



**APPENDICES**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## Appendix A

### Anti-inflammatory screening test (Raw data)

Date: 17-5-61-11  
 Experiment: assay of PGE<sub>2</sub> level in Positive control (Cox2)  
 Assay method: prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit (Cayman)

Item	Screening code	sample code	sample (g/ml)	Absorbance at 405 nm (Cox2)		SD	%B/B <sub>0</sub>	Ln(x)	[PGE <sub>2</sub> ] (pg/ml)	%PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	%Inhibition	IC <sub>50</sub>
				OD 1	OD 2							
	Negative	0.1%DMSO		0.439			43.16	3.93	2031.02	100.00	0.00	
	Positive1	Ibuprofen	3.3x10 <sup>-7</sup>	0.569			65.42	2.89	794.11	39.10	60.90	< 3.3 x 10 <sup>-7</sup>
			10 <sup>-6</sup>	0.678			83.89	2.21	364.32	17.94	82.06	
			3.3x10 <sup>-6</sup>	0.597			70.22	2.79	324.26	15.96	84.04	
	Positive2	Aspirin	10 <sup>-5</sup>	0.614			73.14	2.68	286.72	14.12	85.88	
			3.3x10 <sup>-6</sup>	0.431			41.87	3.98	2144.27	105.58	-5.58	
			10 <sup>-5</sup>	0.502			54.01	3.47	1284.77	63.26	36.74	
	V7331	TEC01	3.3x10 <sup>-5</sup>	0.466			47.79	3.73	835.31	41.13	58.87	1.96 x 10 <sup>-6</sup>
			10 <sup>-4</sup>	0.513			56.95	3.39	591.96	29.15	70.85	
1	V7331	TEC01	10 <sup>-5</sup>	0.467	0.4904	0.023	50.79	3.61	1471.95	72.47	27.53	

Date: 17-5-61-11  
 Experiment: assay of PGE<sub>2</sub> level in Positive control (Cox1)  
 Assay method: prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit (Cayman)

Item	Screening code	sample code	sample (g/ml)	Absorbance at 405 nm (Cox1)		SD	%B/B <sub>0</sub>	Ln(x)	[PGE <sub>2</sub> ] (pg/ml)	%PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	%Inhibition	IC <sub>50</sub>
				OD 1	OD 2							
	Negative	0.1%DMSO		0.413			38.68	4.12	3068.41	100.00	0.00	
	Positive1	Ibuprofen	10 <sup>-6</sup>	0.574			66.28	2.95	957.37	31.22	68.78	< 10 <sup>-6</sup>
			3.3x10 <sup>-6</sup>	0.653			79.88	2.38	539.80	17.80	82.40	
			10 <sup>-5</sup>	0.631			76.09	2.54	316.47	10.32	89.68	
	Positive2	Aspirin	3.3x10 <sup>-5</sup>	0.868			82.38	2.27	242.67	7.91	92.09	
			3.3x10 <sup>-6</sup>	0.432			41.89	3.98	2668.79	68.87	13.03	
			10 <sup>-5</sup>	0.562			64.31	3.04	1040.43	33.93	66.07	8 x 10 <sup>-6</sup>
	V7331	TEC01	3.3x10 <sup>-5</sup>	0.451			46.25	3.64	1162.15	37.90	62.10	
			10 <sup>-4</sup>	0.835			78.79	2.51	307.22	10.02	89.98	
1	V7331	TEC01	10 <sup>-6</sup>	0.4746	0.4804	0.004	49.79	3.65	1818.79	62.57	37.43	

Remark:

IC<sub>50</sub> of positive control: Aspirin (COX-1) = 4x10<sup>-6</sup> - 9x10<sup>-7</sup> g/ml, Ibuprofen (COX-1) = 1.5 x10<sup>-6</sup> g/ml  
 IC<sub>50</sub> of positive control: Aspirin (COX-2) = 4.47x10<sup>-5</sup> - 5.02x10<sup>-5</sup> g/ml, Ibuprofen (COX-2) = 6.45x10<sup>-7</sup> g/ml

Interpretation  
 % Inhibition  
 < 50%      Activity  
 ≥ 50%      Inactive  
                  Active (IC<sub>50</sub> included)

Disclaimer: The results are limited to the test condition and further extrapolation is not inferred. BIOTEC will not take any responsibility for any consequences or damages, which may result from this information. Please note that BIOTEC is not a certification body.

Appendix B

Statistic analysis: Paired Samples Test

B1. Paired Samples Test compared each gel preparation by weight between before and after heating cooling stability study

Formula No.	Paired Differences							t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean		Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		Upper			
	Mean	Std. Deviation			Lower	Upper				
<b>Gel base</b>										
1	-0.02	0.02646	0.01528	-0.0857	0.0457	-1.31	2	0.321		
2	-0.3333	0.56871	0.32835	-1.7461	1.0794	-1.02	2	0.417		
3	0	0.01	0.00577	-0.0248	0.0248	0	2	1		
4	0.02333	0.04041	0.02333	-0.0771	0.1237	1	2	0.423		
5	0.00667	0.00577	0.00333	-0.0077	0.021	2	2	0.184		
6	-0.0033	0.00577	0.00333	-0.0177	0.011	-1	2	0.423		
7	-0.0033	0.00577	0.00333	-0.0177	0.011	-1	2	0.423		
<b>Gel containing the extract</b>										
1	0.00333	0.00577	0.00333	-0.011	0.0177	1	2	0.423		
2	0.04667	0.06351	0.03667	-0.1111	0.2044	1.273	2	0.331		
3 <sup>a</sup>										
4	0.03667	0.04619	0.02667	-0.0781	0.1514	1.375	2	0.303		
5	-0.0633	0.17039	0.09838	-0.4866	0.3599	-0.64	2	0.586		
6	0.30667	0.40501	0.23383	-0.6994	1.3128	1.311	2	0.32		
7	0.01333	0.00577	0.00333	-0.001	0.0277	4	2	0.057		

a. The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.

B2. Paired Samples Test compared each gel preparation by viscosity between before and after heating cooling stability study

Formula No.	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Gel base								
1	2.00333	1.05382	0.60842	-0.6145	4.62116	3.293	2	0.081
2	2.75667	0.82403	0.47576	0.70965	4.80368	5.794	2	0.029
3	3.03333	0.76055	0.4391	1.14403	4.92264	6.908	2	0.02
4	1.93667	1.17628	0.67913	-0.98537	4.85871	2.852	2	0.104
5	2	1.00504	0.58026	-0.49665	4.49665	3.447	2	0.075
6	2.2	1.71572	0.99057	-2.06209	6.46209	2.221	2	0.156
7	1.56333	2.3185	1.33859	-4.19614	7.3228	1.168	2	0.363
Gel containing the extract								
1	-7.65667	1.34515	0.77662	-10.9982	-4.31512	-9.859	2	0.01
2	-6.76333	0.1222	0.07055	-7.0669	-6.45977	-95.86	2	0
3	-11.2	0.77788	0.44911	-13.1324	-9.26763	-24.94	2	0.002
4	-9.99	0.79303	0.45786	-11.96	-8.02	-21.82	2	0.002
5	-11.85	0.88476	0.51082	-14.0479	-9.65213	-23.2	2	0.002
6	-10.6567	1.89447	1.09378	-15.3628	-5.95053	-9.743	2	0.01
7	-15.1833	1.62543	0.93844	-19.2211	-11.1455	-16.18	2	0.004

B3. Paired Samples Test compared each gel preparation by pH value between before and after heating cooling stability study

Formula No.	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Gel base								
1	0.24	0.37	0.21362	-0.6791	1.1591	1.123	2	0.378
2	0.26	0.10583	0.0611	-0.0029	0.5229	4.255	2	0.051
3	0.7867	0.35233	0.20342	-0.0886	1.6619	3.867	2	0.061
4	0.6733	0.10786	0.06227	0.4054	0.9413	10.81	2	0.008
5	1.1433	0.28572	0.16496	0.43358	1.8531	6.931	2	0.02
6	1.0733	0.20984	0.12115	0.55206	1.5946	8.859	2	0.013
7	1.2367	0.36254	0.20931	0.33607	2.1373	5.908	2	0.027
Gel containing the extract								
1	0.7633	0.14503	0.08373	0.40306	1.1236	9.116	2	0.012
2	0.61	0.17578	0.10149	0.17333	1.0467	6.011	2	0.027
3	0.66	0.17692	0.10214	0.22051	1.0995	6.461	2	0.023
4	0.85	0.21932	0.12662	0.30519	1.3948	6.713	2	0.021
5	1.04	0.14422	0.08327	0.68173	1.3983	12.49	2	0.006
6	0.44	0.08544	0.04933	0.22776	0.6522	8.92	2	0.012
7	0.74	0.05196	0.03	0.61092	0.8691	24.67	2	0.002

B4. Paired Samples Test compared each gel preparation by total phenolic contents between before and after heating cooling stability study

