

## Abstract

Hua-Khao-Yen-Tai (*Dioscorea membranacea* Pierre) has mostly been used as ingredient in Thai traditional anticancer preparations. The rhizome of *D. membranacea* was found potently cytotoxic and possibly contributed to such a therapeutic effect. Bioassay-guided isolation was used for the discovery of a selective novel cytotoxic compound, dioscorealide B. In this study, we aimed to develop the extraction methods that gave extracts with high yield of a cytotoxic compound, dioscorealide B, and high cytotoxic activity against MCF-7, a human breast cancer cell line, and to determine stability of ethanolic extract under accelerated conditions. The extracts of *D. membranacea* were obtained by three extraction methods such as decoction, maceration and soxhlet extraction, using different solvents e.g. hexane, chloroform, methanol, ethanol and water. The results showed that the single solvent soxhlet extraction using chloroform exhibited the greatest performance in extracting dioscorealide B ( $591.05 \pm 20.26 \mu\text{g/g}$  dried plant) from *D. membranacea* in the shortest extraction period of 4 hours and produced high cytotoxic extract against MCF-7 ( $\text{IC}_{50} = 5.19 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$ ). Thus, it is the method of choice for extracting active ingredient, dioscorealide B from *D. membranacea*. The results of stability of dioscorealide B in ethanolic extract under accelerated condition at 45°C and 75% RH for 4 months exhibited that the remaining dioscorealide B was significantly decreased to  $64.28 \pm 2.42\%$  though the cytotoxicity against MCF-7 of the extract was not change. Heat-accelerated conditions at 60, 70, and 80°C with 75% RH for 1 month, also decreased the remaining dioscorealide B at the end of the exposure time to  $61.16 \pm 3.72\%$ ,  $42.72 \pm 0.92\%$  and  $22.97 \pm 2.35\%$ , respectively. Nevertheless, the cytotoxic activity against MCF-7 of all extracts obtained by all tested conditions remained the same.

## บทคัดย่อ

หัวข้าวเย็นใต้ชนิด *Dioscorea membranacea* Pierre เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหลักในตำรับยารักษาโรคมะเร็งตามการแพทย์แผนไทย จากงานวิจัยพบว่ารากของหัวข้าวเย็นมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและมีศักยภาพในการรักษามะเร็งได้ เมื่อแยกสารสำคัญในรากหัวข้าวเย็นด้วยวิธี Bioassay-guided isolation พบสารใหม่ที่ออกฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงคือ dioscorealide B ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญคือ dioscorealide B ออกมาจากรากหัวข้าวเย็นใต้ได้มากที่สุด และสารสกัดจากวิธีการใดที่จะแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ดีที่สุด รวมทั้งศึกษาความคงตัวของสารสกัดทั้งทางเคมีในเชิงปริมาณของ dioscorealide B และทางฤทธิ์ทางชีวภาพในเชิงการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดชั้นเอธานอลที่ได้จากวิธีการแช่หมักภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45°C และ 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน และภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงคือ 60°C 70 °c และ 80°C ที่ 75%RH เป็นเวลา 1 เดือน จากการสกัดสารที่ได้จากวิธีการต่างๆ ได้แก่ การสกัดด้วยวิธีต้มน้ำ (decoction) การแช่หมัก (maceration) และการสกัดต่อเนื่องด้วย soxhlet apparatus ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมธานอล และเอธานอล พบว่าการสกัดสารโดยวิธี soxhlet extraction ด้วยคลอโรฟอร์มสามารถสกัดสาร dioscorealide B จากรากหัวข้าวเย็นใต้ได้มากที่สุด (591.05 ± 20.26 µg จากพืชแห้ง 1 g) ในระยะเวลาสั้นที่สุดคือ 4 ชั่วโมง และสารสกัดที่ได้จากวิธีนี้สามารถแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ดี (IC<sub>50</sub> = 5.19 ± 0.79 µg/ml) และจากการทดสอบความคงตัวของสารสกัดชั้นเอธานอลพบว่าการเก็บสารสกัดไว้ภายใต้สภาวะ 45°C ที่ 75% RH เป็นเวลา 4 เดือน ทำให้ปริมาณสาร dioscorealide B คงเหลือ 64.28 ± 2.42% ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 สำหรับสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงคือ 60°C 70 °c และ 80°C ที่ 75%RH พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนมีปริมาณ dioscorealide B คงเหลือ 61.16 ± 3.72%, 42.72 ± 0.92% และ 22.97 ± 2.35% ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่าความสามารถในการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดชั้นเอธานอลเมื่อทดสอบในทุกๆ สภาวะยังคงสูงเท่าเดิม