



APPENDICES

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

APPENDIX A

CERTIFICATE OF THE APPROVAL FOR THE USE OF ANIMALS



Certificate of Approval

For Use of Animals

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: 27 / 2554


Title of project: *In vivo* albino rabbit skin irritation test of crude and semi – purified extracts from various parts of Long Kong (*Lansium domesticum*, Correa)
(Under the main topic of Development of cosmetic, food supplement and pharmaceutical products from Long Kong (*Lansium domesticum*, Correa)

Principal investigator: Professor Aranya Manosori

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 November 2011



.....

Bannakij Lojanapiwat , M.D.

Professor

Chair

Date.....27 December 2011


.....

Niwes Nantachit , M.D.

Associate Professor

Dean

Date.....27 December 2011



หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หมายเลขโครงการ: ๒๗ / ๒๕๕๔
ชื่อโครงการวิจัย: การทดสอบการก่อการแพ้และระคายเคืองในกระต่ายของสารสกัด
หยาบและกิ่งบรีสุทธ์จากส่วนต่างๆของลองกอง (ภายใต้โครงการ
การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหารเสริม และยา จากลองกอง)
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ อรัญญา มโนสร้อย
สังกัด: ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์
ได้พิจารณาโครงการวิจัย แล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางสากลและประเทศในการปฏิบัติเกี่ยวกับการ
ดูแลและใช้สัตว์

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมาได้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่ ๑๖ พฤศจิกายน ๒๕๕๔

(ศาสตราจารย์นายแพทย์บรรณกิจ โลจนาภิวัฒน์) (รองศาสตราจารย์ นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต)

คณบดี

ประธานคณะกรรมการ
จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
วันที่ ๒๗ ธ.ค. ๒๕๕๔

วันที่ ๒๗ ธ.ค. ๒๕๕๔

APPENDIX B

CERTIFICATE OF THE ETHICAL CLEARANCE



NO. 20/2012

CERTIFICATE OF ETHICAL CLEARANCE

Ethical Review Committee

Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University

Title of Project : Development of anti-wrinkle cosmetic formulations containing extracts
from leaves of Long kong (*Lansium domesticum*, Corr.)

Principal investigator : Miss Kulthida Kumguan
Prof. Dr. Jiradej Manosroi
Prof. Dr. Aranya Manosroi

Participating Institution (s) : Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand

APPROVED BY ETHICAL REVIEW COMMITTEE, FACULTY OF PHARMACY CHIANG MAI
UNIVERSITY

Nimit Morakote

(Associate Professor Nimit Morakote, Ph.D.)

Chairman of Ethical Review Committee

W. Taesotikul

(Associate Professor Wandee Taesotikul, M.Sc.)

Dean of Faculty of Pharmacy

Chiang Mai University

DATE OF APPROVAL 17 May 2012



เลขที่ ๒๐/๒๕๕๕

เอกสารรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์

โดย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงการวิจัย : การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางต้านริ้วรอยที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบลองกอง
(ภายใต้โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหารเสริมและยาจากลองกอง)

ผู้ดำเนินการวิจัย : นางสาวกุลธิดา คำกวน
ศาสตราจารย์ ดร. ภก. จีระเดช มโนสร้อย
ศาสตราจารย์ ดร. ภญ. อรัญญา มโนสร้อย

หน่วยงานรับผิดชอบ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ได้พิจารณาโครงการวิจัยเรื่องข้างต้นแล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อ
สิทธิสวัสดิภาพและไม่มีภัยอันตรายแก่ผู้ถูกวิจัยแต่ประการใด

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่เสนอได้

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นิมิตร มรกต)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

ลงชื่อ

(รองศาสตราจารย์ ภญ. วรณดี แต่ใสตฤกุล)

คณบดี คณะเภสัชศาสตร์

รับรอง ณ วันที่ ๑๗ พฤษภาคม ๒๕๕๕

APPENDIX C
ORDER OF REACTION DETERMINATION

The degradation rate constants (k) of gallic acid were estimated from the slope of the plot between the bioactive concentrations versus times, by the least-squares fitting of various kinetic equations including zero order, first order and second order calculated according to the following equations:

$$\text{Zero order equation : } [A]_t = -k_0 + [A]_0$$

$$\text{First order equation : } \ln[A]_t = -k_1 + \ln[A]_0$$

$$\text{Second order equation : } 1/[A]_t = 1/[A]_0 + k_2$$

Where $[A]_t$ represents the concentration of gallic acid at a particular time, and $[A]_0$ represents the initial concentration of gallic acid and k represents the slope of the resulting linear of the order rate constants.