Formula No.	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Gel containing the extract								
1	-43.87	12.38607	7.1511	-74.6387	-13.1013	-6.135	2	0.026
2	-39.49	14.1584	8.17436	-74.66142	-4.31858	-4.831	2	0.04
3	-51.09333	10.83074	6.25313	-77.99839	-24.18827	-8.171	2	0.015
4	-80.69667	16.36249	9.44689	-121.3433	-40.04999	-8.542	2	0.013
5	-84.49667	6.24418	3.60508	-100.0081	-68.98527	-23.44	2	0.002
6	-234.5867	17.41864	10.05666	-277.857	-191.3164	-23.33	2	0.002
7	-93.44	9.75657	5.63296	-117.6767	-69.20333	-16.59	2	0.004

B5. Paired Samples Test of the gel containing *Terminalia catappa* Linn. red leaf extract formula 1 compared between each time of long term stability at 0, 1, 2, 3 months by viscosity, pH, hydroxyl radical scavenging activity (OHRAC) and total phenolic compound

Parameter	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Viscosity0 - 1	-2.409	1.4305	0.8259	-5.96256	1.14456	-2.917	2	0.1
Viscosity0 - 2	-1.04167	0.09431	0.05445	-1.27595	-0.80739	-19.13	2	0.003
Viscosity0 - 3	-1.79633	1.37568	0.79425	-5.21371	1.62104	-2.262	2	0.152
pH0 - pH1	-0.11333	0.04933	0.02848	-0.23587	0.00921	-3.979	2	0.058
pH0 - pH2	-0.08333	0.16803	0.09701	-0.50074	0.33407	-0.859	2	0.481
pH0 - pH3	-0.18667	0.06351	0.03667	-0.34443	-0.0289	-5.091	2	0.036
OHRAC0 - 1	-5.864	10.4899	6.05635	-31.92236	20.1944	-0.968	2	0.435
OHRAC0 - 2	-1.5	2.32838	1.34429	-7.28402	4.28402	-1.116	2	0.381
OHRAC0 - 3	0.813	1.77828	1.02669	-3.60448	5.23048	0.792	2	0.511
TPC0 - TPC1	-58.519	29.73989	17.17033	-132.397	15.359	-3.408	2	0.076
TPC0 - TPC2	-22.8517	22.56502	13.02792	-78.90629	33.203	-1.754	2	0.222
TPC0 - TPC3	-38.9467	20.76723	11.98997	-90.53533	12.642	-3.248	2	0.083

B6. Paired Samples Test of the gel containing *Terminalia catappa* Linn. red leaf extract formula 2 compared between each time of long term stability at 0, 1, 2, 3 months by viscosity, pH, hydroxyl radical scavenging activity (OHRAC) and total phenolic compound

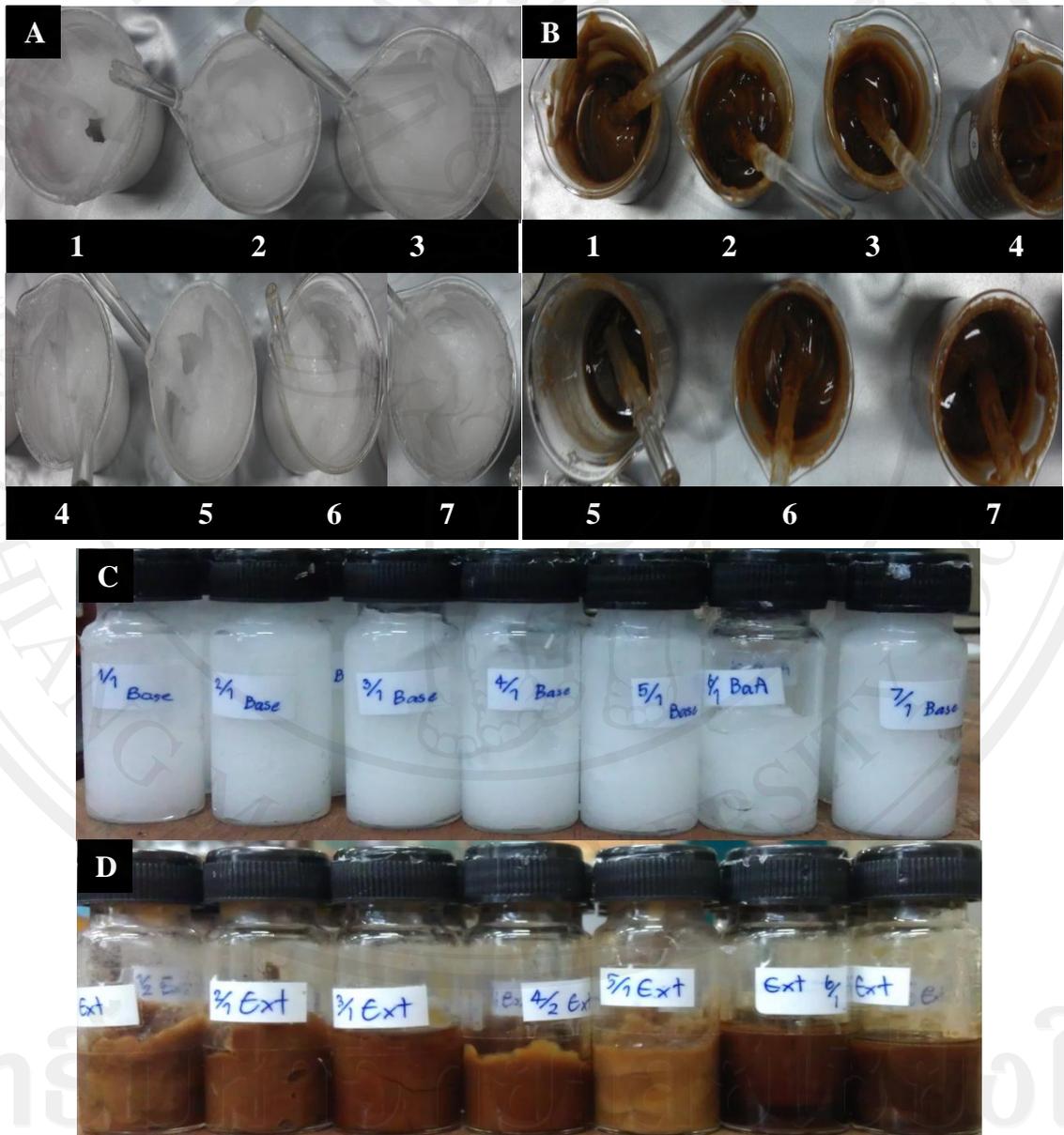
Parameter	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Viscosity0 - 1	0.31	1.4203	0.82001	-3.21822	3.83822	0.378	2	0.742
Viscosity0 - 2	2.14133	0.2007	0.11588	1.64276	2.6399	18.48	2	0.003
Viscosity0 - 3	3.29633	0.63361	0.36582	1.72236	4.87031	9.011	2	0.012
pH0 - pH1	0	0.09	0.05196	-0.22357	0.22357	0	2	1
pH0 - pH2	0.03	0.24515	0.14154	-0.57899	0.63899	0.212	2	0.852
pH0 - pH3	-0.07667	0.03512	0.02028	-0.16391	0.01057	-3.78	2	0.063
OHRAC0 - 1	-24.071	37.18489	21.46871	-116.443	68.3014	-1.12	2	0.379
OHRAC0 - 2	5.06533	3.87727	2.23854	-4.56633	14.69699	2.263	2	0.152
OHRAC0 - 3	-8.03367	4.19306	2.42086	-18.4498	2.38246	-3.32	2	0.08
TPC0 - TPC1	-34.1693	7.61028	4.3938	-53.0743	-15.2643	-7.78	2	0.016
TPC0 - TPC2	36.34967	6.82396	3.93982	19.398	53.30133	9.226	2	0.012
TPC0 - TPC3	-5.92433	2.54366	1.46858	-12.2431	0.39446	-4.03	2	0.056

B7. Paired Samples Test of the gel containing *Terminalia catappa* Linn. red leaf extract formula 5 compared between each time of long term stability at 0, 1, 2, 3 months by viscosity, pH, hydroxyl radical scavenging activity (OHRAC) and total phenolic compound

Parameter	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
				95% Confidence Interval of the Difference				
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Viscosity0 - 1	-0.829	0.814	0.46996	-2.85108	1.19308	-1.764	2	0.22
Viscosity0 - 2	-0.84833	1.38651	0.8005	-4.29261	2.59595	-1.06	2	0.4
Viscosity0 - 3	-0.69267	0.63263	0.36525	-2.26421	0.87888	-1.896	2	0.198
pH0 - pH1	-0.02667	0.02082	0.01202	-0.07838	0.02504	-2.219	2	0.157
pH0 - pH2	0.09667	0.21962	0.1268	-0.4489	0.64224	0.762	2	0.525
pH0 - pH3	0.08667	0.14364	0.08293	-0.27016	0.4435	1.045	2	0.406
OHRAC0 - 1	18.68133	6.41882	3.70591	2.7361	34.62656	5.041	2	0.037
OHRAC0 - 2	16.22367	6.40763	3.69945	0.30622	32.14111	4.385	2	0.048
OHRAC0 - 3	8.988	6.57372	3.79534	-7.34202	25.31802	2.368	2	0.141
TPC0 - TPC1	-51.8777	6.74694	3.89535	-68.638	-35.1173	-13.32	2	0.006
TPC0 - TPC2	32.95067	8.79483	5.0777	11.1031	54.79823	6.489	2	0.023
TPC0 - TPC3	-16.1447	3.11749	1.79989	-23.889	-8.40038	-8.97	2	0.012

## Appendix C

### Gel base and gel containing the extract (Picture)



**Figure 4.20** Gel bases and gel containing *T. catappa* Linn. red leaf extract. A: Gel bases before heating cooling stability tested; B: Gel containing the extract before heating cooling stability tested; C: Gel bases after heating cooling stability tested; D: Gel containing the extract after heating cooling stability tested.

**Appendix D**  
**Ethic for animal test**



Certificate of Approval  
For Use of Animals  
Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: 16 / 2555  
Title of project: Anti-inflammatory test in Rat  
Under the Project Title "Development of Topical Anti-inflammatory Gel Preparation from *Terminalia catappa* Linn. Leaf Extract"  
Principal investigator: Associate Professor Panee Sirisa-Ard, Ph.D  
Affiliation: Faculty of Pharmacy

The Faculty of Medicine, Chiang Mai University, supported by the results of Animal Ethics committee review, that the use of animals in the project conforms with international and national guidelines for ethical conduct on the care and use of animals.

Hereby approves the research proposal to be conducted under its proposed scheme. The approval is effective from 16 August 2012

Bannakij Lojanapiwat, M.D.

Professor

Chair

Date...29 August 2012

Niwes Nantachit, M.D.

Associate Professor

Dean

Date...29 August 2012

Appendix E  
HPLC Chromatogram



ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ศวท-มช.)  
239 ถ. ห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง เชียงใหม่ 50200  
โทรศัพท์: 053-941971, 053-943397  
โทรสาร: 053-892275 E-mail : stsc@science.cmu.ac.th

ใบรายงานผลการทดสอบ

เลขที่รายงานผล 55/698

รหัสตัวอย่าง STSC-CMU 55/171

ชื่อ / หน่วยงานผู้ขอรับบริการ นางสาวนิลบล จินประเสริฐ  
ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
วันที่รับตัวอย่าง 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2555 ช่วงเวลาที่ทดสอบ 9-31 กรกฎาคม พ.ศ. 2555  
วันที่ออกรายงานผลทดสอบ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2555  
รายละเอียดตัวอย่าง สารสกัดสมุนไพร  
ผลการทดสอบตัวอย่าง

ลำดับที่	รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	MDL	วิธีทดสอบ
1	Gallic acid	2,577	mg/kg	-	HPLC
2	Quercetin	708	mg/kg	-	HPLC

หมายเหตุ :

(a) ND = Not Detected (ไม่พบ)

(b) MDL = Method Detection Limit (ค่าต่ำสุดที่วัดได้ของการทดสอบ)

ผลการทดสอบตามเอกสารข้างต้นนี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบเท่านั้น และห้ามใช้รายงานฉบับนี้ในการขอ-คัดทอน โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร

ลงชื่อ.....  
(อาจารย์ ดร. กฤษณะ จิตมณี)  
ผู้จัดการด้านวิชาการ

ลงชื่อ.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นวาศรี รักษิระธรรม)  
ผู้อำนวยการ ศวท-มช.



ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ศวท-มช.)  
239 ด.ห้วยแก้ว ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง เชียงใหม่ 50200  
โทรศัพท์: 053-941971, 053-943397  
โทรสาร: 053-892275 E-mail : stsc@science.cmu.ac.th

### ใบรายงานผลการทดสอบ

เลขที่รายงานผล 55/801

รหัสตัวอย่าง STSC-CMU 55/171

รายงานผลการทดสอบฉบับเพิ่มเติมรายงานผลการทดสอบเลขที่ TR 55/698

ชื่อ/หน่วยงานผู้ขอรับบริการ นางสาวนิลุบล จินประเสริฐ

ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วันที่รับตัวอย่าง 9 กรกฎาคม พ.ศ. 2555 ช่วงเวลาที่ทดสอบ 9 กรกฎาคม – 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555

วันที่ออกรายงานผลทดสอบ 10 กันยายน พ.ศ. 2555

รายละเอียดตัวอย่าง สารสกัดสมุนไพร

ผลการทดสอบตัวอย่าง

ลำดับที่	รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	MDL	วิธีทดสอบ
1	Ellagic acid	3,920	mg/kg	-	HPLC

หมายเหตุ :

(a) ND = Not Detected (ไม่พบ)

(b) MDL = Method Detection Limit (ค่าต่ำสุดที่วัดได้ของการทดสอบ)

ผลการทดสอบตามเอกสารข้างต้นนี้ รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบเท่านั้น และห้ามใช้รายงานฉบับนี้ในการย่อ-คัดทอน โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร

ลงชื่อ.....*กฤษณะ จิตมณี*.....

(อาจารย์ ดร. กฤษณะ จิตมณี)

ผู้จัดการด้านวิชาการ

ลงชื่อ.....*ดร. นวสิทธิ์ รักษารัตน์*.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. นวสิทธิ์ รักษารัตน์)

ผู้อำนวยการ ศวท-มช.

**HPLC Condition:**

Detector: Diode array detector

Wave length: Gallic acid: 280 nm; Quercetin: 375 nm; Ellagic acid: 254 nm

Injection volume: 50  $\mu$ L.

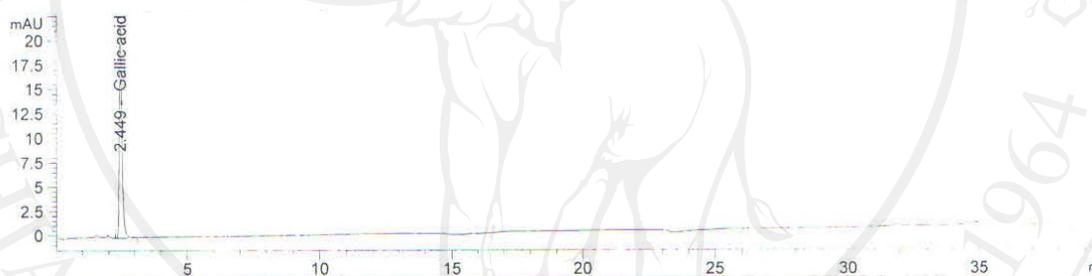
Flow rate: 1.0 mL/min

Column: Agilent Zorbax Ecilpse XDB-C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m**Mobile phase (Gradient elution)**

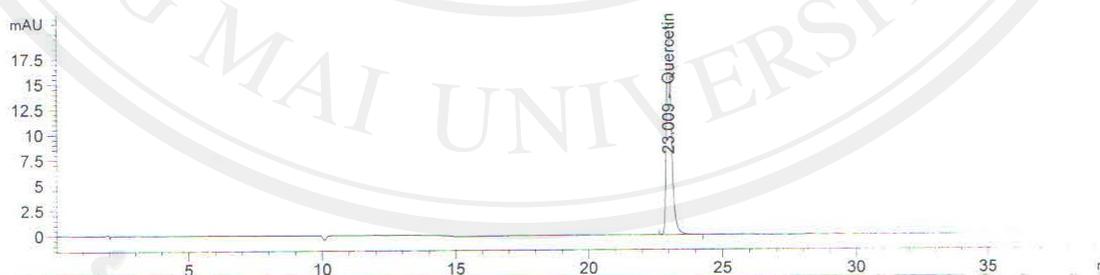
Gallic acid and quercetin. A: 4% Acetic acid; B: Acetronitile

Ellagic acid. A: 0.5% Acetic acid; B: 0.5% Acetic acid: Acetronitile (80:20)

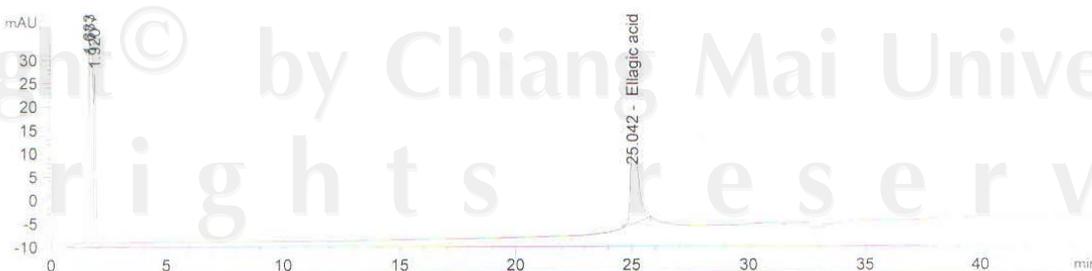
A: Standard gallic acid

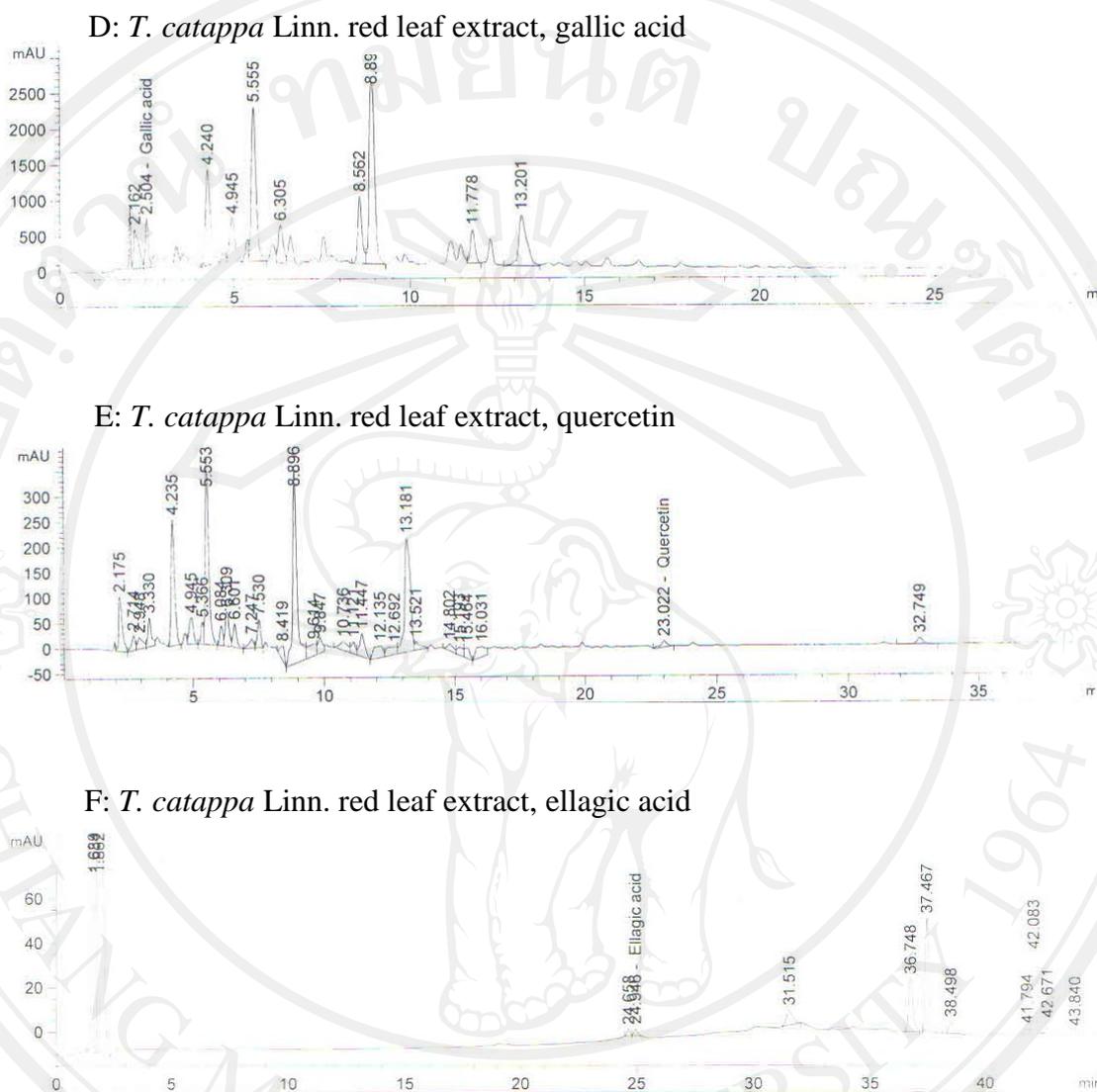


B: Standard quercetin

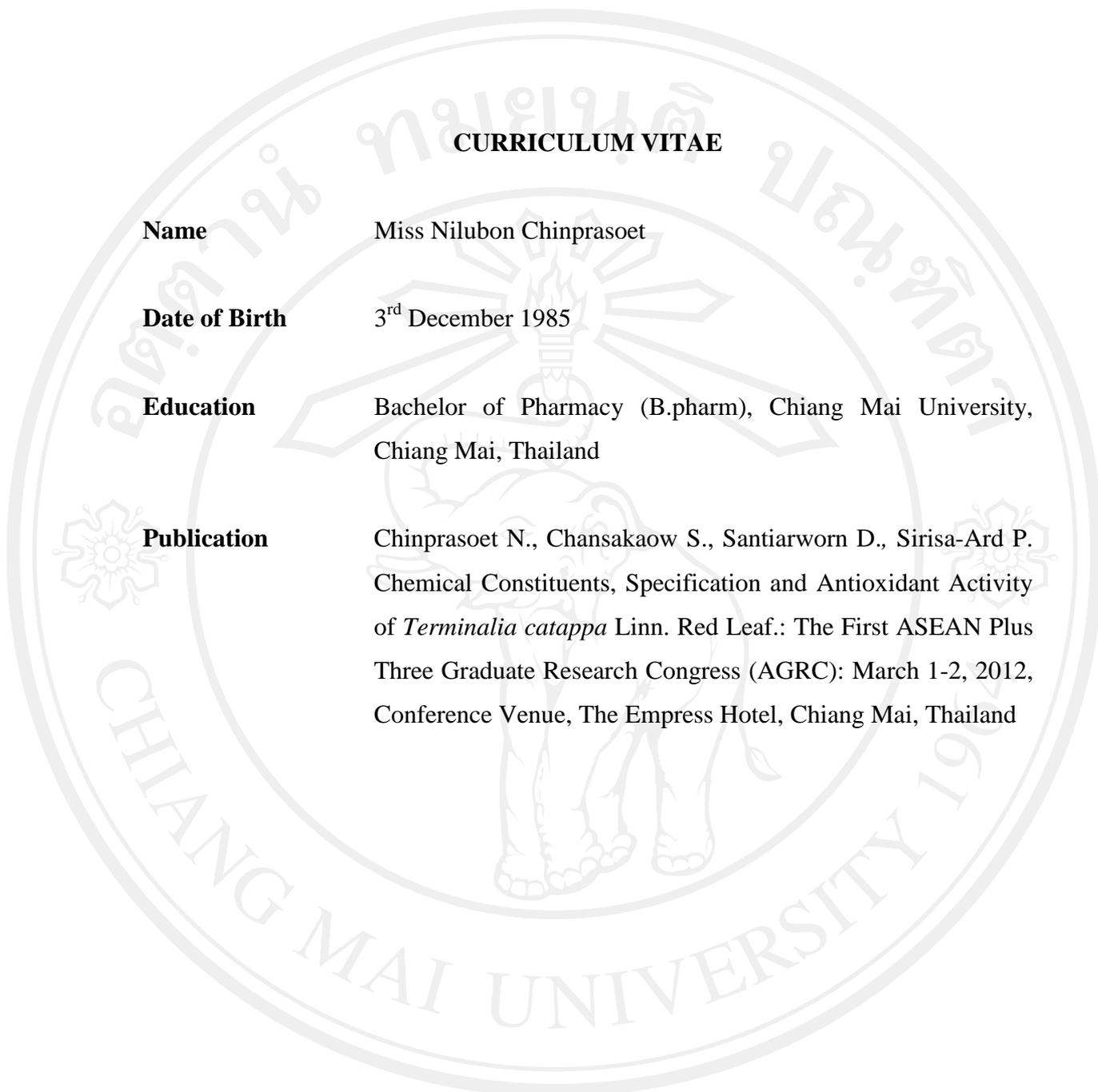


C: Standard ellagic acid





**Figure 4.21** HPLC Chromatograms. A: Standard gallic acid; B: Standard quercetin; C: Standard ursolic acid; D: *T. catappa* Linn. red leaf extract, gallic acid; E: *T. catappa* Linn. red leaf extract, quercetin; F: *T. catappa* Linn. red leaf extract, ellagic acid.

The logo of Chiang Mai University is a large, faint watermark in the background. It features a central figure of a person standing on a lotus flower, surrounded by a circular border containing the university's name in Thai and English, and the year 1961.

## CURRICULUM VITAE

**Name** Miss Nilubon Chinprasoet

**Date of Birth** 3<sup>rd</sup> December 1985

**Education** Bachelor of Pharmacy (B.pharm), Chiang Mai University,  
Chiang Mai, Thailand

**Publication** Chinprasoet N., Chansakaow S., Santiarworn D., Sirisa-Ard P.  
Chemical Constituents, Specification and Antioxidant Activity  
of *Terminalia catappa* Linn. Red Leaf.: The First ASEAN Plus  
Three Graduate Research Congress (AGRC): March 1-2, 2012,  
Conference Venue, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand