

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ ระงับปวด และสมานแผลของตำรับทาสาร
สกัดมาตรฐานเปลือกผลทับทิมในสัตว์ทดลอง

(Studies on anti-inflammatory, analgesic and wound healing
activities of standardized *Punica granatum* fruit peel extract topical
formulation in experimental animals)

คณะนักวิจัย

รศ. ดร. วันทนา เจริญมงคล

รศ. ดร. ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์

รศ. นัฏฐา แก้วนพรัตน์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ PHA550382S

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อพัฒนาตำรับทาของสารสกัดมาตรฐานเปลือกผลทับทิม (SPRE) และ ประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบ ระงับปวด และสมานแผลของตำรับ SPRE กับกรดอิลลาจิก (EA) ที่ขนาดสมมูลกัน โดยทดลองแบบในกาย EA เป็นสารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ของ SPRE (ไม่น้อยกว่าร้อยละ 13) หาปริมาณ EA โดยใช้ HPLC ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการศึกษาความคงตัว การปลดปล่อยยาแบบนอกกาย และ penetration/retention ที่ผิวหนัง ตำรับ SPRE ขนาดร้อยละ 5 ซึ่งเตรียมด้วย polyethylene glycols จะมีความคงตัว และมี อัตราการปลดปล่อยคิดเป็น 36.6741 ± 5.0072 มก./ ตาราง ซม./ ชม. ซึ่งเข้าได้กับ โมเดลจลนศาสตร์อันดับศูนย์ retention ที่ผิวหนังของ EA คิดเป็น 2.22 ± 0.16 มก./ ตาราง ซม. โดยมี recovery ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 95.14 ± 5.51 แต่ตรวจไม่พบ EA จาก SPRE ที่ผ่านชั้นผิวหนังของหนูขาว

สำหรับการศึกษาแบบในกาย ได้ประเมินผลด้านการอักเสบของ SPRE ในรูปทาต่อโมเดลแบบ เตียบพลัน (phenol เหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่หูของหนูถีบจักร น้ำมันสลอดเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่หูของ หนูถีบจักร และ carrageenan เหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่อุ้งเท้าของหนูขาวใหญ่) และโมเดลแบบเรื้อรัง (complete Freund's adjuvant (CFA) เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของข้อ ได้ทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของ SPRE ในรูปทาในการทดสอบเพิ่มความไวต่อความเจ็บปวดด้วย punctuate mechanical ในหนูขาวใหญ่ และการ ทดสอบด้วย formalin ในหนูถีบจักร ได้ประเมินฤทธิ์สมานแผลของ SPRE ในโมเดลแผลที่ผิวหนังของหนู ขาวใหญ่: แผลแบบ incision แผลแบบ excision และแผลไฟไหม้ การศึกษาทั้งหมด จะทำการทดสอบ SPRE พร้อมกับสารประกอบ EA ซึ่งเป็นสารบ่งชี้

ในโมเดลผิวหนังอักเสบจากการสัมผัส โดยใช้ phenol เหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่หูของหนูถีบจักร ตำรับ SPRE (ร้อยละ 5, 2.5 และ 1) และตำรับ EA ที่ขนาดสมมูลกัน (ร้อยละ 0.65, 0.325 และ 0.13) มีฤทธิ์ลด การบวมที่หู ขึ้นกับขนาดที่ให้ โดยมีการยับยั้งสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 79.12 และ 73.63 ตามลำดับ ฤทธิ์ myeloperoxidase ลดลงเช่นกัน คิดเป็นร้อยละ 69.68 และ 68.79 ตามลำดับ SPRE (ร้อยละ 5, 2.5 และ 1) และ EA ที่ขนาดสมมูลกัน (ร้อยละ 0.65, 0.325 และ 0.13) มีฤทธิ์ลดการบวมที่หูของหนูถีบจักร ซึ่งเกิดจากการ เหนี่ยวนำด้วยน้ำมันสลอด ขึ้นกับขนาดที่ให้ โดยมีการยับยั้งสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 86.30 และ 80.82 ตามลำดับ SPRE บรรเทาการตอบสนองต่อการอักเสบในการทดสอบ carrageenan เหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่อุ้งเท้าของ หนูขาวใหญ่ และในการทดสอบ CFA เหนี่ยวนำให้เกิดข้ออักเสบ แต่ EA ในขนาดที่สมมูลกัน มีฤทธิ์เฉพาะที่ ขนาดร้อยละ 0.65 และ 0.325 เท่านั้น ทั้ง SPRE (ร้อยละ 5) และ EA (ร้อยละ 0.65) ในรูปทา มีฤทธิ์ระงับปวด ได้อย่างมีนัยสำคัญในการทดสอบการเพิ่มความไวต่อความเจ็บปวดด้วย punctuate mechanical ในหนูขาวใหญ่ และการทดสอบด้วย formalin ในหนูถีบจักร โมเดลสมานแผลแบบในกาย SPRE (ร้อยละ 5 และ 2.5) และ EA

II

ที่ขนาดสมมูลกัน (ร้อยละ 0.65 และ 0.325) สามารถเพิ่ม tensile strength ได้สูงสุด สำหรับแผลแบบ incision ที่ 10 วัน หลังจากทำให้เกิดแผล คิดเป็นร้อยละ 35.43 และ 31.82 ตามลำดับ SPRE ที่ขนาดร้อยละ 5 และ 2.5 ช่วยเพิ่มการสมานของแผลแบบ excision และแผลไฟไหม้ โดยทำให้เกิดการหดตัวของแผลเร็วขึ้น ขณะที่ EA มีฤทธิ์ทำให้แผลไฟไหม้ดีขึ้นเฉพาะที่ขนาดร้อยละ 0.65 เท่านั้น ประสิทธิภาพสูงสุดของการสมานแผลของ SPRE เนื่องมาจากการส่งเสริมการสังเคราะห์ collagen คิดเป็น 21.83 มก./ก. และผลด้านการอักเสบซึ่งมีหลักฐานจากการยับยั้ง myeloperoxidase EA ไม่มีผลต่อการเพิ่มการสะสมของ collagen และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่น้อยกว่า ซึ่งอาจทำให้มีประสิทธิผลด้านสมานแผลที่ต่ำกว่า

จากผลการทดลองบ่งชี้ว่าตำรับขี้ผึ้ง SPRE PEG ที่ขนาดร้อยละ 5 มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเป็นที่น่าพอใจ สำหรับการศึกษแบบในกาย SPRE มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและสมานแผลที่เหนือกว่า EA ตำรับทาของ SPRE อาจนำมาใช้รักษาผิวหนังอักเสบและช่วยการสมานของแผล

คำสำคัญ: ทับทิม ตำรับทา อักเสบ ปวด แผล

III

Abstract

The aim of the present study was to develop a stable topical formulation containing standardized pomegranate rind extracts (SPRE) and assess anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of SPRE formulation with that of its equivalent ellagic acid (EA) formulation *in vivo*. EA, the major active constituent of SPRE (not less than 13%) was quantified by HPLC as an indicator for studies on the stability, *in vitro* drug release, and skin penetration/retention. The formulation prepared with polyethylene glycols containing 5% SPRE has been found to be stable and provide a release rate of $36.6741 \pm 5.0072 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ that was best fitted to the zero-order kinetic model. The skin retention of EA in the skin was $2.22 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ with a total recovery of $95.14 \pm 5.51\%$, but EA from SPRE was not detected to penetrate the full-thickness rat skin.

For *in vivo* studies, topical anti-inflammatory effects of SPRE were evaluated against acute models (phenol-induced mouse ear edema, croton oil-induced mouse ear edema and carrageenan-induced rat paw edema) and chronic model (complete Freund's adjuvant (CFA)-induced polyarthritis). The topical analgesic activities of SPRE were investigated in the rat punctuate mechanical hyperalgesia test and in the mouse formalin test. The wound healing activities of SFPE were assessed in three rat models of dermal wounds: incision, excision, and burn wound. All studies of SPRE were carried out in parallel with its marker compound EA.

In the phenol-induced mouse ear edema model of contact dermatitis, SPRE formulations (5%, 2.5% and 1%) and their equivalent EA formulations (0.65%, 0.325% and 0.13%) dose-dependently reduced ear edema with maximal inhibition of 79.12% and 73.63%, respectively. Myeloperoxidase activity was also decreased by up to 69.68% and 68.79%, respectively. SPRE (5%, 2.5%, and 1%) and the equivalent EA (0.65%, 0.325%, and 0.13%) dose-dependently reduced the croton oil-induced mouse ear edema with a maximal inhibition of 86.30% and 80.82%, respectively. SPRE dose-dependently attenuated the inflammatory responses in the carrageenan-induced rat paw edema and in the CFA-induced polyarthritis but the equivalent EA were effective only at the doses of 0.65% and 0.325%. Both SPRE (5%) and EA (0.65%) showed significant topical analgesic activities in the rat punctuate mechanical hyperalgesia test and in the

IV

mouse formalin test. *In vivo* wound healing models, SPRE (5% and 2.5%) and its equivalent EA (0.65% and 0.325%) increased the tensile strength of the incision wound at 10 days post-wounding maximally by 35.43% and 31.82%, respectively. SPRE at 5% and 2.5% helped the healing of excision wound and burn wound by expediting wound contraction, while EA was effective only at 0.65% in improving the burn wound. The healing efficacy of SPRE was attributable to its enhancement of collagen synthesis by 21.83 mg/g maximally and its anti-inflammatory effect as evidenced by inhibition on myeloperoxidase. EA had no effect on increasing collagen accumulation and was milder in the anti-inflammatory action, probably explaining its lower healing efficacy.

The results indicated that this 5% SPRE PEG ointment was of satisfactory physicochemical properties. For *in vivo* studies, SPRE was more active as an anti-inflammatory and wound healing agent than EA. SPRE topical formulation is a promising phytopharmaceutical effective in the treatment of inflammatory skin disorders and facilitating the healing of wounds.

Key words: *Punica granatum*; topical formulation; inflammation; pain; wound