The trend line of graph which showed the linear regression (r^2) that was the most closed to one would be selected for prediction of shelf life and half life. The predicted shelf life (t_{90}) and half life (t_{50}), which were the time required when gallic acid in the formulations remained at 90 and 50%, respectively were estimated by substituting k into the following shelf life and half life equations:

$$\text{Zero order : Shelf life } (t_{90}) = 0.2/k_0$$

$$\text{Half life } (t_{50}) = [A]_0/2k_0$$

Where $[A_0]$ was the amounts of gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) at initial and k_0 was the degradation rate constants of the zero order kinetic equations.

$$\text{First order : Shelf life } (t_{90}) = 0.152t_{50}$$

$$\text{Half life } (t_{50}) = 0.693/k_1$$

Where k_1 was the degradation rate constants of the first order kinetic equations.

$$\text{Second order : Shelf life } (t_{90}) = 0.11t_{50}$$

$$\text{Half life } (t_{50}) = 1/[A]_0k_2$$

Where $[A_0]$ was the amounts of gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) at initial and k_2 was the degradation rate constants of the second order kinetic equations.

For example;

For the zero order, the degradation rate constant (k) of gallic acid of the 0.1% extract dissolved in propylene glycol kept at $27\pm 2^\circ\text{C}$ for 3 months were determined from slope of graph which plotted between time (month) and remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or $[A]_t$ at particular time as shown in **Figure C1**.

For the first order, the degradation rate constant (k) of gallic acid of the 0.1% extract dissolved in propylene glycol kept at $27\pm 2^\circ\text{C}$ for 3 months were determined from slope of graph which plotted between time (month) and natural logarithm of remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or $\ln[A]_t$ at particular time as shown in **Figure C2**.

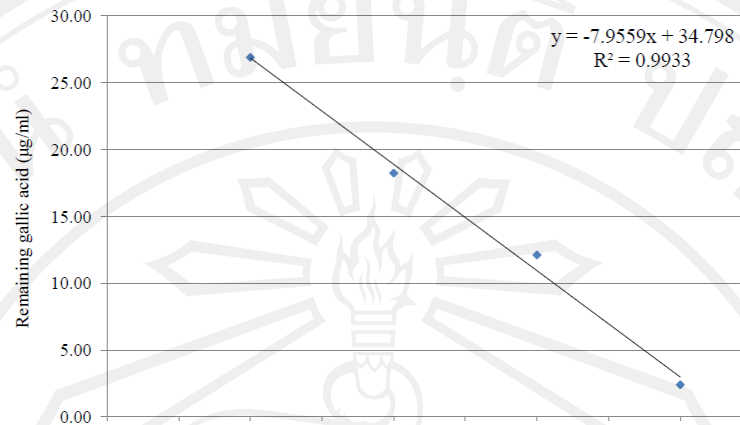


Figure C1 Linear graph plotting between time (x-axis) and remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or $[A]_t$ (y-axis) for determination of degradation rate constant of zero order

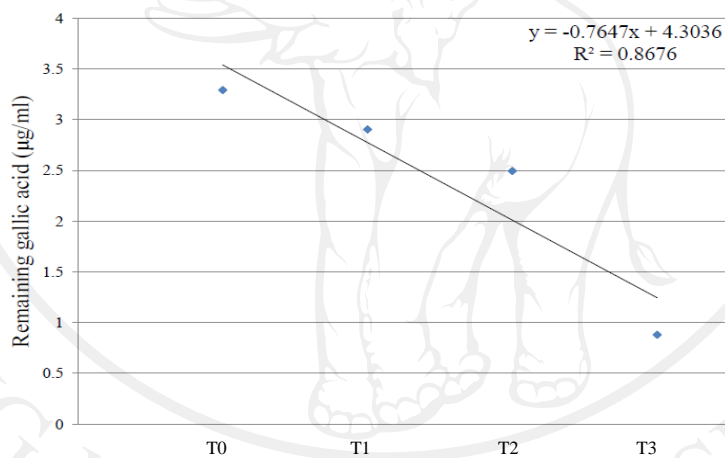


Figure C2 Linear graph plotting between time (x-axis) and remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or (y-axis) for determination of degradation rate constant of first order

For the second order, the degradation rate constant (k) of gallic acid of the 0.1% extract dissolved in propylene glycol kept at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 months were determined from slope of graph which plotted between time (month) and a proportion of remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or $1/[A]_t$ at particular time as shown in **Figure C3**.

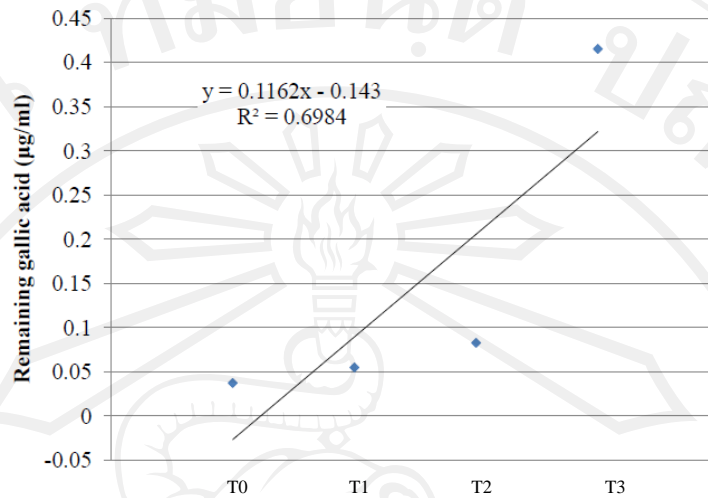


Figure C3 Linear graph plotting between time (x-axis) and a proportion remaining gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) or $1/[A]_t$ (y-axis) for determination of degradation rate constant of second order

The trend line of zero order gave the highest linear regression ($r^2 = 0.9933$) which was the most closed to one, therefore, the degradation rate constant (k_0) of zero order were selected for prediction of shelf life and half life of the remaining gallic acid in the 0.1% extract dissolved in propylene glycol stored at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 months.

The half life and shelf life of gallic acid was calculated from the the degradation rate constant of the zero order kinetic equation from the following equation:

$$\text{Shelf life } (t_{90}) = 0.2t_{50}$$

$$\text{Half life } (t_{50}) = [A]_0/2k_0$$

Where $[A]_0$ is the remaining gallic acid at initial (T0) ($[A]_0 = 26.89 \mu\text{g/ml}$) and k_0 is the degradation rate constants of the zero order kinetic equations ($y = -7.9559x + 34.798$) ($k_0 = 7.9559$)

Half life of the gallic acid in 0.1% extract dissolved in propylene glycol was followed:

$$\begin{aligned}\text{Half life (t}_{50}) &= 26.89 / (2 \times 7.9559) \\ &= 1.69 \text{ days}\end{aligned}$$

Shelf life of the gallic acid in 0.1% extract dissolved in propylene glycol was followed:

$$\begin{aligned}\text{Shelf life (t}_{90}) &= 0.2 \times 1.69 \\ &= 0.34 \text{ days}\end{aligned}$$

APPENDIX D

FORMULATIONS OF BUFFER AND SOLUTIONS USED IN THIS STUDY

1. 30% acrylamide solution

Acrylamide 14.7 g

N,N'-methylenebisacrylamide 0.3 g

Add distilled water to 50 ml

2. Lower gel buffer (0.75 M Tris) pH 8.8

Tris (hydroxymethyl)-methlamine 45.37 g

Add distilled water to 500 ml and adjust pH to 8.8 using HCl

3. Upper gel buffer (0.25 M Tris) pH 6.8

Tris (hydroxymethyl)-methlamine 15 g

Add distilled water to 500 ml and adjust pH to 6.8 using HCl

4. Loading dye pH 6.8

Tris (hydroxymethyl)-methlamine 1.5 g

Sodium dodecyl sulfate 4 g

1% bromophenol blue in 25 M sucrose solution 4 ml

Add distilled water to 100 ml

5. Electrophoresis buffer pH 8.5 (10X)

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Tris (hydroxymethyl)-methlamine	30	g
Glycine	144	g
Add distilled water to 1,000 ml		

6. Separating gel (7% acrylamide) for zymogram

Gelatin	0.01	g
Distilled water	2.4	ml
Lower gel buffer pH 8.8	5	ml
30% acrylamide solution	2.3	ml
10% sodium dodecyl sulfate	100	μ l
10% ammonium persulfate	100	μ l
TEMED	10	μ l

7. Stacking gel (5% acrylamide) for zymogram

Distilled water	1.128	ml
30% acrylamide solution	400	μ l
Upper gel buffer pH 6.8	500	μ l
10% sodium dodecyl sulfate	10	μ l
10% ammonium persulfate	20	μ l
TEMED	10	μ l

APPENDIX E

SATISFACTION EVALUATION BY QUESTIONNAIRES OF VOLUNTEERS

Example of questionnaire

แบบสอบถามเพื่อประเมินความพึงพอใจ

การพัฒนาทำรับเครื่องสำอางต้านริ้วรอยที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบพลองทอง

คำชี้แจง

แบบสอบถามนี้จัดทำขึ้นเพื่อสอบถามความพึงพอใจของอาสาสมัคร

ระหว่างเดือน กรกฎาคม 25 55 - สิงหาคม 2555

โปรดทำเครื่องหมาย ลงในช่อง ที่ตรงกับความเป็นจริงของท่านมากที่สุด

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

เพศ ชาย หญิง

อายุ _____ ปี

น้ำหนัก _____ กิโลกรัม

ส่วนสูง _____ เซนติเมตร

ตอนที่ 2 ข้อมูลการใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว (ในระยะเวลา 1 เดือนที่ผ่านมา)

ท่านใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหรือไม่ ใช่ ไม่ใช่

ความสม่ำเสมอในการใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

ทุกวัน สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง ต่ำกว่าสัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง

ประเภทผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ใช้เป็นประจำ (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

ลดริ้วรอยเหี่ยวย่น เพิ่มความชุ่มชื้น ลดความหมองคล้ำ

อื่นๆ (ระบุ).....

สภาพผิวของท่าน

ผิวแพ้ง่าย ผิวแห้ง ผิวมัน ผิผสม (บางส่วนแห้งหรือมัน)

ผิวเป็นสิวง่าย อื่นๆ(ระบุ)

ตอนที่ 3 ความคิดเห็นต่อผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์หมายเลข 1	ความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
ความพึงพอใจต่อลักษณะผลิตภัณฑ์					
1. สีของผลิตภัณฑ์					
2. กลิ่นของผลิตภัณฑ์.					
3. ความหนักของผลิตภัณฑ์.					
4. ความมันวาวของเนื้อผลิตภัณฑ์.					
ความพึงพอใจหลังทาผลิตภัณฑ์					
1. ความเหนอะหนะของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์					
2. ความรวดเร็วในการซึมซาบหลังทาผลิตภัณฑ์.					
3. ความเนียนนุ่มของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					
4. ปื้นขาวบนผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					

ผลิตภัณฑ์หมายเลข 2	ความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
ความพึงพอใจต่อลักษณะผลิตภัณฑ์					
1. สีของผลิตภัณฑ์					
2. กลิ่นของผลิตภัณฑ์.					
3. ความหนักของผลิตภัณฑ์.					
4. ความมันวาวของเนื้อผลิตภัณฑ์					
ความพึงพอใจหลังทาผลิตภัณฑ์					
1. ความเหนอะหนะของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์					
2. ความรวดเร็วในการซึมซาบหลังทาผลิตภัณฑ์.					
3. ความเนียนนุ่มของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					
4. ปื้นขาวบนผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					

ผลิตภัณฑ์หมายเลข 3	ความพึงพอใจ				
	5	4	3	2	1
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
ความพึงพอใจต่อลักษณะผลิตภัณฑ์					
1. สีของผลิตภัณฑ์					
2. กลิ่นของผลิตภัณฑ์.					
3. ความหนักของผลิตภัณฑ์.					
4. ความมันวาวของเนื้อผลิตภัณฑ์.					
ความพึงพอใจหลังทาผลิตภัณฑ์					
1. ความเหนอะหนะของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์					
2. ความรวดเร็วในการซึมซาบหลังทาผลิตภัณฑ์.					
3. ความเนียนนุ่มของผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					
4. ปื้นขาวบนผิวหลังทาผลิตภัณฑ์.					

Table E1 General information summaries of human volunteers who have assessed for *in vivo* anti-aging activities and satisfaction evaluations

Sex	Numbers of volunteers	Age ranges (years old)	Average mass (kg)	Average height (m)	Average body mass index (BMI) (kg/m ²)
Male	10	27 - 49	69.97±8.30	1.69±0.08	24.53±6.42
Female	10	24 - 57	54.67±15.17	1.57±0.07	22.31±3.80
Total	20	24 - 57	63.09±13.94	1.64±0.10	23.53±5.12

Note: BMI = [mass (kg)] / [height (m)]²

Table E2 Numbers out of 20 volunteers in the satisfaction evaluation of the physical appearance and organoleptic evaluation on the cream formulations containing the ethyl acetate semi-purified extract at 0.1, 0.3 and 0.5% (w/w)

Scale of satisfaction	Numbers of volunteer														
	Very poor			Poor			Fair			Good			Excellent		
Concentrations of cream	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%	0.3%	0.5%	0.1%	0.3%	0.5%
Physical appearance															
Color	0	0	0	0	0	5	6	9	10	9	8	2	5	3	3
Odor	0	0	0	1	3	6	12	9	10	2	5	2	5	3	2
Consistency	0	0	1	2	3	1	11	10	14	6	5	3	1	2	1
Glossiness	0	0	0	4	2	1	8	9	12	4	7	5	4	2	2
Organoleptic evaluation															
Sticky	0	0	0	3	2	3	11	9	13	5	6	3	1	3	1
Absorption	1	0	0	0	3	2	12	9	12	3	6	4	4	2	2
Smoothness	0	0	0	1	0	0	9	8	12	6	7	3	4	5	5
creamy residue	0	0	0	0	2	1	12	10	14	4	5	2	4	3	3

CURRICULUM VITAE

Name	Ms. Kulthida Kumguan
Date of birth	15 July 1987
Education	2003-2005 High School Certificate from the Princess Chulabhorn's College, Chiang Rai, Thailand 2006-2009 Bachelor of Science (Cosmetic Science) from Mae Fah Luang, University, Chiang Rai, Thailand 2010-2012 A Master degree at Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand under the TRF-MAG Program

Publications:

1. Aranya Manosroi, **Kulthida Kumguan**, Charinya Chankhampan, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Nanoscale MMP-2 inhibition of Long Kong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press, 2012. (Impact Factor 1.352)

Scientific Presentations:

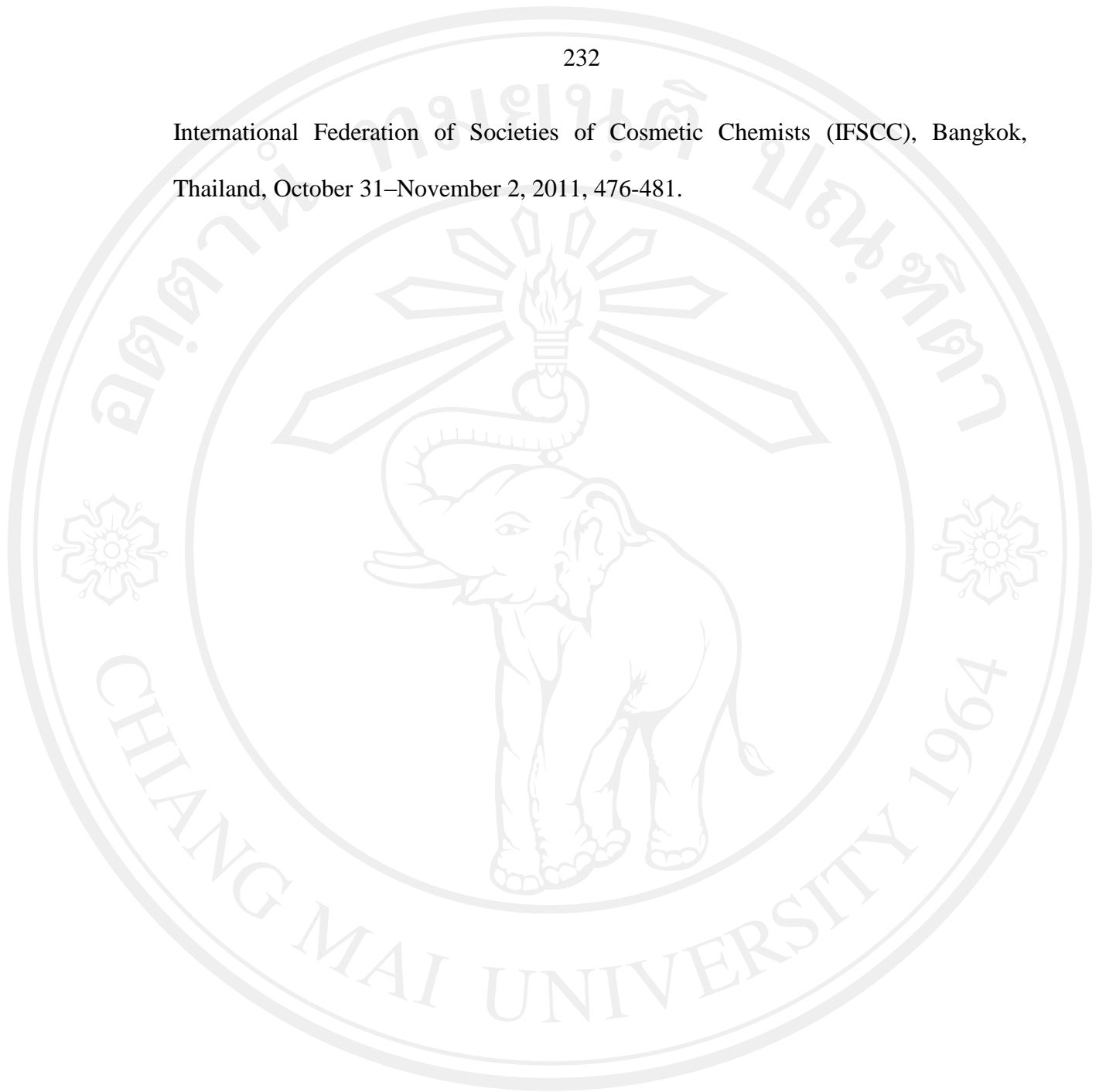
1. **Kulthida Kumguan**, Jiradej Manosroi, Pensak Jantrawut, Tanachai Pankasemsuk, Worapaka Manosroi and Aranya Manosroi. Antioxidant activities of aqueous extract from leaves of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.), 3E IFSCC 2011 Conference,

- International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), Bangkok, Thailand, October 31 – November 2, 2011 (Poster presentation)
2. Aranya Manosroi, **Kulthida Kumguan**, Pensak Jantrawut, Tanachai Pankasemsuk, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Antioxidant activities of aqueous extract from leaves of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.), The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 4), Chiang Mai, Thailand, November 28 – 30, 2012. (Poster presentation)
 3. Aranya Manosroi, **Kulthida Kumguan**, Pensak Jantrawut, Tanachai Pankasemsuk, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Nanoscale MMP-2 inhibition of Long Kong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging, The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 4), Chiang Mai, Thailand, November 28 – 30, 2012. (Poster presentation)
 4. **Kulthida Kumguan**, Charinya Chankhampan, Worapaka Manosroi, Jiradej Manosroi and Aranya Manosroi. Nanoscale gelatinase A inhibition on human skin fibroblast of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.) leaf extracts, the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (Stt38), Chiang Mai, Thailand, October 17 – 19, 2012 (Oral presentation)

Proceedings:

1. **Kulthida Kumguan**, Jiradej Manosroi, Pensak Jantrawut, Tanachai Pankasemsuk, Worapaka Manosroi and Aranya Manosroi. Antioxidant activities of aqueous extract from leaves of Long Kong (*Lansium domesticum* Corr.), 3E IFSCC 2011 Conference,

International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), Bangkok,
Thailand, October 31–November 2, 2011, 476-481.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved