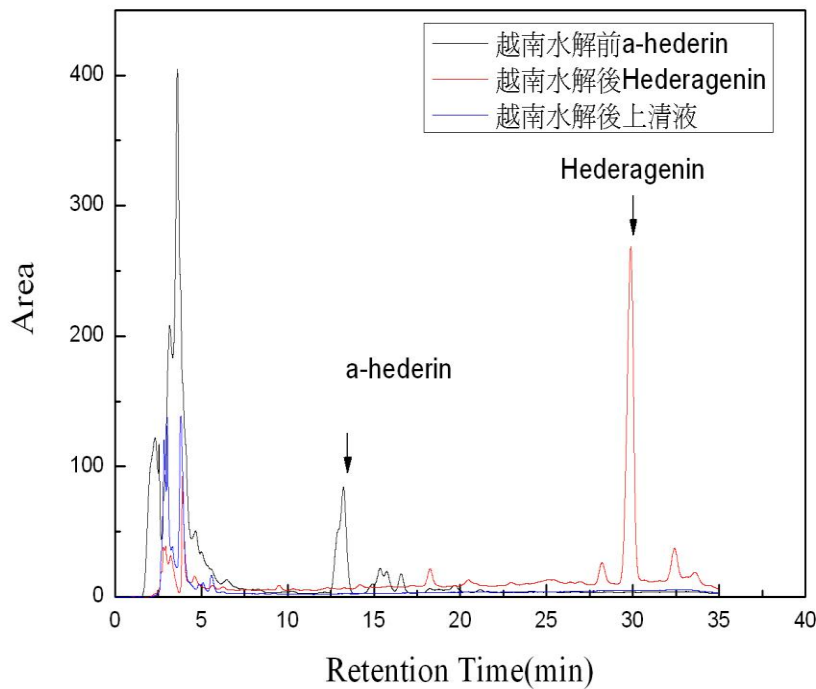


Fig 27. 越南地區水解前後層析圖。

c. 各產地之皂素 (α -hederin) 含量

α -hederin 之含量與濃度已經由與 Hederagenin 分子量之比值校正。由表 1 得知屏東獅子鄉所產的無患子皂素含量最多，高達 0.172 g 每克種皮，具有相當高的潛力成為母樹，國外種的以印度的皂素較多，每克果皮粉末含有 0.159 g 皂素。台南安定較少可能為當初採收果實過於集中於某部位而導致的誤差，若分散於各部位採收所得之變異較少。本次計畫之進度陸續進行，許多野生無患子生長良好，相信可找到具有皂素含量更多的母樹品種作為未來平地造林或生產無患子果實的主要來源，使台灣的無患子產業更加的發產與興盛。

Table 1. 國內各地與印度、越南無患子皂素含量之比較。

產地/來源	Area	[α -hederin](mg/ml)	推估總量(毫克 α -hederin/克種皮)
台南安定鄉(H ₂ O)	2632.54	0.58	46.21
台東(H ₂ O)	5600.30	1.47	117.39
印度(H ₂ O)	7347.89	1.99	159.30
越南(H ₂ O)	6724.62	1.80	144.36
屏東獅子鄉(H ₂ O)	7897.27	2.16	172.48

IV. 傳統比色法與皂苷元分析技術之定量結果比較

1. 香草醛硫酸法用於五個不同地區無患子皂素含量之定量

根據表 3 結果顯示，香草醛硫酸法定量結果除了安定地區的皂素含量約在 111.66 (mg saponin/ g pericarp powder)其餘地區之含量皆在 200~340(mg saponin/ g pericarp powder)左右與表 2 利用皂苷元分析技術之結果相比高出二到三倍之含量估計。根據邱義源等人於 2007 年的研究指出，利用有機相萃取方法，所得之正丁醇層(一般認為皂素多分布於此分層)之收率為 22.28% (嘉義大學後山)與 25.56% (台南安定)，然而正丁醇層中不僅含有皂素亦含有其他種類之化合物，故皂素含量應低於正丁醇層之固形份收率。而香草醛硫酸法的結果已接近邱等人 (2007)之正丁醇層收率，顯示此方法在比色方面不僅易受到干擾，且化學反應之專一性較低造成定量結果超過實際皂素之含量。而皂苷元分析技術，僅分析無患子中之皂苷元含量來作為分析皂素含量之推斷 (Philip and Stanley, 1986)，因為分析目標的化合物明確使得在定量結果較為接近實際值。

Table 2. The result of quantification in method of hydrolysis by suspended sapogenin

cropped place	[hederagenin](mg/ml)	dilution factor	estimated content (mg saponin/g pericarp powder)
Anding, Tainan	0.58	20	29.09 ± 2.12
Taitung	1.47	20	73.90 ± 3.97
India	1.99	20	100.28 ± 4.58
Vietnam	1.80	20	90.87 ± 4.10
Shizi, Pingtung	2.16	20	108.57 ± 4.99

Table 3. The result of quantification in method of vanillin-Sulfuric acid assay

Cropped place	[alpha-hederin](mg/ml)	dilution factor	estimated content (mg saponin/g pericarp powder)
Anding, Tainan	0.28	100	111.66 ± 4.85
Taitung	0.54	100	216.73 ± 10.34
India	0.76	100	304.60 ± 15.91
Vietnam	0.68	100	272.32 ± 11.21
Shizi, Pingtung	0.85	100	340.16 ± 15.42

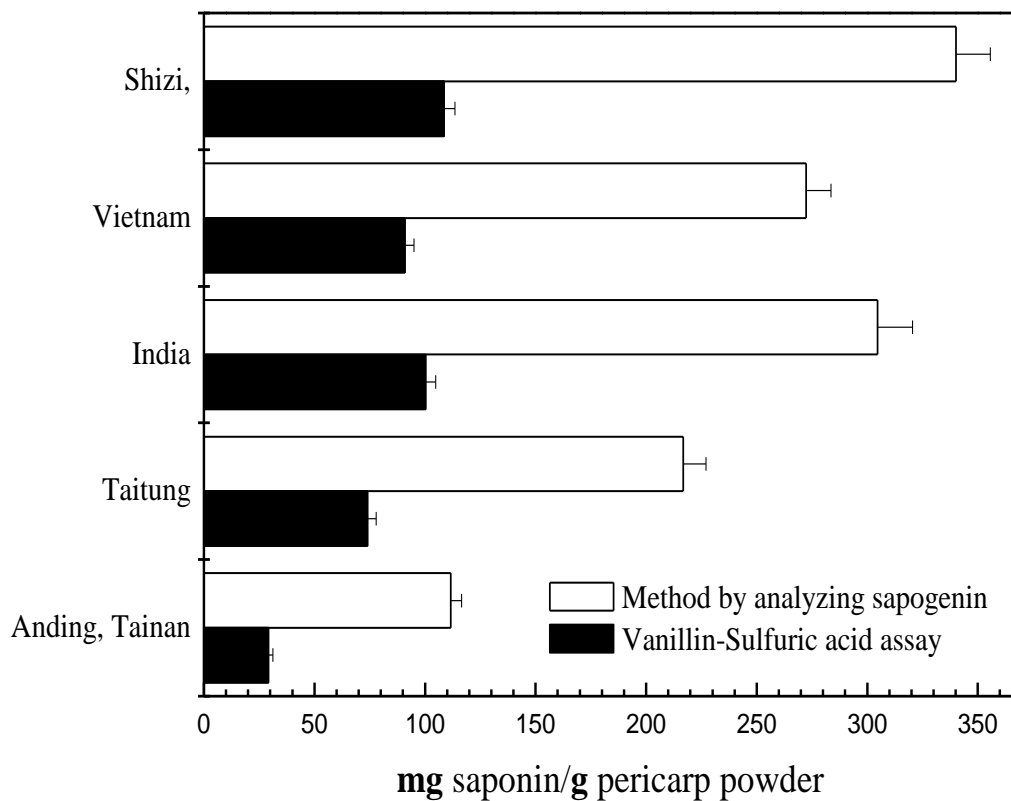


Fig. 28 The comparison in two methods in quantification.

V. 利用皂苷元分析技術比較成熟與未成熟無患子之差異性

本實驗利用未成熟與已成熟的無患子做為分析的樣品且在外觀上可輕易邊別出差別。如表 4 所示，雖然以下任何分析的母樹為不同一株，但仍然可以明顯辨別出含量上的差異。如同一般預測的認知，未成熟的無患子皂苷元含量遠低於已成熟(約為成熟之百分之二十)。另外，也顯示皂苷元分析方法能確實且有效分辨含量差異，對於母樹篩選有非常大的助益。在後續研究上，會呈現皂苷元在不同月份之含量變化差異，並比較各月份不同地區含量多寡。

Table 4. The comparison between mature and immature soapnut trees.

Cropped place	Appearance	[hederagenin](mg/ml)	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)
Anding, Tainan		0.58	29.09
Taitung		1.47	73.89
India	dense color (mature)	1.99	100.28
Vietnam		1.80	90.87
Shizi, Pingtung		2.16	108.57
Taitung1		2.67	2.67 ± 0.48
Taitung2		14.26	14.26 ± 0.64
Kaohsiung		19.56	19.56 ± 1.58
Taitung3	Light color (immature)	20.40	4.21 ± 0.10
Danei, Tainan		4.21	20.40 ± 0.57
Anding, Tanan (model garden)		19.33	19.33 ± 0.32
Dawu, Taitung		5.95	5.94 ± 0.23

