

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2316-B-040-004

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：王祖興(中山醫學院生命科學系)

共同主持人：劉新裕(臺灣農業試驗所農藝系)

計畫參與人員：

一、中文摘要

山藥(Dioscorea)自古以來即是藥用及保健用食材重要之原料，對人體有益腸胃、滋補、降血糖及調養婦科疾病等多種效能，目前也是本省大力推廣種植之保健食材。現代研究發現某些山藥品系含有獨特的皂甘、多糖、多酚化合物及其他抗氧化物質，這些成分都可能與山藥所具有之保健功能有密切相關。但這些分子多數都仍未被清楚了解及定義，而這些分子是否確為其食用山藥後所發揮保健功能之有效成分？或這些具生物活性分子之間是否具有其交互作用？則更不得而知，再加上山藥品系繁多，其中組成也常因品系、栽培之地理氣候因素而有極大差異，因此深入了解山藥中具生物活性之成分及與其保健功能間之相關性，並依此建立山藥品系間機能性之評估標準，對未來山藥的推廣種植是極為重要的工作。目前眾多的醫學報告幾乎已確定生物氧化物與抗氧化系統間之失調是萬病之因。因此，本研究計畫即以抗氧化活性作為其功能性指標，藉此找尋並特性化山藥仿食用方式萃取所得冷凍乾燥樣品中所具有抗氧化活性之主要成分，了解這些分子在細胞或動物之生理功能，並建立未來評估山藥不同品系之機能性指標是本研究計畫及後續計畫之長遠目標。本期計畫完成之重要成果如下：

- (1) 臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品具有明顯保護硫酸銅與過氧化氫合併處理造成牛胸腺 DNA 的傷害。
- (2) 臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品可能具與銅離子鍵結之活性。

- (3) 臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品中具有明顯保護硫酸銅與過氧化氫合併處理造成牛胸腺 DNA 傷害的主要有效分子其分子量分佈在30kDa以下範圍。
- (4) 臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品中具有明顯保護硫酸銅與過氧化氫合併處理造成牛胸腺 DNA 傷害的主要有效成分對熱呈不敏感性。甚至加熱有促進其抗氧化活性。
- (5) 利用彗星分析(comet assay)發現：臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品可有效保護過氧化氫、硫酸鐵在人類淋巴母細胞株所造成的核 DNA 傷害。但對硫酸鐵所造成的核 DNA 傷害則不具保護性。
- (6) 利用過氧化氫螢光探針 amplex red 測量臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品都不具顯著分解過氧化氫之能力，推測本研究所製備之山藥萃取樣本不含過氧化氫酵素(catalase)及過氧化酵素(oxidase)。
- (7) 以質體 DNA 構形改變(conformational change)的分析發現：臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品不具抗游離輻射(X-ray)之活性。
- (8) 以 Bio-Rad 試劑測量發現：30%酒精當作萃取溶劑可明顯增加蛋白質之含量約1.5(不加熱)至2.0倍(加熱)。臺農二號山藥之水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品中含有一主要蛋白分子量約36.8 kDa。

(9) 臺農二號山藥之水萃物再經煮沸 30 分鐘後，顯著改變其對溶劑之溶解能力，不溶於一般之極性溶劑如水、dimethyl sulfoxide、乙醚等，但可溶解於鹼性溶劑如 NaOH，以 0.2N NaOH 溶解之山藥水萃物亦不具保護硫酸銅與過氧化氫合併處理造成牛胸腺 DNA 傷害之活性。

關鍵詞：抗氧化活性，氫氧自由基，臺農二號山藥，ethidium 鍵結分析，彗星分析

Abstract

The tubers of *Dioscorea* are mainly used as a health food and for extraction of diogenin, sapogenin and its glycoside dioscin for use as steroid intermediate in the pharmaceutical industry in China. Free radicals have been related with aging and diseases, such as cancer, diabetes and especially in neurological disorders. A diet including variable antioxidant foods may therefore help to prevent these illnesses. In this experiment, we evaluated the *in vitro* antioxidant activities of four lyophilized extracts obtained from *Dioscorea alata* L. tubers: (1) aqueous extract, AE (2) 30% ethanolic extract, EE (3) aqueous extract boiling for 30 minutes, ABE and (4) 30% ethanolic extract boiling for 30 minutes, EBE. Protective effect against H₂O₂-CuSO₄ induced DNA damages on calf thymus DNA damages were detected by ethidium bromide binding assay as a model system. Except the lyophilized aqueous extract for boiling 30 minutes, three other different extracts were significantly reduced the H₂O₂-CuSO₄ induced DNA damages on calf thymus DNA. The ID₅₀ value for lyophilized aqueous extract, 30% ethanolic extract and 30% ethanolic extract boiling for 30 minutes was 0.14, 0.22, and 0.17 mg/mL, respectively. These results suggest that the *Dioscorea* tubers extracts have strong antioxidant actions and that it may be prophylactic food against the age related and neurological diseases.

Keywords: Antioxidant activity, hydroxyl

radical, *Dioscorea alata* L. (TN2), ethidium bromide binding assay, comet assay

二、緣由與目的

眾多的現代生物醫學數據指出細胞或個體中氧化物質(oxidant)與抗氧化系統間的失調是造成人類老化及重要疾病如癌症、發炎、心血管疾病及神經病變等極為重要的原因¹，因此藉日常膳食中常規補充抗氧化劑，或添加天然之抗氧化劑，衍然已成為現代生活中不可缺少的一環，因為對於疾病，預防重於治病！因此，了解天然食材中安全性高且具有抗氧化活性的成分，也成為目前及未來國人預防疾病、保持健康的重要工作之一。

山藥為薯蕷科(Dioscoreaceae)薯蕷屬(*Dioscorea*)多年生蔓性之根莖類植物，可供食用、藥用或保健用之重要作物之一，亦為國際性之糧食作物，極早即被栽培與利用，『神農本草經』且列山藥為上品藥材。研究報告指出，山藥富含蛋白質、糖、胺基酸、鈣、磷、鐵、維生素 C 等多種有益生命活動的重要物質，這也是山藥作為益壽佳品的物質基礎²⁻³。部分山藥塊莖更含有皂甘(diosgenin)⁴⁻⁸，是合成激素的重要原料⁹，也是山藥藥用價值的一個重要的可能作用因子。動物實驗或臨床實驗也證實，山藥確有增進食慾、改善人體消化機能及抗疲勞改善體質、降血糖等多種功能¹⁰⁻²⁰。除皂甘外，山藥中也含有多種具有抗氧化活性之分子，如多酚(polyphenol)化合物²¹⁻²²、抗氧化酵素(過氧化氫酵素及超氧歧化酵素)²³，這些分子在現代生物醫學也被證實與抗老化及抗癌之功能有關，也很可能是山藥發揮其保健功能之重要分子。除皂甘的研究外，有關山藥所含重要具生物活性分子，如抗氧化活性分子的探討仍不多，再加上山藥種類繁多，其中的組成份也常因品種及天然或栽培地理環境之不同而有很大差異²⁴⁻²⁵，另外，每個研究室萃取樣品的方式差異性也甚大，如萃取溶劑的選擇等等，使得不同研究室間的數據無法比較，而山藥中具某種生物活性之分子是否可由人類的飲食及消化路徑被溶出而發揮其保健也不得而

知。因此仿照一般飲食方式製備山藥萃取物質，並分析萃取物中主要具有抗氧化活性之主要分子，進而了解這些分子與其所發揮之保健功能間之關係，仍非常值得繼續開發探討。

本省目前由臺灣農業試驗所推廣種植的重要之山藥品系，計有八種白肉及三種紅肉共十一種，均非常適合在本省栽培生產。其中臺農 2 號, TN2 (*D. alata* L.) 除高產穩定外，對環境適應力強、營養品質佳、容易加工、耐病、塊莖肉質味美、粘度甚高、顏色潔白、易保存且不易褐化等多種優良特性，在食用、加工用及保健利用等方面之發展，深具潛力，可說是推廣種植之代表性品種，對該品種中所含具生物活性分子之研究亦可作為研究其他品種之模式，意義甚高。本研究的目的：即是以臺農 2 號作為材料，利用 EtBr 嵌入鍵結 DNA 分析(ethidium bromide binding assay) 及彗星分析(comet assay) 評估其水溶液、30%酒精溶液、水溶液煮沸三十分鐘及 30%酒精溶液煮沸萃取物質在試管試驗中清除 H₂O₂-CuSO₄ 釋放氫氧自由基的能力及抑制 H₂O₂ 誘發人類淋巴母細胞 DNA 傷害能力之抗氧化活性，並將基於其所具之抗氧化活性，以系列不同孔徑濾膜過濾分餾山藥萃取物質，進一步找尋山藥萃取物質中主要具有抗氧化活性之部份(fraction)，以作為未來了解山藥萃取物中確切抗氧化分子結構、保健功能，以及建立省產多種山藥品系新機能性評估指標之基礎。

三、結果與討論

Ethidium bromide 鍵結分析之特性

螢光染劑 Ethidium bromide 與雙股 DNA 的嵌入性鍵結可用來定量 DNA，而此種定量關係也被運用來測量 DNA 損傷的程度，例如 DNA 鏈斷傷害、DNA 內轉體等都可因這些傷害造成 ethidium bromide 無法與 DNA 鍵結而減低其螢光值而被量化²⁶。本研究以過氧化氫合併硫酸銅的 Fenton 反應來釋放氫氧自由基，造成牛胸腺 DNA 的傷害而降低 ethidium bromide 與 DNA 鍵結所產生之螢光值。固定過氧化氫濃度在 25mM，ethidium bromide 與 DNA 鍵結的強度將隨硫酸銅濃度(0~200 μM)的增加而明顯的下

降，減低 50%程度的硫酸銅濃度約為 50 μM(圖一)。之後研究山藥萃取物質及已知抗氧化劑在保護牛胸腺 DNA 免於過氧化氫及硫酸銅所造成傷害的能力，都是以 25 mM 過氧化氫及 50 μM 硫酸銅所造成的 DNA 傷害當作一標準來進行評估。

利用一些已知的抗氧化劑如過氧化氫酵素(catalase)及銅離子螯合劑如 DDC (diethyldithiocarbamic acid)，PHE (1,10-phenanthroline)，NEO (neocuproin) 直接作用系統中的過氧化氫及銅離子，都能在某種濃度區間呈現明顯降低 H₂O₂-CuSO₄ 所造成的 DNA 傷害。然而 PHE 所呈現的劑量保護效應特殊，保護作用在濃度低於 0.5 mM 以下明顯，但濃度超過 0.5 mM 以上則逐漸喪失其保護性，此現象與該物質與銅離子鍵結產生具有傷害 DNA 分子的錯合物(complex)有關。若以氫氧自由基之清除劑如 DMSO (dimethyl sulfoxide)、glutathione 加入系統中時發現 DMSO 在 0~10 mM 範圍，保護作用在濃度 1 mM 即達到飽和，抑制 H₂O₂-CuSO₄ 造成 DNA 傷害的程度約 63%。濃度繼續增加至 10 mM 則無更大的保護效果(圖二)。此現象顯示 H₂O₂-CuSO₄ 系統對牛胸腺 DNA 所造成的傷害可能有部份(約 30%)的傷害並非來自其反應所釋放之氫氧自由基。將 glutathione 加入 H₂O₂-CuSO₄ 系統中，發現 glutathione 濃度在 150 μM 以下會強烈增加系統對牛胸腺 DNA 的傷害，濃度在 50 μM 時增加達三倍之多，濃度提高到 200~1000 μM 則出現約 50%的保護作用但並無明顯劑量效應關係(圖三)。此現象說明 glutathione 具有 pro-oxidant 與 antioxidant 的雙重作用²⁷，而且在 Fenton reaction 需要極高的濃度才能展現其清除氫氧自由基的能力，此與細胞內部維持高 glutathione 濃度(>1 mM) 的情相吻合。上述的試驗證實 H₂O₂-CuSO₄ 在系統中的確可釋放氫氧自由基而造成牛胸腺 DNA 傷害，而降低 ethidium bromide 的螢光值。

山藥萃取物質之特性

臺農二號山藥去皮-80 °C 之冷凍樣品(臺灣農業試驗所劉新裕博士提供)經圖四之流程進行萃取。萃取所得的四種冷凍乾

縮樣品，在外觀上除水加熱呈細白色粉末外其餘水、30%酒精及30%酒精加熱者則是淡黃色不規則狀樣品，其中30%酒精萃取者更具有黏稠性。對溶劑的溶解性方面，水加熱組之冷凍乾縮樣品對水、酒精、氯仿、乙醚及DMSO等多種常用溶劑均呈不溶性，但可快速溶於鹼性溶液如NaOH；其餘三種方式萃取之冷凍乾縮樣品，在20 mg/mL的濃度則可簡單完全的溶解於水中。

四種不同方式萃取之山藥冷凍乾縮樣品蛋白質含量分別為水萃取組0.11，水加熱組0.12，30%酒精組0.28，30%酒精加熱組0.17 $\mu\text{g protein}/\mu\text{g lyophilized extract}$ 。以14%之SDS-PAGE分析水萃取組，30%酒精組及30%酒精加熱組之蛋白圖譜發現在此三種不同萃取方式之冷凍乾縮樣品含有一種主要之蛋白，分子量約為36.8 kDa(圖五)。在不同的山藥品系如 *Dioscorea cayenensis* 及 *Dioscorea batatas decne* 也曾發現有主要之儲藏蛋白 dioscorins，其分子量約為32.0 kDa²⁸⁻²⁹。本研究在臺農二號萃取冷凍乾縮樣品中所發現分子量約36.8 kDa之主要蛋白與其所具有之清除氫氧自由基之抗氧化活性應無關連，因該蛋白在30%酒精組之含量比其他萃取組高出甚多但其清除氫氧自由基的能力則與水萃取組及30%酒精加熱組相當。然而該蛋白之功能或與 dioscorin 間之相關性則需進一步的分析。

山藥萃取物質之抗氧化活性

Ethidium bromide assay

除水加熱萃取之冷凍乾縮樣品以0.2N NaOH加以溶解外，其餘三種方式萃取之冷凍乾縮樣品均以滅菌之MQ水溶解成10 mg/mL之庫存溶液，分裝於1.5 mL離心管中保存於-80 °C冰箱備用。利用 Ethidium bromide assay 評估四種不同方式萃取之山藥冷凍乾縮樣品之抗氧化活性，發現除水加熱組外，其餘三種不同萃取方式所得之冷凍乾縮樣品均能明顯有效清除氫氧自由基而保護牛胸腺DNA不受H₂O₂-CuSO₄作用而受傷。保護50%的劑量，分別為水萃取組0.14 mg/mL，30%酒精萃取組0.22 mg/mL，30%酒精加熱組0.17 mg/mL(圖

六)。水萃取組冷凍乾縮樣品不具清除氫氧自由基能力並非因0.2N NaOH溶液抑制 ethidium bromide 鍵結DNA所導致，因為同濃度的NaOH對 ethidium bromide 鍵結DNA的能力並沒有影響。

以競爭CuSO₄與銅離子螯合劑的能力來測量山藥萃取物質是否具有與銅離子鍵結的活性，結果發現山藥萃取物質不會競爭CuSO₄而降低Cu-DDC錯合物的形成，反而增加Cu-DDC錯合物的量(圖七)。此數據除說明山藥保護牛胸腺不受的傷害並非肇因於與銅離子的結合，並且說明山藥萃取物中含有可測度的銅離子濃度，此數據與臺灣農業試驗所劉新裕博士數據吻合。

將山藥水、30%酒精及30%酒精加熱萃取之水溶液以100 °C處理十分鐘後，再測量其對H₂O₂-CuSO₄造成DNA傷害的保護能力，發現加熱並不會減低其上述三種不同萃取樣品的保護能力，甚至在加熱處理組有提昇其保護能力的趨勢，平均約增加10%(圖八)。上述三種不同山藥萃取樣品水溶液經0.2 μm 過濾膜的過濾產物，在100 °C加熱十分鐘後，仍維持增加其保護H₂O₂-CuSO₄造成DNA傷害能力的趨勢。這個數據說明山藥萃取物質中具有保護DNA不受H₂O₂-CuSO₄作用而受傷的有效分子是呈熱安定性。

將山藥水萃取之冷凍乾燥樣品水溶液以不同孔徑大小之過濾膜，包含8 μm ，5 μm ，3 μm ，0.45 μm ，0.2 μm ，100K，30K進行過濾分離，發現即使是通過30K過濾膜的濾物仍具有90%以上保護牛胸腺DNA不受H₂O₂-CuSO₄作用的傷害，由此數據推測在山藥萃取的冷凍乾燥樣品中所具有強力清除氫氧自由基的有效分子，其分子量應在30 kDa以下(圖九)。

Comet assay

為測量山藥萃取之冷凍乾燥樣品在細胞層級之抗氧化活性，將30%酒精萃取之冷凍乾燥樣品水溶液與人類淋巴球先行混合，濃度範圍從0.125~1 mg/mL，培養三十分鐘後，加入為100 μM H₂O₂濃度，處理十分鐘以磷酸緩沖液清洗，每次五毫升，清洗二次，然後以彗星分析測量H₂O₂

在不同濃度山藥萃取物質及不含山藥萃取物質處理下對人類淋巴母細胞所造成的 DNA 傷害程度。每個處理分析 30 個慧星圖像，並以電腦軟體(Euclid Analysis, MO)計算其 Tail moment 作為其 DNA 傷害之指標，結果發現添加山藥萃取物之各組有降低 H₂O₂ 對人類淋巴球所造成的 DNA 傷害。此外山藥萃取物對硫酸銅在人類淋巴球所造成的核 DNA 傷害亦具明顯之保護活性，但對硫酸鐵所造成之核 DNA 傷害，則無明顯保護活性(圖十)。

四、計畫成果自評

本研究至目前的成果已證實臺農二號山藥水、30%酒精及 30%酒精加熱萃取之冷凍乾縮樣品均具有明顯保護硫酸銅與過氧化氫在牛胸腺 DNA 造成之傷害，且此保護能力與所具有之與銅離子之專一性鍵結有密切關係，與清除氫氧自由基的活性關係則可能較低，因山藥萃取物不無直接保護 X-ray 所造成之質體 DNA 傷害(圖十一)。利用不同口徑之膜過濾山藥萃取物，在評估其上述保護硫酸銅與過氧化氫在牛胸腺 DNA 造成傷害的能力，發現主要有效保護之分分，其分子量在 ≤ 30 kDa 範圍。本研究在試管及人類淋巴球都有明顯保護 DNA 免於氧化傷害，且因所具有之銅離子專一螯合能力，對銅離子代謝異常之疾病如 Menkes 及 Wilson 疾病，可能是一極為恰適當之保健食材，值得朝此方向作深入了解及開發。本研究室目前正以 TLC 之方式希望能找出山藥萃取物中發揮保護硫酸銅與過氧化氫在牛胸腺 DNA 造成傷害之真正主要分子，執行成果良好。

五、參考文獻

- Gate L. Paul J. Ba GN. Tew KD. Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. [Review] *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 53(4):169-80, 1999
- Wanasundera JP. Ravindran G. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods for Human Nutrition*. 46(1):33-9, 1994
- [Analysis of nutrient constituents in *Dioscorea opposita*]. [Chinese] *Chung Yao Tung Pao Bulletin of Chinese Materia Medica*. 12(4):36-8, 1987
- Xu LX. Liu AR. [Determination of diosgenin in *Dioscorea*]. [Chinese] *Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica*. 19(2):141-5, 1984
- Liu CL. Chen YY. Ge SB. Li BG. [Studies on the constituents of *Dioscorea* plants. II. Isolation and identification of steroidal saponins from *Dioscorea collettii* Hook. F.]. [Chinese] *Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica*. 18(8):597-606, 1983
- Fang YW. Zhao JJ. Ho YZ. Li BG. Xu CJ. [Elucidation of the chemical structures of two steroid saponins of *Dioscorea nipponica* Makino]. [Chinese] *Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica*. 17(5):388-91, 1982
- Cooke BK. Determination of diosgenin in *Dioscorea deltoidea* and *Dioscorea sylvatica* by using gas-liquid chromatography. *Analyst*. 95(126):95-7, 1970
- Chakravarti RN. Dash SN. Variable yields of diosgenin from *Dioscorea yams*. *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine*. 14(2):45-7, 1966
- Xu CJ. [Cultivation of *Dioscorea*---an important raw material for steroidal hormones]. [Chinese] *Chung Yao Tung Pao Bulletin of Chinese Materia Medica*. 8(4):3-5, 1983
- Kelmanson JE. Jager AK. van Staden J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 69(3):241-6, 2000
- Dykman KD. Tone C. Ford C. Dykman RA. The effects of nutritional supplements on the symptoms of fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Integrative Physiological & Behavioral Science*. 33(1):61-71, 1998
- Aderiye BI. Ogundana SK. Adesanya SA. Roberts MF. Antifungal properties of yam (*Dioscorea alata*) peel extract. *Folia Microbiologica*. 41(5):407-12, 1996
- Vasil'eva IS. Paseshnichenko VA. Steroid glycosides from suspension cultures of *Dioscorea deltoidea* cells and their biological activity. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 404:15-22, 1996.
- Hu K. Dong A. Yao X. Kobayashi H. Iwasaki S. Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Medica*. 62(6):573-5, 1996
- Araghiniknam M. Chung S. Nelson-White T. Eskelson C. Watson RR. Antioxidant activity of *Dioscorea* and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sciences*. 59(11):PL147-57, 1996
- Iwu MM. Okunji CO. Ohiaeri GO. Akah P. Corley D. Tempesta MS. Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Medica*. 56(3):264-7, 1990
- Iwu MM. Okunji CO. Akah P. Tempesta MS. Corley D. Dioscoretine: the hypoglycemic

principle of *Dioscorea dumetorum*. *Planta Medica*. 56(1):119-20, 1990

18. Hikino H. Konno C. Takahashi M. Murakami M. Kato Y. Karikura M. Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of dioscorans A, B, C, D, E, and F; glycans of *Dioscorea japonica* rhizophors. *Planta Medica*. (3):168-71, 1986
19. Undie AS. Akubue PI. Pharmacological evaluation of *Dioscorea dumetorum* tuber used in traditional antidiabetic therapy. *Journal of Ethnopharmacology*. 15(2):133-44, 1986
20. Jindal MN. Kelkar VV. Doctor RB. The anorexiant activity of Kalio-kund (*Dioscorea bulbifera* Linn.), methylphenidate and cocaine in rats: a preliminary study. *Indian Journal of Medical Research*. 57(6):1075-80, 1969
21. Imbert MP. Seaforth C. Anthocyanins in *Dioscorea alata* L. *Experientia*. 24(5):445-7, 1968
22. Farombi EO Britton G Emerole GO Evaluation of the antioxidant activity and partial characterization of extracts from browned yam flour diet. *Food Research International* 33:493-499
23. Isamah GK Asagba SO Thomas AE Lipid peroxidation, o-diphenolase, superoxide dismutase and catalase profile along the three physiological regions of *Dioscorea rotundata* Poir cv Omi *Food Chemistry* 69: 1-4, 2000
24. Blunden G. Hardman R. Hind FJ. Seasonal variations in sapogenin yields from *Dioscorea sylvatica* and *D. hondurensis*. *Planta Medica*. 19(1):19-22, 1970
25. Karnick CR. Seasonal periodicity of sapogenin production in *Dioscorea deltoidea* wall and *Dioscorea prazeri* Prain & Burkill. *Planta Medica*. 16(3):269-72, 1968
26. Prutz WA. Measurement of copper-dependent oxidative DNA damage by HOCl and H₂O₂ with the ethidium-binding assay. *Journal of Biochemical & Biophysical Methods*. 32(2):125-35, 1996.
27. Thomas S. Lowe JE. Hadjivassiliou V. Knowles RG. Green IC. Green MH. Use of the Comet assay to investigate the role of superoxide in glutathione-induced DNA damage. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 243(1):241-5, 1998
28. Hou WC. Liu JS. Chen HJ. Chen TE. Chang CF. Lin YH. *Dioscorin*, the major tuber storage protein of yam (*Dioscorea batatas* decne) with carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 47(5):2168-72, 1999
29. Conlan RS. Griffiths LA. Napier JA. Shewry PR. Mantell S. Ainsworth C. Isolation and characterisation of cDNA clones representing the genes encoding the major tuber storage protein (dioscorin) of yam (*Dioscorea cayenensis* Lam.). *Plant Molecular Biology*. 28(3):369-80, 1995

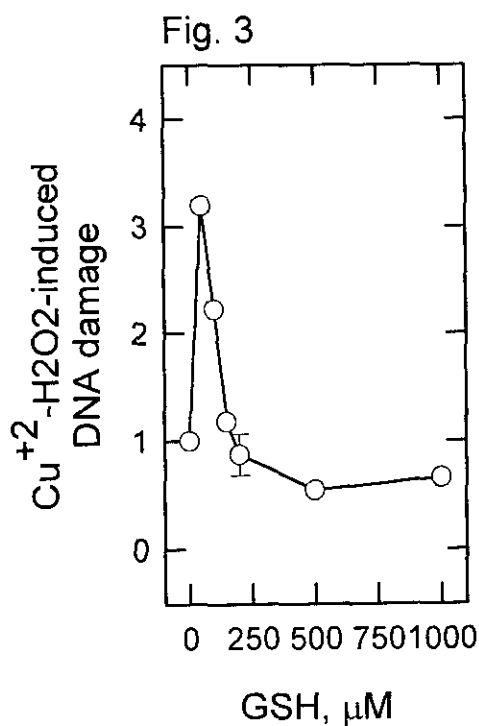
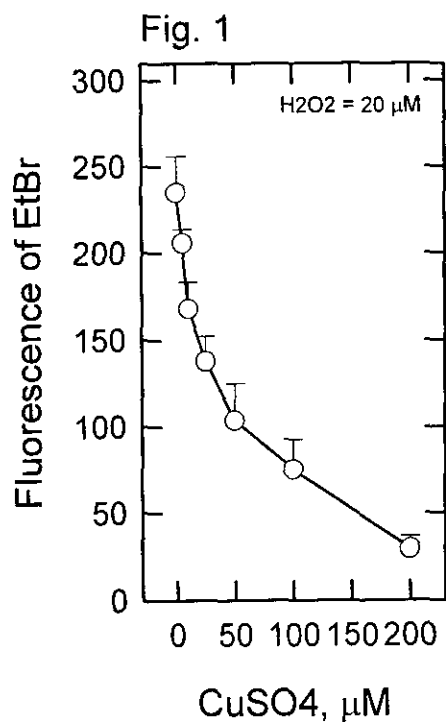
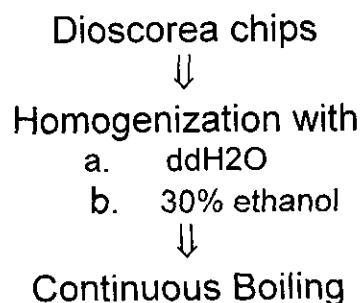


Fig. 4 Extract Preparation Protocol



- for 30 min or not
- ↓
- Centrifugation
5000 rpm 30 min x 2
- ↓
- Remove supernatant
- ↓
- Freeze-dry
1. Aqueous extracts, AE
 2. Aqueous boiled extract, ABE
 3. Ethanolic extracts, EE
 4. Ethanolic boiled extracts, EBE

Fig. 5

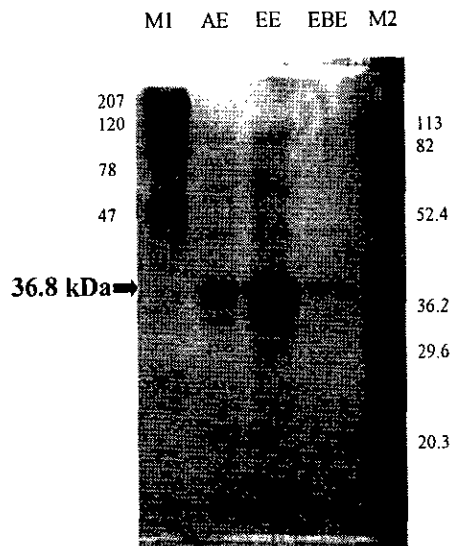


Fig. 6

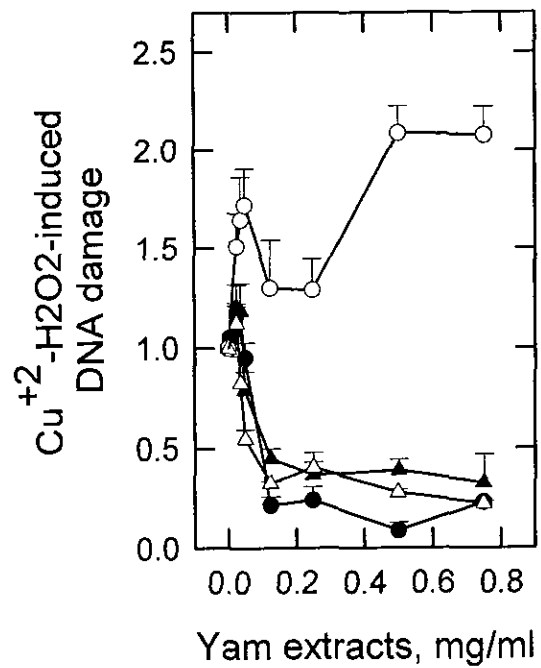
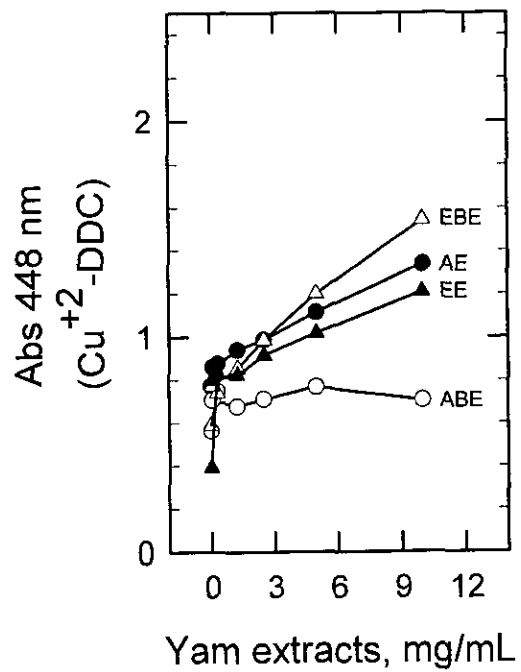


Fig. 7



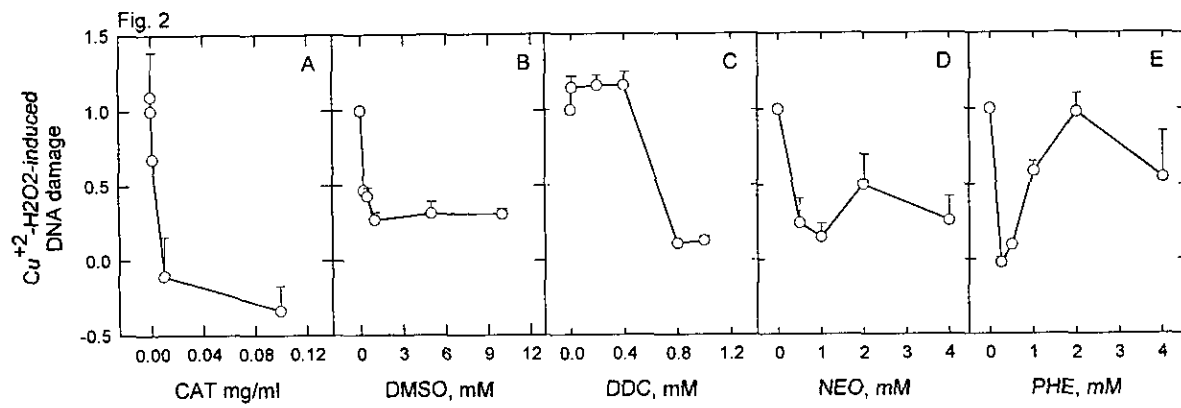


Fig. 8

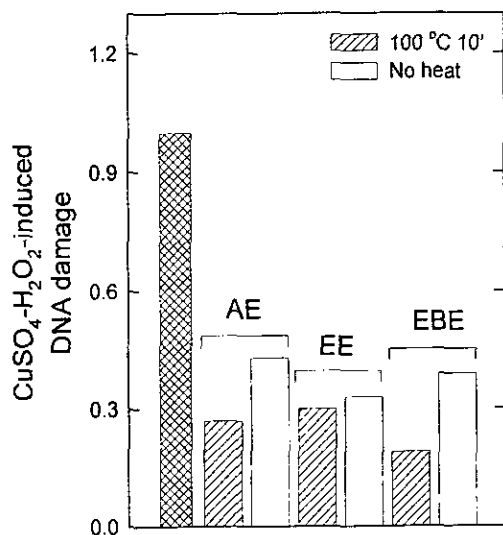


Fig. 9

