

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

台灣山藥塊莖的固醇類皂素分析與其加工中組成的變化 (1/3)

計畫編號：NSC 89-2316-B-002-034-

執行期間：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：呂廷璋 國立台灣大學 食品科技研究所

共同主持人：孫璐西 國立台灣大學 食品科技研究所

計畫參與人員：楊登傑 國立台灣大學 食品科技研究所

一、摘要

為確立目前台灣各栽培品種山藥中薯蕷皂配基 (diosgenin) 的含量，重新評估目前測定山藥中薯蕷皂配基的數種分析方法的適當性。由於山藥中薯蕷皂配基主要以配醣體的薯蕷皂素形式存在，且部分為 spirostanol glycoside，在進行分析時，須將醣基水解去除，並將 spirostanol 轉變為薯蕷皂配基 (Δ^5 -furostanol) 的型態，才能準確的測得薯蕷皂配基含量。評估 7 種萃取與水解的流程，發現山藥的粗纖維會干擾定量，因此須先以甲醇萃取山藥中的固醇類皂素，再以 2 N 鹽酸-甲醇溶液或 2 N 硫酸-異丙醇溶液 (70%) 進行酸水解去醣基後，於 80 °C 下放置 30 分鐘，藉以蒸去甲醇或異丙醇，而後以正己烷進行劃分收集萃取，才能高效率的將山藥中薯蕷皂配基萃取出來，適合於定量檢測。檢測 19 種台灣產山藥樣品中，僅發現基隆山藥、基隆山藥 (白皮白肉)、嘉義刺薯和陽明山山藥 (原生種) 含有薯蕷皂配基，薯塊內肉的含量範圍為每克乾重有 41 ~ 70 μg ，而皮所含的量較內肉部分為高，其含量約為內肉部分的 2 至 3 倍。本試驗選擇以高效率液相層析法 (HPLC) 配合紫外光偵檢，作為主要的分析方法，因為此分析系統具有操作方便以及樣品不須經衍生化處理等優點。依據分光光度計對薯蕷皂配基全光譜掃描的結果，選用 203 nm 紫外光為檢測波長，配合 C18 管柱為靜相，以氫甲烷/水 = 95/5 (v/v) 為動相，流速 1 ml/min 可有效分析山藥中的薯蕷皂配基。

關鍵詞：山藥、薯蕷皂配基 (diosgenin)、高效率液相層析法 (HPLC)、固醇類皂素

ABSTRACT

To establish a diosgenin content database of Chinese yam grown in Taiwan, the validation of current analytical methods was re-evaluated. The majority of diosgenin components are in the form of glycosides (saponins). To accurately analyzing the content of diosgenin, the glycosyl groups on the saponins, both spirostanol and furostanol glycosides, shall be removed by acid hydrolysis and converted to diosgenin (Δ^5 -furostanol) before the quantitative chromatography. After evaluating 7 different procedures, we suggested that an exhaustive extraction with methanol was required to separate the saponins from crude fiber of yam that

interfered the determination. The acid hydrolysis was found more effective in organic solvent (2 N hydrochloric acid in methanol or 2 N sulfuric acid in 70% isopropanol) than aqueous solution. The hydrolysate was incubated at 80°C for 30 min to evaporate the organic solvent and to complete the convert, before the hexane (liquid-liquid) extraction. Four among 19 tested cultivars contain diosgenin in the range of 41 to 70 $\mu\text{g}/\text{g}$ (dry basis) in flesh, and the peel of these cultivars also contain diosgenin with a content 2 to 3 times higher than the content in the flesh. The high-performance chromatographic conditions for the analysis were: column, C₁₈ reverse phase column; eluent, acetonitrile: water = 95:5 (V/V); flow rate, 1 ml/min; detection, UV 203 nm.

Keywords: Dioscorea, Chinese yam, diosgenin, steroidal saponin, HPLC

二、緣由與目的

山藥為薯蕷科 (Dioscoraceae)，薯蕷屬 (Dioscorea)，多年生蔓性之根莖類植物，為中國傳統的重要食、藥用植物，『神農本草經』更將其列為上品藥材，認為具有滋養、強壯及止瀉功效，亦為常用之保健食品材料 (Liu et al., 1995; 林等, 1998)。山藥主要的食用部份為地下塊莖 (擔根體)，富含蛋白質、醣類、胺基酸、鈣、磷、鐵、維生素 C 與約 1-2% 的黏質等，並含有約豐富的皂素 (saponins)，是山藥所含具生理活性的重要化合物 (Liu et al., 1994; Liu et al., 1995; 曾等, 1999; 劉等, 2000)。

山藥塊莖的皂素屬固醇類皂素 (steroidal saponins)，主要以醣化合物 (glycosides) 的形式存在，主要以 spirostanol glycoside 和 furostanol glycoside，若經水解去掉醣基的配醣體 (aglycone) 稱為薯蕷皂配基 (diosgenin, Δ^5 -furostanol)，是一種固醇類皂素配基 (steroidal saponins)，可作為合成固醇類荷爾蒙 (steroidal hormones)，副腎臟腺皮質素 (corticosteroids) 和避孕藥等藥物之原料 (Chen, 1985; Chen and Wu, 1994)。使用天然的固醇類皂素配基來製造固醇類藥物，可較容易的經由部份合成的方法進行生產，避免以純化學合成方法生產固醇類藥物的技術瓶頸，因為從石油化學原料進行合成，須經多次複雜且效率不高的合成與純化步驟 (Chen 和 Wu, 1994)。在中國大陸生產薯蕷皂配基的主要山藥品種為 *Dioscorea colletti* (華南薯蕷)，此外，*D. althaeoides*、*D. colletti* var. *hypoglauca*、*D.*

gracillima, *D. nipponica*, *D. panthaica*, *D. parviflora* 和 *D. zingiberensis* 等品種均含有多量的薯蕷皂配基(diosgenin)平均含量約佔新鮮山藥的 1.5~3.6 % (Chen and Wu, 1994)。

薯蕷屬植物種類繁多 (Liu et al., 1994 ; Liu et al., 1995) 且其地下塊莖 (擔根體) 型態差異性很大, 形狀有圓形、長形、掌狀等, 外皮顏色有紅、黃、褐、白等色, 內層則有白、紅、紫、紅等顏色 (Tindall, 1983 ; Liu et al., 1995 ; 黃, 1996)。本省的農業試驗單位, 經多年的努力已在種源庫的收集與建立、栽培、採收與保鮮等技術方面, 都有很好的成果, 並培育出適合台灣生產環境, 農藝特性佳、產能高的台農一號 (Liu, et al., 1992) 及台農二號 (Liu, et al., 1996) 兩種新推廣品種。目前栽培的主要品系有: 山藥台農 1 號 (*Dioscorea alata* L.)、山藥台農 2 號 (*Dioscorea alata* L.)、大汕二品系 (*Dioscorea alata* L.)、大汕三品系 (*Dioscorea alata* L.)、中國長品系 (*Dioscorea alata* L.)、二刺品系 (*Dioscorea alata* L.)、紫玉薯品系 (*Dioscorea alata* L. var. *purpurea* (Roxb) M. Pouch)、自然品系 (*Dioscorea alata* L.)、大陸淮山品系 (*Dioscorea alata* L.)、基隆山藥品系 (*Dioscorea japonica* Thumb. Var. *pseudojaponica* (Hay.) Yamamoto)、黃藥品系 (*Dioscorea bulbifera* L.) 和恆春品系 (*Dioscorea doryophora* Hance) 等 12 種 (Lay et al., 1999), 是具有量產能力的食藥用資源作物之一。但文獻中對台灣產的山藥所含的薯蕷皂配基(diosgenin)研究較少, 雖然 Wang 和 Lo (1968) 早期的研究指出台灣產的八種山藥品種未檢測出含有薯蕷皂配基, 但 Chen (1985) 廣泛的檢測 34 種台灣地區所栽種台灣品種與引進品種山藥的薯蕷皂配基含量, 發現有 17 種品種含有薯蕷皂配基含量, 其中五年生的 *D. composita* (菊山藥) 含量高達 18.3%。

山藥中薯蕷皂配基的萃取, 可利用甲醇或乙醇迴流萃取(reflux)即可得到山藥固醇類皂素的粗萃物, 再經酸水解去醴基, 則可得到薯蕷皂配基(Wang and Lo, 1968 ; Chen, 1985 ; Yeh et al., 1994 ; Taylor et al., 1997 ; Taylor et al., 2000); 或先將山藥經鹽酸水解處理, 再以石油醚(petroleum ether)萃取來得到山藥薯蕷皂配基 (Li and Ruan, 1980 ; Mahato et al., 1981 ; Yang and Chen, 1983 ; Drapeau et al., 1986 ; Chen and Wu, 1994) ; 以溶於 70 % 異丙醇(isopropanol) 的硫酸水解, 再以正己烷(hexane)行劃分收集(partition)以得薯蕷皂配基(Drapeau et al., 1986 ; Ortuno et al., 1998 ; Savikin-Fodulovic et al., 1998) ; 酸水解後再以超臨界二氧化碳萃取的技術, 亦有利用於山藥薯蕷皂配基的萃取 (Liu et al., 1995 ; 曾等, 1999)。

傳統的皂素配基(sapogenin)分析常使用薄層層析法(thin layer chromatography, TLC) (Blunden et al., 1967 ; Blunden and Hardman, 1968 ; Wang and Lo, 1968 ; Chen, 1985), 但在定量分析上較為繁瑣; 由於皂素配基的極性較低, 近年在分析時多選用氣液層析法(GLC)(Knight, 1977 ; Liu et al., 1995 ; Pierre et al., 1995 ; Taylor et al., 1997 ;

Savikin-Fodulovic et al., 1998 ; 曾等, 1999 ; Taylor et al., 2000) 或高效能液體層析法(HPLC)(Tal and Goldberg, 1981 ; Mahato et al., 1981 ; Chen, 1985 ; Yeh et al., 1994 ; Ortuno et al., 1998 ; Ortuno et al., 1999 ; Oncina et al., 2000)。

對於台灣地區目前栽種的山藥品種的薯蕷皂配基含量急需建立一個更新的資料庫。因此本年度計畫在於評估一個適當分析薯蕷皂配基(diosgenin)的方法, 並確立目前台灣各栽培品種山藥中薯蕷皂配基(diosgenin)的含量。

三、分析方法

本實驗以 HPLC 配合 UV 203nm (以 Hitachi-U3210 型分光光度計進行全光譜掃描, 最大吸收波峰為 201nm) 來檢測 diosgenin (Sigma, D1634), 靜相為 C₁₈ 管柱 (LUNA C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm (Phenomenox, CA), 以氫甲烷/水 = 95/5 (v/v) 為動相, 流速為 1ml/min)。

比較文獻中萃取 diosgenin 的各種方法, 評估其 diosgenin 萃取效果。流程一: 參考 Li and Ruan, 1980 ; Mahato et al., 1981 ; Yang and Chen, 1983 ; Drapeau et al., 1986 ; Chen and Wu, 1994 的方法, 將 10 克經凍乾的山藥粉末, 以 50ml 2N 鹽酸於 80 迴流裝置 (reflux apparatus) 下水解 3 小時, 過濾後的酸水解渣以水洗至中性, 而後於 50 真空乾燥箱乾燥 5 小時, 將乾燥後的酸水解渣, 置入圓筒濾紙 (28 × 100 mm), 放入索氏萃取裝置 (Soxhlet extractor), 以 150ml 石油醚 (petroleum ether) 於 65 下迴流萃取 10 小時, 得到山藥固醇類皂素配基萃取液, 經真空濃縮去除石油醚後, 再以甲醇定容至 5ml, 行 HPLC 分析。流程二、三和四: 參考 Drapeau et al., 1986 ; Ortuno et al., 1998 ; Savikin-Fodulovic et al., 1998 的方法, 將 10 克經凍乾的山藥粉末, 以 50ml 2N 硫酸 (以 70% 異丙醇溶液調配) 在 80 迴流裝置 (reflux apparatus) 下水解 8 小時, 接著 (1) 直接加入 50ml 正己烷的方式進行劃分收集 (liquid-liquid extraction) 萃取三次 (流程二); (2) 先加入 50 ml 蒸餾水混勻後, 再加入 50ml 正己烷的方式進行劃分收集及萃取三次 (流程三); (3) 先加入氫氧化鈉溶液中中和酸水解樣品後, 再以真空濃縮去除異丙醇, 再加入 50ml 正己烷的方式進行劃分收集萃取三次 (流程四); 合併三次萃取之正己烷層, 再以 100ml 水洗三次, 經真空濃縮去除正己烷後, 再以甲醇定容至 5ml, 行 HPLC 分析。流程五、六和七: 參考 Wang and Lo, 1968 ; Chen, 1985 ; Yeh et al., 1994 ; Taylor et al., 1997 ; Taylor et al., 2000 的方法, 取 10 克經凍乾的山藥粉末, 置入圓筒濾紙 (28 × 100 mm), 放入索氏萃取裝置 (Soxhlet extractor), 以 150ml 甲醇於 85 下迴流萃取 10 小時, 萃取液減壓濃縮至乾, 加入 (1) 2.0N 鹽酸水溶液 20 ml (流程五); (2) 2.0N 鹽酸 (濃鹽酸以甲醇溶液調配) 20ml (流程六); (3) 2N 硫酸 (以 70% 異丙醇溶液調配) (流程七); 於 80 中迴流 2 小時, 再於 80 放置 30 分鐘, 藉以蒸去甲醇或異丙醇, 而後加入 20ml 正己烷進行劃分收集萃取三次, 合併三次萃取之正己烷層, 以

50ml 水洗三次，經真空濃縮去除正己烷後，再以甲醇定容至 5ml，行 HPLC 分析。

四、結果與討論

依文獻中曾使用過分析 diosgenin 的動相溶劑：氘甲烷、甲醇、氯仿和水等做評估。經多次實驗發現，再逆相的 C_{18} 管柱上以氘甲烷/水 = 95/5 (v/v)，對山藥中的 diosgenin 有良好的分離和偵測效果，且當定為 S/N=10/1 時，偵測極限為 200ng。萃出物並參考 Wang 和 Lo (1968) 的 TLC 法，以矽膠薄層為靜相，氯仿/甲醇=97/3(v/v)為動相進行測定，對山藥薯蕷皂素配基以及其他化合物有良好的分離效果，展開吹乾後，再噴以 10% 硫酸(以甲醇調配)，放入 110 烘箱 5 分鐘以呈色，且僅 diosgenin 會呈現綠色小點，可輔助山藥中 diosgenin 的檢測。由表一中可發現不同的處理方法檢測 18 種台灣產山藥中薯蕷皂配基 (diosgenin) 的含量，僅有基隆山藥、基隆山藥 (白皮白肉) 嘉義刺薯和陽明山山藥 (原生種) 檢測到含有薯蕷皂配基，其中又以流程六和七，亦即先以甲醇將山藥固醇類皂素的粗萃物萃出，再經酸水解去醯基，得到山藥皂素效果最好，含量分別為基隆山藥、基隆山藥 (白皮白肉) 嘉義刺薯和陽明山山藥 (原生種)，每克乾重含有 70.44±5.27、49.69±3.65、43.58±3.29 和 46.23±1.73 μg 的 diosgenin；而山藥皮中的 diosgenin 含量亦有相同的情形，由流程六中測得基隆山藥、基隆山藥 (白皮白肉) 嘉義刺薯和陽明山山藥 (原生種) 等 4 種的削皮，每克乾重分別含有 126.55±5.93 148.36±9.23 136.45±9.49 和 117.29±3.68 μg 的薯蕷皂配基(表二)。

Drapeau 等人(1986)曾依據 Paseshnicenko (1973) 的論點認為由 spirostanol 皂素 furostanol 皂素轉變為 diosgenin 的理論轉化率分別為 85-92%與 60-70%，並比較不同酸水解的效率，發現利用 2N 硫酸的 70% 異丙醇溶液較鹽酸水溶液水解得到較高的 diosgenin，推測是因為酸水解過程除去皂素的醯基外，仍須環化 furostanol 上的 F 環，使其轉化為 diosgenin。推論出雖以鹽酸進行酸水解，雖可將 spirostanol 和 furostanol 皂素轉成 diosgenin，但將 furostanol 皂素轉成 diosgenin 的能力較低。2N 硫酸 (以 70% 異丙醇溶液調配) 進行水解，則可促使 spirostanol 和 furostanol 皂素轉成 diosgenin 的能力增加，以致測得的 diosgenin 含量較高。由表一、表二可看出不管山藥的肉或削皮，流程一(鹽酸水解)測到的 diosgenin 含量遠低於流程二(硫酸-70% 異丙醇水解)者。

山藥皮可能因為是塊莖的主要代謝部分且要抵抗環境的傷害，諸如蟲害、氣候等等，以避免內部組受到損傷，因而有較多的二次代謝產物生成，所以由山藥削皮測得的 diosgenin 量較內肉為多。

因為 70% 異丙醇會溶解 diosgenin，恐造成以山藥粉末經 2N 硫酸(70% 異丙醇)酸水解後，diosgenin 並不會完全被正己烷萃出，因而以流程三和四進行試驗，原是想藉提

高水份含量以降低異丙醇濃度，或以濃縮方式去除異丙醇，進而使 diosgenin 自異丙醇中溶出，但實驗結果發現，山藥粉末經酸水解後加入 50ml 的水，再以正己烷行劃分收集萃取(流程三)，不但未使 diosgenin 測得的量增加，甚至遠低於未加水而直接以正己烷行劃分收集萃取者(流程二)，而中和後再以正己烷行劃分收集萃取者(流程四)甚至皆偵測不到有 diosgenin 的存在。推測經酸水解後的山藥渣或游離出的某些物質，可能有吸附 diosgenin 的能力，在加入水或以鹼溶液行中和、濃縮去異丙醇後，此些具有吸附 diosgenin 能力的渣或物質之懸浮性增加，因而更增加了對 diosgenin 的吸附能力所導致，而中和過程更可能因有較多和玻璃器皿接觸的機會，因而增加了 diosgenin 的管壁殘留，造成 diosgenin 的流失。

為了證實上述的推論，因此直接以 diosgenin 標準品 5mg 溶於 2N 硫酸-70% 異丙醇溶液，以流程二、三和四的方法，進行 diosgenin 的檢測分析，發現以流程三的方法得到 diosgenin 的回收率高達 90.64%，而流程二和四回收率僅為 79.07%和 73.36% (表三)，因此推斷異丙醇的存在，應會影響山藥凍乾粉末於 2N 硫酸-70% 異丙醇溶液酸水解後，以正己烷行劃分收集萃取 diosgenin 的能力(流程二)；而水份的增加，因稀釋了異丙醇的濃度，確實可導致 diosgenin 自異丙醇釋放出，而增加了正己烷萃取 diosgenin 的能力(流程三)；但是中和過程可能因較多和玻璃器皿接觸的機會，造成 diosgenin 的管壁殘留，使得 diosgenin 流失 (流程四)，雖然異丙醇經真空濃縮去除，但檢測的 diosgenin 回收率，仍低於酸水解完直接以正己烷行劃分收集萃取者。

但是若以 diosgenin 標準品 5mg 加入 10g 的台農二號山藥凍乾粉末 (無法檢測到含有 diosgenin)，以流程二、三和四的方法，進行 diosgenin 的檢測分析，發現所有處理法得到 diosgenin 的回收率均較直接以 diosgenin 標準品檢測的回收率低，其中以流程二所得到的 67.86% 為最高，以流程四得到的 24.19% 為最高 (表三)，此結果應可支持上述之推論，山藥的酸水解渣或某些游離物，可能具有吸附 diosgenin 的能力，同時於加入水或鹼溶液行中和、濃縮去異丙醇時，這些具有吸附 diosgenin 能力的渣或物質之懸浮性增加，因而更增加了吸附 diosgenin 的能力。

流程五、六和七則是先以甲醇將山藥固醇類皂素的粗萃物萃出，再經酸水解去醯基，得到山藥皂素配基，流程五是以 2N 鹽酸水溶液，流程六是以 2N 鹽酸甲醇溶液，流程七是以 2N 硫酸 70% 異丙醇溶液行酸水解。由表一可看出，若先將山藥固醇類皂素的粗萃物萃出，再經酸水解處理，除流程五外，流程六和七所偵測到的 diosgenin 含量，均較各種處理方法為高，此結果和 Talyor 等人(2000)以硫酸-70% 異丙醇溶液行酸水解，測得葫蘆巴種子(fenugreek seed)中的固醇類皂配基(steroidal sapogenin)含量較以鹽酸水溶液行酸水解為高的情形相同。流程五可能因山藥的甲

醇萃出物，在濃縮去甲醇的過程，致固醇類皂素(steroidal saponin)附著於濃縮瓶壁，其並不溶解於鹽酸水溶液，造成皂素酸水解不完全，進而影響了 diosgenin 的測定；流程六和七其酸是以甲醇及 70% 異丙醇調配，而山藥固醇類皂素可溶於其中，進而使得酸水解更加完全，同時可能因沒有山藥酸水解渣或游離物質造成吸附 diosgenin 的干擾，以致偵測出的 diosgenin 有較高的量。但是以流程六和七的方式檢測山藥中的 diosgenin 發現，先以甲醇將山藥固醇類皂素的粗萃物萃出，再經酸水解去醣基，得到山藥的固醇類皂素配基的過程中，不管以鹽酸的甲醇溶液或是硫酸的 70% 異丙醇溶液行酸水解，所偵測到的 diosgenin 量並無顯著差異，推論可能在沒有山藥的酸水解渣或某些游離物的存在干擾下，不管以鹽酸的甲醇溶液或是硫酸的 70% 異丙醇溶液行酸水解，均可提高 spirostanol 和 furostanol 皂素轉成 diosgenin 的能力，致檢測到 diosgenin 的量較其他處理組為高。對於山藥皮中 diosgenin 的檢測亦和山藥肉部分，有相同的結果(表二)。

由於 diosgenin 會溶於甲醇和異丙醇中，可能影響酸水解後以正己烷行劃分收集萃取 diosgenin 的效果，因此進一步以 diosgenin 標準品 5mg 加入 10g 的台農二號山藥凍乾粉末以流程五、六和七的方法，進行 diosgenin 的檢測分析，由表四可看出以流程五測得的量為最高，達 95.47 %，似乎和先前實驗有些矛盾，實際上。因為加入台農二號山藥凍乾粉末的原本就為 diosgenin 的標準品，雖然經甲醇萃取濃縮仍有附著於濃縮瓶壁的問題，但 diosgenin 會被稍後的正己烷萃取溶出，不像山藥中帶有醣基的皂素需要酸水解與轉化的步驟，若皂素不能完全水解或轉化成不帶醣基的皂素配基，則無法溶於正己烷中，以致影響了 diosgenin 的測定。而甲醇和異丙醇的存在影響了正己烷萃取 diosgenin 的效果(表四)，流程六和七(即酸水解後再經 80 加熱 30 分鐘以蒸去酸液中的醇類化合物)測得的 diosgenin 的回收率分別為 89.31 和 90.21 %，而未經 80 加熱 30 分鐘蒸除部分有機溶劑處理者的回收率，則分別為 82.87 和 83.33 %。

經由上述的實驗我們可以得知以 HPLC 配合紫外光偵檢，波長設定為 203nm，靜相為 C18 管柱，動相以氫甲烷/水 = 95/5 (v/v)，流速 1 ml/min。配合以甲醇先行萃取出山藥中固醇類皂素，再以 2.0N 鹽酸(濃鹽酸以甲醇溶液調配)或 2N 硫酸(以 70% 異丙醇溶液調配)行酸水解去醣基後，於 80 放置 30 分鐘，藉以蒸去甲醇或異丙醇，而後以正己烷進行劃分收集萃取，對於山藥中的 diosgenin 有最好的偵測效果。同時在檢測的 19 種台灣產山藥樣品中，僅基隆山藥、基隆山藥(白皮白肉)、嘉義刺薯和陽明山山藥(原生種)都檢測出含有 diosgenin，而削皮所含的 diosgenin 量又較肉部分為高，其含量約為肉部分的 2 至 3 倍。

五、參考文獻；

1. 劉新裕、盧煌勝、林俊義。2000。2000 年山藥之生產

與藥膳利用。pp6-21。台灣省農業試驗所。台中。

2. 曾慶瀛、余哲仁、王璧娟、劉新裕。1999。山藥抗氧化活性之研究。1999 藥用植物之開發與利用研討會論文集。pp21-35。台灣省農業試驗所。台中。
3. 林俊義、盧煌勝、劉新裕。1998。1998 山藥之生產與食譜。pp5-15。台灣省農業試驗所。台中。
4. 黃鵬。1996。新興特用作物長形山藥栽培模式建立。花蓮區農業改良場農技報導 30: 1- 3。
5. Blunden, G. and Hardman, R. 1968. An Improved method of densitometric thin layer chromatography as applied to the determination of saponin in *Dioscorea* tubers. J. Chromatogr. 38: 355-363.
6. Blunden, G., Hardman, R. and Morrison, J. 1967. Quantitative elimination of diosgenin in *Dioscorea* tubers by densitometric thin layer chromatography. J. Pharm. Sci. 58(8): 948-950.
7. Chen, A. H. 1985. Applied studies on the saponins of *Dioscorea* I. Studies on the saponins of *Dioscorea* in Taiwan. Chin. Chem. Soc. J. 43: 79-85.
8. Chen, Y. and Wu, Y. 1994. Progress in research and manufacturing of steroidal saponins in China. J. Herb Spic. Med. Plant. 2: 59-70.
9. Drapeau, D., Sauvaire, Y., Blanch, H. W. and Wilke, C. R. 1986. Improvement of diosgenin yield from *Dioscorea deltoidea* plant cell cultures by use of a non-traditional hydrolysis method. Planta Med. 6: 474-478.
10. Lay, H. L., Denq, S. M., Liu, S. Y. and Sheu, B. W. 1999. Studies on the identification of Chinese drugs material in yams (*Dioscorea* spp.). J. Food Drug Anal. 7: 313-325.
11. Li, D. G. and Ruan, Y. C. 1980. Diosgenin and yamogenin from four species of *Dioscorea* L. in Yunnan. Acta Botan. Yunnanica 2: 476-479.
12. Liu, B., Lockwood, G. B. and Gifford, L. A. 1995. Supercritical fluid extraction of diosgenin from tubers of *Dioscorea nipponica*. J. Chromatogr. A. 690 :250-253.
13. Liu, S. Y., Wang, J. Y., Shyu, Y. T., Hu, M. F., Yang, H. R. and Ho, C. C. 1996. The development of yam new variety Tainung No. 2. J. Agric. Res. Chin. 45: 260-284.
14. Liu, S. Y., Wang, J. Y., Shyu, Y. T. and Song, L. M. 1995. Studies on yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. J. Chin. Med. 6: 111-126.
15. Liu, S. Y., Wang, J. Y., Song, L. M. and Shyu, Y. T. 1994. Studies on the production and quality of yam (*Dioscorea* spp.). J. Chin. Med. 5: 167-183.
16. Liu, S. Y., Wang, J. Y., Shyu, Y. T., Duan, C. H. 1992. The development and adaptability of *Dioscorea alata* L. cv. Tainung No. 1. J. Agric. Res. Chin. 41(2): 140-158.
17. Mahato, S. B., Sahu, N. P. and Roy, S. K. 1981. High-performance liquid chromatographic for the determination of diosgenin in plants. J. Chromatogr. 121: 169-173.
18. Oncina, R., Botia, J. M., Dio Rio, J. A. and Ortuno, A. 2000. Bioproduction of diosgenin in Callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. Food Chem. 70: 489-492.
19. Ortuno, A., Oncina, R., Botia, J. M. and Dio Rio, J. A. 1999. Regulation of the diosgenin expression in *Trigonella foenum-graecum* plants by different plant growth regulators. Food Chem. 65: 227-232.
20. Ortuno, A., Oncina, R., Botia, J. M. and Dio Rio, J. A.

1998. Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum-graecum* plants. Modulation by benzylaminopurine. Food Chem. 63:51-54.
21. Pierre, P. R., Sauvaire, Y. D., Hillaire-Buys, D. M., Leconte, O. M., Baissac, Y. G., Ponsin, G. R. and Ribes, G. R. 1995. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. Steroid 60: 674-680.
22. Savikin-Fodulovic, K., Grubisic, D., Culafic, L., Menkovic, N. and Ristic, M. 1998. Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*. Plant Sci. 135: 63-67.
23. Tal, B. and Goldberg, I. 1981. High-performance liquid chromatographic separation of steroidal saponins. J. Nat. Prod. 44: 750-751.
24. Taylor, W. G., Zaman, M. S., Mir, Z., Mir, P. S., Acharya, S. N., Mears, G. J. and Elder, J. L. 1997. Analysis of steroidal saponins from Amber fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by capillary gas chromatography and combined gas chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 45: 753-759.
25. Taylor, W. G., Elder, J. L., Chang, P. R. and Richards, K. W. 2000. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. J. Agric. Food Chem. 48: 5206-5210.
26. Tindall, H. D. 1983. Dioscoreaceae, Vegetable in the Tropics, Vol. 1, Macmillan Press, London, pp201-224.
27. Wang, N. Y. and Lo, T. B. 1968. Studies on thin layer chromatography of steroidal saponins and preliminary report of saponin fraction of Formosan *Dioscorea*. Chin. Chem. Soc. J. 1: 30-38.
28. Yang, M. H. and Chen, Y. Y. 1983. Steroidal saponins in *Dioscorea collettii* [isolated from the acid treated rhizome]. Planta Med. 49 (1): 38-42.
29. Yeh, F. T., Huang, W. W., Cheng, C. C., Na, C., and Tsay, H. S. 1994. Tissue culture of *Dioscorea doryophora* Hance II. Establishment of suspension culture and the measurement of diosgenin content. Chin. Agron. J. 4: 257-268.

表一 不同萃取方式對山藥肉中薯蕷皂配基含量檢測之影響

Table 1. Diosgenin content in fresh of yams (*Dioscorea* spp.) determined by using HPLC with different sample preparing procedures.

Samples	Procedures						
	1	2	3	4	5	6	7
基隆山藥 (正)	10.68±3.39 ^d	51.79±1.41 ^b	27.72±5.51 ^c	ND	5.78±1.08 ^e	64.91±3.12 ^a	70.44±5.27 ^a
基隆山藥 (白皮白肉)	10.40±1.71 ^d	44.55±2.29 ^b	20.57±7.32 ^c	ND	7.69±2.48 ^d	49.69±3.65 ^a	49.15±6.35 ^a
基隆山藥 (白皮黃肉)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
基隆山藥 (紅皮白肉)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
陽明山山藥 (原生種)	6.68±3.31 ^c	43.78±1.83 ^b	10.52±5.28 ^c	ND	5.38±0.63 ^c	46.23±1.73 ^a	45.34±1.63 ^a
陽明山山藥 (白皮白肉)	ND ⁵	ND	ND	ND	ND	ND	ND
陽明山山藥 (紅皮白肉)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
嘉義刺薯	7.54±3.26 ^d	35.93±2.01 ^b	21.66±6.48 ^c	ND	5.29±0.51 ^d	43.58±3.29 ^a	41.08±3.71 ^a
恆春山藥	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大汕三	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大汕二	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
品三	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大葉壽豐	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
花蓮壽豐	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
中國長	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
台農二號	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
台農一號 (千里達)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
名間長紅	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

1. Diosgenin content = μg of diosgenin / g of dried yam (*Dioscorea* spp.)

2. Sample preparing procedures are described in the text

3. Values are mean \pm S. D.

4. Means of three replicates

5. ND = not detected

6. Figures bearing different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$)

表二 不同萃取方式對山藥削皮中薯蕷皂配基含量檢測之影響

Table 2. Diosgenin content in peels of yams (*Dioscorea* spp.) determined by using HPLC with different sample preparing procedures.

Samples	Procedures		
	1	2	6
基隆山藥(正)	53.85±6.24 ^c	111.67±3.94 ^b	126.55±5.93 ^a
基隆山藥(白皮白肉)	63.21±6.67 ^c	142.71±3.56 ^b	148.36±9.23 ^a
基隆山藥(白皮黃肉)	ND	ND	ND
基隆山藥(紅皮白肉)	ND	ND	ND
陽明山山藥(原生種)	58.57±4.65 ^c	94.36±4.32 ^b	117.29±3.68 ^a
陽明山山藥(白皮白肉)	ND ⁵	ND	ND
陽明山山藥(紅皮白肉)	ND	ND	ND
嘉義刺薯	66.44±7.29 ^c	128.85±4.46 ^b	136.45±9.49 ^a
恆春山藥	ND	ND	ND
大汕三	ND	ND	ND
大汕二	ND	ND	ND
品三	ND	ND	ND
大葉壽豐	ND	ND	ND
花蓮壽豐	ND	ND	ND
中國長	ND	ND	ND
台農二號	ND	ND	ND
台農一號(千里達)	ND	ND	ND
名間長紅	ND	ND	ND

1. Diosgenin content = μ g of diosgenin / g of dried peel of yam (*Dioscorea* spp.)

2. Sample preparing procedures are described in the text

3. Values are mean \pm S. D.

4. Means of three replicates

5. ND = not detected

6. Figures bearing different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$)

表三 經 2N 硫酸-70%異丙醇溶液水解後，不同方式的正己烷萃取對薯蕷皂配基回收率的影響

Table 3. The yield discrepancy of diosgenin form selected hexane extracting methods after hydrolyzed with 2N H₂SO₄ in 70% isopropanol.

Samples	Procedures		
	2	3	4
5mg diosgenin	79.07(0.12) ^b	90.64(0.11) ^a	73.36(0.24) ^c
5mg diosgenin + 10mg 台農二號	67.86(5.96) ^a	30.74(10.72) ^b	24.19(8.41) ^c

1. Means of three replicates
2. Sample preparing procedures are described in the text
3. Values in parentheses are coefficient of variation (%)
4. Figures bearing different letters in the same row are significantly different (p<0.05)

表四 經甲醇萃取後，不同的酸水解方式對薯蕷皂配基回收率的影響

Table 4. The yield discrepancy of diosgenin form selected hydrolysis methods after extracted with methanol.

Samples	Procedures		
	5	6	7
5mg diosgenin + 10mg 台農二號 (酸水解後再經80 加熱30分鐘)	95.47 (0.11) ^a	89.31 (1.43) ^b	90.21 (1.38) ^b
5mg diosgenin + 10mg 台農二號 (酸水解後未經80 加熱30分鐘)	95.21 (0.12) ^a	82.87 (2.24) ^c	83.33 (3.01) ^c

1. Means of three replicates

2. Sample preparing procedures are described in the text

3. Values in parentheses are coefficient of variation (%)

4. Figures bearing different letters in the table are significantly different ($p < 0.05$)