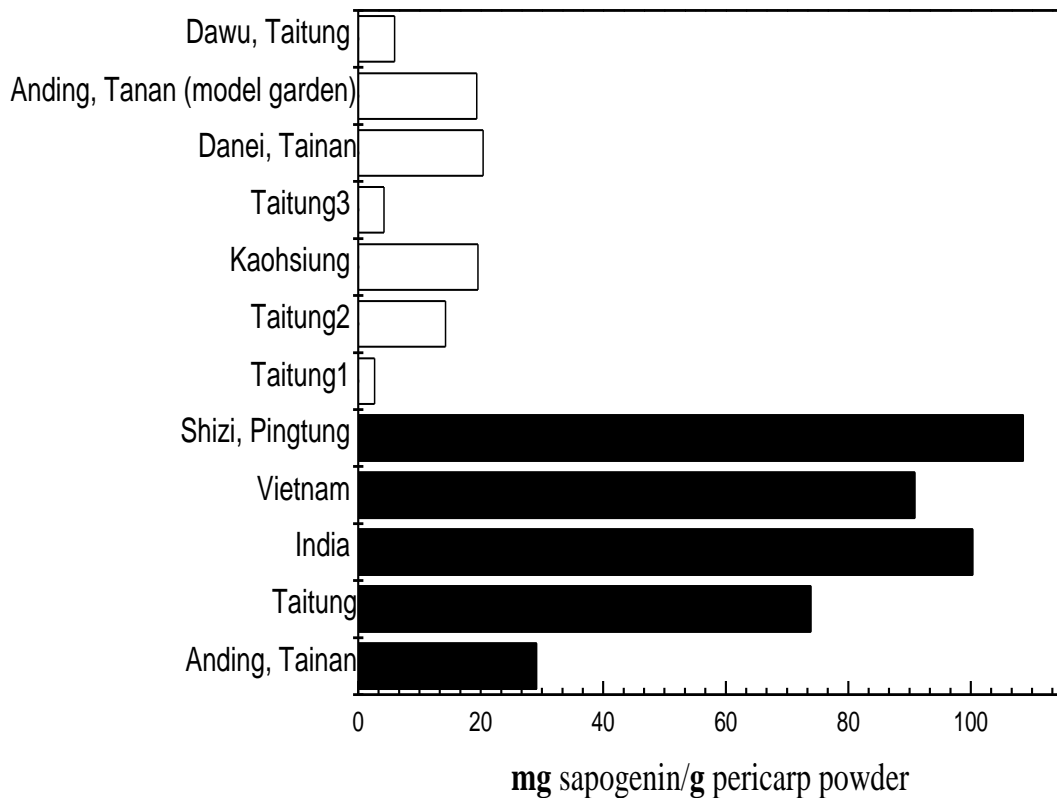


Fig. 29 The comparison between mature and immature soapnut trees.

VI. 各月份不同地區母樹皂苷元含量分析與同株母樹各個月份含量變化分析之結果

皂苷元分析技術用於無患子篩選之應用

無患子廣佈於台灣中低海拔的山區，在過去石化原料並不多的時代，它被用來作為洗滌的工具。後來，石油化學合成技術大幅進步，無患子被化學合成的皂基所取代。如今環保意識的抬頭，無患子再度成為環保、無污染的希望，正因為如此，無患子也讓農產品有了市場的利基。基於成本的考量，無患子果皮所產生的皂素含量必須達到一定程度才會有利潤，因此，篩選優良且能產生較為大量皂苷的母樹是一項重要的工作。

本計畫所採用的方法乃是分析皂苷元含量多寡推測皂素含量，在過去已經有

非常多相關研究皆採用類似的原理，如Rothrock於1957的研究用來分析固醇類得皂素以及Philip與Stanely於1986年在做大豆皂苷元水解效率分析，另外，在葫蘆巴豆中分析的皂苷元也應用相同概念分析(Taylor *et al.*, 2000)。與本實驗室所採用方法不同的是，皂苷元水解的環境並非傳統的有機溶劑而以水取代，因水與皂苷元類化合物的極性差異大，不易溶解於其中且利用孔隙較小的膜即可過濾並定量分析。

以下所呈現的結果之檢測儀器採用 μ Bondapak之C18 column，3.9 mm X 300 mm， Pump採用日本Jasco公司的PU-1580及PU-980，流速為1 mL/min，沖提比例為40/60 = Acetonitrile/H₂O，至30分鐘為60/40 = Acetonitrile/H₂O。檢測器為Hitachi L-3000 Photo Diode Array Detector 並將光源設在Wavelength 為206 nm進行含量分析。

1. 各月份不同地區母樹皂苷元含量分析

(1) 七月份各地之皂苷元含量分析

七月份結果如表 5 所示，整體估計含量除了左鎮 3 以外，其餘地區大致分布於 2 ~ 40 (mg sapogenin/g pericarp powder) 與表 4 已成熟做對照，7 月份含量大約為已成熟含量的 1/3 ~ 1/5 倍。其中有四個地區之含量低於 10 (mg sapogenin/g pericarp powder)，分別為台東 1、台南大內、台東大武及花蓮(東)。特別的是，在這四點中，有三個地區屬於東部地區，另外，左鎮 2 之含量高達 39.56 (mg sapogenin/g pericarp powder)，這些差異極大的結果是否因為氣候或地理因素仍待往後更多的研究與實驗才能得知。

Table 5. The content of sapogenins in soapnut trees cropped in July.

Cropped place	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
Taitung1	2.67 ^a	0.48
Taitung2	14.26 ^{de}	0.64
Kaohsiung	19.56 ^f	1.58
Danei, Tainan	4.21 ^{ab}	0.10
Taitung3	20.40 ^f	0.57
Zouchen, Tainan1	15.37 ^e	0.32
Dawu, Taitung	5.94 ^b	0.23
Zouchen, Tainan2	39.56 ⁱ	0.81
Zouchen, Tainan3	32.13 ^h	2.11
Nantou Rd 151 (1K)	28.70 ^g	1.27
Nantou Rd 151 (3K)	11.50 ^{cd}	0.15
Hualien (north)	10.18 ^c	0.39
Hualien (east)	4.00 ^{ab}	0.22
Hualien (Tai-tun)	11.51 ^{cd}	0.77
Zhi-shan-yen, Taipei	10.39 ^c	0.22

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at

level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

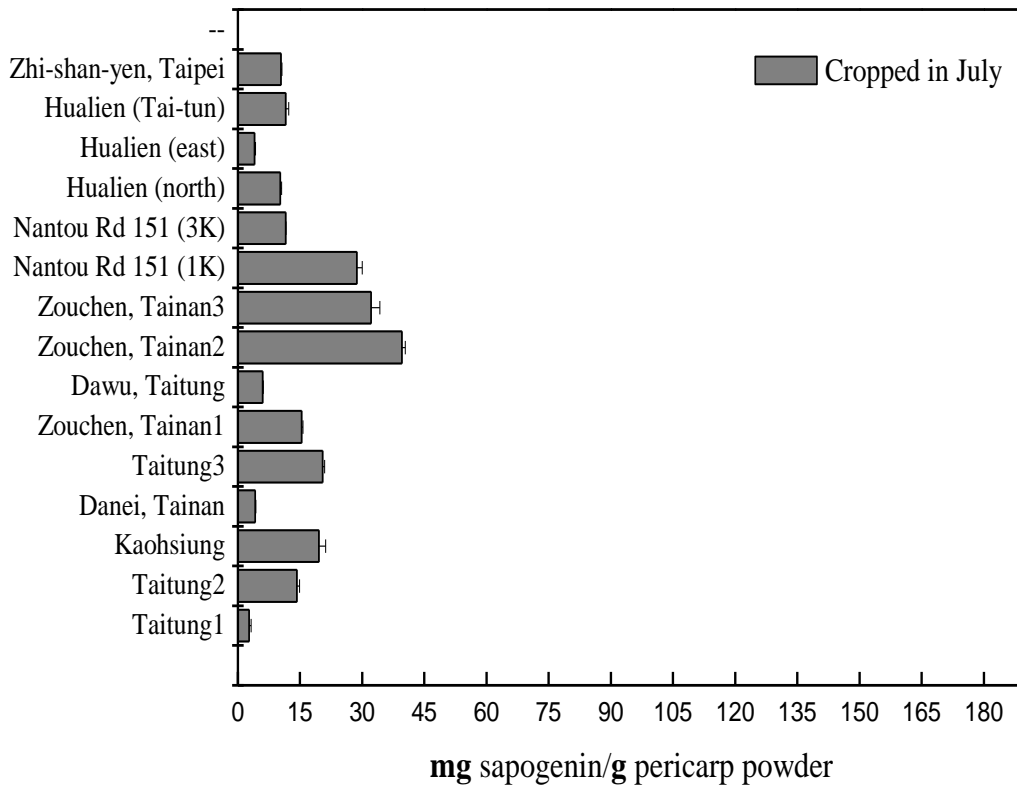


Fig. 30 The content of sapogenins in soapnut trees cropped in July.

(2) 八月份各地之皂苷元含量分析

八月份之含量相較於七月份有明顯的上升趨勢，但仍有兩個地區含量不到 10 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)，分別為台東 1 之 4.88 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)與花蓮(東)之 4.26 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)，而台東大武於 7 月份低於 10，在八月份已上升至 18。本月份明顯高於其他地區為台南大內，其含量為 91.35 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)與表 4 已測得之成熟無患子相比已經相當接近，這樣的結果顯示台南大內此棵母樹在今年是較為早熟的。另外，南投 151 縣道 3 公里處之無患子母樹含量亦達 74.34 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)與已成熟含量相比已是相當接近之值。

Table 6. The content of sapogenins in soapnut trees cropped in August.

Cropped place	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
Taitung1	4.88 ^a	0.32
Taitung2	31.02 ^{cd}	0.98
Kaohsiung	48.12 ^{ef}	1.85
Danei, Tainan	91.35 ^h	4.14
Taitung3	23.56 ^{bc}	0.39
Zouchen, Tainan1	18.20 ^b	0.48
Dawu, Taitung	18.22 ^b	0.54
Zouchen, Tainan2	58.19 ^f	1.07
Zouchen, Tainan3	51.70 ^f	2.38
Nantou Rd 151 (1K)	48.08 ^{ef}	2.55
Nantou Rd 151 (3K)	74.34 ^g	7.65
Hualien (north)	18.82 ^b	0.27
Hualien (east)	4.26 ^a	0.29
Hualien (Tai-tun)	13.02 ^{ab}	0.87
Zhi-shan-yen, Taipei	38.49 ^{de}	2.15

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

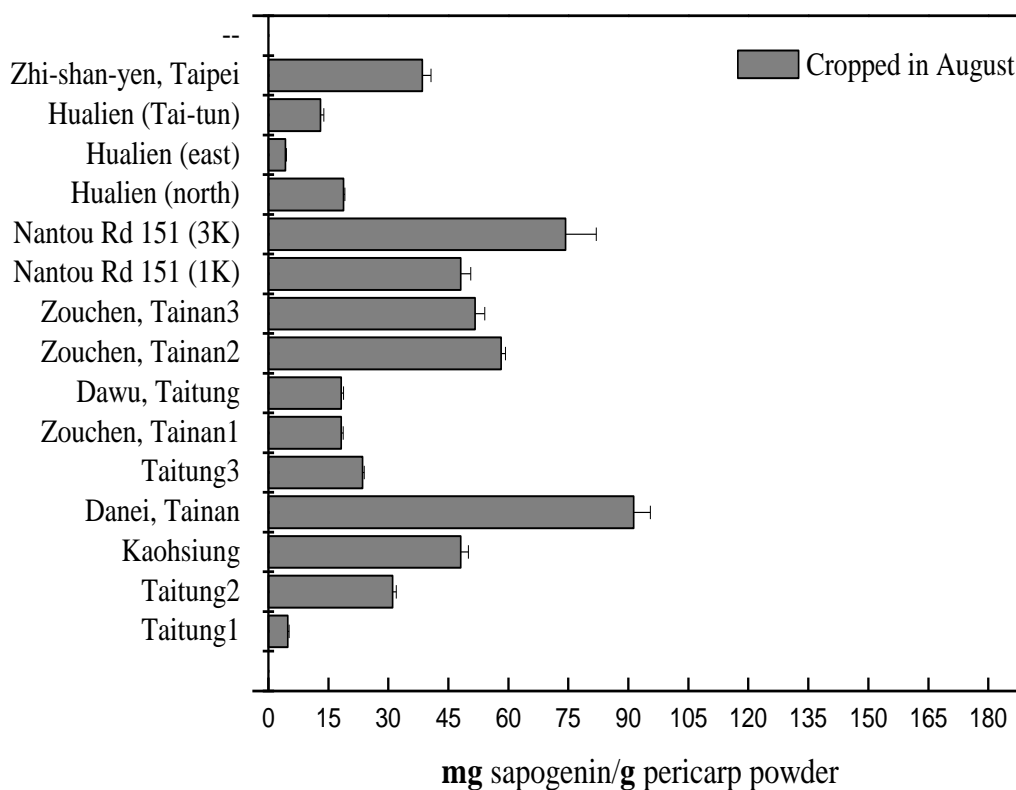


Fig. 31 The content of sapogenins in soapnut trees cropped in August.

(3) 九月份各地之皂苷元含量分析

在九月份如預期，各地區之無患子皂苷元含量皆有上升趨勢。然而，這個月份花蓮(東)此棵母樹高達 169.34 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)，其增加幅度從八月份算起高達 165.08 (**mg sapogenin/g pericarp powder**)並為該月份含量最多的母樹，造成這樣的現象是否母樹受到環境、氣候或土壤的遽變仍有待研究。截至目前為止其他地區所受測的母樹沒有相對應的變化產生，待計畫結束仍會加以追蹤此棵樹在含量變化或其他環境因子是否受到干擾。

Table 7. The content of sapogenins in soapnut trees cropped in September.

Cropped place	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
Taitung1	78.10 ^{bcd}	1.71
Taitung2	82.56 ^{bcd}	6.05
Kaohsiung	77.08 ^{bcd}	9.62
Danei, Tainan	92.34 ^d	7.34
Taitung3	36.51 ^a	2.09
Zouchen, Tainan1	42.46 ^a	1.44
Dawu, Taitung	58.12 ^{ab}	1.88
Zouchen, Tainan2	123.93 ^e	4.45
Zouchen, Tainan3	60.99 ^{abc}	4.90
Nantou Rd 151 (1K)	77.47 ^{bcd}	4.54
Nantou Rd 151 (3K)	98.57 ^{de}	3.05
Hualien (north)	82.41 ^{bcd}	8.22
Hualien (east)	169.34 ^f	15.63
Hualien (Tai-tun)	44.95 ^a	0.14
Zhi-shan-yen, Taipei	78.92 ^{bcd}	3.45

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at

level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

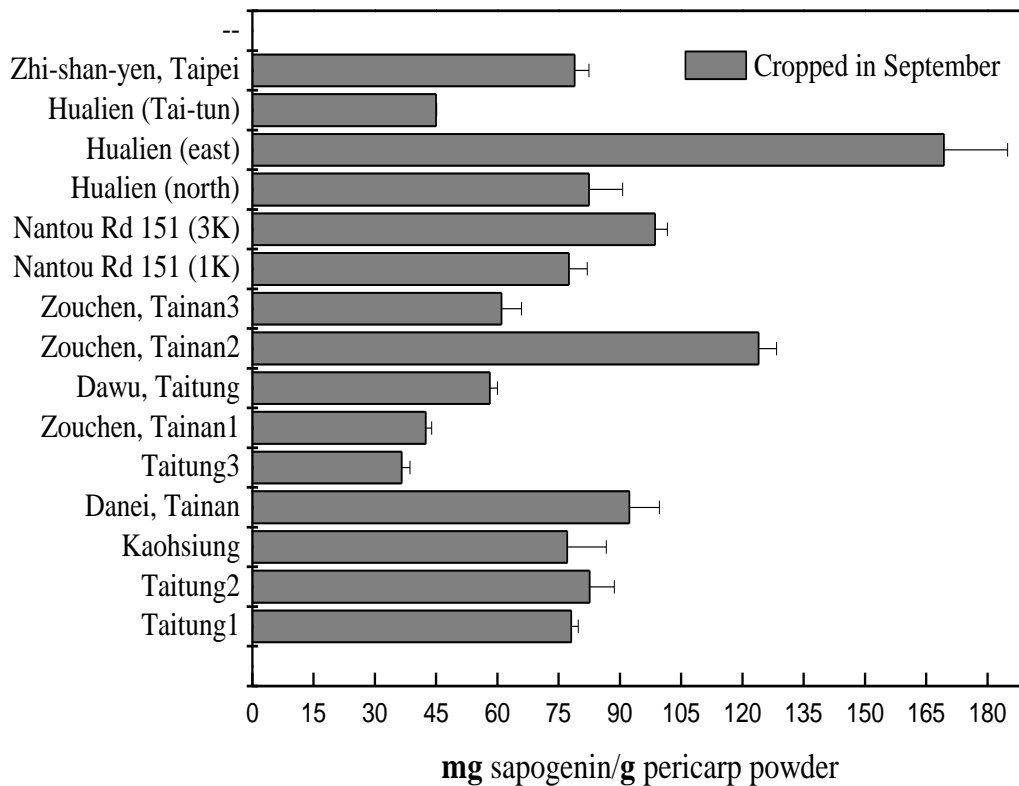


Fig. 32 The content of sapogenins in soapnut trees cropped in September.

(4) 十月份各地之皂苷元含量分析

在十月左右，無患子在果實生長上已臻成熟，一般來說，4到6月為無患子開花期，8到10為果實成長期。而根據表8結果顯示，大部份地區所測定出來的皂苷元含量已達最高峰，超過100 (mg sapogenin/g pericarp powder)的母樹有高雄、台南大內、台南左鎮2、南投151縣道3公里處、花蓮(東)以及台北芝山岩，而低於90 (mg sapogenin/g pericarp powder)分別有台東3、台南左鎮1、台南左鎮3、南投151縣道1公里處與花蓮(糖廠)。在研究對象15株母樹中，僅5株含量不足90 (mg sapogenin/g pericarp powder)，顯示雖然成熟速度有差異，但與過去研究已成熟無患子相比 (表4)，仍有一定之比例在這個月份達到較高含量之預期。

而 8 月到 9 月份期間，皂苷元含量大幅成長之”花蓮(東)”此株母樹在本月份含量變化有平緩之現象。縱觀計畫研究設定至 10 月作為最後觀察月份來看，花蓮(東)此母樹皂苷元含量與其他地區母樹有顯著的差異。

Table 8. The content of sapogenins in soapnut trees cropped in October.

Cropped place	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
Taitung1	90.62 ^{cd}	0.88
Taitung2	93.30 ^{cd}	1.21
Kaohsiung	100.59 ^d	2.57
Danei, Tainan	128.43 ^f	2.88
Taitung3	70.19 ^b	0.82
Zouchen, Tainan1	73.52 ^b	2.01
Dawu, Taitung	90.52 ^{cd}	0.90
Zouchen, Tainan2	125.12 ^{ef}	4.23
Zouchen, Tainan3	63.14 ^{ab}	8.84
Nantou Rd 151 (1K)	86.82 ^c	1.50
Nantou Rd 151 (3K)	113.71 ^e	1.23
Hualien (north)	90.76 ^{cd}	2.33
Hualien (east)	168.71 ^g	4.52

Hualien (Tai-tun)	52.55 ^a	1.83
Zhi-shan-yen, Taipei	122.49 ^{ef}	3.08

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

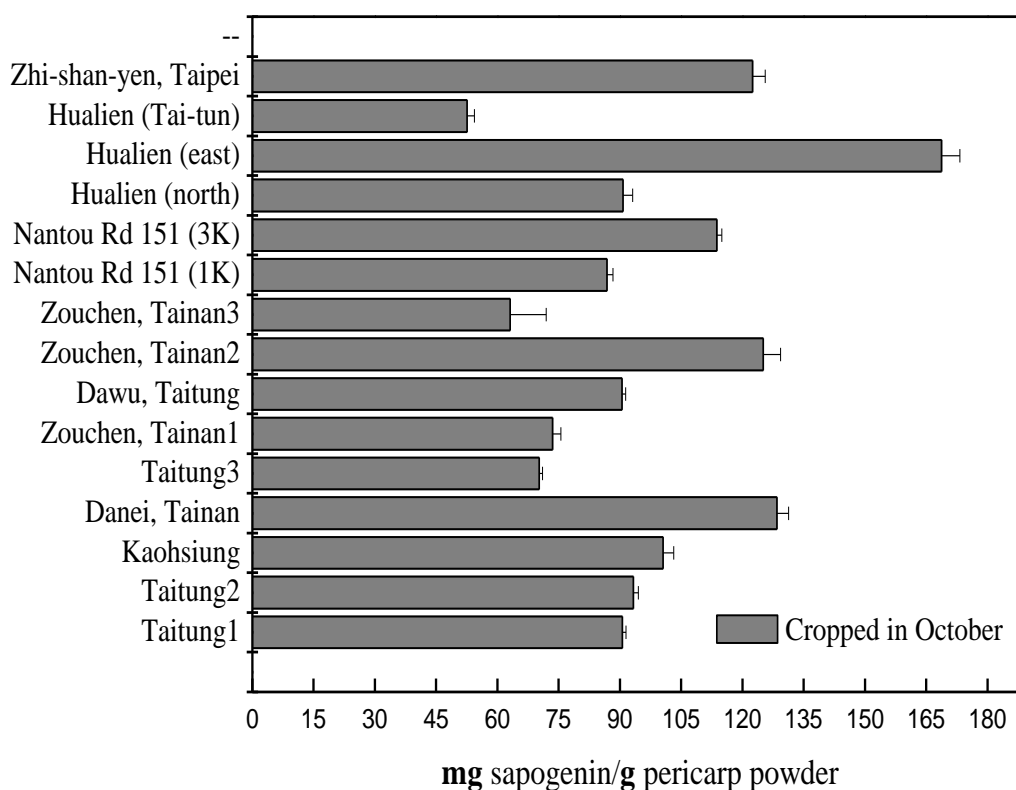


Fig. 33 The content of sapogenins in soapnut trees cropped in October.

2. 同株母樹月份含量變化分析

(i) Zhi-shan-yen, Taipei

台北芝山岩母樹位於芝山岩生態公園附近，為本次計畫唯一位於北部地區之研究母樹。在月份含量變化圖(Fig. 29)顯示，其含量變化呈現相當線性的趨勢且每個月份皂苷元含量皆有顯著差異，若未來此母樹不僅作為種源的來源且需要做為皂素的來源，那麼在採集時間點上勢必斟酌，太早採收皂素收率較低則不符

合經濟上的考量。

Table 9. The content of saponins in different months in Zhi-shan-yen, Taipei.

Date of cropping	Estimated content (mg saponin/g pericarp powder)	SD
July	10.39 ^a	0.22
August	38.49 ^b	2.15
September	78.92 ^c	1.87
October	122.49 ^d	3.08

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

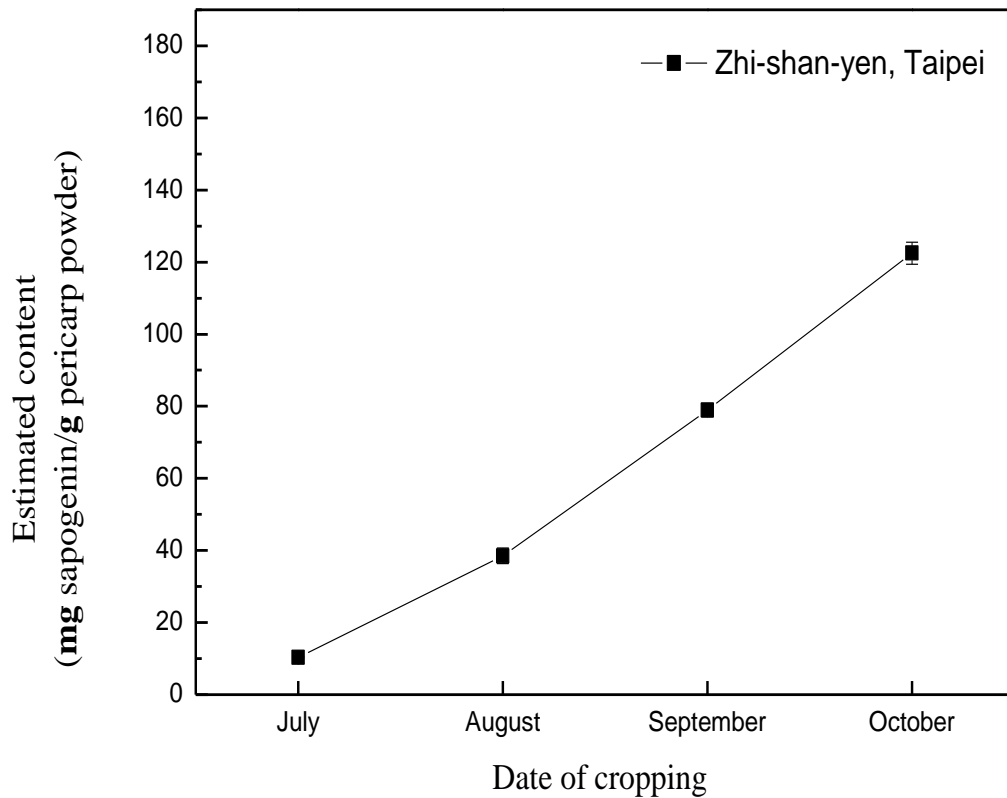


Fig. 34 The curve of the content of saponins in different months in Zhi-shan-yen, Taipei.

(ii) Nantu Rd 151 (1K)

根據圖 30 顯示南投 151 縣道 1 公里處無患子皂苷元含量增加亦呈現線性成

長，但在斜率上較為平緩，這樣結果表示皂素在每個月份的增加量較少，以採收上效益的考量，延後收穫的時間才可能獲得較高的皂素收率已提高利用的價值。

Table 10. The content of sapogenins in different months in Nantu Rd 151 (1K).

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	28.70 ^a	1.27
August	48.08 ^b	2.55
September	77.47 ^c	4.54
October	86.82 ^d	1.50

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

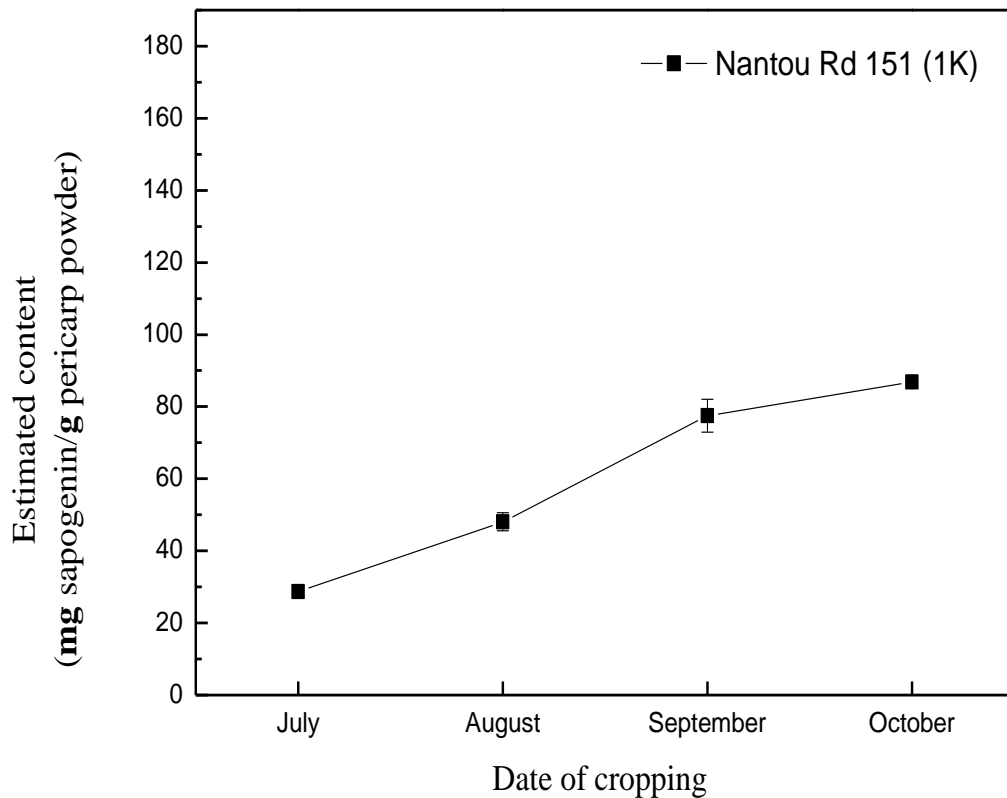


Fig. 35 The curve of the content of sapogenins in different months in Nantu Rd 151 (1K).

(iii) Nantou Rd 151 (3K)

根據統計分析結果，南投 151 縣道 3 公里處的野生無患子母樹在每個月份皂苷元含量有明顯的差異。從圖 31 亦可得知 7~8 月無患子皂苷元增加量較大而

8~10 月份較為平緩，就如一般認知，植物成熟則內部成分會達到穩定的量且僅有少許的變化。

Table 11. The content of sapogenins in different months in Nantu Rd 151 (3K).

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	11.50 ^a	0.15
August	74.34 ^b	7.65
September	98.57 ^c	3.05
October	113.71 ^d	1.23

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

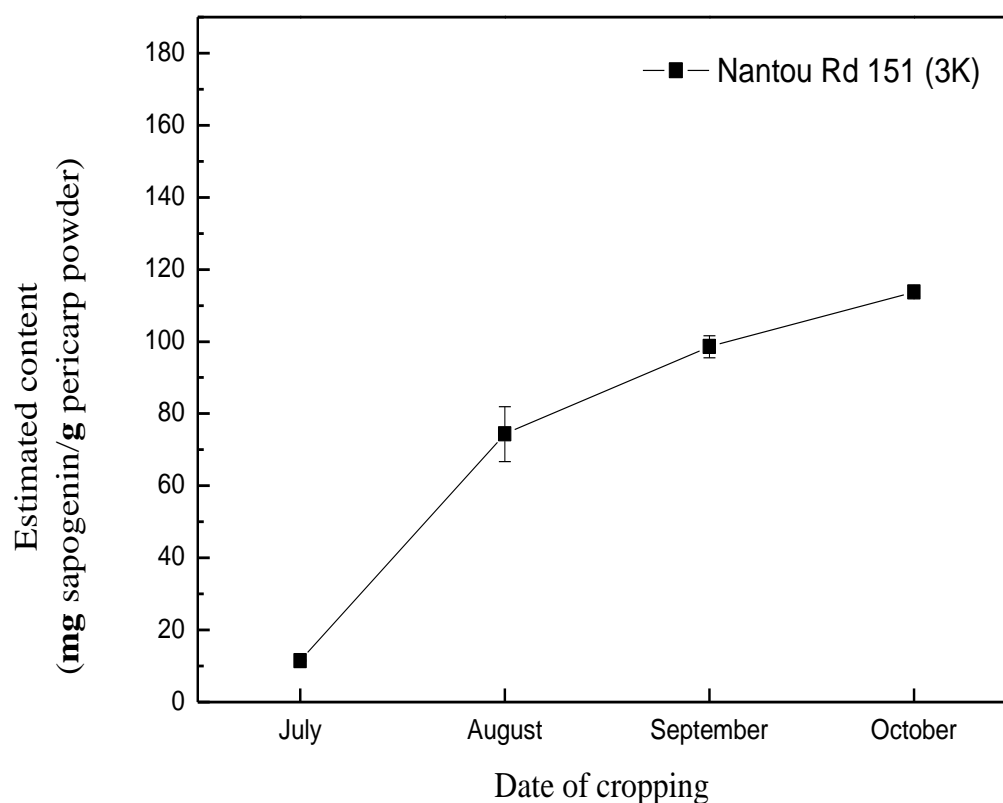


Fig. 36 The curve of the content of sapogenins in different months in Nantu Rd 151 (3K).

(iv) Danei, Tainan

台南縣大內鄉此株母樹在 8~9 月期間皂苷元含量呈現停滯的現象，然而到 10 月份又出現相當大幅的增加量。在本次計劃的結果中僅有此例於調查中期出

現含量變化差異非常小的時期，但是否受到環境因子或取樣上技術之問題待更進一步之研究。

Table 12. The content of saponins in different months in Danei, Tainan.

Date of cropping	Estimated content (mg saponin/g pericarp powder)	SD
July	4.21 ^a	0.10
August	91.35 ^b	4.14
September	92.34 ^b	7.79
October	128.43 ^c	2.88

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

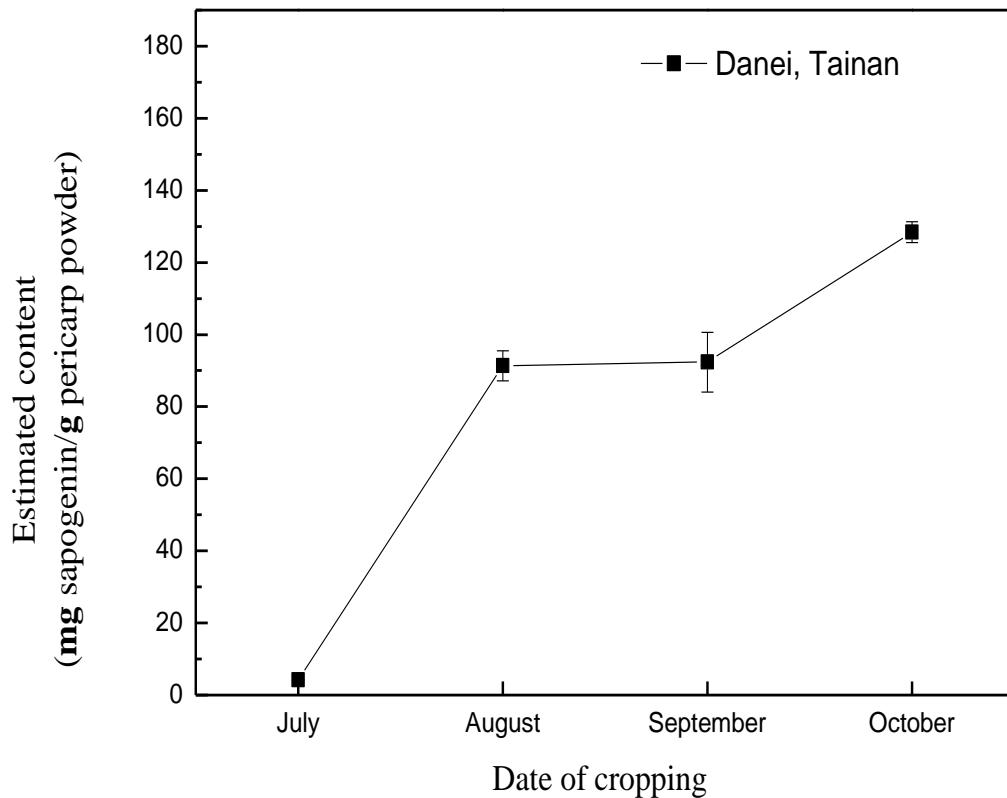


Fig.37 The curve of the content of saponins in different months in Danei, Tainan.

(v) Zouchen, Tainan1

根據圖 33 結果顯示，台南左鎮 1 皂苷元含量變化曲線呈現典型的上升趨勢，但截至 10 份定量結果，尚未出現平緩期。其 10 月份之含量為 73.52 (mg saponin/g pericarp powder) 相較於其他地區是較少的。在調查的 15 株母樹中的

5 株母樹之含量不足 90 (mg sapogenin/g pericarp powder), 而台南左鎮 1 為其中之一。這表示此株母樹很有可能在往後能有成熟(皂苷元含量增加)的空間。

Table 13. The content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan1.

Date of cropping	Estimated content	
	(mg sapogenin/g pericarp powder)	
July	15.37 ^a	0.32
August	18.20 ^b	0.48
September	42.46 ^c	1.44
October	73.52 ^d	2.01

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

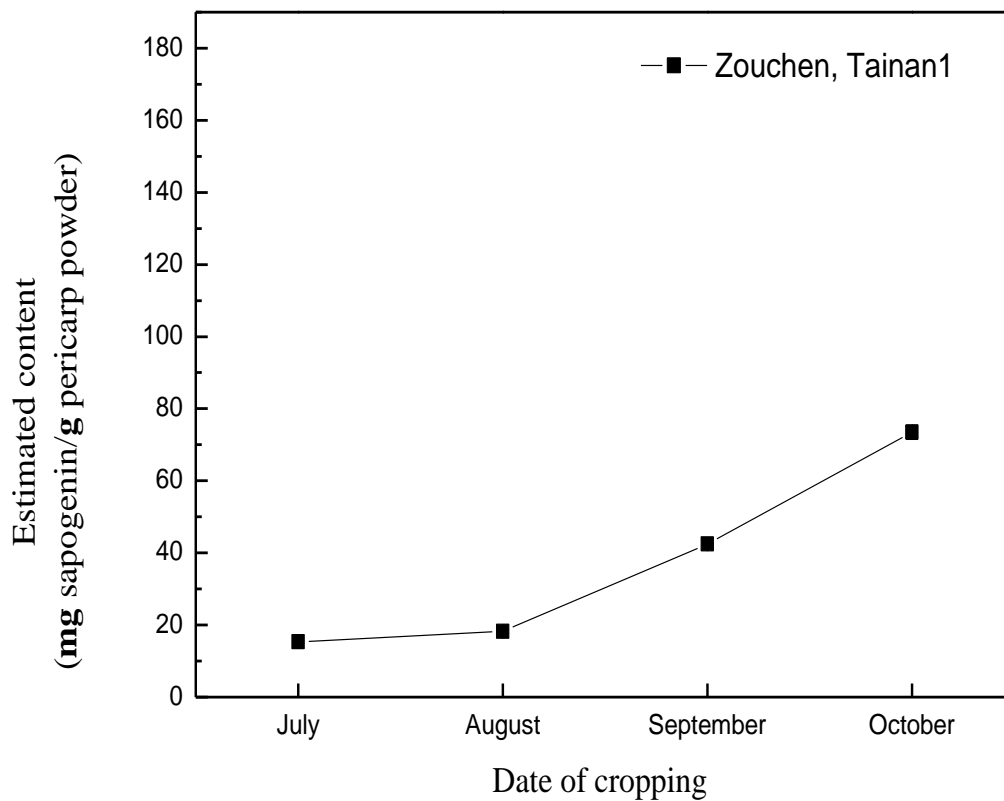


Fig. 38 The curve of the content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan1.

(vi) Zouchen, Tainan2

台南左鎮 2 所測得皂苷元含量根據圖 34 所示明顯成長，而經由統計分析結

果，九月與十月含量確實無顯著差異。依照這樣的結果，往後需要利用或採收於九月後進行方可得到最佳的含量。

Table 14. The content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan2.

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	39.56 ^a	0.81
August	58.19 ^b	1.07
September	123.93 ^c	4.45
October	125.12 ^c	4.23

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

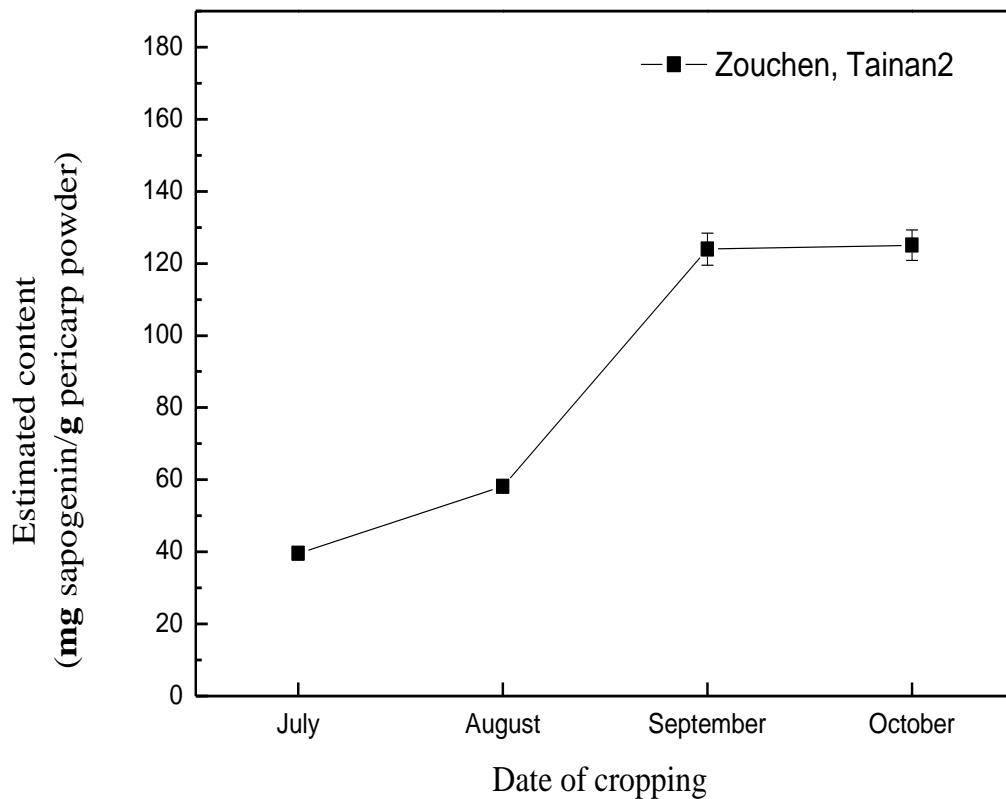


Fig. 39 The curve of the content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan2.

(vii) Zouchen, Tainan3

台南左鎮3結果顯示，8月到10月無顯著差異。以九月到十月為例，皂苷元的增加量僅 2.15 (mg sapogenin/g pericarp powder)。不管在含量增加速度以及於

十月最高含量僅有 63.14 (mg sapogenin/g pericarp powder)的考量上，在母樹篩選上並非良好的選育與種子的來源。

Table 14. The content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan3.

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	32.13 ^a	2.11
August	51.70 ^b	2.38
September	60.99 ^b	4.90
October	63.14 ^b	8.84

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

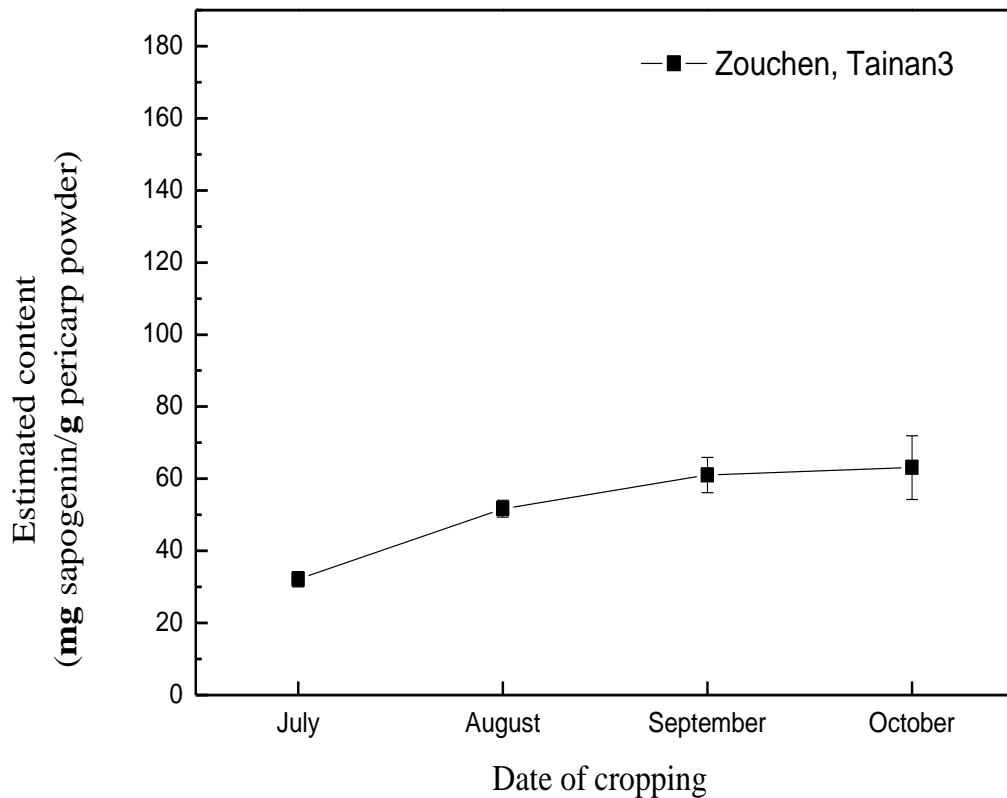


Fig. 40 The curve of the content of sapogenins in different months in Zouchen, Tainan3.

如圖 36、圖 37 與圖 39 所示，高雄、花蓮(北)及花蓮(糖廠)這三株母樹如預期的結果，皂苷元含量不斷上升，而在 9~10 月份漸趨平緩。值得注意的是，花蓮(東)在上述討論中以被提出，在圖 38 可以更明顯辨別出其 8~9 月份中皂苷元

含量之差異性非常顯著。同樣地，與上述典型的含量變化曲線，在 10 月份都有漸趨平緩之現象。花蓮(東)除了皂苷元增加量非常大的特異性外，它的含量也是在各個產地之母樹含量最高的一株母樹，在九月份中定量之結果達 169.34 (mg sapogenin/g pericarp powder)，在十月份亦有 168.71(mg sapogenin/g pericarp powder)有稍微減少但在統計上並無顯著的差異性。這樣的結果顯示花蓮(東)此母樹具有成為優良種源的可能性。

(viii) Kaohsiung

Table 14. The content of sapogenins in different months in Kaohsiung.

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	19.56 ^a	1.58
August	48.12 ^b	1.85
September	92.40 ^c	9.99
October	100.59 ^d	2.57

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

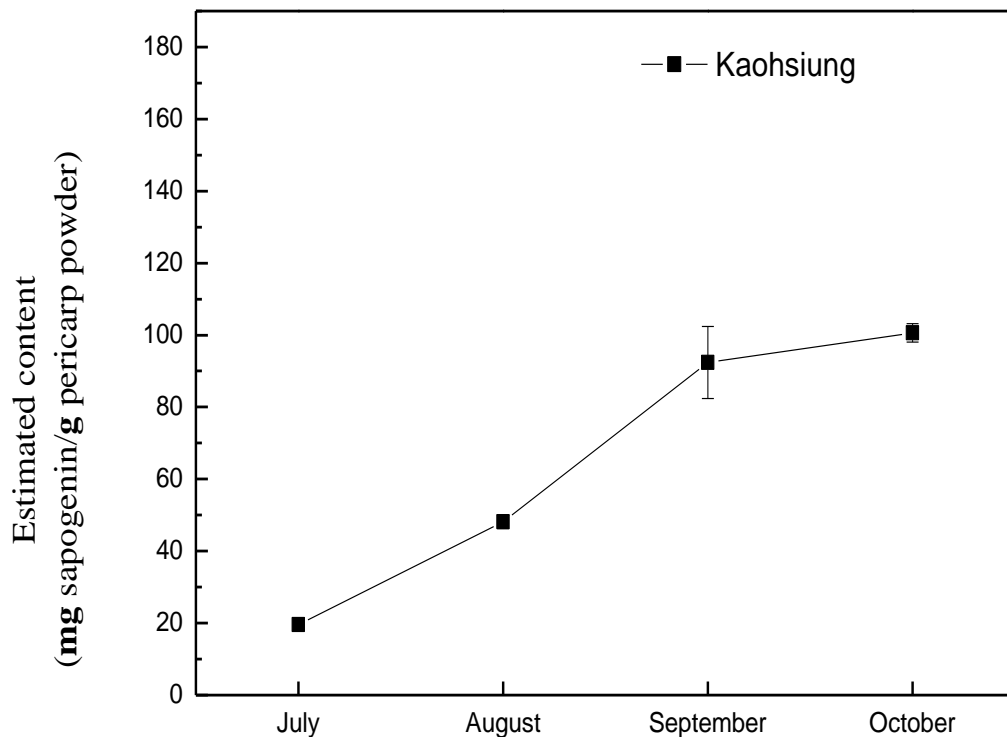


Fig. 41 The curve of the content of sapogenins in different months in Kaohsiung.

(ix) Hualien (north)

Table 15. The content of sapogenins in different months in Hualien (north).

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	10.18 ^a	0.39
August	18.82 ^a	0.27
September	82.41 ^b	8.22
October	90.76 ^b	2.33

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

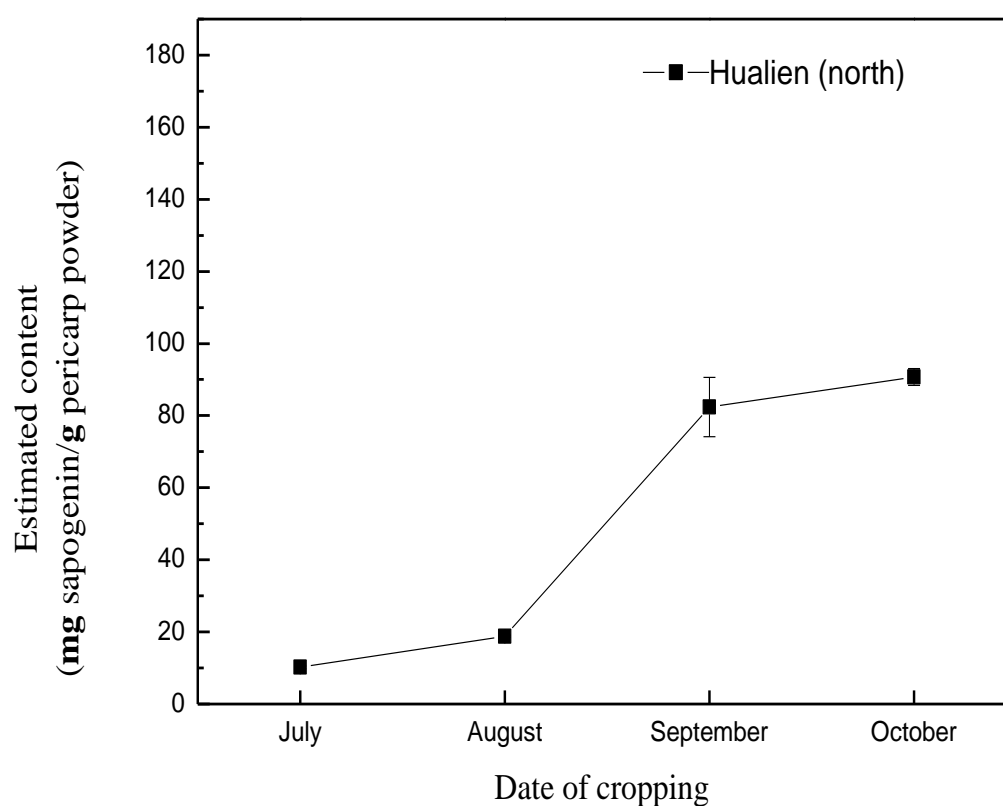


Fig. 42 The curve of the content of sapogenins in different months in Hualien (north).

(x) Hualien (east)

Table 16. The content of sapogenins in different months in Hualien (east).

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	4.00 ^a	0.22
August	4.26 ^a	0.29
September	169.34 ^b	15.63

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

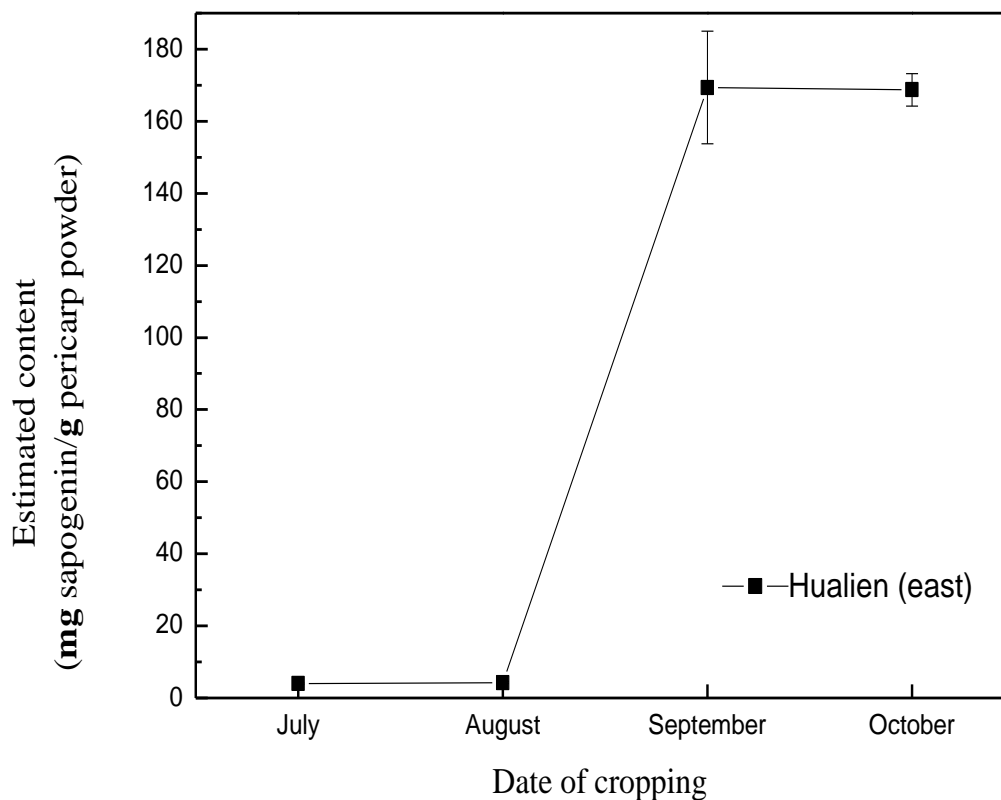


Fig. 43 The curve of the content of sapogenins in different months in Hualien (east).

(xi) Hualien (Tai-tun)

Table 17. The content of sapogenins in different months in Hualien (Tai-tung).

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	11.51 ^a	0.77
August	13.02 ^a	0.87
September	44.95 ^b	0.14
October	52.55 ^c	1.83

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

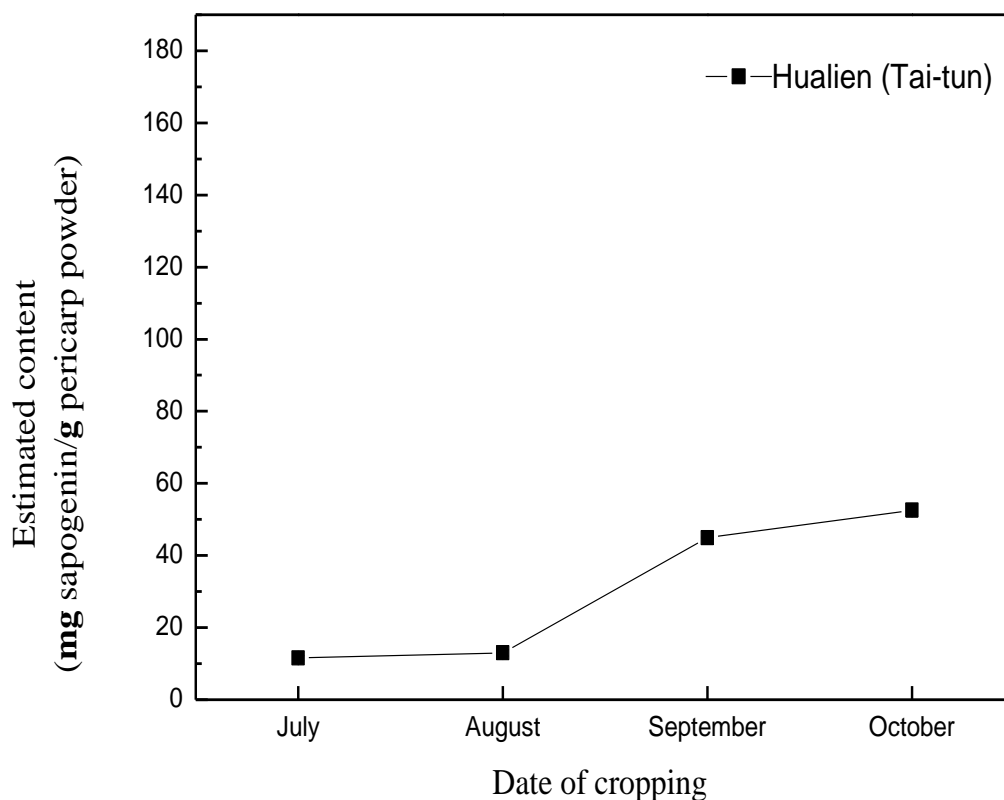


Fig. 44 The curve of the content of saponins in different months in Hualien (Tai-tun).

根據圖 40、圖 41 結果顯示，台東 1 與台東 2 整體趨勢相當並與上述典型含量變化曲線類似。除此之外，在十月份都呈現出最高的皂苷元含量，也都在 90 (mg saponin/g pericarp powder) 以上。圖 42 並未在十月份出現平緩的現象，且十月含量亦不如台東 1 與 2。

(xii) Taitung 1

Table 18. The content of saponins in different months in Taitung 1.

Date of cropping	Estimated content (mg saponin/g pericarp powder)	SD
July	2.67 ^a	0.48
August	4.88 ^a	0.32
September	83.41 ^b	1.78
October	90.62 ^c	0.88

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

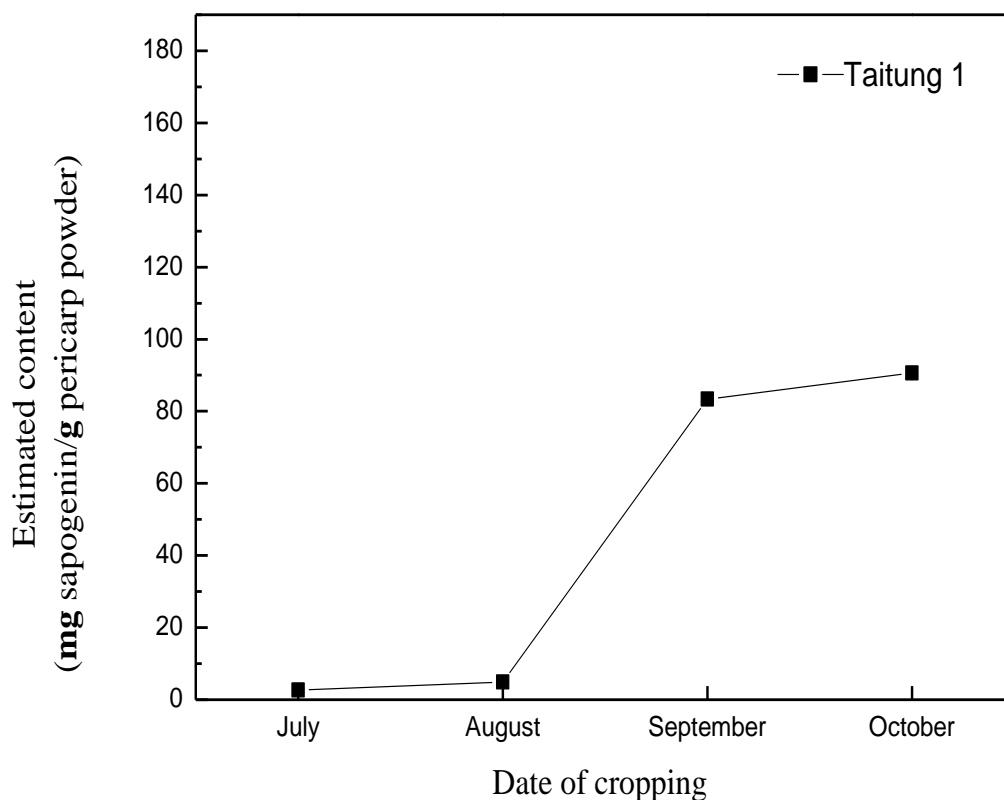


Fig. 45 The curve of the content of sapogenins in different months in Taitung 1.

(xiii) Taitung 2

Table 19. The content of sapogenins in different months in Taitung 2.

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	14.26 ^a	0.64
August	31.02 ^b	0.98
September	82.56 ^c	6.05
October	93.30 ^d	1.21

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

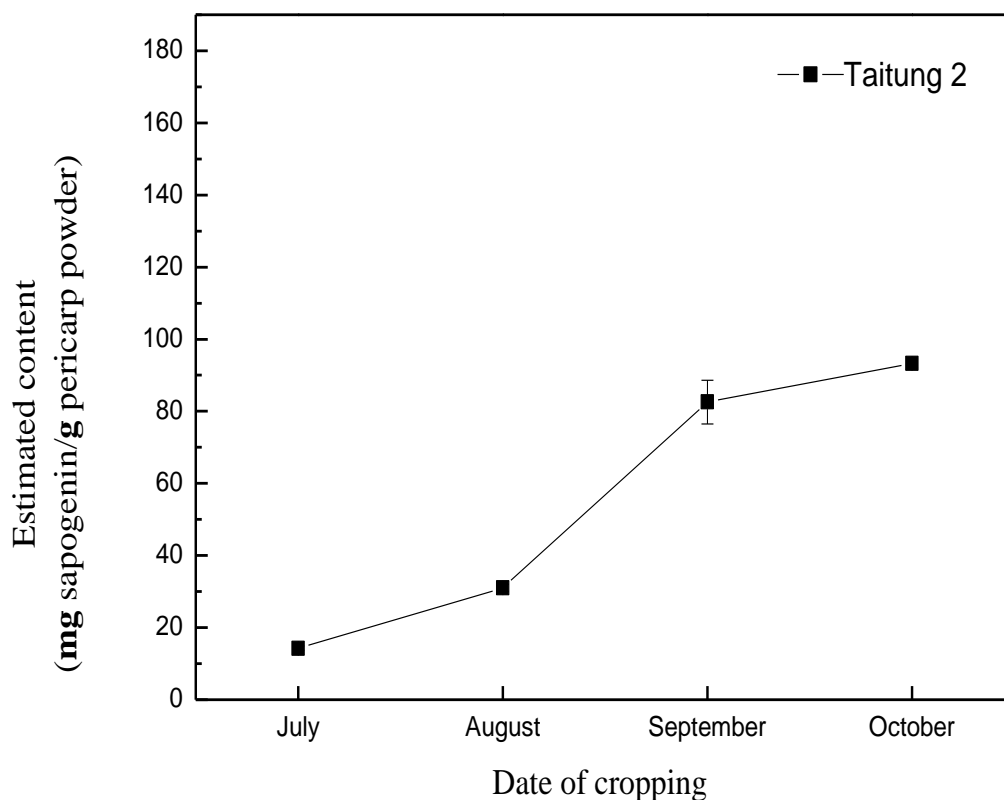


Fig. 46 The curve of the content of sapogenins in different months in Taitung 2.

(xiv) Taitung 3

Table 20. The content of sapogenins in different months in Taitung 3.

Date of cropping	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)	SD
July	20.40 ^a	0.57
August	23.56 ^a	0.39
September	36.51 ^b	2.09
October	70.19 ^c	0.82

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

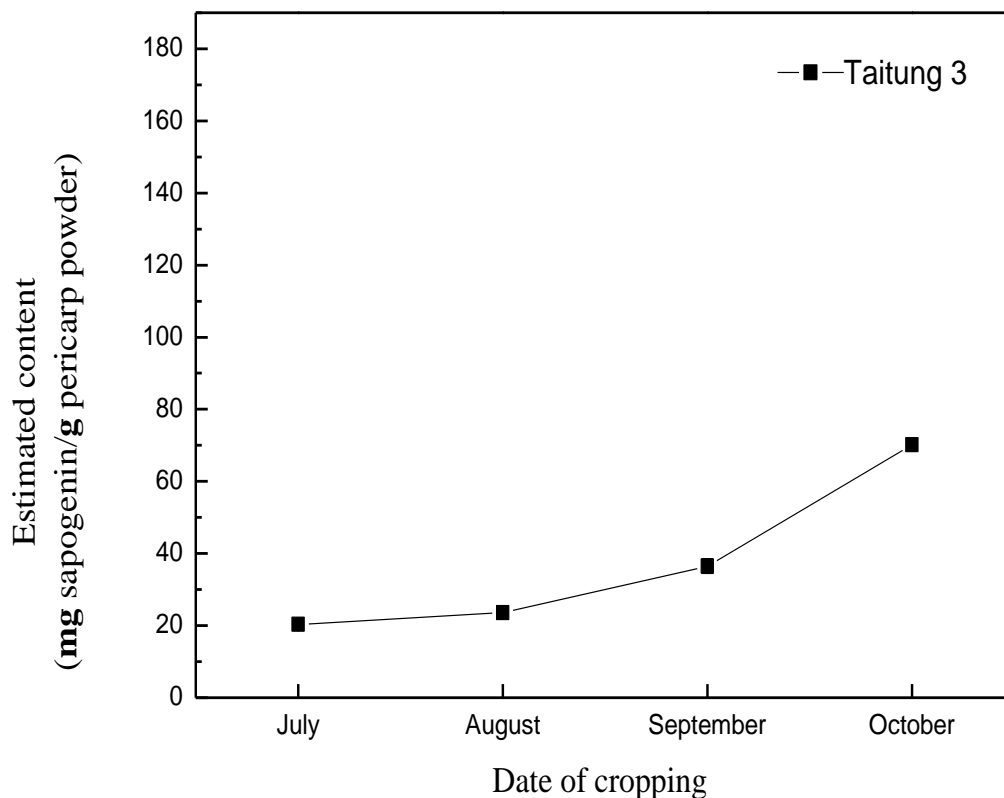


Fig. 47 The curve of the content of sapogenins in different months in Taitung 3.

VII. 各月份之各株母樹含量排序結果與優良母樹選定

將所有採集樣品依照皂苷元含量多寡進行排序，可以發現到(表 21)皂苷元前十多的月份絕大部分分佈在十月份，除了花蓮(東)以外，同一地區中十月大多高於九月份之含量。利用統計之差異性檢定，發現花蓮(東)在這前十含量多寡之排序中與其他樣品有顯著差異，而 3~6 名成為次多之分組。綜合前文數據與排序之結果可以發現花蓮(東)此株母樹確實是本次計畫中最具有潛力成為優良母樹的來源之一。

Table 21. The rank of different cropped places in different months.

Rank	Cropped place with date	Estimated content (mg sapogenin/g pericarp powder)
1	Hualien (east) (9)	169.34±15.63 ^c
2	Hualien (east) (10)	168.71±4.52 ^c
3	Danei, Tainan (10)	128.43±2.88 ^b
4	Zouchen, Tainan2 (10)	125.12±4.23 ^b
5	Zouchen, Tainan2 (9)	123.93±4.45 ^b
6	Zhi-shan-yen, Taipei (10)	122.49±3.08 ^b
7	Nantou Rd 151 (3K) (10)	113.71±1.23 ^{ab}
8	Kaohsiung (10)	100.59±2.57 ^a
9	Nantou Rd 151 (3K) (9)	98.57±3.05 ^a
10	Taitung2 (10)	93.3±1.21 ^a

Note: Estimated content values marked by different letters are significantly different at level of $P < 0.05$ according to the Scheffe test.

IV. 結論

皂素定量方法中有兩種主要的比色法可粗略定出樣品皂素含量，其一為香草醛硫酸法，其二為五氯化銻法。比色法的試驗步驟簡易、定量結果之呈現快速。但比色法中的樣品未經一定程度的分離或處理則容易干擾定量的結果。另外，皂素粗萃取物經由甲醇、乙醚與正丁醇等液相分配進行分離後，尚需進一步純化，方法有有機溶劑沉澱法、鉛鹽沉澱法、膽固醇沉澱法、氧化鎂法和常用的管柱層析法可得較純之皂素，但過程相當繁複且耗時，僅用於定量方法時並不實用，因此酸水解之方法為本計劃中所採用的方法。

本計畫所採用的方法乃是分析皂苷元含量多寡推測皂素含量，在過去已經有非常多相關研究皆採用類似的原理。本實驗室所採用方法是將皂苷元水解的環

境以水取代有機溶劑，因水與皂苷元類化合物的極性差異大，不易溶解於其中而可以膜進行過濾並定量分析。

經由同月份不同地區皂苷元含量的分析結果以及同一地區不同月份之皂苷元含量增加趨勢，再以不同月份與不同地區之母樹混合排序等分析，花蓮(東)與其它樣本在皂苷元含量上有顯著差異，因此成為最具有潛力之優良母樹與種源之一。而如台南大內、台南左鎮 2 以及台北芝山岩的含量雖不及花蓮(東)，但仍可作為嫁接或採收來源的考量。

V. 參考文獻

劉知昱 (1998) 苦茶籽生物活性成分之研究。台灣大學農業化學研究所碩士論文。

邱義源、曾慶瀛、吳思敬、陳立耿、吳進益、翁博群、黃襟錦、熊文俊 (2007) 無患子高附加價值生物活性成分之分離與應用。行政院農委會林務局委託研究計畫：無患子豐產育林、產品研發推廣應用及認證之研究。

Chinese National Standards (2006) CNS 12634. Method of test for fruit and vegetable juice products - Determination of sugars by HPLC. Bureau of Standards, Metrology and Inspection, Taipei, Taiwan.

Grenby, T.H. (1991) Intense sweeteners for the food industry: an overview. *Trend of Food Science and Technology*. 2: 2-6

Hanzas, P. C. and W. W. Barr (1969) Millipore-antimony pentachloride colorimetric method for rapid determination of saponin in refined beet sugar. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists* 15: 495

Hiai, S. H. Oura and T. Nakajima (1976) Color reaction of some saposenins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica* 29: 116-122

Huang, H. C., S. C. Liao, F. R. Chang, Y. H. Kuo and Y. C. Wu (2003) Molluscicidal

- Saponins from *Sapindus mukorossi*, Inhibitory Agents of Golden Apple Snails, *Pomacea canaliculata*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 4916-4919
- Heng, L., J. P. Vincken, G. A. van Koningsveld, L. Legger, H. Gruppen, M. A. J. S. van Boekel, J. P. Roozen and A. G. J. Voragen (2006) Bitterness of saponin and their content in dry peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 1225-1231
- Huang, H. C., L. Zhng, Y. C. Wu, Y. H. Kuo and Y. H. Kuo (2009) Studies on Chemical Constituents and Bioactivities of Saponins. *The Chinese Chemical Society* 67(1):1-12
- Kitagawa, I. (2002) Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 74: 1189-1198
- Lasztity, R., M. Hidvegi and A. Bata (1998) Saponins in food. *Food Reviews international*. 14: 371-390
- Oda, K., H. Matsuda, T. Murakami, S. Katayama, T. Ohgitani and M. Yoshikawa (2000) Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medical and food plants. *Biological Chemistry*. 381: 67-74
- Oleszek, W. A. (2002) Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*. 967: 147-162
- Oleszek, W. and Z. Bialy (2006) Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002–2005). *Journal of Chromatography A*. 1112: 78-91
- Price, K.P., Johnson, I.T., and Fenwick, G. R., 1978. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. *Journal of Food Science Nutrition*,26(1): 27-135.
- Philip, A. I. and Z. D. Stanley (1986) Effect of Hydrolysis on Sapogenin Release in Soya. *Journal of Food Chemistry* 34: 1037-1041

- Rothrock, J. W., P. A. Hammes and W. J. Mcaleer (1957) Isolation of Diosgenin by Acid Hydrolysis of Saponin. *Industrial and Engineering Chemistry* 49 (2): 186–188
- Smith R. L., H. Schumacher and R. T. Williams (1965) The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *British Journal of Pharmacology*. 25(2): 324-337.
- Sparg, S. G., M. E. Light and J. V. Staden (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 219-243
- Taylor, W. G., J. L. Elder, P. R. Chang and K. W. Richards (2000) Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *Journal of Food Chemistry* 48: 753-759