SUT 1-104-50-12-55

รายงานการวิจัย

ทับทิม *(Punica granatum)* ไทยเพื่อสุขภาพ

Thai Pomegranate *(Punica granatum)* for Health

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT 1-104-50-12-55

รายงานการวิจัย

ทับทิม *(Punica granatum)* ไทยเพื่อสุขภาพ

Thai Pomegranate *(Punica granatum)* for Health

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์. ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์. ดร. กนกอร อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รองศาสตราจารย์. ดร. ศจีรา คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี ปีงบประมาณ 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2555

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี และคุณสมบัติของสารสกัดและน้ำทับทิม (*Punica granatum* L) ไทยซึ่งเพาะปลูกในจังหวัดนครราชสีมา และเพื่อแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ที่จะได้จากการใช้ทับทิมเป็นเครื่องดื่มประเภทผลไม้ และการนำเปลือกผลทับทิมไปใช้ประโยชน์ เพื่อสุขภาพในการป้องกันและรักษามะเร็งของคน

การทดลองประกอบด้วย

1) ศึกษาวัดปริมาณของพฤกษเคมี คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ สารเวโฟนอยส์ ในสารสกัดเปลือกผล สารสกัดเมล็ด และ น้ำทับทิม
2) วิเคราะห์คุณสมบัติต้านอนุมูลของสารสกัดเปลือกผล สารสกัดเมล็ด และน้ำทับทิม
3) ศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ และการยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งจากคนโดยสารสกัดเปลือกผล สารสกัดเมล็ด และน้ำทับทิม
4) ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการป้องกันแสงอุลตราไวโอเลท บี (Ultraviolet B) บนหนังหนูแรท

สารพฤกษเคมีในผลิตภัณฑ์ทับทิมไทย

ผลิตภัณฑ์ผลทับทิมมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก และมากกว่าสารเฟลโวนอยส์ สารทั้งสองชนิดนี้มีในสารสกัดเปลือกทับทิมมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเมล็ด และน้ำทับทิม

คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น

ผลทับทิมมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลสูงมากเทียบได้กับสารต้านอนุมูลมาตรฐานที่บริสุทธิ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอลมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ พลังรีดิวส์อนุมูลเหล็ก และ ยับยั้ง การสลายไขมันได้สูงมาก รองลงมาคือสารสกัดเมล็ด ส่วนน้ำทับทิมมีประสิทธิภาพน้อยที่สุด ประสิทธิภาพต้านอนุมูลเหล่านี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารเฟลโวนอยส์

ความเป็นพิษของทับทิมระดับเซลล์และการยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์สายพันธ์มะเร็ง

ผลิตภัณฑ์ทับทิมไม่มีความเป็นพิษระดับเซลล์ต่อกุ้งฝอยมีชีวิต และสามารถยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเต้านมของคน

อิทธิพลของสารสกัดทับทิมต่อผิวหนังหนูแรทที่ฉายด้วยรังสีอั ลตราไวโอเลท

สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้น 8 mg/cm^2 ทาบนผิวหนังหนูบริเวณที่ไม่มีขนก่อนการฉายรังสี UVB ที่ 3xMED (minimal erythema dose = 0.07-0.08 J/cm^2) 24 ชั่วโมง สัปดาห์ละ 2 ครั้ง นาน 3 เดือน สามารถลดอาการบวมแดง (erythema) ลดอาการบวมแดง ของผิวหนัง (erythema) ได้ 2.5 เท่า ลดความหนาของผิวหนังได้ 1.7 เท่า ลด sunburn cells ได้ 7.4 เท่าเทียบกับตัวควบคุม และป้องกันการแตกหักของ DNA ในเซลล์ผิวหนังที่ได้รับรังสี UVB

สรุปได้ว่าทับทิมไทยมีพฤกษเคมีปริมาณมาก มีศักยภาพในการต้านอนุมูล แต่ไม่มีพิษเซลล์สิ่งมีชีวิตปกติ มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญ เพิ่มจำนวนเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง เปลือกทับทิมมีศักยภาพต้านรังสีอัลตราไวโอเลท บี ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งชนิดหนึ่ง ดังนั้นทับทิมไทยจึงมี ศักยภาพสูงในการพัฒนาทางเภสัชวิทยาเพื่อเป็นยาในการักษาและอาหารสำหรับสุขภาพและป้องกันการเกิดมะเร็งในคน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The purposes of this research were to study for determination of the phytochemical quantity and the properties of the extracts and juice of Thai pomegranate *Punica granatum* L. fruit, grown in Nakhon Ratchasima. The research demonstrated the benefit of pomegranate as fruit drink, and the use of pomegranate peel for human health and cancer prevention. The studies were performed as followings.

1) Measuring phytochemicals which were total phenolic compounds and flavonoids content in the pomegranate extracts and juice.
2) Analyzing antioxidant activities of pomegranate peel and seed extracts and juice.
3) Studying cytotoxicity and antiproliferation of a human cancer cell line.
4) Studying protective effect of pomegranate on UVB-irradiated rat skin.

Phytochemicals in Thai pomegranate products

Pomegranate products contained high total phenolic compounds, which was higher than flavonoids. Both total phenolic compounds and flavonoids were highest in pomegranate peel extracts, followed by seed extracts and juice.

Antioxidant activity

Pomegranate fruits possessed high antioxidant activities, comparable to those of pure antioxidant standards. Pomeganate peel extracts, especially, showed the highest activities of free radical scavenging ($DPPH^{\bullet}$), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and lipid peroxidation inhibition/ferric thiocyanate (FTC); followed by seed extracts. The least antioxidant activities were of pomegranate juice. These antioxidant activities of pomegranate products were well correlated with the amount of total phenolic compounds and flavonoids content.

Cytotoxicity and antiproliferation of pomegranate products

Pomegranate products did not show cytotoxicity to brine shrimps, representing the normal animal and were able to inhibit the proliferation of MCF-7 cells, a human breast cancer cell line.

Effect of pomegranate on UV-irradiated rat skin

Pomegranate peel ethanolic extract at 8 mg/cm2, topically pretreated on hairless rat skin before irradiation with UVB at 3xMed (minimal dose, 0.07-0.08 J/cm2) for 24 h, twice a week, 3 months was able to reduce skin erythema 2.5 fold, skin thickness 1.7 fold, epidermal sunburn cells 7.4 fold of control. It also prevented DNA fragmentation of UVB-irradiated epidermal cells.

It was concluded that Thai pomegranate products containing high phytochemicals were very potent in antioxidant activities without cytotoxicity to normal living animals, with antiproliferation property against cancer cell line(s). The pomegranate peel was also potent against UVB which one of carsionogens. The Thai pomegranate, thus, has high potential for pharmacological and therapeutic development and is as nutraceupticals for human health and cancer prevention.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 4
1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ 5
เอกสารอ้างอิง 6

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
2.1 คำนำ 7
2.2 อนุกรมวิธานของทับทิม 8
2.3 สารต้านอ็อกซิเดชั่นในทับทิม 9
2.4 เอสโตรเจนในทับทิม 11
2.5 ฤทธิ์ต้านรังสีอัลตราไวโอเลทของทับทิม 12
เอกสารอ้างอิง 12

3 พฤกษาเคมี ฤทธิ์ต้านอ็อกซิเดชั่น และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต 15
3.1 คำนำ 15
3.2 วัตถุประสงค์ 16
3.3 อุปกรณ์และวิธีการ 16
3.3.1 สารเคมี 16
3.3.2 การเตรียมสารสกัด 16
3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารเฟลโวนอยส์	17
	3.3.5 การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ	17
	3.3.6 การวิเคราะห์พลังรีดิวส์ต้านอนุมูลเหล็ก	18
	3.3.7 การวิเคราะห์การยับยั้งการสลายไขมัน	18
	3.3.8 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย Brine shrimp lethality assay	19
	3.3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7	19
	3.3.10 การวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์	20
	3.3.11 การวิเคราะห์สถิติ	20
	3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์	20
	3.4.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและเฟลโวนอยส์ในทับทิม	20
	3.4.2 การต้านอนุมูล (Antioxidant activity) ของผลิตภัณฑ์ทับทิม	22
	3.4.3 ความเป็นพิษระดับเซลล์ (cytotoxicity) ของทับทิม	29
	3.4.4 โปร์ไฟล์ทางพิษวิทยาเพื่อการพัฒนาเภสัชวิทยาและการรักษา	33
	3.5 สรุปผลการทดลอง	44
	เอกสารอ้างอิง	45
4	อิทธิพลของสารสกัดทับทิมต่อผิวหนังหนูแรทที่ฉายด้วยรังอัลตราไวโอเลท บี	51
5	สรุปผลการทดลอง	61
	5.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ เฟลโวนอยส์	61
	5.2 การต้านอนุมูล และความสัมพันธ์กับสารพฤกษเคมีของผลิตภัณฑ์ทับทิม	61
	5.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของทับทิม	61
	5.4 โปร์ไฟล์ทางพิษวิทยาเพื่อการพัฒนาเภสัชวิทยาและการรักษา	62
	5.5 อิทธิพลของสารสกัดทับทิมต่อผิวหนังหนูแรทที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท บี	62
ประวัติผู้วิจัย		64

สารบัญตาราง

ตารางที่			หน้า
3.1	Total phenolics compounds and flavonoids content of ethanolic and water extracts of pomegranate peel (PPE/e, PPE/w) and seeds (PSE/e, PSE/w) and juice (PJ). Data expressed as mean ± SE, n = 4.	……	21
3.2	Scavenging activity of DPPH radicals by pomegranate peel and seed extracts, and juice. Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.	……	23
3.3	Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of pomegranate extracts and juice. Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.	……	25
3.4	Lipid peroxidation inhibition by FTC of pomegranate extracts and juice. Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.	……	27
3.5	Cytotoxicity of the extracts of pomegranate peel and seeds, and juice as assayed by brine shrimp lethality (BSLA)	……	30
3.6	Antiproliferation effect of pomegranate peel extracts on MCF-7 cells, assayed by MTT	……	31
5.1	Summary of phytochemicals, antioxidant activities and cytotoxicity of pomegranate *Punica granatum* fruit products. Data were mean ± SE, n = 4, $p < 0.05$	……	63

สารบัญภาพ

ภาพที่			หน้า
2.1	Pomegranate tree, A and fruits and seeds, B	.....	7
2.2	Phenolics compounds found in 100% pomegranate juice.	.....	9
2.3	Comparison of antioxidant potency among various fruit juice.	.....	10
3.1	The two-chamber container with a perforate divider and light. The smaller chamber was for brine shrimp egg hatching. The larger chamber was for the nauplii, migrated toward the light.	……..	19
3.2	Relationships between the efficacy of scavenging of DPPH radicals, IC_{50}, by pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).	.....	24
3.3	Relationships between ferric reducing antioxidant power (FRAP), IC_{50}, of pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).	.....	26
3.4	Relationships between lipid peroxidation inhibition (FCT), IC_{50}, of pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).	.....	28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารเคมีจากพืช หรือ พฤกษเคมี หรือ Phytochemicals เป็นคำศัพท์ใหม่ที่มีอิทธิพลต่ออาหารที่เปี่ยมด้วยคุณค่าทางโภชนาการแม้ไม่ใช่สารโภชนาการที่จำเป็นต่อชีวิต (non-nutritive plant chemicals) ที่พืชใช้ในการป้องกันพืชเองรวมทั้งมนุษย์ พฤกษเคมีที่รู้แล้วกว่าพันชนิด เช่น flavonoids, flavones, isoflavones, catechins, anthocyanidins, isothiocyanates, carotenoids, allyl sulfides, และ polyphenols เป็นต้น มีการผลิตพฤกษเคมีเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจากธรรมชาติและในประเด็นใหม่เชิงวิทยาศาสตร์ phytochemicals ได้เพิ่มความรู้ของสารเคมีจากพืชอาหารเป็นสารป้องกันโรค เรียกว่า Nutraceutical ซึ่งหมายถึง สุขภาพร่างกายที่แข็งแรงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอาหาร ดังเช่นบรรพบุรุษของคนเราและกลุ่มชนที่อาศัยในชนบทห่างไกลจะมีอายุยืนยาวเป็นพิเศษและปราศจากโรคสมัยใหม่บางอย่างเช่น มะเร็ง โรคหัวใจ เป็นต้น (Nebeling, 2002; Caribbean Food and Nutrition Institute, 2005)

พฤกษเคมี เป็นสารอินทรีย์เคมีหลายกลุ่ม คือ phenolic compounds, terpenes, betalains, organosulfides, indole glucosinolates/sulfur compounds protein inhibitors แ ละ organic acids อื่น พบมีในทุกส่วนของพืชจากพืชผักและผลไม้ จาก ใบ ดอก เปลือกผล และเมล็ด เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติอ็อกซิแดนซ์โดยธรรมชาติ (Natural antioxidants) เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และ วิตามินอี เป็นต้น แอนติอ็อกซิแดนซ์ (antioxidants) เป็นสารพลอยได้ของพืชที่ช่วยป้องกันพืชจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) ซึ่งเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีพลังรบกวนการทำงานปกติของเซลล์ อนุมูลอิสระในสิ่งแวดล้อมของสังคมสมัยใหม่มีบทบาทสำคัญเพิ่มและมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งพบมีอยู่ในรูปของมลพิษ ส าร เสริมในอาหาร สารกำจัดศัตรูพืช สารกำจัดวัชพืช ควันบุหรี่ ฯลฯ เป็นต้น อนุมูลอิสระสามารถทำความเสียหายให้แก่เซลล์ จนถึงส่วนประกอบภายในของเซลล์ เช่น RNA/DNA ที่สามารถนำสู่การเกิดมะเร็งได้ อนุมูลอิสระสามารถเปลี่ยน cholesterol ในกระบวนการ oxidation ในหลอดเลือด ซึ่งจะช่วยเร่งให้หลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ชนิด arteriosclerosis อันเป็นปัญหาหนึ่งของโรคหัวใจ สารเคมีจากพืชหลายชนิดนอกจากเป็นแอนติอ็อกซิแดนซ์ช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจแล้ว ยังช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง หรือยับยั้งพัฒนาการของมะเร็ง ลดอาการบวม ป้องกั นการแข็งตัวของเลือด เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อรา (Nebeling, 2002; “phytochemicals”, n.d.) ในทำนองเดียวกันสารเคมี

จากพืชบางชนิดอาจให้ผลต่อการส่งเสริมให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน การศึกษาวิจัยถึงองค์ความรู้คุณสมบัติด้านดีและไม่ดีของสารเคมีจากพืชและต่อสิ่งมีชีวิตในระดับเซลล์และตัวสัตว์จึงสำคัญและจำเป็น และยังสามารถประยุกต์ให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริม ป้องกัน และรักษาพยาธิสภาพของคนได้อีกด้วย

สารเคมีบางชนิดจากพืชผักและผลไม้หลายชนิดมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Phytoestrogen) (Nebeling, 2002; Caribbean Food and Nutrition Institute, 2005) โดยสามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen receptor) ภายในเซลล์ และแสดงอิทธิพลคล้ายฤทธิ์ของฮอร์โมน estrogen ที่คนผลิตได้เองในร่างกาย แต่มีศักยภาพต่ำกว่า หรืออาจเป็นสารยับยั้งฤทธิ์ของฮอร์โมน estrogen ก็ได้ estrogen เป็นประโยชน์ป้องกันกระดูกพุกร่อน โรคหัวใจและมะเร็งบางชนิด เช่นยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้นการใช้ประโยชน์จาก Phytoestrogen จำเป็นต้องวิจัยทดลองหาข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และหาขนาดปริมาณที่พอเหมาะเพื่อการใช้จึงจะบังเกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้บริโภค

ทับทิม (Pomegranate: *Punica granatum*) เป็นพืชอาหารดั้งเดิมของเอเชียและตะวันออกกลาง รวมทั้งประเทศไทย ทับทิมเป็นพืชที่ใช้ในพิธีกรรมด้วยเหตุผลความเชื่อถือและใช้เพื่อสุขภาพ น้ำทับทิมก็เช่นเดียวกับอาหารผลไม้อีกหลายชนิด คือ มีสาร Phytochemicals ที่มีคุณสมบัติแอนติอ็อกซิแดนซ์ และ Phytoestrogenic (Khorsandi and Yazdi, 2006) โดยธรรมชาติซึ่งอาจมีหรือไม่มีผลข้างเคียง การศึกษาในประเทศอิสราเอลพบว่าคนบริโภคน้ำทับทิมสามารถลดไขมันชนิด LDL ป้องกัน HDL peroxidation ลดขนาด atherosclerotic lesions และ foam cells (Aviram, 2000) ทับทิมไทยยังไม่เป็นที่นิยมบริโภคมากนักในหมู่ประชากรของประเทศไทยทั้งที่มีปลูกทั่วไปทุกภูมิภาค อาจเป็นเพราะลักษณะของผลที่ไม่สะดวกต่อการบริโภค แต่การทำเป็นผลิตภัณฑ์น้ำทับทิมกำลังได้รับความนิยมใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพเพิ่มมากขึ้น แม้ยั งไม่แพร่หลายมากนักในประเทศ เพราะมีราคาค่อนข้างสูงมาก แ ละการจำหน่ายอยู่ในลักษณะขายตรง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายยังไม่มีข้อมูลการศึกษาวิเคราะห์เชิงวิทยาศาสตร์ถึงคุณสมบัติทางชีวภาพสนับสนุนให้คนไทยรู้มากนัก เพียงแต่อ้างถึงผลของการบริโภคโดยรวม และการใช้ประโยชน์รักษาอาการท้องร่วงและแผลพุพองโดยภูมิปัญญาพื้นบ้านเป็นหลักฐานประกอบหลักเท่านั้น

การตรวจสอบสารจากทับทิมทางวิทยาศาสตร์ถึงคุณสมบัติด้านชีวภาพต่อสุขภาพเพื่อประโยชน์สูงสุดต่อการบริโภค ส่งเสริมการปลูก การผลิตให้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเสริมสุขภาพในเชิงพาณิชย์จำหน่ายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ และเพื่อให้ได้ข้อมูลวิทยาศาสตร์สนับสนุนภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทยในการใช้ทับทิมไทย และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ได้ต่อไปจึงมีความสำคัญ

ทับทิมไทยน่าจะมีสาร phytochemical ทั้งปริมาณมากและคุณภาพดีในการเป็นสารต้าน oxidation ต้าน reactive oxygen stress ลดไขมันในหลอดเลือด และเป็นสัญญาณในกลไกที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ และต่อสุขภาพของผู้บริโภค สามารถรักษาหรือป้องกันโรคหัวใจ เชื้อโรค และโรคมะเร็ง ป้องกันรังสี UV-B ได้ นอกจากนี้สารจากทับทิมไทยคาดว่าน่าจะมีคุณ สมบัติ estrogenic ที่สามารถนำมาใช้ทดแทน estrogen จากสัตว์ได้โดยไม่มีอาการข้างเคียง คุณสมบัติเหล่านี้ของทับทิมไทยคาดว่าจะนำสู่การพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณค่าด้านสุขภาพและการแพทย์

ดังนั้นการวิจัยทับทิมที่เพาะปลูกในประเทศไทยโครงการนี้ จะทำให้ได้ค วามรู้และข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ที่จะช่วยส่งเสริมให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ทับทิมไทยเพื่อสุขภาพและพาณิชย์ในประเทศไทยและต่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อทราบส่วนประกอบทางเคมีโดยรวมของทับทิมส่วนต่างๆ

1.2.2 เพื่อทราบคุณสมบัติแอนติอ็อกซิแดนซ์ คุณสมบัติความเป็นพิษ

1.2.3 เพื่อทราบคุณสมบัติและปัจจัยต่อการเจริญของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยกำหนดขอบเขตไว้ดังนี้

1.3.1 ศึกษาทับทิมในส่วนเปลือกของผล (peel/rind) ผล (aril) และเมล็ด (seeds)

1.3.2 ศึกษาส่วนเปลือกผลและเมล็ดในรูปของสารสกัดด้วยน้ำและ/หรือแอลกอฮอร์ Ethanol/Methanol ส่วนเนื้อของผลทับทิมจะศึกษาในรูปของน้ำทับทิมโดยตรง

1.3.3 วิเคราะห์หา ส่วนประกอบทางเคมีและปริมาณ Phytochemicals ได้แก่ phenolics content และ flavonoids content

1.3.4 วิเคราะห์หาคุณสมบัติ Antioxidant activity โดย *in vitro*

1.3.5 วิเคราะห์หาคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ Cytotoxicity

1.3.6 ศึกษาต้านฤทธิ์ของรังสีอัลตราไวโอเรทบี (UVB) ต่อผิวหนังโดยใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ

1.3.7 ศึกษาคุณสมบัติต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์สายพันธุ์

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1.4.1 ศึกษาส่วนประกอบและคุณสมบัติ Antioxidant activity และ Cytotoxicity ของสารสกัดทับทิม

- การเตรียมสารสกัด (crude extract) จากทับทิม
  - เก็บตัวอย่างเปลือกผล และ เมล็ดทับทิม และบดแห้ง เก็บสต็อกพืชบดและน้ำทับทิมที่อุณหภูมิ -20^0C
  - สกัดแยกส่วนเปลือกผล และ เมล็ด ด้วย น้ำ และ 70% ethanol หรือ สารทำละลายอื่นที่เหมาะสม ด้วย Soxhlet extraction apparatus ที่อุณหภูมิ 60^oC ระเหยสารสกัดใน Evaporator และทำแห้งใน Lyophilizer เก็บสารสกัดแห้งที่ -20^0C เพื่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป
- การวิเคราะห์หาปริมาณส่วนประกอบทางชีวเคมีของสารจากทับทิม
  - วิเคราะห์ปริมาณ Phenolic content โดยวิธี Follin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999)
  - วิเคราะห์ปริมาณ Flavonoid content โดยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric method (Jia, Tang, and Wu, 1999)
- การวิเคราะห์คุณสมบัติ Antioxidant Activity ของสารจากทับทิม
  - วิเคราะห์ Antioxidant activity โดย *In Vitro* assay

  (1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) colorimetric method (Veeru, Kishor, and Meenakshi, M., 2009)

  (2) Linoleic acid oxidation โดย FTC (Ferric thiocyanate) method (Gülçın, Oktay, Kırecci, and Küfrevıoglu, 2003)
- การวิเคราะห์หาคุณสมบัติ Cytotoxicity
  - โดยวิธี Brine shrimp lethality assay (BSLA) (Meyer et al., 1982) โดยเพาะกุ้งฝอยในน้ำทะเลเทียม
- ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอิทธิพลของ Ultraviolet radiation B ต่อเซลล์ผิวหนังของหนูแรท
  - โกนขนของส่วนหลังหนู ทาสารจากทับทิมและน้ำทับทิม ฉายรังสี UVB เปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสาร
- วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อการเจริญของเซลล์สายพันธุ์ด้วยวิธี MTS-based titer non-radioactive cell proliferation assay (Lui et al., 2002)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้องศ์ความรู้เป็นหลักฐานเชิงวิทยาศาสตร์ของสารประกอบจากทับทิมที่สามารถนำสู่การวิจัยต่อไปในการแยกและวิเคราะห์หาสาร active compounds ที่บริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์จำเพาะต่อสุขภาพ ฆ่าเชื้อโรคจุลินทรีย์ และ การผลิตยาในอนาคต

1.5.2 ผลการวิจัยสามารถพัฒนาสารจากทับทิมให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพเชิงพาณิชย์ และพัฒนาเป็นยาป้องกันและรักษาโรคและมะเร็งได้

1.5.3 สร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ทับทิม ส่งเสริมการบริโภคในประเทศ การเพาะปลูกและสร้างรายได้ให้เกษตรกร

1.5.4 ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ในรูปของนักศึกษาบัณฑิตศึกษาได้อย่างน้อย 1 คน

1.5.5 ได้ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M. et al. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. Am J Clin Nutr. 71:1062–76.

Caribbean Food and Nutrition Institute. (2005). Phytochemicals. nyam news. Nos 1&2: pp4, ISSN 0255-8203.

Gulcın, I., Oktay, M., Kırecci, E., and Kufrevıoglu, O.I. (2003). A screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anise* L.) seed extracts. Food Chem. 83: 371-382.

Jia, Z. Tang, M., and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555-559.

Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y. , Brown, J., and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferation activities of raspberries. J. Agric. Food Chem 50: 2926-2930.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45: 31-34.

Nebeling, L. (2002). Phytochemicals: The Color of a Healthy Diet. Pediatric Basics. 98: 1-10.

Phytochemicals. Available online at http://www.phytochemicals.info

Khorsandi, F. and F.A. Yazdi, 2006. Enhancement of phytoestrogen content of pomegranate seeds by zinc fertilization. *Int. J. Agric. Biol.,* 11: 787–790. ISSN Print: 1560–8530; ISSN Online: 1814–959609–193/MUH/2009/11–6–787–790. Available online at http://www.fspublishers.org

Singleton, V. L. Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu. Methods Enzymol. 299: 152-178.

Veeru, P., Kishor, M.P, and Meenakshi, M. (2009). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(8), pp. 608-612. Available online at http://www.academicjournals.org/JMPR.

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำนำ

ทับทิม pomegranate, *Punica granatum* L. เป็นพืชเก่าแก่ คาดว่าประมาณ 3500-2000 BC ในตำนานกรีกโบราณถือเป็นผลไม้แห่งชีวิตจากสวนสวรรค์ ใช้เป็นสัญ ลักษณ์ของความสามารถในการสืบพันธุ์ (fertility) และการเกิดใหม่ (rebirth) และเป็นสัญลักษณ์ของความศิวิไลซ์ของมนุษย์ (human civilization) ทับทิมเป็นพืชถิ่นดั้งเดิมในแถบเปอร์เซีย และหิมาลายัน มีการเพาะปลูกทับทิมมากในอิหร่านและอิรัก ยุโรปใต้ที่มีอากาศแบบเมดิเตอเรเนียน (Mediterranean) และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia) อัฟริกาเขตศูนย์สูตร และบางรัฐในสหรัฐอเมริกา ทับทิมมีหลายสายพันธุ์ ทับทิมเป็นไม้พุ่มถึงไม้ขนาดใหญ่ สูงถึง 5 เมตร เปลือกของต้นสีน้ำตาล กิ่งเจริญใหม่สีแดง ใบขนาดเล็กเรียว มัน ยาว 3-7 เซนติเมตร กว้าง 2 เซ็นติเมตร ใบเรียงแบบตรงกันข้าม (opposite) เขียวตลอดปี ดอกขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-12 เซ็นติเมตร สีแดงอมส้ม ผลขนาดใหญ่มีมงกุฎ (crowned) ผลมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีน้ำบรรจุในถุง (sac) (Figure 2.1)

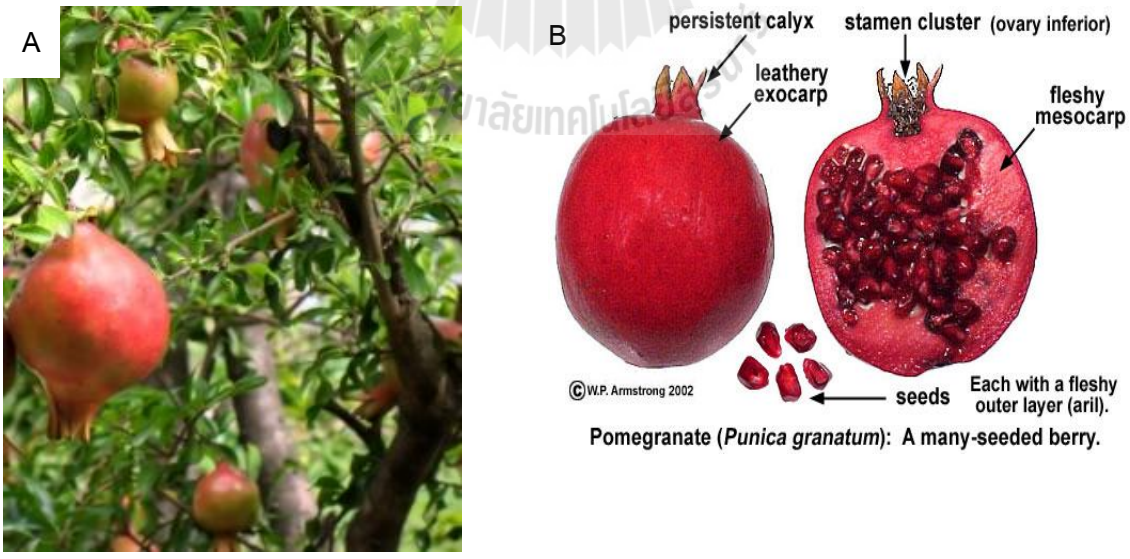

Figure 2.1 Pomegranate tree, A and fruits and seeds, B

ทับทิมใช้ในการแพทย์พื้นบ้านของไทย ทุกส่วนของทับทิมมีสรรพคุณในการรักษาอาการและโรคบางโรค เช่น ใช้ใบทำน้ำยาอมกลั้วคอ และยาล้างตา ใช้ดอกห้ามเลือด ใช้เปลือกและผลแห้งเป็นยาแก้ท้องร่วง ท้องเดิน แก้บิด และ แก้โรคลักกะปิดลักกะเปิด ใช้เปลือกต้นและเปลือกรากเป็นยาขับพยาธิตัวตืด และพยาธิตัวกลมและใช้เมล็ดแก้โรคลักกะปิดลักกะเปิด (http://www.rspg.or.th) ฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ชะล้างแผลพุพอง ต้านการหดตัวของกล้ามเนื้อ และพบมีฤทธิ์เป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงมาก มีพิษต่อตับ ก่อกลายพันธุ์ (http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/punica.html) นอกนั้นเป็นการใช้ตามความเชื่อถือด้านความเป็นศิริมงคล

2.2 อนุกรมวิธานของทับทิม

ทับทิมเป็นพืชดอกในสกุล Punicaceae มีลำดับขั้นอนุกรมวิธานดังนี้

Pomegranate Taxonomic Hierarchy (http://www.itis.gov)

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Viridaeplantae
Infrakingdom	Streptophyta
Division	Tracheophyta
Subdivision	Spermatophytina
Infradivision	Angiospermae
Class	Magnoliopsida
Superorder	Rosanae
Order	Myrtales
Family	Punicaceae
Genus	Punica L.
Species	Punica granatum L.

2.3 สารต้านออกซิเดชั่น (Antioxidants) ในทับทิม

พฤกษเคมี คือสารเคมีจากพืช ซึ่งพืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อป้องกันพืชเองและผู้บริโภค นักวิจัยคาดว่ามีสารพฤกษเคมีประมาณ 40,000 ชนิด ส่วน การวิจัยทับทิมเชิงวิทยาศาสตร์ได้รับความสนใจศึกษามานานตั้งแต่ปลายทศวรรษที่ 1990 และเมื่อไม่นานมานี้ ทับทิมถูกขนาน นามเป็นอาหารซูบเปอร์ "superfood" เนื่องจากพบมีสารพฤกษเคมีหลายชนิด (Figure 2.2) เช่น antioxidant polyphenols,nNatural phytoestrogens, ascorbic, citric, fumaric and malic acids, essential amino acids, vitamins B & C (phytochemicals) ในเปลือกพบมี punicotannic acid, gallic acid , mannite, pelletierine and N-methylisopelletierine และน้ำทับทิมมี ellagitannins, pelargonidin, punicalin, punicalagin, anthocyanins, cyanidin, ellagic acid และ สารเคมีส่วนมากพบในเปลือกของผลทับทิม (Seeram, Lee and Heber, 2004; http://www.phytochemicals.info) สารเคมีเหล่านี้มีประโยชน์รักษาได้หลายอาการ

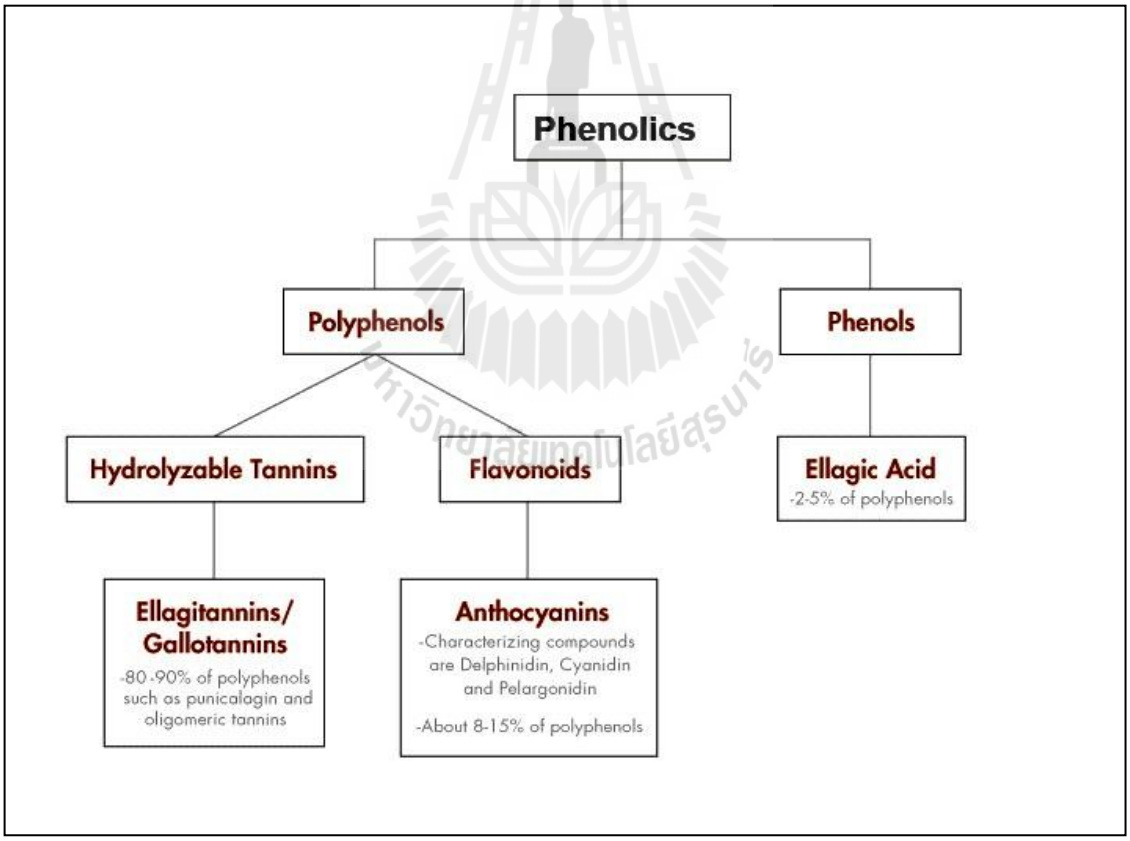

Figure 2.2 Phenolics compounds found in 100% pomegranate juice.

Source: http://www.pomwonderful.com/health/glossary/

สารต้านออกซิเดชั่นเป็นสารที่เกิดโดยธรรมชาติในพืชที่ใช้ป้องกันพืชจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียรที่ปฏิกิริยาสูง รบกวนการทำงานของเซลล์ อนุมูลอิสระมีมากมายจากมลพิษ สารเสริมอาหาร (additives) สารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) สารกำจัดแมลง (insecticides) ควันบุหรี่ ฯลฯ อนุมูลอิสระทำลายส่วนประกอบของเซลล์ รวมทั้ง DNA/RNA ซึ่งนำสู่การเกิดมะเร็งได้

ทับทิมมีพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอ็อกซิเดชั่น (antioxidant activity) (Schubert, Lansky, and Neeman,1999; Anand, 2004; Seeram, 2005; Li, 2006; Zhang, et al., 2011) การศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพการต้านอนุมูลของน้ำผลไม้หลายชนิดในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า น้ำทับทิมมีศักยภาพต้านอนุมูลสูงมากที่สุด (Seeram, et al., 2008) (Figure 2.3)

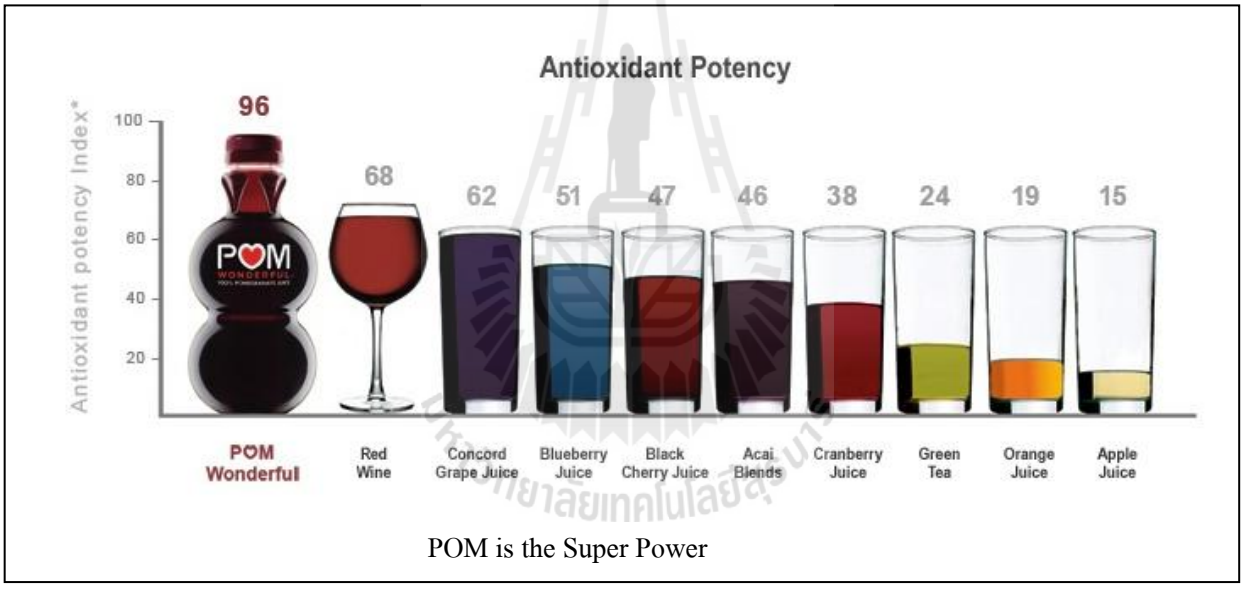

Figure 2.3 Comparison of antioxidant potency among various fruit juice.
Source: http://www.pomwonderful.com/health/pom-is-the-antioxidant-superpower

การศึกษาให้คนบริโภคน้ำทับทิม (pomegranate juice) พบว่าสามารถลด Oxidative stress ลด LDL oxidation ลด platelet aggregation ลดความดันเลือดสูง และลดขนาดของ arterial plaque ในคน (Aviram, et al., 2000; Aviram and Dornfeld, 200; Aviram, et al., 2004) น้ำทับทิมยังลดลิ่มไขมันหรือลดความหนาชั้นใน (intima) ของหลอดเลือดในหนูเมาส์ (Aviram, et al., 2000) นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่แสดงว่า สารสกัดจากผลทับทิมยับยั้งการ เจริญเพิ่มจำนวนเซลล์สายพันธุ์ (เซลล์เนื้องอก/มะเร็ง) จากเนื้องอกใน

ช่องปาก ลำไส้ใหญ่และต่อมลูกหมาก และ เมื่อทาสารสกัดบนผิวหนังหนูสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกผิวหนัง (Seeram, et al., 2005) สารสกัดเมล็ดทับทิมด้วย methanol และน้ำทับทิมหมักสามารถลดขนาดของเนื้องอกต่อมน้ำนมที่เพาะในจานเลี้ยงได้ถึง 87% (Mehta and Lansky,2004) แสดงว่าสารจากทับทิมมีศักยภาพสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกัน หรือ รักษามะเร็งเต้านมได้

2.4 เอสโตรเจน (Pomegranate Phytoestrogens) ในทับทิม

สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของผลทับทิม ด้วยน้ำและแยกด้วย ethylacetate ทดสอบพบ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม สารสกัดแสดงปฏิกิริยาจับกับ β-estrogen receptor (ER) (Kuiper, et al., 1998) สารสกัดจากเมล็ด น้ำทับทิม น้ำทับทิมหมัก และเปลือก วิเคราะห์ด้วย HPLC-MS/MS พบสาร estrogenic compounds 3 ชนิด คือ luteolin, quercetin และ kaempferol (van Elswijik et al., 2004) Lansky (1999) ได้จดสิทธิบัตร United States Patent อาหารเสริมสารเอสโตรเจนจากทับทิมสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ ซึ่งตรงกันข้ามกับ Choi, D.W., et al. (2006) สกัดน้ำทับทิมและเมล็ด แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC และ GC-mass spectrometer ไม่พบสาร estrogenic compound อย่างไรก็ตาม ความชัดเจนของการมี phytoestrogen ในทับทิมหรือไม่จึงเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ควรตรวจสอบก่อนการส่งเสริมให้บริโภคให้แพร่หลายต่อไป รวมทั้งทับทิมที่เพาะปลูกในประเทศไทยด้วย สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วย methanol สามารถยับยั้งแผลในกระเพาะและลำไส้เล็กที่ถูกชักนำด้วยยา aspirin และ ethanol ในหนูแรทได้กว่า 70% และเมื่อวิเคราะห์ชีวเคมีของเซลล์กระเพาะและลำไส้เล็กพบว่าระดับของสารแอนติอ็อกซิแดนซ์ที่เป็นเอนไซม์และโปรตีน คือ superoxidase dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) และ glutathione peroxidase (GPx) เพิ่มขึ้น (Ajaikumar, 2005) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในเนื้อเยื่อตับ หัวใจ และไตของหนูแรทเมื่อได้รับสารสกัด flavonoids จากผลทับทิมสกัดด้วย petroleum และ acetone (Sudheesh and Vijayalakshmi, 2005) สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเมธานอล พบว่าเพิ่มปริมาณ antioxidant enzymes ในเซลล์ คือ reduced glutathione, catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase และลดปริมาณ oxidant H_2O_2, NO and MDA ในเนื้อเยื่อสมองหนูแรท แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดเปลือกผลทับทิมในการป้องกันสมองเสื่อมซึ่งมีสาเหตุจาก oxidative stress (Abdel Moneim, 2012)

2.5 ฤทธิ์ต้านรังสีอัลตราไวโอเลท (anti-UV radiation) ของทับทิม

นอกจากนี้สารสกัดผลทับทิมซึ่งมีสารแอนติอ็อกซิแดนซ์สูงมาก อาจมีศักยภาพเป็นสารป้องกันรังสี UVA และ UVB (Sun block) ได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากชาเขียว เนื่องจาก UV ทำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์ (F'guyer, Afaq, and Mukhtar, 2003). สารสกัดเปลือกทับทิมมีกรดเอลลาจิก (ellagic acid) ปริมาณมากสามารถยับยั้งเซลล์ melanocytes ลดการสังเคราะห์ melanin และ ทำให้ผิวสีน้ำตาลของหนูกินนี (guinea pig) ขาวขึ้น (Yoshimura et al., 2005) สาร punicalagins จากสารสกัดผลทับทิม ป้องกัน human skin fibroblast cells จากการทำลายซึ่งชักนำด้วย UVA และ UVB ลด reactive oxygen species และเพิ่ม antioxidant capacity ของเซลล์ (Pacheco-Palencia, et al., 2008) ผลผลิตทับทิม น้ำทับทิม สารสกัด และน้ำมัน ทับทิมสามารถป้องกันหนังคนสังเคราะห์ (reconstituted human skin – EpiDerm™ FT-200) จาก รังสี UVB ได้โดยยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ collagenase, gelatinase, stromelysin, marilysin, elastase และ tropoelastin (Afaq, et al., 2009) และยับยั้งการแก่ของผิวหนังโดยเพิ่มการสังเคราะห์ procollagen (Park, et al., 2010) ellagic acid ในทับทิมป้องการสลาย collagen ป้องการเหี่ยวย่นของหนังหนูเมาส์ และ ยับยั้งอาการบวมซึ่งชักนำให้เกิดโดย UVB (Bae, et al., 2010)

เอกสารอ้างอิง

Abdel Moneim, A.E. (2012). Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. J Med Plants Res. 6: 195-199.

Afaq, F., Zaid, M.A., Khan, N., Dreher, M., and Mukhtar, H. (2009). Effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. Experimental Dermatol. 18: 553-561.

Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babu, B.H., and Padikkala, J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. J. Ethnopharmacol. 96: 171-176.

Aviram,M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., and Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr. 71: 1062-76.

Aviram, M. and Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis. 158: 195-198.

Aviram M., Rosenblat, M., Gaitini, D., NiteckiS., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., and Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clinical Nutr. 23: 423-433.

Bae, J-Y., Choi, J-S., Kang, S-W., Lee, Y-J., Park, J., and Kan, Y-H. (2010). Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. Experimental Dermatol. 19: e182–e190.

Choi, D.W., Kim, J.Y., Choi, S.H., Jung, H.S., Kim, H.J., Cho, S.Y., Kang, C.S., Seung Yeup Chang, SY. (2006). Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. Food Chem. 96: 562–571.

F'guyer, S., Afaq, F. and Mukhtar, H. (2003). Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 19: 56-72.

Park, H.M., Moon, E., Kim, A-J., Kim, M.H., Lee, S., Lee, J.B., Park, Y.K., Jung5, H-S., Kim, Y.B., , and Sun Yeou Kim, S.Y. (2010). Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. Int'l J Dermatol. 2010, 49, 276–282.

Kuiper, G.G., et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinol., 139: 4252-4263.

Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., and Divakar, S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. Food Chem. 87: 551-557.

Lansky, E.P. (1999). Phytoestrogen supplements prepared from pomegranate material including pomegranate seeds. United States Patent No. 6,060,063.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chem. 96 (2006) 254–260.

Mehta, R. and Lansky, E.P. (2004). Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. Eur . Cancer Prevention. 13 (4): 345-348.

Pacheco-Palencia, L.A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S.T., and Mertens-Talcott, S.U. (2008). Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. J. Agric Food Chem. 56: 8434–8441.

Schubert, S.Y., Lansky, E.P. and Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol. 66: 11-17.

Seerama,, N.P., Adams, LS., Henning, S.M., Niua, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., and Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem. 16: 360-367.

Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., and Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. J Agric Food Chem. 56: 1415–1422.

Seeram, N.P., Lee, R., and Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (Punica granatum L.) juice. Clinica Chimica Acta 348: 63–68.

Sudheesh, S. and Vijayalakshmi, N.R. (2005). Flavonoids from *Punica granatum* – potential antiperoxidative agents. Fitoterapia. 76: 181-186.

van Elswijk, D.A., Schobel, U.P., Lansky, E.P., Irth, H., van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica grantum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. Phytochem. 65: 233-241.

Yoshimura, M., Watanabe, Y., Kasai, K., Yamakoshi, J., and Koga T. (2005). Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. Biosci Biotechnol Biochem. 69: 2368-2373.

Zhang, L., Yanga, X., Yuanhu Zhang, Y., Wanga, L., Zhang, R. (2011). *In vitro* antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. Food Bioproducts Processing. 8 9: 234–240.

http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_07_3.htm

http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt

http://www.pomwonderful.com/health/pom-is-the-antioxidant-superpower/

http://www.phytochemicals.info/plants/pomegranate.php

Global Journal of Pharmacology 6 (2): 131-141, 2012
ISSN 1992-0075
© IDOSI Publications, 2012
DOI: 10.5829/idosi.gjp.2012.6.2.64226

Antioxidant Activity and Bioefficacy of Pomegranate *Punica granatum* Linn. Peel and Seed Extracts

[1]*Jinnawat Manasathien*, [1]*Korakod Indrapichate and* [2]*Kanok-Orn Intarapichet*

[1]Institute of Science, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
[2]Institute of Agriculture Technology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Abstract: Pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel and seed ethanolic and water extracts (PPE/e, PPE/w, PSE/e, PSE/w) were quantified for total phenolic compounds (TPC) and flavonoids content (FC) and antioxidant cytotoxic and antiproliferation activities. TPC and FC ranged as PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w. The amount of TPCs were 449.60±4.40, 380.54±5.87, 77.93±1.62 and 51.58±0.85 µg GAE/mg and of FCs were 38.44±1.44, 26.06±0.93, 16.66±0.47 and 10.55±0.14 µg CAE/mg respectively. The free radical scavenging activity determined by DPPH radicals and the lipid peroxidation inhibition were as high as AA, CA and EGCG the antioxidant controls. In particularly, PPE/e possessed highest free radical scavenging, IC_{50} of 121.65±2.66 µg/ml and lipid peroxidation inhibition activity, IC50 18.04±1.95 µg/ml. All pomegranate extracts were not toxic to normal cells. The cytotoxicity of the extracts ranged as PPE/e > PSE/w > PPE/w > PSE/e with LC_{50} values at 24 hrs of 1,206.98±12.73, 1,294.88±61.28, 1,743.31±20.17 and 2,375.28±69.54 µg/ml, respectively. TPC and FC of the extracts were well correlated to the antioxidant activities, but not to the cytotoxicity. PPE/e and PPE/w most potentially inhibited the proliferation of MCF-7 cells with LC_{50} of 375.75±1.22 and 471.80±4.37 µg/ml. The statistically significant NOAEL ranged as PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w with values of 1,250, 1,000, 750 and 100 µg/ml respectively. LOAEL was PPE/w = PSE/e > PPE/e > PSE/w values of 1,500, 1,000 and 500 µg/ml respectively. MOS and TI values were PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w. NOAEL, LOAEL. MOS and TI data provide further study for the pharmacological and therapeutic development of pomegranate products.

Key words: Antioxidant Activity % Lipid Peroxidation Inhibition % Cytotoxicity % Antiproliferation % NOAEL % LAOEL

INTRODUCTION

Pomegranate *Punica granatum* Linn. has been known for traditional uses to remedy a numbers of symptoms, such as its leaves for eye sore; flowers for blood clotting; rind and dried fruit for diarrhea; stem and root bark for ridding of parasites; and seeds for scurvy. It was also reported to be used in modern medicine. The peel extract was a potent virucidal agent [1] against genital herpes virus [2] due to tannins. It was also used to treat the infection of male or female sexual organs, mastitis, acne, folliculitis, pile, allergic dermatitis and dysentery [3]. Pomegranate peel and seed possessed potent antioxidant properties [4, 5]. Polyphenols from pomegranate fermented juice, peel and seed oil [6] and ethanolic juice [7] were found synergistically inhibited the proliferation and induced apoptosis of human prostate cancer cells. Some evidence of antioxidants and anticancer of pomegranate are available. However, there is no information on toxicological profile of the pomegranate products. This study thus aimed to investigate the potential of pomegranate peel and seed extracts on antioxidant activity, toxicological property and antiproliferative effect on MCF-7, the human breast adenocarcinoma cell line.

As a broad spectral basis of pharmacological action and toxicity of phytochemicals is needed for predicting the adverse effects on human beings and developing

Corresponding Author: Korakod Indrapichate, Institute of Science, Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. Tel: +66 4422 4296, Fax: +66 4422 4185.

drugs [8]. The information on cytotoxicity of pomegranate extracts was then statistically identified for no-observed-adverse-effect-level (NOAEL), lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL), margin of safety (MOS) and therapeutic index (TI). Thus, the information and knowledge from this study will be useful for further research on pomegranate products for pharmacological development and cancer therapy.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Extract Preparation: Pomegranate fruits were collected from local farms in Klangdong, Saraburi, Thailand. The plant was taxonomically identified by the Royal Forest Department of Thailand, specimen voucher no. 080252. The fruits were cleaned. The peel and the seeds were separated, dried and ground to powder and stored. The peel and the seed powders of 50 g was extracted in 500 ml of 70% ethanol or water for 24 hrs in a Soxhlet extraction apparatus, evaporated, lyophilized and kept at -20C for further use.

Chemicals: Folin-Ciocalteau reagent and gallic acid were obtained from Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland. Ascorbic acid (AA), 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), catechin (CA), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin were from GIBCO, Invitrogen Corporation, NY, USA. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was purchased from Molecular Probes, Invitrogen Corporation, NY, USA. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Total Phenolic Compounds Measurement: Total phenolic compounds (TPC) were quantified by Folin-Ciocalteu method [9]. One hundred microliters of sample, dissolved in 70% ethanol or water, were mixed with 2 ml of 2% sodium carbonate solution containing 100 µl Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu: methanol, 1:1, v/v) and incubated for 30 min. The optical absorbance was measured at 760 nm. TPC content was expressed as micrograms of gallic acid equivalents (GAE) per milligrams dried extract.

Flavonoids Content Measurement: Flavonoids content (FC) was quantified using a colorimetric method [10]. Two hundred and fifty microliters of sample were mixed with 1.25 ml dH_2O and 75 µl of 5% $NaNO_2$ for 6 min. One hundred and fifty microliters of 10% $AlCl_3$ were added and allowed to stand for 5 min and then 0.5 ml of 1M NaOH was added and adjusted to 2.5 ml with dH_2O. The optical absorbance was measured at 510 nm. FC was expressed as micrograms of catechin equivalents (CAE) per milligrams of dried extract.

Free Radical Scavenging Assay: Free radical scavenging activity was determined by $DPPH^c$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay [11]. Fifty microliters of sample were mixed with 1.95 ml of DPPH reagent, dissolved in methanol as in instruction, allowed to stand in the dark for 45 min and then measured the absorbance at 515 nm. Ascorbic acid (AA), catechin (CA) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) were served as positive controls. Radical scavenging activity was calculated using the following formula and expressed as median inhibition concentration, IC_{50}.

$$\textit{Radical scavenging activity}\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] x\,100$$

Where:

A_0 : Was the absorbance of a control
A_1 : Was the absorbance of $DPPH^c$ solution in the presence of a sample
A_2 : Was the absorbance without $DPPH^c$ solution

Ferric Thiocyanate Assay: Ferric thiocyanate (FTC) assay was conducted as described by Huang *et al.* [12]. One milliliter of sample, diluted in 99.5% ethanol, was mixed with 1.5 ml of 2.51% linoleic acid, 2.5 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 and then kept at 40°C in the dark. To 0.5 ml aliquot of sample, 4.9 ml of 75% ethanol and 50 µl of 30% ammonium thiocyanate were added and incubated for 3 min. Fifty microliters of 20 mM iron (II) chloride in 3.5% hydrochloric acid were added and measured the absorbance at 500 nm every 24 hrs until one day after the absorbance of control reached its maximum. 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), CA and EGCG were used as positive controls. Lipid peroxidation inhibition (LPI) was calculated using the following formula.

$$\textit{Lipid peroxidation inhibition}\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] x\,100$$

Where:

A_0 : Was the absorbance of control
A_1 : Was the absorbance in the presence a sample

A_2 : Was the absorbance without potassium thiocyanate solution.

Ctytotoxicity Assay: Cytotoxicity was performed by brine shrimp lethal assay (BSLA) as described by Solis *et al.* [13]. Brine shrimp *Artemia salina* Linn. eggs were purchased from a local fish shop. They were hatched and reared in artificial seawater (120 g/l sea salt) under continuous light, at 25°C for 24 hrs [14]. Ten nauplii were transferred onto a 24-well plate containing 200 µl of artificial seawater and incubated with 800 µl of extract solution at various concentrations for 24 hrs. The dead larvae were counted. The percentage of mortality was calculated as following:

$$Mortality\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_1}\right] x\,100$$

Where:

A_1 : Was the live control (the medium without the sample)
A_2 : Was the death in the presence of the samples.

The lethal concentrations at 10%, 50% and 90% (LC_{10}, LC_{50} and LC_{90} values) and 95% confidence intervals were determined at 24 h using the Probit analysis method [15] and expressed as micrograms of sample per milliliter. Four repeats were performed.

Toxicological Profile for Pharmacological Development: Concentration-response relationship between LC_{50} of cytotoxicity and IC_{50} of DPPH radical scavenging activity. No-observed-adverse-effect-level (NOAEL), lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL), margin of safety (MOS) and therapeutic index (TI) were analyzed, described by Calabrese [14], Beck [16] and Faustman [17], as the following formula:

$$MOS = \frac{NOAEL}{Effective\ Dose}$$

$$TI = \frac{LC_{50}}{IC_{50}}$$

Cell Proliferation Assay: MCF-7, human breast cancer cell line (a gift from R.P. Shiu, Dubik and Shiu, 1992) was cultured in complete Dubecco's Modified Eagle's medium, DMEM/F-12, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and incubated in 5% CO_2 atmosphere at 37°C. Cell proliferation was assayed byMTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. MCF-7 cells at 10,000 cells/well in 100 µl were plated onto a 96-well plate and incubated for 24 hrs. The cultured cells were treated with the extracts at various concentrations and continued to incubate for 24 hrs. DMSO was used as control. MTT at 5 µg/µl (in phosphate-buffered saline, pH 7.4) was added and incubated for 4 hrs. The cultured medium was discarded. One hundred and fifty microliters of DMSO were added. The plate was gently agitated until the formazan precipitate was dissolved. The absorbance was measured at 570 nm with the reference wavelength at 630 nm. Decreasing in the absorbance indicated a reduction in cell viability [18]. Four replicates were performed. The antiproliferation activity (%) was plotted against the sample concentrations and the median lethal concentration of 50% (LC_{50}) was derived from the best fit line obtained by linear regression analysis.

$$Antiproliferation\ activity\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{(A_0 - A_2)}\right] x\,100$$

Where:

A_0 : Was the absorbance of control
A_1 : Was the absorbance of the treated sample
A_2 : Was the absorbance of treated sample without cells

Statistical Analysis: Data were analyzed for multiple comparisons by one-way ANOVA, using the least significant test to determine the level of significant at $p < 0.05$ and 0.01. For single comparisons, the different significance of means was determined by Student's *t*-test at significant level of $p < 0.05$ and $p \# 0.01$.

RESULTS

Total Phenolic Compounds and Flavonoids Content: Pomegranate peel ethanolic and water extracts (PPE/e, PPE/w) substantially contained both total phenolic compounds (TPC) and flavonoids content (FC) higher than those of seed extracts (PSE/e, PSE/w) (Table 1). TPCs of all extracts ranged as PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w. The TPC amounts of them were 449.60±4.40, 380.54±5.87, 77.93±1.62 and 51.58±0.85 µg GAE/mg respectively. The FC amounts of them were 38.44±1.44, 26.04±0.93, 16.66±0.47 and 10.55±0.14 µg CAE/mg respectively.

Table 1: Total phenolic compounds, flavonoids contents of pomegranate *P. granatum* peel and seed extracts and their antioxidant activities, assessed by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging and lipid peroxidation inhibition. Data represent mean±SE, n = 4

Sample	Total Phenolics mg GAE/mg	Flavonoids mg GAE/mg	DPPH IC_{50}, µg/ml	LPO Inhibition IC_{50}, µg/ml
PPE/e	449.60±4.40[a]	38.44±1.44[a,a]	121.65±2.66[a]	18.04±1.95[a]
PPE/w	380.54±5.87[a]	26.04±0.93[b,b]	151.78±2.70[a]	22.34±2.11[a]
PSE/e	77.93±1.62[b]	16.66±0.47[c,a]	1,324.35±16.89[b]	166.49±20.38[b]
PSE/w	51.58±0.85[b]	10.55±0.14[d,b]	2,577.53±44.06[c]	201.82±11.37[b]
AA	-	-	113.35±1.95	-
BHA	-	-	-	5.97±0.39
CA	-	-	111.39±0.73	7.38±0.11
EGCG	-	-	65.17±0.34	6.89±0.39

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; AA, ascorbic acid; BHA, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole; CA, catechin; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; IC_{50}, median inhibitory concentration. Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2: Cytotoxicity, LC_{10}, LC_{50} and LC_{90}, of pomegranate *P. granatum* peel and seed extracts assayed by brine shrimp lethality (BSLA). Data were mean±SE, n = 4

Extract	Conc. (µg/ml)	Mortality (%)	LC_{10} (µg/ml)	LC_{50} (µg/ml)	LC_{90} (µg/ml)
PPE/e	500	2.50±1.02	777.73±29.60[b]	1,206.98±12.73[a]	1,863.27±40.04[a]
	750	5.00±1.02	(688.53-876.93)	(1,166.46-1,247.50)	(1,735.85-1,990.69)
	1,000	35.63±2.13			
	1,250	52.50±2.28			
	1,500	73.13±2.13			
	1,750	82.50±2.28			
PPE/w	500	1.88±1.20	1,345.93±5.5[d]	1,743.31±20.17[b]	2,115.54±38.03[a]
	750	3.13±0.63	(1,328.41-1,363.46)	(1,679.14-1,807.49)	(1,994.52-2,236.56)
	1,000	3.75±0.72			
	1,250	5.63±1.20			
	1,500	18.13±1.20			
	1,750	51.25±1.61			
	2,000	81.88±4.83			
PSE/e	500	5.00±1.77	1,055.33±104.88[c]	2,375.28±69.54[c]	3,574.37±99.55[c]
	750	5.63±1.57	(721.54-1,389.13)	(2,153.97-2,596.59)	(3,257.54-3,891.20)
	1,000	13.13±4.93			
	1,500	17.50±1.02			
	2,000	38.75±5.15			
	2,500	57.50±2.28			
	3,000	72.50±2.04			
PSE/w	100	1.88±0.63	230.20 ±34.08[a]	1,294.88±61.28[a]	2,416.04±54.09[b]
	500	18.13±3.29	(121.75-338.66)	(1,099.86-1,489.89)	(2,243.89-2,588.20)
	750	33.50±3.34			
	1,000	45.00±5.10			
	1,500	68.75±1.61			
	2,000	76.25±2.60			
	2,500	86.88±2.13			
Control		1.25±0.72			

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.01$). Control expressed as 0.001% DMSO

Table 3: Antiproliferative activity of pomegranate *P. granatum* peel and seed extracts on MCF-7 cells. Data were mean±SE, n = 4

Sample	Concentration (µg/ml)	Antiproliferation (%)	LC_{50} (µg/ml)
PPE/e	200	11.48±0.96	375.75±1.22[a]
	300	27.08±1.17	
	400	47.90±2.11	
	500	88.35±0.68	
PPE/w	300	8.47±1.82	471.80±4.37[a]
	400	30.89±1.69	
	500	58.07±2.74	
	600	81.52±1.16	
PSE/e	1,600	7.26±0.65	1,786.58±6.74[b,a]
	1,700	30.07±2.49	
	1,800	50.64±3.87	
	1,900	80.74±1.54	
PSE/w	5,000	23.88±4.73	7,969.16±143.37[c,b]
	6,000	34.68±2.78	
	7,000	45.03±1.83	
	8,000	51.44±0.53	
EGCG	200	60.18±0.49	179.23±1.22

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; EGCG, epigallocatechin-3-gallate. Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.01$)

Table 4: Toxicological profiles of pomegranate *P. granatum* peel and seed extracts were statistically derived from cytotoxicity and antioxidant activities

			DPPH		LPI	
Sample	NOAEL (µg/ml)	LOAEL (µg/ml)	MOS	TI	MOS	TI
PPE/e	750	1,000	150	9.92	150	66.91
PPE/w	1,250	1,500	250	11.49	250	78.04
PSE/e	1,000	1,500	10	1.79	20	14.27
PSE/w	100	500	1	0.50	2	6.42

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; NOAEL, no observed adverse effect level; LOAEL, lowest observed adverse effect level; MOS, margin of safety; TI, therapeutic index

Free Radical Scavenging Activity: The pomegranate peel extracts exhibited proton-donating ability by DPPH assay. PPE/e demonstrated highest free radical scavenging activity with IC_{50} value of 121.65±2.66 µg/ml, followed by PPE/w, PSE/e and PSE/w with IC_{50} of 151.78±2.70, 1,324.35±16.89 and 2,577.53±44.06 µg/ml, respectively (Table 1). The activity of PPE/e was prominent and similar to those of AA and CA the antioxidant standards, but two fold less than that of EGCG. The extract scavenging activity, IC_{50}, was well correlated to total phenolic compounds, $R^2 = 0.833$, $P < 0.05$ (Figure 1 A) and to flavonoids content, $R^2 = 0.792$, $P < 0.05$ (Figure 1 B).

Lipid Peroxidation Inhibition: PPE/e possessed highest inhibitory activity on lipid peroxidation (LPO) of linoleic acid with IC_{50} value of 18.04±1.95 µg/ml (Table 1). Pomegranate peel extracts, however, moderately inhibited LPO as compared to the standards. This activity was approximately 2.5-3 fold less than those of BHA, CA and EGCG. PPE/w contained moderate LPO inhibition with IC_{50} of 22.34±2.11 µg/ml. The LPO inhibitory activities of PSE/e and PSE/w were 166.49±20.38 and 201.82±11.37 µg/ml, respectively, which were about 25-30 fold less than those of the standard activities. The correlation between IC_{50} values of lipid peroxidation inhibition and TPC was high with $R^2 = 0.976$, $P < 0.05$ (Figure 1 C) and FC was moderate with $R^2 = 0.835$, $P < 0.05$ (Figure 1 D).

Cytotoxic Effect: The cytotoxicity of the pomegranate extracts as performed by BSLA was low. The LC_{10}, LC_{50} and LC_{90} values at 24 hrs of the extracts were shown in Table 2. PSE/w seemed to be most toxic at LC_{10}, while PPE/e showed the highest at LC_{50} and LC_{90}. At LC_{10}, the cytotoxicity ranged as PSE/w > PPE/e > PSE/e > PPE/w with LC_{10} values of 230.20±34.08, 777.73±29.60, 1,055.33±104.88 and 1,345.93±5.51 µg/ml. At LC_{50}, it ranged as PPE/e > PSE/w > PPE/w > PSE/e with the values of 1,206.98±12.73, 1,294.88±61.28, 1,743.31±20.17 and 2,375.28±69.54 µg/ml, respectively. At LC90, it ranged as PPE/e > PPE/w > PSE/w > PSE/e with the values of

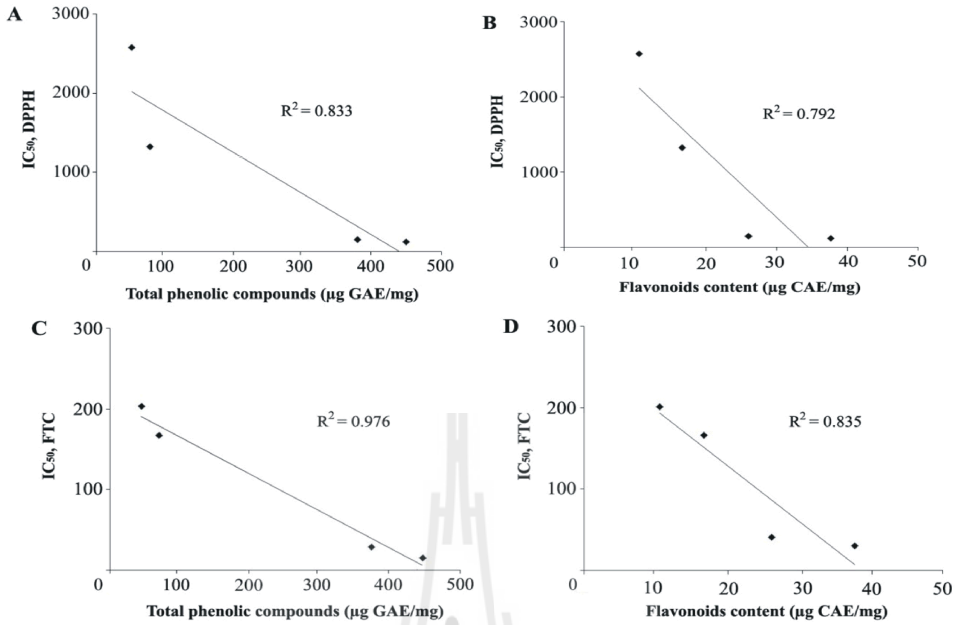

Fig. 1: Relationships between IC_{50} of free radical scavenging activity, by DPPH method, and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B) of P. granatum peel and seed extracts. Relationships between IC_{50} of lipid peroxidative inhibition, by FTC method, and total phenolic compounds (C), and flavonoids content (D) of P. granatum peel and seed extracts

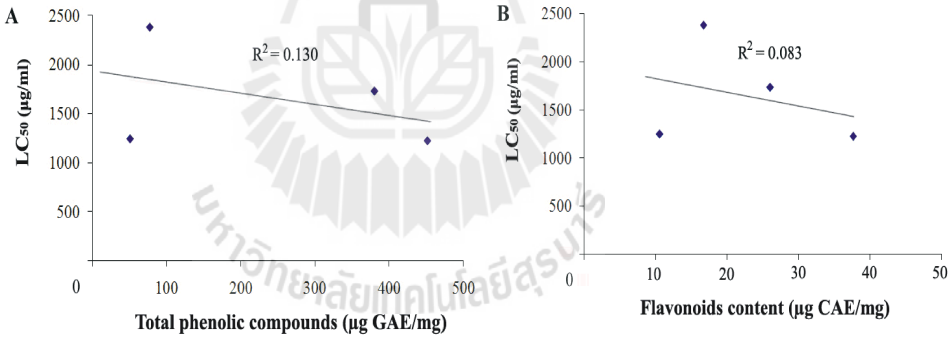

Fig 2: Relationships between LC_{50} of motality and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B) of pomegranate P. granatum peel and seed extracts

1,863.27±40.04, 2,115.54±38.03, 2,416.04±54.09 µg/ml, respectively. However, the cytotoxicity of the pomegranate extracts was not correlated to their TPC and FC contents (Figure 2).

Antiproliferation Effect on MCF-7 Cells: The cytotoxicity of the pomegranate extracts was also evaluated by their activities on the proliferation of a human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells. Interestingly, pomegranate peel extracts were prominently potent against the proliferation of MCF-7 cells. The antiproliferation potency, LC_{50} at 24 h, of PPE/e and PPE/w was 375.75±1.22 and 471.80±4.37 µg/ml (Table 3). The effect of PSE/e was moderate with LC_{50} of 1,786.58±6.74 µg/ml while PSE/w was least effective with LC_{50} of 7,969.16±143.37 µg/ml.

Concentration-Response Functions for Pomegranate Extracts: The NOAEL, LOAEL, MOS and TI were identified based on the statistic significance of PPE cytotoxicity by BSLA. The NOAEL values of the pomegranate extracts ranged as PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w with concentrations of 1,250, 1,000, 750 and 100 µg/ml respectively (Table 4). While, the LOAEL values ranged as PPE/w = PSE/e > PPE/e > PSE/w with concentrations of 1,500, 1,000 and 500 µg/ml respectively.

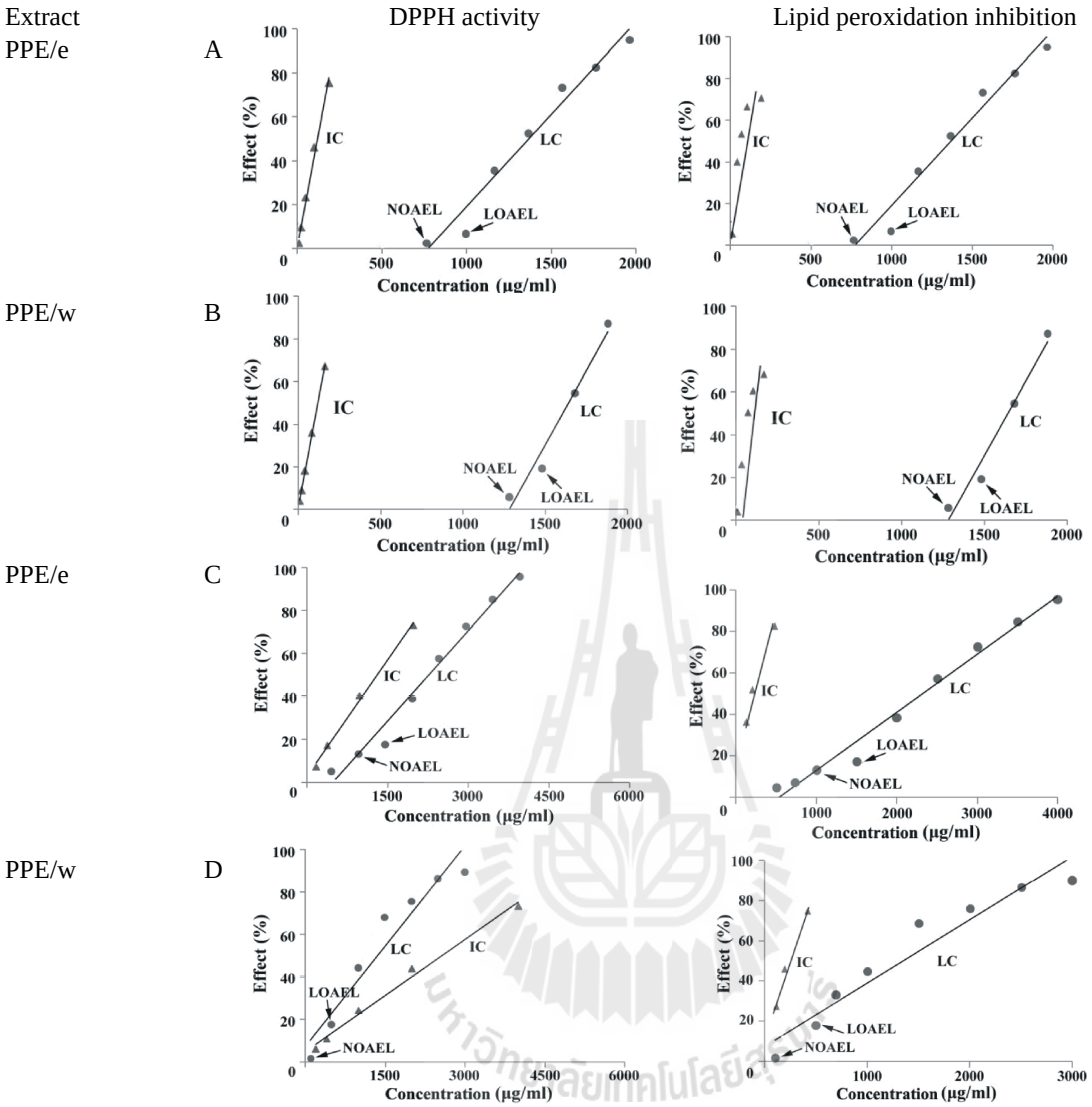

Fig 3: In vitro concentration-response relationships of LC_{50} of cytotoxicity evaluated by brine shrimp lethality assay and IC_{50} of DPPH radical scavenging activity (Lt. panels) and IC50 of lipid peroxidation inhibition and (Rt. panels).

The concentration-response relationships between IC_{50} values of antioxidant activities and LC_{50} values of cytotoxicities and effects of the extracts were showed in Figure 3.

The MOS and the TI of the extract antioxidant effects by DPPH and LPI were as similar pattern to NOAEL and LOAEL, i.e., MOS and TI values were PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w (Table 3). PSE/w possessed lowest MOS of 1 and 2; and TI of 0.50 and 6.42, based on DPPH radical scavenging (Figure 3, Lt. panels) and LPI (Figure 3, Rt. panels) respectively. PPE/w showed highest MOS values of 250; and TI of 11.49 and 78.04 respectively.

DISCUSSION

Phytochemical constituents of plants importantly indicate the antioxidant capacity and cytotoxicity of their products which can be used for human health and drug development.

Pomegranate *Punica granatum* fruits were a rich source of dietary antioxidants [19]. We found that different parts of pomegranate fruits and extracting solvents produced different quantities of different phytochemicals leading to different magnitude of biological activity of the products. PPE possessed higher phenolics and flavonoids than PSE and the ethanolic

extracts of them contained more phenolics than flavonoids [6, 20]. There were some reports that PPE was rich in gallic acid, ellagic acid, flavonols, flavones, flavanones, anthocyanidins and ellagitannins [21-23]. While, PSE was a source of fatty acids, i.e. punicic acid, linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and stearic acids [24] and non-steroid phytochemicals [25]. These reports thus well agreed with our findings.

The substantial amounts of TPC and FC in PPEs were well correlated and dominantly responsible for the antioxidant activity. We found that PSEs possessed less antioxidant activity as other reports [26]. PPE potently scavenged DPPH radicals similar to catechin, it is likely that PPE possessed proton-donating ability and in association with a number of hydroxyl groups in the TPC and FC structures to stabilize free radicals [20, 27-30]. The pomegranate extracts prominently inhibited lipid peroxidation, it could due to their TPC and FC ability to quench hydroxyl radicals by transferring hydrogen atom to free radical [31]. The inhibition of lipid peroxidation activity of the by-product pomegranate peel is one of the important roles of antioxidants which protect biological membranes of living cells, leading to attenuation atherosclerosis [23], hyperlipidemia and diabetic [32]. The antioxidant capacity of PPE was also valuable for increasing shelf life of lipid containing food [33, 34] and meat products [35, 36]. PPE was demonstrated that it well protected the UVB-irradiated rat skin by remarkably reducing skin lesion and DNA fragmentation of the epidermal cells [37].

We found that PPE and PSE of this study did not show cytotoxicity to normal living organism (brine shrimps), i.e. LC_{50} exceeded 1,000 µg/ml [38, 39], which supported by other reports [28, 40, 41]. However, PPE inhibited the proliferation of MCF-7 cells, a human breast adenocarcinoma cell line. The antiproliferation of other cancer cells by PPE was reported, such as HL-60, human promyelocytic leukemia cells [42], MCF-7aro, testosterone-induced breast cancer cells [43], LNCaP-AR and DU-145 cells, prostate cancer cells [44] and PANC-1 cell, pancreatic cancer cells [45]. The cytotoxic and antioxidant studies of pomegranate extracts were useful for prediction of their risk. Similarly, the NOAEL of resveratrol [46], neem-derived pesticides [47], *Tancetum vulgare* [48] and *Herniaria glabra* [49] leaf aqueous extracts, vitamin D [50], copper in bottled drinking water [51] and some environmental chemicals [52] was evaluated for risk assessment and safe consumption. The statistically predicted values of NOAEL, LOAEL, MOS and TI of the pomegranate peel and seed extracts were firstly evaluated for acute toxicity by our study. It was likely indicated that the pomegranate peel and seed extracts were highly effective with low toxicity for normal cell treatments and preferably accepted as potent antioxidants. Thus, these concentration-response relationships provide the important data for the toxicological risk assessment and the implications for pharmacological development of pomegranate products.

CONCLUSION

Pomegranate peel and seed extracts were rich in phenolic and flavonoid compounds with potentially high antioxidant activities, less cytotoxicity to normal cells, high antiproliferation against cancerous MCF-7 cells. The peel and seed extracts were low cytotoxicity with high safety. Particularly, the peel, the by-product of pomegranate fruits was prominently value added. The toxicological risk assessment and pharmacological data from this pomegranate study would be beneficial for clinically therapeutic development.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was granted by Suranaree University of Technology and the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand.

REFERENCES

1. Stewart, G.S., S.A. Jassim, S.P. Denyer, P. Newby, K. Linley and V.K. Dhir, 1998. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. J. Appl. Microbiol., 84(5): 777-783.
2. Zhang, J., B. Zhan, X. Yao and J. Song, 1995. Antiviral activity of tannin from the pericarp of Punica granatum L. against genital herpes virus in vitro. Zhongguo. Zhongyao. Zazhi., 20(9): 556-558.
3. Hu, W., 1997. Skin health inflammatory inucta and producing process thereof. Chinese Patent, 1156617A.
4. Lansky, E.P. and R.A. Newman, 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol., 109(2): 177-206.
5. Guo, C.J., J.J. Yang, J.Y. Wei, Y.F. Li, J. Xu and Y.G. Jiang, 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr. Res., 23: 1719-1726.

6. Lansky, E.P., W. Jiang, H. Mo, L. Bravo, P. Froom and W. Yu, 2005. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Invest. New Drug., 23: 11-20.
7. Malik, A., F. Afaq, S. Sarfaraz, V.M. Adhami, D.N. Syed and H. Mukhtar, 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102: 14813-14818.
8. Dorato, M.A. and J.A. Engelhardt, 2005. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues and definition (s). Reg. Toxicol. Pharm., 42(3): 265-274.
9. Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidations by mean of Folin-Ciocateu reagent. Methods. Enzymol., 299: 152-178.
10. Jia, Z., M. Tang and J. Wu, 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem., 64: 555-559.
11. Sanchez-Moreno, C., L. Plaza, B. De Ancos and M.P. Cano, 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. J. Sci. Food Agric., 83: 430-439.
12. Huang, D.J., H.J. Chen, W.C. Hou, C.D. Lin and Y.H. Lin, 2006. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage root mucilage with antioxidant activities *in vitro*. Food Chem., 98: 774-781.
13. Solis, N.P., W.C. Wright, M.M. Anderson, P.M. Gupta and D.J. Phillipson, 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Med., 59: 250-253.
14. Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin, 1994. Improved method for selection of the NOAEL. Reg. Toxicol. Pharm., 19(1): 48-50.
15. Finney, D.J., 1971. Probits analysis. 3rd ed. Cambridge University Press.
16. Beck, B.D., R.B. Conolly, M.L. Dourson, D. Guth, D. Hattis, C. Kimmel and S.C. Lewis, 1993. Symposium overview: improvements in quantitative non-cancer risk assessment. Fund. Appl. Toxicol., 20: 1-14.
17. Faustman, E.M. and G.S. Omenn, 2001. Risk assessment. In: C.D. Klaassen, (Ed.), Cassarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons, sixth ed. McGraw-Hill, New York.
18. Okonogi, S., C. Duangrat, S. Anuchpreeda, S. Tachakittirungrod and S. Chowwanapoonpohn, 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Food Chem., 103: 839-846.
19. Afaq, F., M. Saleem, C.G. Krueger, J.D. Reed and H. Mukhtar, 2005b. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int. J. Cancer, 113: 423-433.
20. Singh, R.P., K.N.C. Murthy and G.K. Jayaprakasha, 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. J. Agric. Food Chem., 50: 81-86.
21. Amakura, Y., M. Okada, S. Tsuji and Y. Tonogai, 2000b. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. J. Chromatogr. A., 896: 87-93.
22. Aslam, M.N., E.P. Lansky and J. Varani, 2006. Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. J. Ethnopharmacol., 103: 311-318.
23. Aviram, M., N. Volkova, R. Coleman, M. Dreher, K.M. Reddy, D. Ferreira and M. Rosenblat, 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils and flowers are antiatherogenic: studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E^0) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins. J. Agric. Food Chem., 56: 1148-1157.
24. Schubert, S.Y., E.P. Lansky and I. Neeman, 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J. Ethnopharmacol., 66: 11-17.
25. Choi, D.W., J.Y. Kim, S.H. Choi, H.S. Jung, J.H. Kim, Y.S. Cho, S.C. Kang and S.Y. Chang, 2006. Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. Food Chem., 96: 562-571.
26. Singh, R.P., K.N. Chidambara Murth and G.K. Jayaprakasha, 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models J. Agric. Food Chem., 50: 81-86.

27. Wang M., J.E. Simon, I.F. Aviles, K. He, Q.Y. Zheng and Y. Tadmor, 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in Artichocke (*Cynara scolymus* L.). J. Agric. Food Chem., 51: 601-608.
28. Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha and B.S. Jena, 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chem., 80: 393-397.
29. Chowdhury, N.S., M.B. Alam, A.S.M.T. Haque, R. Zahan, M.E.H. Mazumder and M.E. Haque, 2011. *In vitro* free radical scavenging and thrombolytic activities of Bangladeshi aquatic plant *Aponogeton undulates* Roxb. Global J. Pharmacol., 5(1): 27-32.
30. Moussaid, M., A.A. Elamrani, C. Berahal, H. Moussaid, N. Bourhime and M. Benaissa, 2011. Evaluation of the antioxidant potential of some Morocco medicinal plants. Global J. Pharmacol., 5(1): 153-158.
31. Noda, Y., T. Kaneyuka, A. Mori and L. Packer, 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding and pelargonidin. J. Agric. Food Chem., 50: 166-171.
32. Bagri, P., M. Ali, V. Aeri, M. Bhowmik and S. Sultana, 2008. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Food Chem. Toxicol., 47: 50-54.
33. Iqbal, S., S. Haleem, M. Akhtar, M. Zia-ul-Haq and J. Akbar, 2008. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. Food Res. Int., 41: 194-200.
34. Naveena, B.M., A.R. Sen, S. Vaithiyanathan, Y. Babji and N. Kondaiah, 2008. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. Meat Sci., 80: 1304-1308.
35. Devatkal, S.K., K. Narsaiah and A. Borah, 2010. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. Meat Sci., 85: 155-159.
36. Devatkal, S.K. and B.M. Naveena, 2010. Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. Meat Sci., 85: 306-311.
37. Manasathien, J., S. Kupittayanant and K. Indrapichate, 2011. Protective efficacy of pomegranate (*Punica granatum* Linn., Punicaceae) peel ethanolic extract on UVB-irradiated rat skin. Am-Euras. J. Toxicol. Sci., 3(4): 250-258.
38. Mayer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med., 45: 31-34.
39. Patel, C., P. Dadhaniya, L. Hingorani and M.G. Soni, 2008. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. Food Chem. Toxicol., 46: 2728-2735.
40. Meerts, I.A.T.M., C.M. Verspeek-Rip, C.A.F. Buskens, H.G. Keizer, J. Bassaganya-Riera, Z.E. Jouni, A.H.B.M. van Huygevoort, F.M. van Otterdijk and E.J. van de Waart, 2009. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. Food Chem. Toxicol., 47: 1085-1092.
41. Kaur, G., Z. Jabbar, M. Athar and S.M. Alam, 2006. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food Chem. Toxicol., 44: 984-993.
42. Kawaii, S. and E.P. Lansky, 2004. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J. Med. Food, 7: 13-18.
43. Adams, L.S., Y. Zhang, N.P. Seeram, D. Heber and S. Chen, 2010. Pomegranate ellagitannin–derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells *in vitro*. Cancer Prev. Res., 3: 108-113.
44. Hong, M.Y., N.P. Seeram and D.D. Heber, 2008. Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells over expressing the androgen receptor. J. Nutr. Biochem., 19: 848-855.
45. Nair, V., Z. Dai, M. Khan and H.P. Ciolino, 2011. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. Anticancer Res., 31(9): 2699-2704.
46. Calabrese, E.J., M.P. Mattson and V. Calabrese, 2010. Dose response biology: The case of resveratrol. Hu. Exp. Toxicol., 29: 1034-1037.
47. Boeke, S.J., M.G. Boersma, G.M. Alink, J.J.A. Van Loon, A. Van Huis, M. Dicke and I.M.C.M. Ivonne Rietjens, 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. J. Ethnopharmacol., 94: 25-41.
48. Lahlou, S., Z.H. Israili and B. Badiˆaa Lyoussi, 2008. Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. J. Ethnopharmacol., 117: 221-227.

49. Rhiouani, H., J. El-Hilaly, Z.H. Israili and B. Lyoussi, 2008. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. J. Ethnopharmacol., 118: 378-386.
50. Hathcock, J.N., A. Shao, R. Vieth and R. Heaney, 2007. Risk assessment for vitamin D. Am. J. Clin. Nutr., 85: 6-18.
51. Araya, M., B. Chen, L.M. Klevay, J.J. Strain, L. Johnson, P. Robson, W. Shi, F. Nielsen, H. Zhu, M. Olivares, F. Pizarro and L.T. Haber, 2003. Confirmation of an acute no-observed-adverse-effect and low-observed-adverse-effect level for copper in bottled drinking water in a multi-site international study. Reg. Toxicol. Pharmacol., 38: 389-399.
52. Sharpe, R.M., 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. Toxicol. Lett., 120: 221-232.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอ็อกซิเดชั่น และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิต

3.1 คำนำ

หลายประเทศใช้ทับทิม *Punica granatum* L. เป็นยารักษาโรคตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน ทับทิมมีสารอาหารสูง ผลทับทิมมีไวตามีนซีสูง ใน 1 ผลให้ไวตามีนซีถึง 40% ของความต้องการในหนึ่งวัน และมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูง ประเทศในเอเชียและตะวันออกกลาง ใช้เปลือกของลำต้น ผล ราก และเมล็ดทับทิมเป็นยา แต่ ไม่มีการศึกษาวิเคราะห์เชิงวิทยาศาสตร์ การศึกษาวิเคราะห์ส่วนมากดำเนินการในประเทศทางตะวันตก ทับทิมสังเคราะห์สารเคมีซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หลายชนิด รวมทั้ง phenolics (polyphenols และ phenols) เปลือกลำต้นมี punicotannic acid, gallic acid, mannite, pelletierine และ N-methylisopelletierine. ในน้ำทับทิมมีสาร ellagitannins, pelargonidin, punicalin, punicalagin, anthocyanins, cyanidin, ellagic acid สารสกัดผลทับทิมยังเป็นแหล่งของสาร polyphenols ที่ทำให้เกิดกลิ่นและสีของทับทิม (http://www.phytochemicals.info) สารพฤกษเคมีของทับทิมมีสาร ellagic acid ที่มีคุณสมบัติพิเศษเฉพาะอีกด้วย คือ ป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลท (ultraviolet) (Yoshimura, et al., 2005) ป้องกันศัตรูพืช (Kachhwaha, et al., 2006; Mehrabdi, et al., 2011; Abo-Moch, et al., 1010) และยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ผลิตสารพิษ aflatoxin (Hanaboripat, 2011) สาร ellagitannin จากทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Seeram, et al., 2007)

สารพฤกษเคมีมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ในสิ่งมีชีวิต สารเหล่านั้นเรียกว่า สารต้านอ็ อกซิแดนซ์ (antioxidants) พืชต่างๆ รวมทั้งทับทิมสังเคราะห์ antioxidants เพื่อป้องกันพืชจากอันตรายที่เกิดในสิ่งแวดล้อมของสังคมสมัยใหม่ เช่น มลพิษ ควันบุหรี่ สารกันอาหารเสีย (food additives) สารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช ซึ่งเป็นสาเหตุทำลายเซลล์ได้ถึงระดับส่วนประกอบภายในเซลล์ รวมทั้งทำลาย DNA/RNA อันสาเหตุทำให้เกิดมะเร็ง น้ำทับทิมมี antioxidants ปริมาณมากที่สุดในกลุ่มเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่วางขายในประเทศสหรัฐอเมริกา (Seeram, et al., 2008) สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดทับทิมก็มีกำลัง antioxidant สูงเช่นกัน (Singh, Murthy, and Jayaprakasha, 2002) มีการทดลองใช้ผงสกัดเปลือกผลและเมล็ดทับทิม พบว่าสามารถลด lipid oxidation ในพายไส้เนื้อแพะ และ เนื้อแพะดิบบดระหว่างการเก็บในตู้เย็น (Devatkai, Narsaiah and

Borah, 2010; Devatkai and Naveena, 2010) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของน้ำเมล็ดทับทิมต่อการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (chromosome aberration) ในแบคทีเรียและเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน แต่ไม่พบพิษ แม้ที่ปริมาณสูงมาก (Negi, Jayaprakasha and Jena, 2003; Meerts, et al., 2009) และ สารสกัดดอกทับทิมก็ไม่มีพิษต่อตับ (Kaur, et al., 2006)

3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสารสกัดทับทิมโดยวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (total phenolic compounds - TPC) และปริมาณเฟลโวนอยส์ (flavonoids content - FT) ศึกษาคุณสมบัติต้านอ็อกซิเดชั่น (antioxidant activity) และศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 สารเคมี

Folin-Ciocalteau reagent และ gallic acid ซื้อจาก Fluka, Switzerland; catechin (CA), epigallocatechin-3-gallate (EGCG), ascorbic acid (AA), 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), และ linoleic acid และสารเคมีเกรดวิเคราะห์อื่นๆ ซื้อจาก Sigma-Aldrich, St. Louis, USA., กุ้งฝอย Brine shrimp *Artemia salina* L. ซื้อจากร้านขายปลาสวยงามทั่วไปในนครราชสีมา เกลือน้ำทะเลซื้อจาก Mariscience International Co. Ltd., ประเทศไทย, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nutrient Mixture F-12), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin และ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ซื้อจาก Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, U.S.A.,

3.3.2 การเตรียมสารสกัดทับทิม

ทับทิมจากสวนผลไม้ในอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และจำแนกสายพันธุ์ที่กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร Herbarium No. 080252 ล้างทำความสะอาดผลทับทิม แยกเปลือก เมล็ด และ น้ำ อบเปลือกและเมล็ดในตู้อบแบบเป่าลมร้อน บ ดให้เป็นผง และ แยกเศษด้วยตะแกรงรูขนาด 40 mesh แล้วเก็บตัวอย่างที่ -20°C เพื่อใช้ภายหลัง สกัดทับทิมโดยใช้ผงทับทิม 50 กรัม ในสารละลาย 500 ml ซึ่งคือ น้ำกลั่น หรือ 70% ethanol สกัดใน Soxhlet extractor นาน 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ระเหยสารสกัด ทำให้แห้งเป็นผงด้วย lyophilizer ที่ -80°C ทำละลายผงสกัดในสารทำละลายเดิมเมื่อใช้สารสกัดในการทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds - TPC)

วิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Singleton, Orthofer, and Lameula-Raventos, 1999) ผสมตัวอย่าง 100 µl กับ 2 ml ของ 2% สารละลาย sodium carbonate ซึ่งมี 100 µl Folin-Ciocalteu reagent บ่ม 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน แสดงปริมาณ TPC เป็น µg gallic acid quivalent (GAE)/mg ตัวอย่าง โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$Absorbance = (0.0046 \times GA) + 0.0885, \quad R^2 = 0.9964$$

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารเฟลโวนอยส์ (Flavonoids content – FC)

วิเคราะห์ปริมาณ flavonoids content โดยวิธีของ Jia, Tang, and Wu (1999) และ Liu *et al*. (2002). สารสกัด 250 µl ผสมกับ น้ำ 1.25 ml และ 75 µl ของ 5% NaN_2O บ่ม 6 นาที เติม 150 µl ของ 10% $AlCl_3$ บ่ม 5 นาที แล้วเติม 0.5 ml ของ 1 M NaOH เติมน้ำให้ได้ถึง 2.5 ml วัดการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน แสดงปริมาณ FC เป็น µg catechin equivalent (CAE)/µg ตัวอย่าง โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$Absorbance = (0.0039 \times CA) + 0.0388, \quad R^2 = 0.9999$$

3.3.5 การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging)

วิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay (Sanchez-Moreno, et al., 2003) สารสกัด 50 µl ผสมกับ 1.95 ml DPPH reagent ตั้งไว้ในที่มืด 45 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ใช้ ascorbic acid (AA) เป็นสารควบคุมมาตรฐาน ใช้ catechin (CA) และ epigallocatechin-3-gallate (EGCG) เป็นสารควบคุมเชิงบวก แสดงปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระเป็น µg AA equivalent (AAE)/µg ตัวอย่าง คำนวณการกำจัดอนุมูลอิสระดังนี้

$$Radical\ scavenging\ activity\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] x\,100$$

3.3.6 การวิเคราะห์พลังรีดิวส์ต้านอนุมูลเหล็ก (Ferric reducing antioxidant power assay, FRAP)

วิเคราะห์พลัง antioxidation ด้วย Ferric reducing antioxidant power assay ตามวิธี ซึ่งอธิบายโดย Benzie and Strain (1996) FRAP reagent เตรียมสด ประกอบด้วย 5 ml ของ 10 mM tripyridyltriazine ใน 40 mM HCl, 5 ml ของ 20 mM ferric chloride ($FeCl_3$) และ 50 ml ของ 0.1 M acetate buffer, pH 3.6 อุ่น FRAP reagent ที่ 37°C 30 นาที แล้วผสมสารสกัด 150 µl กับ 2.9 ml FRAP reagent บ่มที่ 37°C 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 nm ใช้ AA เป็นสารมาตรฐานและเตรียม calibration curve ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับเปอร์เซ็นต์ reducing power ability ของ AA

$$OD = [0.0091 \times (percent)] + 0.2679, \quad R^2 = 0.9995$$

3.3.7 การวิเคราะห์การยับยั้งการสลายไขมัน (Lipid peroxidation inhibition/Ferric thiocyanate assay (FTC)

Ferric thiocyanate assay ตามวิธีที่อธิบายโดย Huang et al. (2006) ผสม 1 µl สารสกัดซึ่งทำละลายใน 99.5% ethanol กับ 1.5 ml 2.51% linoleic acid ละลายใน 99.5% ethanol 2.5 ml 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 ตั้งสารผสมในที่มืด แบ่งสารผสมนี้ 0.5 ml เติม 4.9 ml 75% ethanol และ50 µl 30% ammonium thiocyanate (NH_4SCN) บ่ม 3 นาที แล้วเติม 50 µl 20 nM ferrous chloride ($FeCl_2$) ใน 3.5% HCl วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm ทุก 24 ชั่วโมงหลังค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุมสูงสุด ใช้ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT), CA, และ EGCG เป็นสารควบคุมเชิงบวก คำนวณการยับยั้งการสลายไขมัน (lipid peroxidation inhibition - LPI) ดังนี้

$$Lipid\ peroxidative\ inhibition\ (\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}\right] x100$$

A_0 คือ absorbance ของสารควบคุม

A_1 คือ absorbance ของสารตัวอย่าง

A_2 คือ absorbance ไม่มี potassium thiocyanate solution

3.3.8 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย Brine shrimp lethality assay (BSLA)

เพาะกุ้งฝอย *Artemia salina* L. ในน้ำทะเลเทียม pH 9.0 โดยปรับเทคนิคจาก Soris et al. (1993) ใช้กล่องพลาสติกซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วนไม่เท่ากัน กั้นด้วยแผ่นซึ่งมีรูเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 mm บรรจุน้ำเกลือ ใส่ไข่กุ้งในส่วนเล็กกว่าของกล่อง ปิดฝา ส่องไฟที่ส่วนใหญ่กว่าของกล่อง (Figure 3.1) วางกล่องไว้ที่อุณหภูมิ 28°C ให้ตัวอ่อนกุ้งเจริญพัฒนา และเก็บตัวอ่อนอายุ 48 ชั่วโมงสำหรับการทดลอง

สารสกัดหลายความเข้มข้นใน 800 µl ใส่ใน 24-well plate ใส่ตัวอ่อนกุ้งฝอย (nauplii larva) 10 ตัว ซึ่งงดอาหารแล้ว เติมน้ำเกลือให้ได้ถึง 1 ml ปิดฝา plate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใน 24 ชั่วโมงสังเกตและนับตัวอ่อนที่ตายหรือมีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณการตายดังนี้

$$Mortality(\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_1}\right] x\,100$$

A_1 คือ จำนวนควบคุมมีชีวิต ไม่มีสารตัวอย่าง

A_2 คือ จำนวนตาย มีสารตัวอย่าง

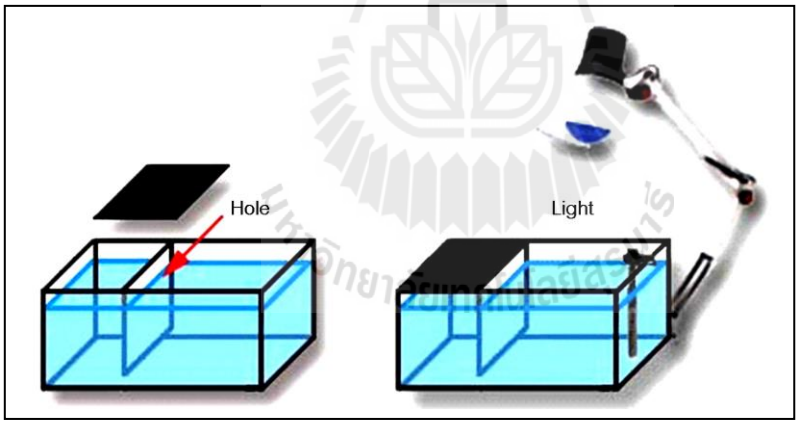

Figure 3.1 The two-chamber container with a perforate divider and light. The smaller chamber was for brine shrimp egg hatching. The larger chamber was for the nauplii, migrated toward the light.

3.3.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7

เพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7ซึ่งเป็น human breast cancer cell line (อนุเคราะห์จาก R.P. Shiu, Dubik and Shiu, 1992) ในอาหารเลี้ยง complete medium (DMEM/F-12) เสริมด้วย 10% fetal bovine serum

(FBS) และ 1% penicillin/streptomycin บ่มในตู้บ่มที่มี 5% CO_2 37°C เวลา 2-3 วันให้เซลล์จนเกือบเต็มจานเลี้ยง (confluent) ก่อนการทดลอง

3.3.10 **การวิเคราะห์การเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell Proliferation Assay)**

MCF-7 จำนวน 10,000 cells/well ใน 100 µl ใน 96-well plate บ่ม 24 ชม. ใส่สารสกัดหลายความเข้มข้น บ่มต่ออีก 24 ชม. ใส่ 100 µl ของ 5 µg/µl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ใน phosphate-buffered saline, pH 7.4 บ่ม 4 ชม. ดูดสารอาหารออก เติม 50 µl 100% DMSO เขย่าถาดเลี้ยงเบาๆ จนตะกอน formazan ละลาย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยมี reference wavelength ที่ 630 nm. วัดด้วย Microplate Reader ค่าดูดกลืนแสงลดลง แสดงการลดปริมาณเซลล์มีชีวิต (Okonogi, et al., 2007) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ใช้ DMSO เป็นตัวควบคุม คำนวณการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ดังสมการข้างล่าง และประสิทธิภาพเป็นค่า LC_{50} (median lethal concentration) โดย linear regression analysis

$$Antiproliferative activity(\%) = \left[1-\frac{(A_1-A_2)}{(A_0-A_2)}\right] x100$$

A_0 คือค่าดูดกลืนแสงควบคุม

A_1 คือค่าดูดกลืนแสงทดลอง

A_2 คือค่าดูดกลืนแสงทดลองที่ไม่มีเซลล์

3.3.11 การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย ANOVA โดย least significant test ที่ระดับนัยสำคัญ ที่ $P < 0.01$ และ 0.05. สำหรับการเปรียบเทียบเชิงเดี่ยว (single comparisons) และโดย Student's *t*-test ที่นัยสำคัญ $P < 0.05$. สำหรับเปรียบเทียบเชิงซ้อน (multiple comparisons แสดงข้อมูลเป็น mean ± SE, n = 4

3.4 ผลการทดลองและ วิจารณ์ผล

3.4.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ เฟลโวนอยส์ในทับทิม

สารพฤกษเคมีของผลทับทิม พบว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิมสกัดด้วยเอธานอลและน้ำ (PPE/e, PPE/w) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds (TPC)) และ เฟลโวนอยส์ (flavonoids content (FC)) มากกว่าสารสกัดเมล็ดทับทิมสกัดด้วยเอธานอลและน้ำ (PSE/e, PSE/w) น้ำ

ทับทิม (PJ) มี TPC และ FT น้อยที่สุด นั่นคือ PPE > PSE > PJ ($p < 0.05$) (Table 3.1) ในสารสกัดทับทิมและน้ำทับทิมมี TPC มากกว่า FT ซึ่ง เรียงตามลำดับดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ

ปริมาณ TPC ดังนี้ 451.96 ± 4.29, 380.54 ± 5.87, 77.93 ± 1.62, 51.58 ± 0.85, 2.55 ± 0.42 µg GAE/mg ของสารสกัดตามลำดับ และ ปริมาณ FT ดังนี้ 37.61 ± 1.44, 26.05 ± 0.93, 16.66 ± 0.47, 10.55 ± 0.14, 0.24 ± 0.03 µg CAE/mg ของสารสกัดตามลำดับ

Table 3.1 Total phenolics compounds and flavonoids content of ethanolic and water extracts of pomegranate peel (PPE/e, PPE/w) and seeds (PSE/e, PSE/w) and juice (PJ). Data expressed as mean ± SE, n = 4.

Extract	Total Phenolics µg GAE/mg	Flavonoids µg CAE/mg
PPE/e	451.96 ± 4.29[a]	37.61 ± 1.44[a,a]
PPE/w	380.54 ± 5.87[a]	26.05 ± 0.93[b,b]
PSE/e	77.93 ± 1.62[b]	16.66 ± 0.47[c,a]
PSE/w	51.58 ± 0.85[b]	10.55 ± 0.14[d,b]
PJ	2.55 ± 0.42[c]	0.24 ± 0.03[e]

GAE, gallic acid equivalents; CAE, catechin equivalents.
Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

จะเห็นได้ว่าสารสกัดเปลือกทับทิมมี TPC และ FT มากกว่าสารสกัดเมล็ด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของ Sign et al. (2002) และการใช้สารทำละลายเอธานอลและน้ำในการสกัดเปลือก (PPE/e, PPE/w) ได้ปริมาณ TPC และ FT ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกันกับสารสกัดเมล็ด (PSE/e, PSE/w) ซึ่งแย้งกับรายงานว่า PPE/e มี TPC มากกว่า PPE/w มากอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าการสกัดด้วยเมธานอลให้สาร TPC ทั้งจากเปลือกและเมล็ดได้มากที่สุด (Sign et al., 2002) มีรายงานว่าสารสกัดเปลือกทับทิม (PPE) สกัดด้วย acetate ได้ TPC มากกว่าการสกัดด้วยสารละลายชนิดอื่น (Yasoubi, et al., 2007) และ เป็นแหล่งที่มี TPC มาก ซึ่งได้แก่ hydroxybenzoic acids (gallic acid and ellagic acid), ellagitannins (punicalin, punicalagin, pedunculagin, gallagic and ellagic acid ester of glucose), and anthocyanidins (delphinidin, cyanidin and pelargonidin) แต่ไม่พบมีใน PSE (Aviram et al., 2008) ใน PSE เป็นแหล่งของ fatty acids ซึ่งได้แก่ punicic acid, (linoleic acid, oleic acid, palmitic acid และ stearic acids (Schubert et al.,1999) และมี phytoestrogen (Lansky, 2000) ที่ไม่ใช่ steroid estrogens (estrone, estradiol

และtestosterone) (Choi et al., 2006) ส่วน PJ มี ellagitannins (punicalagin และ punicalin) มี ellagic acid และ anthocyanins (delphinidin, cyaniding และ pelargonidin) เพียงเล็กน้อย (Aviram et al., 2008)

Flavonoids ใน PPE มากกว่า PSE และ PJ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lansky and Newman (2007) flavonoids ใน PPE ได้แก่ anthocyanidins (Aviram et al., 2008), flavanone (naringenin), flavone (luteolin), และ flavonols (kaempferol และ quercetin) (Aslam, Lansky, and Varani, 2006) และ flavan-3-ols (flavan-3-ol, catechin, epicatechin และ epigallocatechin 3-gallate) (de Pascual-Teresa et al., 2000) ดังนั้นทับทิมจึงเป็นแหล่งที่สำคัญของ polyphenolics และ phenolics ของพืชแหล่งหนึ่ง

3.4.2 การต้านอนุมูล (Antioxidation activities) ของผลิตภัณฑ์ทับทิม

Free radical scavenging of DPPH$^{\cdot}$ by pomegranate products

สารสกัดเปลือกทับทิม PPE มีความสามารถในการกำจัด DPPH radicals (DPPH$^{\cdot}$) ได้ดี และได้ใกล้เคียงกับ catechin ทั้ง PPE/e และ PPE/w สารสกัดเมล็ดกำจัด DPPH$^{\cdot}$ ได้น้อย และน้ำทับทิมกำจัด DPPH$^{\cdot}$ ได้น้อยที่สุด (Table 3.2)

พิจารณาจากค่า IC_{50} (median inhibition concentration) ประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ทับทิมเรียงดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ ซึ่งมี IC_{50} 24 ชม. เท่ากับ 121.65 ± 2.66; 151.78 ± 2.70; 1,324.35 ± 16.89; 2,577.53 ± 44.06 และ 9,925.20 ± 1,116.80 µg/ml ประสิทธิภาพกำจัด DPPH$^{\cdot}$ ของ PPE/e 1.09 เท่าน้อยกว่าประสิทธิภาพของ CA (catechin) แต่น้อยกว่าประสิทธิภาพของ EGCG (epigallocatechin-3-gallate) 1.87 เท่า ส่วนประสิทธิภาพของ PPE/w น้อยกว่าประสิทธิภาพของ CA 1.36 เท่า และน้อยกว่าประสิทธิภาพของ EGCG 2.33 เท่า

ประสิทธิภาพของ PSE/e, PSE/w และ PJ น้อยกว่าประสิทธิภาพของ CA 11.89, 23.14 และ 89.10 เท่าตามลำดับ และ น้อยกว่าประสิทธิภาพของ EGCG 20.32, 39.55 และ 152.30 เท่าตามลำดับ

ประสิทธิภาพกำจัดอนุมูล DPPH$^{\cdot}$, IC_{50}, สัมพันธ์กับปริมาณ TPC และ FT ของสารสกัดและน้ำทับทิมอยู่ในเกรดดี ความสัมพันธ์ระหว่าง DPPH-TPC มีค่า $R^2 = 0.832$, $p < 0.05$ และ ความสัมพันธ์ระหว่าง DPPH-FT มีค่า $R^2 = 0.806$, $p < 0.05$ (Figure 3.2)

Table 3.2 Scavenging activity of DPPH radicals by pomegranate peel and seed extracts, and juice. Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.

Extract	Conc. (µg/ml)	Scavenging of DPPH radicals	
		Activity (%)	IC_{50} (µg/ml), 24 h
PPE/e	10	5.06 ± 0.83	
	25	11.75 ± 0.71	
	50	24.48 ± 0.81	
	100	45.66 ± 1.63	
	200	77.88 ± 1.13	121.65 ± 2.66[a]
PPE/w	10	4.47 ± 0.39	
	25	9.81 ± 0.64	
	50	18.53 ± 0.78	
	100	35.18 ± 0.75	
	200	64.47 ± 1.02	151.78 ± 2.70[a]
PSE/e	100	5.51 ± 1.13	
	200	7.64 ± 1.13	
	400	17.61 ± 0.74	
	1,000	40.73 ± 1.46	
	2,000	73.31 ± 1.01	1,324.35 ± 16.89[b]
PSE/w	200	5.85 ± 0.59	
	400	10.75 ± 0.70	
	1,000	24.10 ± 0.65	
	2,000	43.60 ± 1.46	
	4,000	73.02 ± 1.09	2,577.53 ± 44.06[c]
PJ	2,000	14.68 ± 1.49	
	4,000	26.32 ± 3.94	
	8,000	49.82 ± 7.38	
	16,000	72.97 ± 4.59	9,925.20 ± 1,116.80[c]
CA	10	6.95 ± 0.38	
	100	49.27 ± 1.60	111.39 ± 0.73
EGCG	10	9.98 ± 0.65	
	100	73.99 ± 0.76	65.17 ± 0.34

DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging activity; PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; PJ, pomegranate juice; CA, catechin; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; IC_{50}, median inhibition concentration.
Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

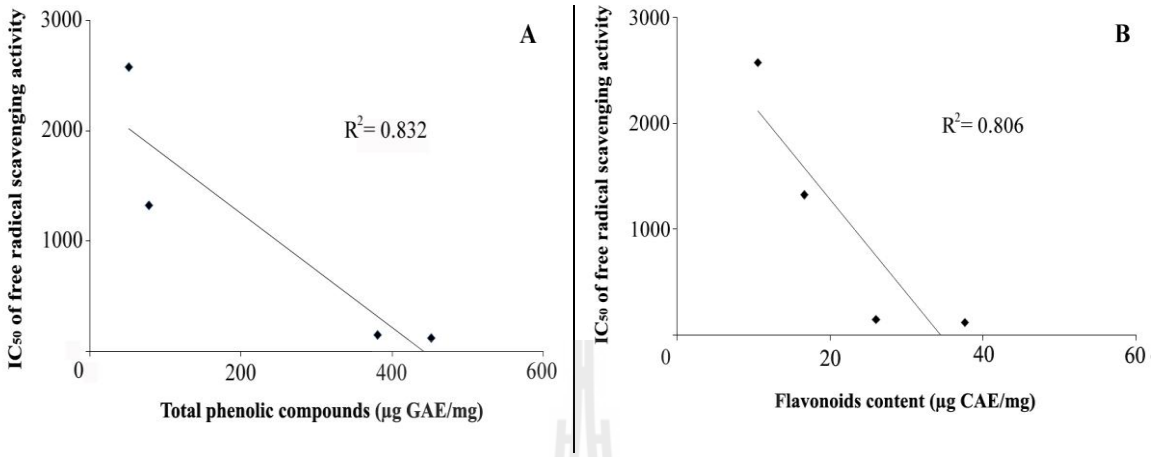

Figure 3.2 Relationships between the efficacy of scavenging of DPPH radicals, IC_{50}, by pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของ PPE/e และ PPE/w ใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับของสาร antioxidants มาตรฐาน CA และ EGCG ส่วนของ PSE/e และ PSE/w มี FRAP ปานกลาง PJ มี FRAP น้อยที่สุด (Table 3.3) ประสิทธิภาพของ FRAP ของผลิตภัณฑ์ทับทิมเรียงดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 24 ชม. ดังนี้ 49.07 ± 1.53; 64.63 ± 1.23; 512.54 ± 15.05; 753.17 ± 17.66 และ 4,615.94 ± 28.90 µg/ml

Ferric reducing antioxidant power ของ PPE/e, PPE/w, PSE/e, PSE/w และ PJ ต่ำกว่า ของ CA 0.84, 1.11, 8.78, 12.91 และ79.09 เท่าตามลำดับ และ ต่ำกว่าของ EGCG 1.48, 1.95, 15.46, 22.71 และ 139.20 เท่า ตามลำดับ

ประสิทธิภาพของพลังรีดิวส์ โดย FRAP, IC_{50}, สัมพันธ์กับปริมาณ TPC และ FT ของสารสกัดและน้ำทับทิมอยู่ในเกรดดีมากและดีตามลำดับ ความสัมพันธ์ระหว่าง FRAP-TPC มีค่า $R^2 = 0.931$, $p < 0.05$ และ ความสัมพันธ์ระหว่าง FRAP-FT มีค่า $R^2 = 0.850$, $p < 0.05$ (Figure 3.3)

Table 3.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of pomegranate extracts and juice.

Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.

Extract	Conc. (µg/ml)	Ferric reducing antioxidant power	
		Activity (%)	IC_{50} (µg/ml), 24 h
PPE/e	25	25.84 ± 0.83	
	50	53.17 ± 1.97	
	100	97.37 ± 0.38	49.07 ± 1.53[a]
PPE/w	25	21.72 ± 0.55	
	50	41.41 ± 0.85	
	100	78.86 ± 0.99	64.63 ± 1.23[a]
PSE/e	200	21.91 ± 0.78	
	400	43.31 ± 0.90	
	1,000	96.99 ± 3.02	512.54 ± 15.05[b]
PSE/w	200	14.30 ± 0.16	
	400	29.27 ± 0.29	
	1,000	69.32 ± 0.53	753.17 ± 17.66[c]
PJ	2,000	22.06 ± 0.68	
	4,000	44.26 ± 0.57	
	8,000	86.38 ± 0.67	4,615.94 ± 28.90[d]
CA	50	43.53 ± 2.91	58.36 ± 4.02
EGCG	50	75.87 ± 2.62	33.16 ± 1.68

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract; PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; PJ, pomegranate juice; CA, catechin; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; IC_{50}, median inhibition concentration.

Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

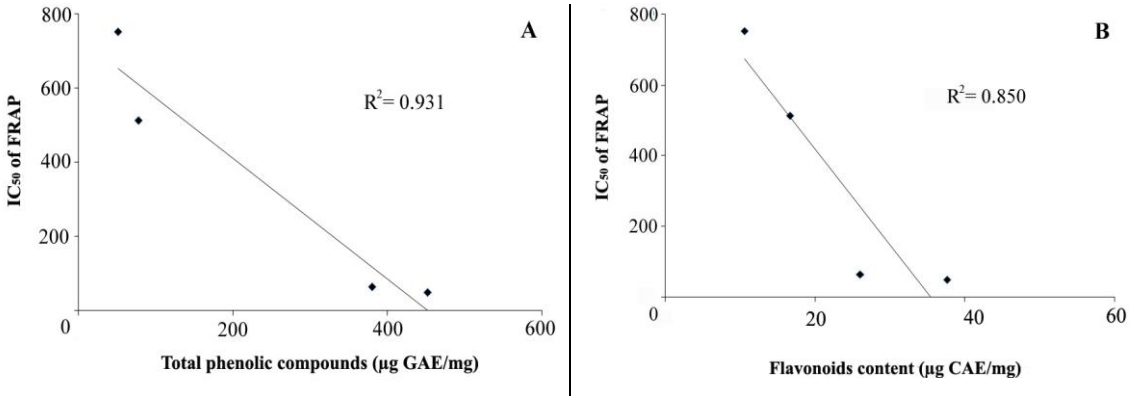

Figure 3.3 Relationships between ferric reducing antioxidant power (FRAP), IC_{50}, of pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).

การวิเคราะห์ FRAP ในปฏิกิริยาเปลี่ยน ferric ใน ferric-tripyridyltriazine complex ให้เป็น ferrous ของสารสกัดเป็น การระบุ ชี้ความสามารถในการรีดิวส์ (reduction) ของผลิตภัณฑ์ทับทิม ซึ่งในการวิเคราะห์นี้ พบว่าสารสกัดเปลือกทับทิม มี reducing power ดีมากเท่ากับของ CA และใกล้เคียงกับ EGCG สาร antioxidant มาตรฐาน การที่ในทับทิมมี TPC และ FT ปริมาณมากซึ่งโครงสร้างมีกลุ่ม hydroxyl (-OH) ให้ H และสลายปฏิกิริยาลูกโซ่อนุมูลอิสระ การทดลองสอดคล้องกับรายงานว่าน้ำที่ได้จากการคั่นผลทับทิม และสารสกัด PPE เป็น antioxidant ที่มี reducing power สูงมาก (Gil, et al., 2000; Guo, et al., 2003) การศึกษานี้แสดงว่า ทับทิมโดยเฉพาะส่วนเปลือกของผลมีสารที่มีศักยภาพเป็น antioxidant ที่สูงมาก

Lipid peroxidation inhibition (LPI) / Ferric thiocyanate (FTC)

สารสกัดเปลือกของผลทับทิม PPE สามารถยับยั้งการสลายไขมันได้มากที่สุด สารสกัดเมล็ดยับยั้งได้ปานกลาง และน้ำทับทิมยับยั้งได้น้อยที่สุด ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทับทิมเรียงดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.04 ± 1.95; 22.34 ± 2.11; 166.49 ± 20.38; 201.82 ± 11.37 และ 688.87 ± 44.03 µg/ml ตามลำดับ (Table 3.4)

จะสังเกตเห็นว่าศักยภาพ LPI ของสารสกัดทับทิมได้น้อยกว่าสาร antioxidant สังเคราะห์ BHA (3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole) และ BHT (butylated hydroxyl toluene) ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บอาหารให้นานขึ้น (Naveena, et al., 2008; Iqbal, et al., 2008) นอกจากนี้ประสิทธิภาพ

การยับยั้งการสลายของไขมัน LPI IC_{50}, ของผลิตภัณฑ์ทับทิมก็สอดคล้องสัมพันธ์ดีมากกับปริมาณ TPC และ FT โดยความสัมพันธ์ของ LPI IC_{50} กับ TPC มีค่า $R^2 = 0.978$, $p < 0.05$ และ ความสัมพันธ์ของ LPI IC_{50} กับ FT น้อยกว่า มีค่า $R^2 = 0.870$, $p < 0.05$ (Figure 3.4)

Table 3.4 Lipid peroxidation inhibition by FTC of pomegranate extracts and juice. Data expressed as mean ± SE, n = 4, and median inhibition concentration, IC_{50}, 24 h.

Extract	Conc. (µg/ml)	Lipid peroxidation inhibition	
		Activity (%)	IC_{50} (µg/ml), 24 h
PPE/e	5	7.47 ± 1.99	
	10	40.32 ± 6.02	
	25	57.20 ± 2.68	
	50	65.65 ± 1.48	18.04 ± 1.95[a]
PPE/w	5	3.19 ± 1.03	
	10	28.40 ± 3.78	
	25	53.51 ± 3.26	
	50	60.68 ± 1.58	22.34 ± 2.11[a]
PSE/e	100	38.32 ± 6.57	
	200	50.93 ± 2.90	
	400	82.52 ± 2.46	
	1,000	-	166.49 ± 20.38[b]
PSE/w	100	28.22 ± 4.97	
	200	46.27 ± 2.72	
	400	77.00 ± 2.48	
	1,000	-	201.82 ± 11.37[b]
PJ	100	3.58 ± 0.38	
	250	29.62 ± 4.21	
	1,000	57.55 ± 1.29	688.87 ± 44.03[c]
BHA	10	57.95 ± 1.15	5.97 ± 0.39
BHT	10	59.57 ± 1.43	5.86 ± 0.17
CA	10	58.51 ± 0.19	7.38 ± 0.11
EGCG	10	61.33 ± 1.26	6.89 ± 0.39

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract;
PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract; PJ, pomegranate juice; BHA, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole; BHT, butylated hydroxyl toluene;
CA, catechin; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; IC_{50} median inhibition concentration.
Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

การทดลองนี้แสดงว่าผลิตภัณฑ์ทับทิมมีคุณสมบัติในการลด peroxyl radicals ซึ่งเป็นผลจากการสลายไขมันในกระบวนการ lipid peroxidation (LPO) (Halliwell and Chirico, 1993) นั่นคือผลิตภัณฑ์ทับทิมทั้งจากเปลือกผล เมล็ดและน้ำทับทิมสามารถยับยั้ง LPO หรือลดอนุมูลในเซลล์ ทำให้นำผลิตภัณฑ์ทับทิมไปใช้ในการป้องกันและรักษาอาการได้หลายอาการ เช่น ลดการจับกันของเกล็ดเลือด การแข็งตัวของหลอดเลือด การอุดตันของหลอดเลือด ความดันเลือด (Aviram, et al., 2000; Aviram and Dornfeld, 2001; Aviram, et al., 2000; Aviram, et al., 2004) เบาหวาน (Bagri, 2008) และป้องกันตับจากผลที่เกิดการสลายสารพิษ (Celik, Temur and Isik, 2009) และป้องกันหัวใจจากสารพิษ (Mohammad, et al., 2011)

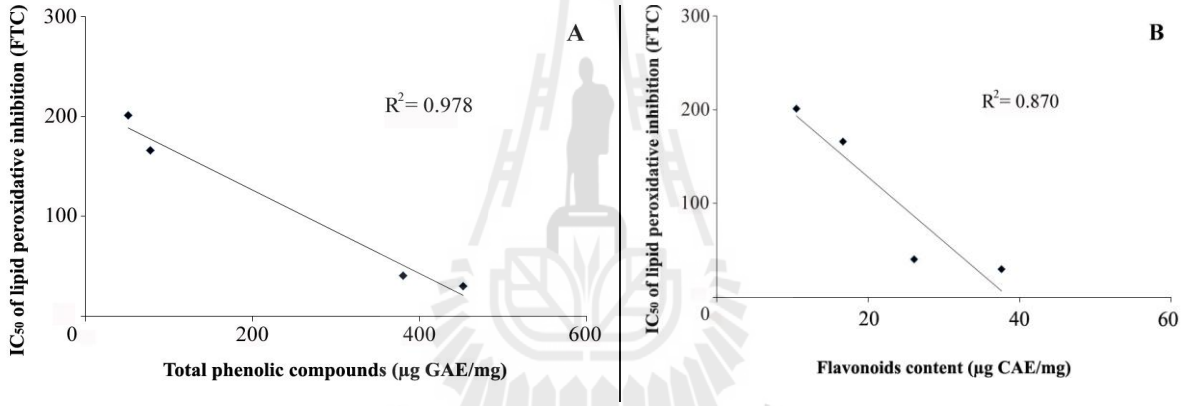

Figure 3.4 Relationships between lipid peroxidation inhibition (FCT), IC_{50}, of pomegranate products and total phenolic compounds (A), and flavonoids content (B).

3.4.3 ความเป็นพิษระดับเซลล์ (Cytotoxicity) ของทับทิม

Cytotoxicity ต่อกุ้งฝอย *Artemia salina* L.

การวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบพิษของผลิตภัณฑ์ทับทิมต่อเซลล์ในระดับสิ่งมีชีวิต โดยใช้กุ้งฝอย *Artemia salina* (Brine shrimp lethality assay – BSLA) เป็นต้นแบบ เนื่องจาก *S. salina* มีเอนไซม์ในการสังเคราะห์ RNA เหมือนเอนไซม์ของคน BSLA นิยมใช้ทดสอบพิษจากพืช เพราะสะดวก ค่าใช้จ่ายไม่มาก และมีประสิทธิภาพ (Ohno, et al., 1997) สารสกัดจากเปลือก PPE และเมล็ด PSE ของทับทิมไม่มีความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และแสดงพิษที่ความเข้มข้นสูงมาก ส่วนน้ำทับทิมแสดงพิษที่ความเข้มข้นสูงมาก (Table 3.5) PPE/e และ PSE/w ที่ความเข้มข้น $\leq$ 1,000 µg/mlไม่มีพิษ และแสดงพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ที่ LC_{50} 24 ชม. เท่ากับ 1,206.98 ± 12.73 และ 1,294.88 ± 61.28 µg/ml ตามลำดับ

PPE/w และ PSE/e แสดงความเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงกว่าประมาณ 2 เท่า คือที่ความเข้มข้น $>$ 1,500 µg/ml LC_{50} ของ PPE/w เท่ากับ 1,743.31 ± 20.17 µg/ml และ LC_{50}ของ PSE/e เท่ากับ 2,375.28 ± 69.54 µg/ml ผลความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ทับทิมทั้งหมดที่ LC_{95} 24 ชม. คล้ายกับที่ LC_{50} ที่ 24 ชม. แต่ในระดับสูงกว่าตามสัดส่วน (ประมาณ 2 เท่า) ความเป็นพิษที่ LC_{95} เรียงลำดับดังนี้ PPE/e $>$ PPE/w $>$ PSE/w $>$ PSE/e $>$ PJ ค่า LC_{95} คือ 2,017.07 ± 83.15; 2,209.13 ± 44.26; 2,693.63 ± 82.26; 4,165.91 ± 100.37; และ 7,399.81 ± 99.67 µg/ml ตามลำดับ

สรุปได้ว่าสารสกัดเปลือก เมล็ดทับทิมและน้ำทับทิมไม่มีความเป็นพิษที่ความเข้มต่ำกว่า mg/ml ต่อสัตว์มีชีวิตซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงาน (Vidal, et al., 2003; Patel, et al., 2008; Meerts et al., 2009) และสอดคล้องกับการประเมินพิษของพืชด้วย BSLA ที่ระบุว่า ถ้า LC_{50} $>$ 1,000 µg/ml ถือว่าไม่มีพิษ (Meyer, et al., 1982)

Table 3.5. Cytotoxicity of the extracts of pomegranate peel and seeds, and juice as assayed by brine shrimp lethality (BSLA).

Extract	Conc. (µg/ml)	Mortality (%)	LC_{50} (µg/ml)	LC_{95}(µg/ml)
PPE/e	500	2.50 ± 1.02		
	750	5.00 ± 1.02		
	1,000	35.63 ± 2.13		
	1,250	52.50 ± 2.28	1,206.98 ± 12.73[a]	2,017.07 ± 83.15[aa]
	1,500	73.13 ± 2.13	(1,166.46-1,247.50)	(1,752.45-2,281.68)
PPE/w	500	1.88 ± 1.20		
	750	3.13 ± 0.63		
	1,000	3.75 ± 0.72		
	1,250	5.63 ± 1.20		
	1,500	18.13 ± 1.20	1,743.31 ± 20.17[b]	2,209.13 ± 44.26[aa]
	1,750	51.25 ± 1.61	(1,679.14-1,807.49)	(2,068.28-2,349.97)
PSE/e	500	5.00 ± 1.77		
	750	5.63 ± 1.57		
	1,000	13.13 ± 4.93		
	1,500	17.50 ± 1.02		
	2,000	38.75 ± 5.15	2,375.28 ± 69.54[c]	4,165.91 ± 100.37[cc]
	2,500	57.50 ± 2.28	(2,153.97-2,596.59)	(3,846.50-4,485.31)
PSE/w	100	1.88 ± 0.63		
	500	18.13 ± 3.29		
	750	33.50 ± 3.34		
	1,000	45.00 ± 5.10		
	1,500	68.75 ± 1.61	1,294.88 ± 61.28[a]	2,693.63 ± 82.26[bb]
	2,000	76.25 ± 2.60	(1,099.86-1,489.89)	(2,431.85-2,955.40)
PJ	5,000	2.50 ± 1.02		
	5,500	5.00 ± 1.02		
	6,000	12.50 ± 2.28		
	6,500	42.50 ± 2.28	6,451.46 ± 52.32[d]	7,399.81 ± 99.67[dd]
	7,000	91.25 ± 3.89	(6,284.96-6,617.97)	(7,082.62-7,717.01)
DMSO	0.01%	1.25 ± 0.72		

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract;
PSE/e, pomegranate seed ethanolic extract; PSE/w, pomegranate seed water extract;
LC_{50} and LC_{95}, median lethal concentrations 50%, and 95% at 24 h.
Data expressed as mean ± SE, n = 4.
Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.01$).

Cytotoxicityt ต่อ MCF-7 cell proliferation

สารสกัดเปลือกทับทิมยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell antiproliferation) มะเร็งเต้านมของคน MCF-7 ตามความเข้มข้นและเวลาที่ได้รับสาร ประสิทธิภาพ cell antiproliferation ของ PPE/e มีค่า LC_{50} ที่ 12, 18 และ 24 ชม เท่ากับ 415.48 ± 24.92, 395.50 ± 15.53, และ 377.88 ± 13.14 µg/ml ตามลำดับ (Table 3.6) ในขณะที่ LC_{50} ของ PPE/w เท่ากับ 513.73 ± 23.19, 481.33 ± 21.79, และ 459.90 ± 15.90 µg/ml ตามลำดับ LC_{50} ของ cell antiproliferation ที่ 12, 18 และ 24 ชม. LC_{50} ของ PPE/e สูงกว่า ของ PPE/w เล็กน้อย คือประมาณ 1.2 เท่า

Table 3.6 Antiproliferation effect of pomegranate peel extracts on MCF-7 cells, assayed by MTT.

Extract		Conc. (µg/ml)	Cell proliferation activity (%)		
			12 h	18 h	24 h
PPE/e		300	83.46 ± 1.12	85.49 ± 1.77	80.37 ± 1.32
		400	58.73 ± 5.75	42.12 ± 4.97	31.49 ± 0.97
		500	22.11 ± 0.27	17.87 ± 0.50	16.52 ± 0.93
	LC_{50}	**(µg/ml)**	**415.48 ± 24.92[a]**	**395.50 ± 15.53[a]**	**377.88 ± 13.14[a]**
PPE/w		400	67.03 ± 1.50	62.93 ± 7.24	69.71 ± 1.08
		500	50.25 ± 2.42	39.67 ± 2.19	30.18 ± 4.36
		600	32.02 ± 5.97	23.66 ± 0.64	20.68 ± 1.28
	LC_{50}	**(µg/ml)**	**513.73 ± 23.19[b]**	**481.33 ± 21.79[b]**	**459.90 ± 15.90[b]**

PPE/e, pomegranate peel ethanolic extract; PPE/w, pomegranate peel water extract. Data are expressed as the mean ± SE, n = 4.

Numbers with different letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

ในการศึกษาความเป็นพิษของทับทิมต่อการยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับหลายรายงาน ผลิตภัณฑ์ทับทิมมีคุณสมบัติยับยั้ง proliferation ของเซลล์มะเร็งคนหลายชนิด สาร ellagitannins จากน้ำทับทิมยับยั้ง proliferation ของ HT-29 cells เซลล์มะเร็งลำไส้ของคน (Kasimsetty, et al., 2010) น้ำทับทิมหมักและสารสกัดเปลือกทับทิมยับยั้ง proliferation ของ HL-60 human promyelocytic leukemia cells เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของคน (Kawaii and Lansky, 2004) สาร

gallagic acid และ สาร ellagitannins จากผลทับทิมยับยั้ง aromatase activity ซึ่งเป็นเอนไซม์เปลี่ยน androgen ให้เป็น estrogen เป็นผลให้ยับยั้ง proliferation เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7aro ซึ่งถูกชักนำด้วย testosterone (Adams, et al., 2010) ในทำนองเดียวกัน สาร gallic acid สกัดจากเปลือกทับทิมชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งไปทำให้ A549 Human alveolar epithelial cells เซลล์มะเร็งปอดตายแบบ apoptosis (Elango, Balwas, and Padma, 2011) pomegranate extracts จากเปลือกและน้ำทับทิมยับยั้ง LNCaP cells เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งเป็น androgen-dependent และ LNCaP–AR และ DU-145 cells ซึ่งเป็น androgen-independent (Hong, Seeram and Heber, 2008) และ PANC-1 cells เซลล์มะเร็งตับอ่อน (Nair, et al., 2011) ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ทับทิม ทั้งเปลือก เมล็ดและน้ำ มี ศักยภาพสูงต่อ antiproliferation ต่อเซลล์มะเร็ง

3.4.4 โปรไฟล์ทางพิษวิทยาสำหรับการพัฒนาทางเภสัชวิทยา

Toxicological profile for pharmacological development

รายงานด้วยบทความตีพิมพ์ เรื่อง Antioxidant Activity and Bioefficacy of omegranate *Punica granatum* Linn. Peel and Seed Extracts ตีพิมพ์ในวารสาร Global Journal of Pharmacology 6 (2): 131-141, 2012; ISSN 1992-0075; DOI: 10.5829/idosi.gjp.2012.6.2.64226 (ดู รายงานหน้า 33-43)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 สรุปผลการทดลอง

สารสกัดทับทิมและน้ำทับทิมมีสารฟีนอลิก (TPC) และสารเฟลโวนอยส์ (FT) ปริมาณมาก และTPC มากกว่า FT ปริมาณของ TPC ดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ 451.96 ± 4.29; 380.54 ± 5.87; 77.93 ± 1.62; 51.58 ± 0.85 และ 2.55 ± 0.42 µg GAE/mg ของสารสกัดตามลำดับ และ ปริมาณ FT ดังนี้ 37.61 ± 1.44; 26.05 ± 0.93; 16.66 ± 0.47; 10.55 ± 0.14 และ 0.24 ± 0.03 µg CAE/mg ของสารสกัด ในทำนองเดียวกันผลการวิเคราะห์ antioxidant activity ทั้ง 3 วิธี คือ scavenging DPPH radicals, ferric antioxidant reducing power (FRAP) และ lipid peroxidation inhibition / ferric thiocyanate (FTC) พิจารณาจากค่า IC_{50} ที่ 24 ชม. พบว่า ประสิทธิภาพ ของ antioxidant activity ของ PPE มากกว่า PSE และ PJ และ ใกล้เคียงกับสาร antioxidants มาตรฐานคือ catechin (CA), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) และ สารสังเคราะห์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT) ปริมาณของ TPC และ FT ในแต่ละส่วนของทับทิมมีความสัมพันธ์ดี (correlation) กับคุณสมบัติ antioxidation และพบว่าทับทิมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์มีชีวิตปกติ ซึ่งใช้ *Artemia salina* เป็นต้นแบบทดลอง แต่มี ความเป็นพิษยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มาร์งสายพันธุ์ของคน ซึ่งใช้เซลล์มะเร็งเต้านมของคน MCF-7 เป็นต้นแบบในการทดลอง สารสกัดเปลือกและเมล็ดทับทิมแสดงโปร์ไฟล์ทางพิษวิทยาเพื่อใช้ในการพัฒนาทางเภสัชวิทยาและการรักษาโดยการวิคราะห์สถิติ ดังนี้ NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) เรียงดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w ซึ่งมีค่า 1,250, 1,000, 750, and 100 µg/ml ตามลำดับ LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) เรียงดังนี้ PPE/w = PSE/e > PPE/e > PSE/w มีค่า 1,500, 1,000, and 500 µg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MOS (margin of safety) และ TI (therapeutic index) ดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w โปร์ไฟล์ทางพิษวิทยาเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทับทิมทางเภสัชวิทยาและการรักษามะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

Abo-Moch, F., Saadi,I., Holland D., and Mansour, F. (2010).The potential of pomegranate peel and heartwood extracts as a source of new bioacaricides to control the carmine spider mite *Tetranychus cinnavarinus*. Israel J Plant Sci. 58: 13-17.

Adams, L.S., Zhang, Y., Seeram, N.P., Heber, D., and Chen, S. (2010). Pomegranate ellagitannin–derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. Cancer Prev Res. 3:108-113.

Aslam, M.N., Lansky, E. P. and Varani, J. (2006). Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix etalloproteinase-1 production in human skin cells. J Ethnopharmacol. 103: 311-318.

Aviram,M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., and Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. Am J Clin Nutr. 71: 1062-76.

Aviram, M. and Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. Atherosclerosis. 158: 195-198.

Aviram M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., and Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clinical Nutr. 23: 423-433.

Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Reddy, K. M., Ferreira, D. and Rosenblat, M. (2008). Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E^0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. J Agric Food Chem. 56: 1148-1157.

Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S. (2008). Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Food and Chem Toxicol. 47: 50–54.

Benzie, I.F.F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power the FRAP assay. Anal Biochem. 239: 70-76.

Celik, I., Temur, A., and Isik, I. (2009). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. Food and Chem Toxicol. 47:145–149

Choi, D.W., Kim, J.Y., Choi, S.H., Jung, H.S., Kim, J.H., Cho, Y.S., Kang, S.C., and Chang, S.Y.(2006). Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC-mass spectrometry. Food Chem. 96:562-571.

de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. J Agric Food Chem. 48: 5331-5337.

Devatkal, S.K., Narsaiah, K. and Borah, A. (2010). Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. Meat Sci. 85:155–159.

Devatkal, S.K. and Naveena, B.M. (2010). Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. Meat Sci. 85: 306–311

Elango, S., Balwas, R., Padma, V.V. (2011). Gallic acid isolated from pomegranate peel extract induces reactive oxygen species mediated apoptosis in A549 cell line. J. Cancer Therapy. 2: 638-645. doi:10.4236/jct.2011.25085

Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M. and Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. 48: 4581-4589.

Guo, C. J., Yang, J. J., Wei, J. Y., Li, Y. F., Xu, J. and Jiang, Y. G. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr Res. 23: 1719-1726.

Halliwell, B. and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 57(suppl): 715S-725S.

Hong, M.Y., Seeram, N.P., David Heber, D. (2008). Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells overexpressing the androgen receptor. J Nutr Biochem. 19: 848–855.

Huang, D. J., Chen, H. J., Hou, W. C., Lin, C. D. and Lin, Y. H. (2006). Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage root mucilage with antioxidant activities in vitro. Food Chem. 98: 774-781.

Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., and Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. Food Res Internat'l. 41: 194–200.

Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555-559.

Kachhwaha, N., Singhvi, P.M., Jain, M., and Mathur, M. (2006) Effect of certain indigenous plant extracts on ovipositional behaviour of *Oryzaephilus surinamensis* (Linn.) in stored cashew nuts. J App Ziil Res. 17: 209-211.

Kasimsetty, S.G., Dobroslawabialanska, Reddy, M.K., Ma, G., Khan, S.I., and Ferreira, D.. (2010). Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. J Agric Food Chem. 58: 2180–2187.

Kaur, G., Jabbar, Z., Athar,M., Sarwar Alam, M. (2006). *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and Chem Toxicol. 44:984–993.

Kawaii1, S. and Lansky, E.P. (2004). Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J Med Food 7: 13–18.

Lansky, E.P. (2000). Phytoestrogen supplements prepared from pomegranate material including pomegranate seeds. U.S. patent no. 6,060,063.

Lansky, E. P. and Newman, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol. 109: 177-206.

Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J. and Liu R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J Agric Food Chem. 50: 2926-2930.

Meerts , I.A.T.M., Verspeek-Rip , C.M., Buskens , C.A.F., Keizer, H.G., Bassaganya-Riera , J., Jouni , Z.E., van Huygevoort , A.H.B.M., van Otterdijk e F.M., van de Waar, E.J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. Food and Chem Toxicol. 47:1085–1092.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R.,Saadati, F., and Mahmudvand, M. (2011). α-Amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. J Agric Sci. 13: 1173-1182.

Mayer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45: 31-34.

Mohammad, H.F., Arvindkumar E, G., Subhash L, B., and Madhurima, D. (2011). Cardioprotective effect of whole fruit extract of pomegranate on doxorubicin-induced toxicity in rat. Pharmaceutical Biol. 4: 377-382.

Nair, V., Dai, Z., Khan, M., and Ciolino, H.P. (2011). Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. Anticancer Res. 31: 2699-2704.

Naveena, B.M., Sen, A.R., Vaithiyanathan, S., Babji, Y., and Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. Meat Sci. 80: 1304–1308

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chem. 80: 393–397.

Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Food Chem. 103: 839-846.

Ohno, Y., Kaneko, T., Inove, T., Morikawa, T., Yoshida, A., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Mumma, J., Akiyama, J., Hagaki, H., Ohkoshi, K., Okumura, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Kujima, H., Saijo, K., Sakamoto, K., Sugiura, S., Sunouchi, M., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Chiba, K., Nakamura, T., Matsukawa, K. and Matsushige, C. (1997). Interlaboratory validation of alternative methods to the eye irritation test for the safety evaluation of cosmetic ingredients: an overview of the plan and the results. Animal Alternatives, Welfare and Ethics. 27: 1155-1158.

Peta, C., Dadhaniya, P., Hingorani, L., and Soni, M.G. (2008). Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. Food Chem Toxicol. 46:2728–2735.

Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B. and Cano, M. P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. J Sci Food Agric. 83: 430-439.

Schubert, S. Y., Lansky, E. P. and Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J. Ethnopharmacol. 66: 11-17.

Seerama,, N.P., Adams, LS., Henning, S.M., Niua, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., and Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem. 16: 360-367.

Seerama,, N.P., Aronson, W., Zhang, Y., Henning, S.M., Moro, A., Ru-Polee, Sartippour, M., Harris, D., Rettig, M., Suchard,| M.A., Pantuck, A.J., Belldegrun, A.A. and Heber, D. (2007). Pomegranate Ellagitannin-Derived Metabolites Inhibit Prostate Cancer Growth and Localize to the Mouse Prostate Gland. J Agric Food Chem. 55:7732–7737.

Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., and Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. J Agric Food Chem. 56: 1415–1422.

Singh, R.P., Chidambara Murth, K. N. and Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models J Agric Food Chem. 50: 81-86.

Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lameula-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidations by mean of Folin-Ciocateu reagent. Methods Enzymol. 299: 152-178.

Solis, N. P., Wright, W. C., Anderson, M. M., Gupta, P. M. and Phillipson, D. J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medica. 59: 250-253.

Thanaboripat. D. (2011).Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. KMITL Sci Tech J. 11: 35-42.

Vidal, A., Fallarero, A., Peña, B.R., Medina, M.E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y., Vuorela, P.M. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. J Ethnopharmacol. 89: 295–300.

Yasoubi, P., Barzrgar, M., Sahari, M.A., and Azizi, M.H. (2007). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate *(Punica granatum* L.) Peel Extracts. J Agric Sci Technol. 9: 35-42.

Yoshimura, M., Watanabe, Y., Kasai, K., Yamakoshi, J., and Koga T. (2005). Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. Biosci Biotechnol Biochem. 69: 2368-2373.

http://www.healthfreedom.info/pomegranates_for_cancer_and_heart%20disease.htm

http://www.phytochemicals.info/plants/pomegranate.php

http://www.umm.edu/altmed/articles/pomegranate-002881.htm

American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences 3 (4): 250-258, 2011
ISSN 2079-2050
© IDOSI Publications, 2011

Protective Efficacy of Pomegranate *(Punica granatum* Linn., Punicaceae) Peel Ethanolic Extract on UVB-Irradiated Rat Skin

Jinnawat Manasathien, Sajeera Kupittayanant and Korakod Indrapichate

School of Biology, Institute of Science,
Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Abstract: Pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel ethanolic extract (PPE) contained substantial phenolics and flavonoids of 451.96 ± 4.29 µg GAE/mg and 37.61 ± 1.43 µg CAE/mg, respectively. PPE possessed marked antioxidant activities evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) with IC_{50} 51.51 ± 2.03 µg/ml, FRAP (ferric reducing antioxidant power) with IC_{50} 49.07 ± 1.53 µg/ml and FTC (ferric thiocyanate) with IC_{50} 61.43 ± 4.18 µg/ml. Its antioxidant capacity, using ascorbic acid (AA) equivalents, was similar to the known natural antioxidants, catechin (CA) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), but 2.9-3.5 fold less than the synthetic antioxidants, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxyl toluene (BHT). PPE topically applied on hairless rat skin for 30 min prior to UVB irradiation at 3xMED (minimal erythema dose = 0.07-0.08 J/cm^2) for 24 hrs, twice a week for one month. Propylene glycol was the vehicle control. PPE remarkably lessened the UVB-induced lesions on the skin. Topical pretreatments of PPE and EGCG at 8 mg/cm^2 were able to protect the skin against 3xMED UVB-induced erythema, epidermal thickness, sunburn cells and DNA fragmentation. The erythema was reduced 2.5 fold and the epidermal thickness was decreased 1.7 fold of the vehicles. The sunburn cells were 7.4 fold less than the vehicles. DNA fragmentation was very slightly occurred. These findings indicate that topical PPE prior to UVB irradiation is very effective in prevention the skin lesions and DNA damages. This also makes use of and was value added to the pomegranate peel.

Key words: Pomegranate Peel Ethanolic Extract % Antioxidant Activity % UVB Irradiation % Erythema % DNA Fragmentation

INTRODUCTION

Overexposure to UV radiation is a great concern of inducing sunburn formation and skin cancer. UVA (320-400 nm) and UVB (290-320 nm) cause oxidative damages to skin cells [1, 2]. UVA induces a variety of reactive oxygen species (ROS) inducing DNA, lipid and protein damages. UVB is responsible for erythema, inflammation, DNA damage and skin cancer [3, 4]. Acute exposure to UVB affects on keratinocytes producing sunburn formation on epidermis and inducing apoptosis [5] and hyperproliferation of epidermal cells [6]. Long-term and recurrent exposure to UV causes gradual deterioration of skin structure and function. Apparently, accumulation of DNA damages as results of the recurrent and acute DNA injuries and the effect of chronic inflammation [7] could ultimately lead to the development of skin cancers [8]. Protecting skin actinic damages by UV using topical sun block produced from plant products is now of interest.

Pomegranate (*Punica granatum* Linn.) has been used in many countries as traditional medicines, such as treatment of intestinal parasites [9] and Gram- negative bacteria [10]. Pomegranate pericarp exhibits antiviral activity [11]. Pomegranate bark, leaves, fruits and fruit rind are mild astringent, used to treat diarrhea, dysentery, hemorrhage and some fevers [12]. Recently, chemical constituents of pomegranate have been identified and found containing antioxidant property [13, 14]. Few studies reported that pomegranate fruit extract was able to suppress UV-induced skin pigmentation, when topically applied [15] or orally administration [16]. It also suppressed human epidermal keratinocyte damage [17] and inhibited skin tumorgenesis in CD1 mice [18]. There

Corresponding Author: Korakod Indrapichate, School of Biology, Institute of Science,
Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
Tel: +66-4422-4296, Fax: +66 4422 4633.

are few evidences of pomegranate peel on skin protection against UV irradiation. This study illustrated the protective effects of pomegranate peel ethanolic extract (PPE) against UVB irradiation on rat skin. The knowledge findings here could be useful for application of pomegranate peel to protect and heal UV-induced human skin damages.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Folin-Ciocalteau reagent and gallic acid were obtained from Fluka, Switzerland. Catechin (CA), epigallocatechin-3-gallate (EGCG), ascorbic acid (AA), 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and linoleic acid were purchased from Sigma-Aldrich, USA. Agarose was from Promega, Spain. Ethidium bromide was from Bio-Rad, USA. RNase A was purchased from Amresco®, USA. DNA ladder and Genomic DNA Extraction Kit were obtained from RBC Bioscience, USA. All other chemicals and solvents were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, USA. A UV light source (285-350 nm), Waldmann UV 109B equipped with UV21 lamp and Variocontrol spectroradiometer were from Waldmann (Villingen-Schwenningen, Germany).

Pomegranate Collection and Peel Extraction: Pomegranate fruits were purchased from local farms in Nakhon Ratchasima, Thailand. The fruits were cleaned and peeled. The peel was dried and ground to powder. The pomegranate peel powder was extracted in 70% ethanol in a Soxhlet extraction apparatus. The pomegranate peel ethanolic extract (PPE) was evaporated, lyophilized and kept at -20°C. The PPE power was re-dissolved in its original solvents for all experiments.

Determination of Total Phenolic Compounds: Total phenolic content (TPC) was measured by Folin-Ciocalteu method [19]. One hundred microliters of sample was mixed with 2 ml of 2% sodium carbonate and 100 µl Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu : methanol, 1:1, v/v) and incubated for 30 min. The absorbance was measured at 760 nm. Gallic acid was used as a standard. TPC content was expressed as mg of gallic acid equivalents per milligram of sample.

Determination of Flavonoid Content: Flavonoid content was quantified by a colorimetric method modified from Liu *et al*. [20]. Briefly, 250 µl of sample was mixed with 1.25 ml of dH_2O and 75 µl of 5% $NaNO_2$. After incubation for 6 min, 150 µl of 10% $AlCl_3.6H_2O$ was added and allowed to stand for 5 min. Five hundred microliters of 1 NaOH was added and the final volume was made up to 2.5 ml with dH_2O. The solution was well mixed and the absorbance was measured at 510 nm. The flavonoid content was calculated and expressed as micrograms of CA equivalents per milligram of the sample.

Free Radical Scavenging Activity: Antioxidant property was determined by free radical scavenging activity using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) method [21]. Sample solution of 50 µl was mixed with 1.95 ml of DPPH reagent. The mixture was kept in the dark for 45 min and then the absorbance was measured at 515 nm. CA and EGCG were used as standard controls. The free radical scavenging value was calculated using AA equivalents per µg of sample. The antioxidant activity of sample was defined as the amount of antioxidants necessary to reduce the initial $DPPH^{c}$ concentration by 50% (IC_{50}).

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay: The ferric reducing antioxidant power (FRAP) was estimated according to the method of Benzie and Strain [22]. Briefly, sample solution of 100 µl was mixed with 2.9 ml of fresh FRAP reagent, containing 100 mM acetate buffer, pH 3.6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) and 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ solution. The reaction was incubated at 37°C for 30 min and the absorbance was measured at 593 nm. CA and EGCG were used standard controls. The FRAP value was calculated and expressed as IC_{50} using AA equivalents per µg of sample.

Ferric Thiocyanate (FTC) Assay: Inhibition of lipid peroxidation was measured by ferric thiocyanate (FTC) method as described by Huang *et al*. [23]. One milliliter of sample, diluted in 99.5% ethanol, was mixed with 1.5 ml of 2.51% linoleic acid in 99.5% ethanol, 2.5 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 and kept at 40°C in the dark. Then, to 50 µl of this mixture was added to 4.9 ml of 75% ethanol and 50 µl of 30% ammonium thiocyanate. Precisely 3 min after the addition of 50 µl of 20 mM $FeCl_2$ in 3.5% HCl to the reaction mixture, the absorbance of red color of $Fe(SCN)_3$ was measured at 500 nm every 24 hrs until the day after the absorbance of the control reached its maximum. EGCG and the synthetic antioxdidants, BHA (3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole) and BHT (butylated hydroxyl toluene), were used standard controls. The lipid peroxidation value was calculated using CA equivalents

per µg of sample. The lipid peroxidative inhibition of sample was defined as the amount of antioxidants necessary to reduce the initial lipid peroxide concentration by 50% (IC_{50}).

UV Irradiation and Experimental Animals: UVB (290-320 nm) irradiation and its strength were set and determined on hairless skin surface to obtain minimal erythema dose (MED) to produce minimally perceptible erythema reaction. MED was 0.07-0.08 J/cm^2 at 13 cm height with an increment of 0.04 J/cm^2 in 24 hrs [24].

Female Wistar rats, 7-8 week old and 150-200 grams weight were obtained from the National Laboratory Animal Center, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand. The rats were housed at the Animal Facility of Suranaree University of Technology at 25EC, 50-70% RH and fed *ad libitum.* The rat hair on its back was shaven off about 4×2 cm for all experiments. The rats were divided into 6 groups of 6 rats per group. Group I was normal control (-UV). Group II received non-vehicle (-VE). Group III received vehicle control (propylene glycol) (+VE). Group IV received 2 mg/cm^2 EGCG control (+EGCG). Group V received 2 mg/cm^2 PPE (2-mg PPE). Group VI received 8 mg/cm^2 PPE (8-mg PPE). Groups II – VI were topically applied the test samples for 30 min prior to UVB irradiation at 3xMED for 24 hrs. The rats were irradiated twice a week (every 3 or 4 days) for a month. The UV damages were observed by erythema using dermatoscope and photodocumentation and evaluated by the Draize score system [25, 26] on scale of 0 to 4 (0: none, 1: very slight, 2: well define, 3: moderate, 4: severe). The treated rats were sacrificed, the central exposed area of skin was removed and processed for histological and DNA preparations.

Histological Preparation and Histopathologic Analysis: The skin samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin overnight and processed for paraffin sectioning by standard histological techniques. The sections at 3-5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin. Epidermal area and thickness were measured by computerized image analysis at 400 magnifications. Sunburn cells (SCs) were counted per square millimeter.

DNA Fragmentation: DNA was isolated from the treated skin using a genomic DNA extraction kit. RNase A (10 mg/ml) was added to the cell lysate and let stand at room temperature for 30 minutes. The DNA precipitate was centrifuged at 13,000 rpm for 3 minutes, washed in elution buffer and resuspended in TE buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.6 and 1 mM EDTA. The DNA, 4 µg, was electrophoresed on 2% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide in 45 mM Tris, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA at 100 mVolts for 1.5 hrs. The DNA ladders were visualized under UV fluorescence and photographed.

Statistical Analysis: Data were analyzed by ANOVA, using the least significant test to determine the level of significant at $P \# 0.05$ and 0.01. All data were expressed as mean ± standard error. For single comparisons, the different significance of means was determined by Student's *t*-test at significant level of $P \# 0.01$.

RESULTS

Total Phenolic and Flavonoid Contents: It has been well known that plant phenolics possess high antioxidant activity. In this study, pomegranate peel ethanolic extract (PPE) contained total phenolic compounds (TPC) of 451.96 ± 4.29 µgGAE/mg extract and flavonoid content (FC) of 37.61 ± 1.43 µgCAE/mg extract (Table 1). The amount of TPC and FC could indicate the antioxidant activity of PPE.

Free Radical Scavenging Activity: The antioxidant activity of PPE, measured by DPPH method, was able to scavenge oxidants as concentration dependent manner. At 100 µg/ml PPE could inhibit DPPH$^{\cdot}$ radicals up to 79% (Table 2). The effectiveness of PPE, determined by IC_{50}, was similar to CA. The IC_{50} of PPE was 51.51 ± 2.03 µg/ml and of CA was 55.43 ± 0.83 µg/ml. However, the effectiveness of PPE was a half of EGCG, IC_{50} of 27.51 ± 1.32 µg/ml ($P \# 0.01$).

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP): The FRAP of PPE reduced ferric-2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine [Fe(III)-TPTZ] complex to its ferrous-2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine [Fe(II)-TPTZ] with IC_{50} of 49.07 ± 1.53 µg/ml (Table 2). The FRAP value of PPE was slightly higher than that of CA, IC_{50} of 58.36 ± 4.02 µg/ml and 1.5 fold lower than that of EGCG, IC_{50} of 33.16 ± 1.09 µg/ml ($P \# 0.01$).

Ferric Thiocyanate (Ftc): FTC assay demonstrated that PPE was able to inhibit the peroxidation of linoleic acid in a dose-dependent manner. The antioxidant effectiveness of PPE as IC_{50} value was 61.43 µg/ml (Table 2). The FTC of PPE was approximately 2.9-3.5 fold lower than those of BHA and BHT, the synthetic oxidants and of EGCG, the natural antioxidant.

Table 1: Total phenolic compounds content and flavonoid contents of pomegranate peel ethanolic extract. Data were mean ± SE, n = 4.

Extract	Total Phenolics µgGAE/mg	Total Flavonoids µgCAE/mg
PPE	451.96 ± 4.29	37.61 ± 1.44

PPE, pomegranate peel ethanolic extract; GAE, gallic acid equivalent; CAE, catechin equivalent.

Table 2: Antioxidant capacity of pomegranate peel ethanolic extract assayed by DPPH, FRAP and FTC methods. Data were expressed as mean ± SE, n = 4.

Antioxidant power by	Sample	Concentration (µg/ml)	Activity (%)	IC_{50} (µg/ml)
DPPH	PPE	25	21.99 ± 2.40	51.51 ± 2.03
		50	51.32 ± 2.03	
		100	97.65 ± 2.94	
	CA	50	50.02 ± 1.99	55.43 ± 0.83
	EGCG	50	74.36 ± 0.94	27.51 ± 1.32*
FRAP	PPE	25	25.84 ± 0.83	49.07 ± 1.53
		50	53.17 ± 1.97	
		100	97.37 ± 0.38	
	CA	50	43.53 ± 2.91	58.36 ± 4.02
	EGCG	50	75.87 ± 2.62	33.16 ± 1.09*
LPI	PPE	10	21.50 ± 0.65	61.43 ± 4.18
		50	46.81 ± 5.87	
		100	78.88 ± 5.81	
	BHA	10	48.13 ± 7.34	19.84 ± 7.60*
	BHT	10	54.69 ± 8.38	17.71 ± 5.21*
	EGCG	10	40.25 ± 1.03	21.25 ± 4.99*

DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity; FRAP, ferric reducing antioxidant power; LPI, lipid peroxidative inhibition; PPE, pomegranate peel ethanolic extract; CA, catechin; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; BHA, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole; BHT, butylated hydroxyl toluene; IC_{50}, median inhibitory concentration. * $P \# 0.01$.

Erythema Reduction: Topical application of PPE on hairless rat skin prior to UBV irradiation at 3xMED was able to reduce the skin erythema. The UVB irradiation on non-vehicle (-VE) and vehicle (+VE) pretreated controls induced erythema at 3.69 ± 0.13 and 3.57 ± 0.20 scores, respectively. While, topical application of 2- and 8-mg/cm^2 PPE significantly lowered erythema at 1.78 ± 0.15 and 1.40 ± 0.24 scores, respectively ($P \# 0.01$) (Figure 1). The erythema symptom induced by the UVB irradiation was illustrated in Figure 2. Apparently, the erythema reduction by 8-mg/cm^2 PPE and EGCG pretreatment was about 2.5 fold of the vehicle controls. This clearly demonstrated that PPE well prevented the rat skin from UVB-induced erythema.

Epidermal Thickness: UVB irradiation at 3xMED increased the epidermal thickness of the vehicle control rats to 69.71 ± 1.07 µm as compared with the non-treated normal control (18.47 ± 2.25 µm) as shown in Figures 3 and 4 A, C. That was UVB increased the skin thickness of irradiated rats about 3.8 fold of non-treated normal control. Topical pretreatment of PPE at 2 and 8 mg/cm^2 effectively reduced the epidermal thickness of UVB-irradiated skin to 50.34 ± 1.88 and 40.34 ± 1.12 µm, respectively ($P \# 0.01$) (Figures 3 and 4 D, E). PPE and EGCG at 8 mg/cm^2 topical treatments prior to UVB irradiation equally reduced skin thickness (Figure 4 E, F), which was 1.7 fold of the vehicle. It is noticeable that topical pretreatment of PPE did not reduce the epidermal thickness down to the normal control level and it was about 2.2-2.7 fold thicker.

Sunburn Cells and DNA Fragmentation: UV radiation caused sunburn cells and damaged DNA, which lead to cell death. UVB irradiation significantly induced sunburn cells (SCs) in the epidermis of the vehicle control (+VE) approximately 17.86 ± 3.43 cells/mm^2 (Figure 5). Topical pretreatments of PPE at 2 and 8 mg/cm^2 were able to reduce sunburn cells down to 5.00 ± 1.01 and 2.40 ± 0.24 cells/mm^2, respectively (Figures 4 D, E and 5). The effects of PPE and EGCG at 8 mg/cm^2 were nearly equal and about 7.4 fold less than the vehicle control. In addition, the UVB irradiation induced DNA fragmentation in the non-vehicle and the vehicle controls, presented as long DNA ladder in Figure 6, lane 3 and lane 4. Topical pretreatments of PPE at 8 mg/cm^2, (lane 6) more greatly protected DNA from being fragmented by UVB than 2 mg/cm^2, (lane 5).

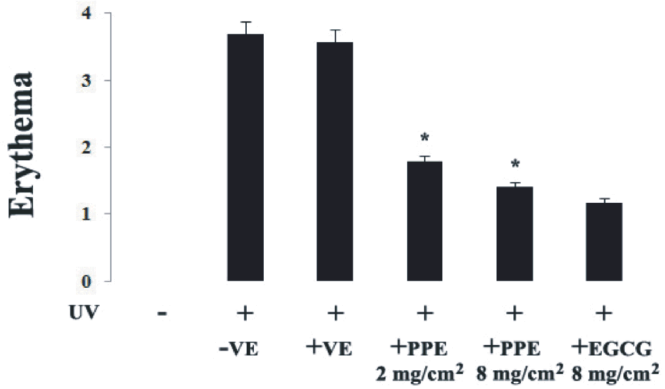

Fig. 1: The inhibitory effect of pomegranate peel ethanolic extract (PPE) on UVB-induced erythema on rat skin. The test skin was pretreated with PPE, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and vehicle controls (+UV, +VE) before irradiation with 3xMED for 24 h, twice a week for a month. Data were shown as mean score of erythema ± SE, n = 6, * P # 0.01.

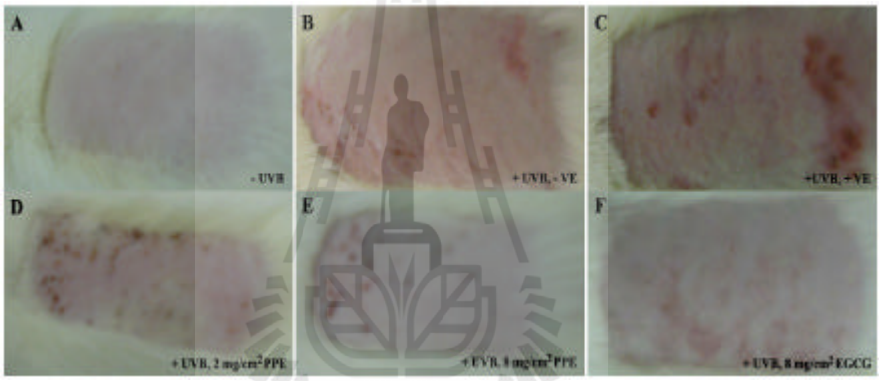

Fig. 2: Skin features demonstrated the erythema induced by UVB irradiation after topical pretreatment of pomegranate peel ethanolic extract (PPE) on hairless area of rat skin. The skin received 3xMED UVB for 24 h., twice a week for a month. A, normal control rat skin; B, UVB and non-vehicle control (-VE); C, UVB and vehicle control (+VE); D, UVB and 2 mg/cm^2 PPE; E, UVB and 8 mg/cm^2 PPE; F, UVB and 8 mg/cm^2 EGCG.

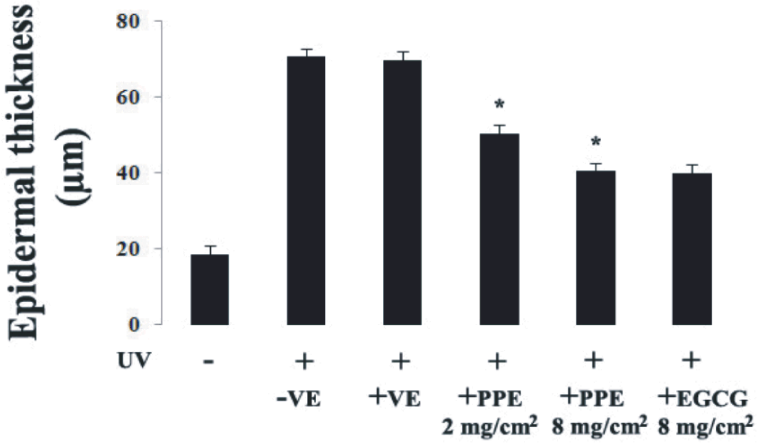

Fig. 3: Inhibitory effect of pomegranate peel ethanolic extract on UVB-induced epidermal thickness of rat skin. The test skin was topically pretreated with PPE, vehicle and non-vehicle control and then irradiated with 3xMED UVB for 24 h, twice a week for a month. Data were expressed as mean ± SE, n = 6, *P < 0.01.

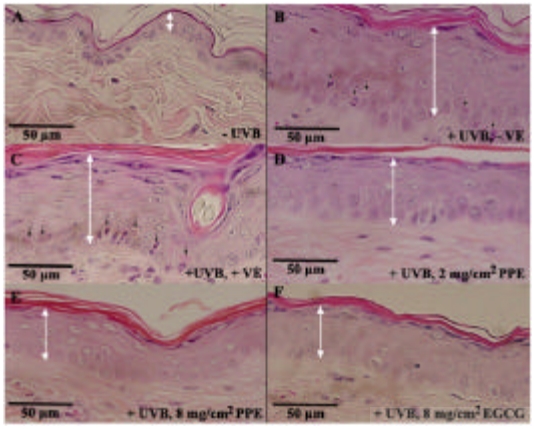

Fig. 4: Histographs of 3xMED UVB-irradiated rat skin illustrated the epidermal thickness (double head arrows) and sunburn cells (arrows) at 400x magnification. A, normal control; B, UVB and non-control (-VE); C, UVB and vehicle control (+VE); D, UVB and 2 mg/cm^2 PPE; E, UVB and 8 mg/cm^2 PPE; F, UVB and 8 mg/cm^2 EGCG.

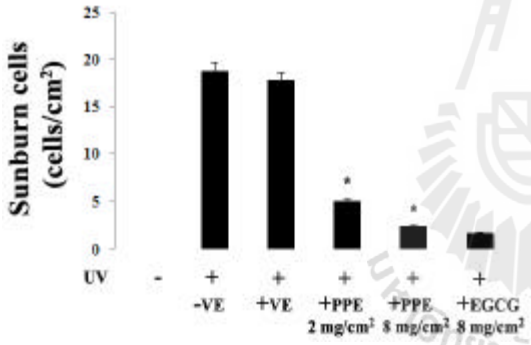

Fig. 5: Effect of PPE on UVB-induced sunburn cells (SCs) in rat skin. UVB at 3xMED irradiated on hairless skin for 24 h, twice a week for a month. Data were presented as mean ± SE, n = 6, $^*P$ # 0.01.

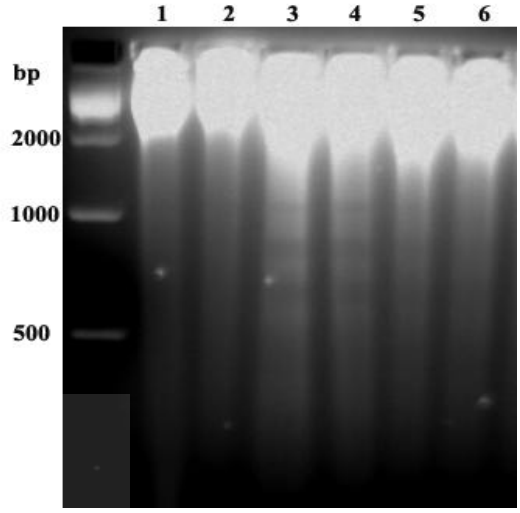

Fig. 6: Effects of 3xMED UVB irradiation on DNA fragmentation of rat epidermal cells: DNA, 4 µg, was electrophoresed on 2% agarose gel. Lane 1, normal control; Lane 2, 8 mg/cm^2 EGCG; Lane 3, non-vehicle control (-VE); Lane 4, vehicle control (+VE); Lane 5, 2 mg/cm^2 PPE; Lane 6, 8 mg/cm^2 PPE.

DISCUSSION

The importance of antioxidant activities of phenolic compounds and their possible usage in medicine and processed foods as a natural antioxidant have reached a new high of human health interest recently. Pomegranate was reported that it contained various phytochemicals, mainly phenolic hydroxyl groups, flavonoids tannin and unsaturated fatty acids with bioactivities [27] and antioxidant activities [14, 28, 29]. Our study demonstrated that PPE contained substantial amount of phenolic compounds and expressed marked antioxidant capacity as equivalent to AA and comparable to natural antioxidants of CA and EGCG. This was in agreement with pomegranate peel methanolic extract [30]. However, PPE antioxidant capacity was only a half of BHA and BHT, which are synthetic antioxidants used for increasing shelf life or stabilizing lipid containing food products [31]. PPE was effective in reducing formation rate of secondary oxidant products, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in sunflower oil storage [32]. On the contrary, acetone and methanolic extracts of pomegranate peel by sonication possessed higher antioxidant activity than BHA and BHT [33]. Therefore, it is obvious that extraction systems for pomegranate peel produce a variety of constituents and bioactivities.

This study demonstrated that topical pretreatment of PPE was able to protect rat skin from UVB irradiation. PPE was as effective as EGCG in prevention of epidermal erythema and cell injury and in reduction of epidermal thickness. There was evidence that dietary ellagic acid rich in berries and pomegranate reduced UV-induced epidermal thickness in mouse skin [34]. Similarly, some reports revealed that green tea could reduce erythema, sunburn cells, skin thickness and DNA damages in human skin [35-37]. A number of antioxidants (EGCG, vitamins C and E, CoQ10, lycopene, silybin, resveratrol, genistein and pycnogenol) and plant extracts (green tea, grape seeds,

pomegranate and coffee) were used in skin care formulations [38]. Oral ingestion of ellagic acid extracted from pomegranate rind could reduce erythema and inhibited pigmentation in human skin [39]. Ellagic acid presented in berries and pomegranate was also demonstrated to prevent collagen destruction and inflammatory responses in human fibroblasts and keratinocytes caused by UVB irradiation [34, 40]. Pomegranate was reported to down regulate the UVB-induced proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and increase p21 and p53 leading to cell cycle arrests and apoptosis in human artificial skin EpiDerm [41-44]. These definitely supported our study that topical pretreatment of PPE attenuated the skin symptom, reduced sunburn cells and inhibited epidermal cell proliferation and induced epidermal cell apoptosis caused by UVB irradiation.

In conclusion, pomegranate peel was rich in antioxidants, played remarkable roles in prevention skin lesion from UVB irradiation by alleviation of erythema, sunburn cells and DNA damages. These findings provide useful knowledge of pomegranate peel for further researches on its potential in chemoprevention of skin cancer induced by UVB radiation and in agro-industry. This could make use of the pomegranate by-products.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was granted by Suranaree University of Technology and the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand. We are grateful to Associate Professor Nirush Lertprasertsuke, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for her kind help in the histological preparation.

REFERENCES

1. Halliday, G.M., 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. Mutat. Res., 571: 107-120.
2. Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy, 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. Toxicol. Appl. Pharmacol., 195: 298-308.
3. Griffiths, H.R., P. Mistry, K.E. Herber and J. Lunec, 1997. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 35: 189-237.
4. Pourzand, C. and R.M. Tyrrell, 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. Photochem. Photobiol., 70: 380-390.
5. King, K.L. and J.A. Cidlowski, 1995. Cell cycle and apoptosis: Common pathway to life and death. J. Cell. Biochem., 58: 175-180.
6. Hashimoto, Y., M. Tsutsui, S. Matsuo and H. Iizuka, 1995. Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: Effects of ultraviolet B irradiation (UVB) and topical PUVA treatment. J. Dermatol. Sci., 10: 16-24.
7. Gilchrest, B.A., 1996. A review of skin aging and its medical therapy. Brit. J. Dermatol., 135: 867-875.
8. Melnikova, V.O. and H.N. Ananthaswamy, 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. Mutat. Res., 571: 91-106.
9. Jurenka, J.S., 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. Altern. Med. Rev., 13: 128-144.
10. Belal, S.K.M., A.H. Abdel-Rahman and D.S. Mohamed, 2009. Protective effect of pomegranate fruit juice against *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal histopathological changes in mice. World Appl. Sci. J., 8: 245-254.
11. Zhang, J., B. Zhan, X. Yao and J. Song, 1995. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital herpes virus *in vitro*. Zhongguo. Zhongyao. Zazhi., 20: 556-558.
12. Lansky, E.P. and R.A. Newman, 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol., 109: 177-206.
13. Singh, R.P., K.N.C. Murthy and G.K. Jayaprakasha, 2002. Studies on the antioxidation activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. J. Agric. Food Chem., 50: 81-86.
14. Akbarpour, V., K. Hemmati and M. Sharifani, 2009. Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit in maturation stage. Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., 6: 411-416.
15. Yoshimura, M., Y. Watanabe, K. Kasai, J. Yamakoshi and T. Koga, 2005. Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosine activity and ultraviolet-induced pigmentation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69: 2368-2373.

16. Kasai, K., M. Yoshimura, T. Koga, M. Aril and S. Kawasaki, 2006. Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 52: 383-388.
17. Syed, D.N., A. Malik, N. Hadi, S. Sarfaraz, F. Afaq and H. Mukhtar, 2006. Photochemopreventive effect of pomegranate fruit extract on UVA-mediated activation of cellular pathways in normal human epidermal keratinocytes. Photochem. Photobiol., 82: 398-405.
18. Afaq, F., M. Saleem, C.G. Krueger, J.D. Reed and H. Mukhtar, 2005. Anthocyanin andhydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int. J. Cancer., 113: 423-433.
19. Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidations by mean of Folin-Ciocateu reagent. Methods. Enzymol., 299: 152-178.
20. Liu, M., X.Q. Li, C. Weber, C.Y. Lee, J. Brown and R.H. Liu, 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J. Agric. Food Chem., 50: 2926-2930.
21. Sanchez-Moreno, C., L. Plaza, B. De Ancos and M.P. Cano, 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. J. Sci. Food Agric., 83: 430-439.
22. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. Anal. Biochem., 239: 70-76.
23. Huang, D.J., H.J. Chen, W.C. Hou, C.D. Lin and Y.H. Lin, 2006. Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage root mucilage with antioxidant activities *in vitro*. Food Chem., 98: 774-781.
24. Lowe, N.J. and J. Friedlander, 1997. Sunscreens: rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In: Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak M.A., editors. Sunscreens. Marcel Dekker, New York, pp: 37-38.
25. Middelkamp-Hup, A.M., M.A. Pathak, C. Parrado, D. Goukassian, F. Rius-Diaz, M.C. Mihm, T.B. Fitzpatrick and S. Gonzalez, 2004. Oral *Polypodium leucotomos* extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. J. Am. Acad. Dermatol., 51: 910-918.
26. Phillips, J.T., J. Bhawan, M. Yaar, Y. Bello, D. LoPiccolo and J.F. Nash, 2000. Effect of daily versus intermittent sunscreen application on solar simulated UV radiation-induced skin response in humans. J. Am. Acad. Dermatol., 43: 610-618.
27. Wang, R., Y. Ding, R. Liu, L. Xiang and L. Du, 2010. Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics Fruit. Veget. Cereal Sci. Biotechnol., 4: 77-87.
28. Li, Y., C. Guo, J. Yang, J. Wei, J. Xu and S. Cheng, 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chem., 96: 254-260.
29. Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha and B.S. Jena, 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chem., 80: 393-397.
30. Tehranifar A., S. Yahya, K. Mahdiyeh and J.B. Vahid, 2011. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. Ind. Crops Prod., 34: 1523-1527.
31. Bera, D.B., D.B. Lahiri and A. Nag, 2006. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. J. Food Eng., 74: 542-545.
32. Iqbal, S., S. Haleem, M. Akhtar, M.Z. Haq and J. Akbar, 2008. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. Food Res. Int., 41: 194-200.
33. Yasoubi, P., M. Barzegarl, M.A. Sahari and M.H. Azizi, 2007. Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. J. Agric. Sci. Technol., 9: 35-42.
34. Bae J.Y., J.S. Choi, S.W. Kang, Y.J. Lee, J. Park and Y.H. Kang, 2010. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. Exp. Dermatol., 19: e18-e190.
35. Elmets, C.A., D. Singh, K. Tubesing, M. Matsui, S. Katiyar and H. Mukhtar, 2001. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. J. Am. Acad. Dermatol., 44: 425-432.
36. Katiyar, S.K., B.M. Bergamo, P.K. Vyalil and C.A. Elmets, 2001. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 65: 109-114.

37. Camouse, M.M., D.S. Domingo, F.R. Swain, E.P. Conrad, M.S. Matsui, D. Maes, L. Declercq, K.D. Cooper, S.R. Stevens and E.D. Baron, 2009. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. Exp. Dermatol., 18: 522-526.
38. Allemann, I.B. and L. Baumann, 2008. Antioxidants used in skin care formulations. Skin Therapy Letter, 13: 5-8.
39. Kasai, K., M. Yoshimura, M. Aru and S. Kawasaki, 2006. Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 52: 383-388.
40. Pacheco-Palencia, A.L., G. Noratto, L. Hingorani, T.S. Talcott and U.S. Mertens-Talcott, 2008. Protective effects of standardized Pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. J. Agric. Food Chem., 56: 8434-8441.
41. Zaid, M.A., F. Afaq, N. Khan and H. Mukhtar, 2007. Protective effects of pomegranate derived products on UVB-induced DNA damage, PCNA expression and MMPs in human reconstituted skin. J. Invest. Dermatol., 127: S143.
42. Afaq, F., N. Khan, D.N. Syed and H. Mukhtar, 2010. Oral feeding of pomegranate fruit extract inhibits early biomarkers of UVB radiation induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. Photochem. Photobiol., 86: 1318-1326.
43. Pacheco-Palencia, A.L., G. Noratto, L. Hingorani, T.S. Talcott and U.S. Mertens-Talcott, 2008. Protective effects of standardized Pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. J. Agri. Food Chem., 56: 8434-8441.
44. Borner, C., 1996. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. J. Biol. Chem., 271: 12695-12698.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

อิทธิพลของสารสกัดทับทิมต่อผิวหนังหนูแรทที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท บี

Effect of pomegranate extract on UVB-irradiation rat skin

รายงานวิจัยบทนี้เป็นผลงานส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

Manasathien, J., Kupittayanant, S. and Indrapichate, K. (2011). Protective efficacy of pomeganate (*Punica granatum* L., Punicaceae) peel ethanolic extract on UVB-irradiated rat skin. American-Eurasian J Toxicol Sc. 3 (4): 250-258, ISSN 2079-2050.

สารสกัดเปลือกทับทิม (*Punica granatum*) ด้วยเอธานอล (PPE) มีสารประกอบ phenolics และ flavonoids มาก 451.96 $\pm$ 4.29 μg GAE/mg และ 37.61 $\pm$ 1.43 μ CAE/mg ตามลำดับ PPE แสดงกิจกรรมต้านอ็อกซิเดชั่นอย่างเด่นชัด ประเมินด้วย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ค่า IC_{50} 51.51 $\pm$ 2.03 μg/ml, ประเมินด้วย FRAP (ferric reducing antioxidant power) ค่า IC_{50} 49.07 $\pm$ 1.53 μg/ml และประเมินด้วย FTC (ferric thiocyanate) ค่า IC_{50} 61.43 $\pm$ 4.18 μg/ml. ความสามารถต้านอ็อกซิเดชั่นของ PPE เทียบกับ Ascorbic acid (AA) คล้ายกับสารต้านอ็อกซิเดชั่นธรรมชาติ Catechin (CA) และ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) แต่น้อยกว่าสารต้านอ็อกซิเดชั่นสังเคราะห์ 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) และ Butylated hydroxyl toluene (BHT) 2.9-3.5 เท่าตามลำดับ ทา PPE บนหนังหนูบริเวณที่โกนขนออกแล้วก่อนฉายรังสี UVB ที่ความเข้ม 3xMED (minimal erythema dose = 0.07-0.08 J/cm^2) เป็นเวลา 24 ชม. สัปดาห์ละ 2 ครั้ง นาน 1 เดือน ใช้ Propylene glycol เป็น vehicle control พบว่า PPE ลดการทำร้ายผิวหนังได้อย่างชัดเจน เมื่อทาผิวหนัง ด้วย PPE และด้วย EGGC ที่ 8 mg/cm^2 สามารถลดการทำร้ายด้วย UVB โดยลดอาการแดง (erythema) 2.5 เท่า, ลดการหนาของหนังกำพร้า (epidermal thickness) 1.7 เท่า, ลดเซลล์ไหม้ (sunburn cells) 7.4 เท่า และ ดีเอนเอขาดเป็นท่อน (DNA fragmentation) เพียงเล็กน้อย การศึกษาพบนี้ แสดงว่า การทาผิวหนังด้วย PPE ก่อนการฉายรังสี UVB ป้องกันการทำร้ายผิวหนังและดีเอนเอของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการพบนี้ จึงเป็นใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเพิ่มให้กับเปลือกทับทิม

หน้า 52-60 เป็นบทความฉบับเต็ม

Manasathien, J., Kupittayanant, S., and Indrapichate, K. (2011). Protective efficacy of promegranate (*Punica granatum* Linn., Punicaceae) peel ethanolic extract on UVB-irradiated rat skin. American-Eurasian J Toxicol Sc. 3(4): 250-258.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ เฟลโวนอยส์

ผลทับทิม *Punica granatum* L. ทั้งสามส่วนคือ เปลือก เมล็ด และน้ำ มีปริมาณสารปร ะกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds) มากกว่าสารเฟลโวนอยส์ (Flavoniods) และสารสกัดด้วยเอธานอลมีปริมาณ TPC และ FC มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณของสารสกัดดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ โดยปริมาณ TPC คือ 451.96 ± 4.29; 380.54 ± 5.87; 77.93 ± 1.62; 51.58 ± 0.85; 2.55 ± 0.42 µg GAE/mg ตามลำดับและ ปริมาณ FC คือ 37.61 ± 1.44; 26.05 ± 0.93; 16.66 ± 0.47; 10.55 ± 0.14; 0.24 ± 0.03 µg CAE/mg ตามลำดับ

5.2 การต้านอนุมูล และความสัมพันธ์กับสารพฤกษเคมีของผลิตภัณฑ์ทับทิม

คุณสมบัติ antioxidant ของผลิตภัณฑ์วิเคราะห์โดย DPPH radical scavenging, ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ ferric thiocyanate (FTC) หรือ lipid peroxidation inhibition (LPI) พบว่าผลิตภัณฑ์ทับทิมมีประสิทธิภาพ antioxidant สูงมากในการกำจัดอนุมูลอิสระ การรีดิวส์อนุมูลเหล็ก และการยับยั้งการสลายไขมัน ในภาพรวม ประสิทธิภาพของ สารสกัดเปลือกทับทิม PPE มีคุณสมบัติเป็น antioxidant สูงมากเทียบเท่ากับสาร antioxidant มาตรฐาน ประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ด PSE มีคุณสมบัติ antioxidant ระดับดี ส่วน น้ำทับทิมมีคุณสมบัติเป็น antioxidant น้อยที่สุด และประสิทธิภาพ antioxidant ของผลิตภัณฑ์ทับทิมทั้งหมดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ TPC และ FC ที่มีในแต่ละผลิตภัณฑ์ของทับทิม

5.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของทับทิม

ผลิตภัณฑ์ของผลทับทิมไม่มีความเป็นพิษระดับเซลล์ต่อสิ่งมีชีวิตคือกุ้ง *Artremia salina* แต่สารสกัดเปลือกทับทิม PPE/e มีความเป็นพิษค่อนข้างมากต่อเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมของคน และพิษมากกว่า PPE/w เล็กน้อย ส่วนสารสกัดเมล็ดทับทิมมีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อ เซลล์ MCF-7

ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับ สารพฤกษเคมี คุณสมบัติและประสิทธิ์ภาพ และความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ทับทิมครั้งนี้ ซึ่งมี สารสกัดเปลือก สารสกัดเมล็ด และน้ำทับทิมสรุปรวมไว้ในตาราง 5.1

5.4 โปร์ไฟล์ทางพิษวิทยาเพื่อการพัฒนาทางเภสัชวิทยาและการรักษา

การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงนัยสำคัญของ NOAEL เรียงดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w ซึ่งมีค่า 1,250, 1,000, 750, and 100 µg/ml ตามลำดับ LOAEL เรียงดังนี้ PPE/w = PSE/e > PPE/e > PSE/w มีค่า 1,500, 1,000, and 500 µg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MOS และ TI ดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w ค่าสถิติของ NOAEL, LOAEL. MOS และ TI เป็นข้อมูลสำคัญ สำหรับการศึกษาต่อไปเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทับทิมทางเภสัชวิทยาและการักษา

5.5 อิทธิพลของสารสกัดทับทิมต่อผิวหนังหนูแรทที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลท บี

จากการนำสารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอล PPE/e ซึ่งมีสาร TPC และ FC มาก และมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่สูงมาก ไปทดลองป้องกันผิวหนังจากรังสี UVB พบว่า PPE/e ที่ความเข้มข้น 8 mg/cm^2 ทาบนผิวหนังหนูบริเวณที่ไม่มีขน ก่อนฉายรังสี UVB ที่ 3xMED (minimal erythema dose = 0.07-0.08 J/cm^2) 24 ชั่วโมง สัปดาห์ละ 2 ครั้ง นาน 3 เดือน สามารถป้องกันผิวหนังระดับหนังกำพร้า (epidermis) จากการทำร้ายของ UVB โดยลดอาการบวมแดง ของผิวหนัง (erythema) ได้ 2.5 เท่า ลดความหนาของผิวหนังได้ 1.7 เท่า ลด sunburn cells ได้ 7.4 เท่าเทียบกับผิวหนังที่ไม่ได้ทา PPE/e ก่อนฉายรังสี UVB และป้องกันการแตกหัก DNA ของเซลล์ที่ได้รับการฉายรังสี UVB

การวิจัยนี้แสดงหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนผลทับทิมไทยส่วนเปลือก น้ำ และเมล็ด มีสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อสุขภาพของคน กล่าวคือ มีสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการแตกหักของโครโมโซมซึ่งคือสารพันธุกรรม และป้องกันรังสี UVB ต่อการทำลายผิวหนัง ผลิตผลจากทับทิมมีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไปเพื่อใช้เป็นสารกันแดด (sun block) และเป็นสารป้องกัน และ /หรือเป็นยารักษามะเร็งได้

Table 5.1 Summary of phytochemicals, antioxidant activity and cytotoxicity of pomegrante *Punica granatum* products. Data were mean ± SE, n = 4, $p < 0.05$

Extract	Major phytochemical		Antioxidant activity, IC_{50}, 24 h			Cytotoxicity, LC_{50}, 24 h	
	TPC	FT	DPPH	FRAP	FTC/LPI	*A. salina*	MCF-7
	µg GAE/mg	µg CAE/mg	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
PPE/e	451.96 ± 4.29^{a}	37.61 ± 1.44^{a,a}	121.65 ± 2.66 ^{a}	49.07 ± 1.53^{a}	18.04 ± 1.95^{a}	1,206.98 ± 12.73^{a}	377.88 ± 13.14^{a}
PPE/w	380.54 ± 5.87^{a}	26.05 ± 0.93^{b,b}	151.78 ± 2.70 ^{a}	64.63 ± 1.23^{a}	22.34 ± 2.11^{a}	1,743.31 ± 20.17^{b}	459.90 ± 15.90^{b}
PSE/e	77.93 ± 1.62^{b}	16.66 ± 0.47^{c,a}	1,324.35 ± 16.89 ^{b}	512.54 ± 15.05^{b}	166.49 ± 20.38^{b}	2,375.28 ± 69.54^{c}	-
PSE/w	51.58 ± 0.85^{b}	10.55 ± 0.14^{d,b}	2,577.53 ± 44.06 ^{c}	753.17 ± 17.66^{c}	201.82 ± 11.37^{b}	1,294.88 ± 61.28^{a}	-
PJ	2.55 ± 0.42^{c}	0.24 ± 0.03^{e}	9,925.20 ± 1,116.80^{c}	4,615.94 ± 28.90^{d}	688.87 ± 44.03^{c}	6,451.46 ± 52.32^{d}	-
CA	-	-	111.39 ± 0.73	58.36 ± 4.02	5.97 ± 0.39	-	-
EGCG	-	-	65.17 ± 0.34	33.16 ± 1.68	5.86 ± 0.17	-	-
BHA	-	-	-	-	7.38 ± 0.11	-	-
BHT	-	-	-	-	6.89 ± 0.39	-	-

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กรกช นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

   สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 044-22-4296 โทรสาร 044-22-4633
4. ประวัติการศึกษา

   พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วท.บ. (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   พ.ศ. 2520 ปริญญาโท วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล

   พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Molecular Biology) Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania, USA.
5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญ

   Molecular cell Biology (cell proliferation and cell apoptosis) และ Plant-based insect pest biological control

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี