



**APPENDICES**

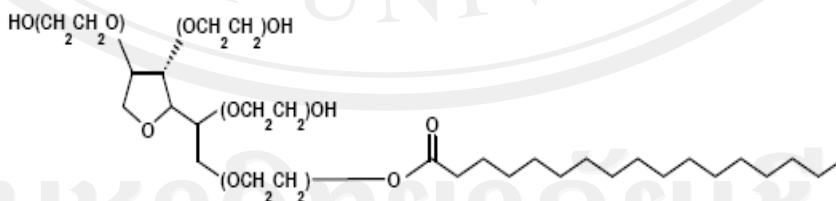
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**APPENDIX A**  
**CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF THE CHEMICALS USED IN**  
**THIS STUDY**

**1. Tween 61**

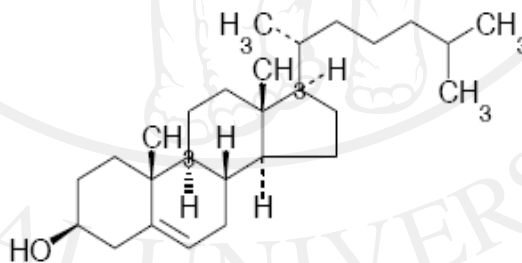
Chemical name	polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate
Synonyms	polysorbate 61, Tween 61
Empirical formula	$C_{32}H_{62}O_{10}$
Molecular weight	607
Description	tan solid
HLB	9.6
Solubility	dispersible in water, soluble in ethanol
Chemical structure	chemical structure of polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate is shown in <b>Figure A.1</b>



**Figure A.1** Chemical structure of Tween 61

## 2. Cholesterol

Name	cholesterol
Chemical name	cholest-5-en-3 $\beta$ -ol
Synonyms	cholesterin
Empirical formula	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O
Molecular weight	386.67
Description	white or faintly yellow, almost odorless, needles
Melting point	147 - 150 °C
Solubility	soluble in acetone, chloroform, ether, fixed oils, practically insoluble in water
Chemical structure	chemical structure of cholesterol is shown in <b>Figure A.2</b>

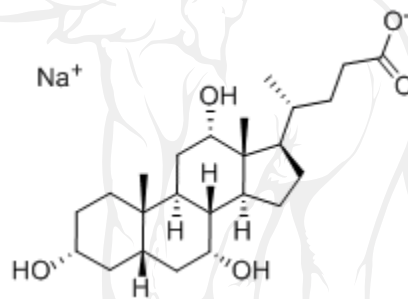


**Figure A.2** Chemical structure of cholesterol

## 3. Sodium cholate

Chemical name	17-(1-Methyl-3-carboxypropyl)etiocolane-3, 17-beta-(1-methyl-3-carboxypropyl)etiocolane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol, 3,7,12-
---------------	---

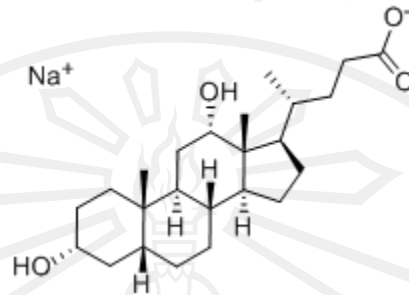
	trihydroxy-,(3- $\alpha$ ,5- $\beta$ ,7- $\alpha$ ,12- $\alpha$ )-cholan-24-oicaci, 3,7,12-Trihydroxy-5-chloanicacid
Synonyms	Sodium choleate, Cholic acid sodium salt
Empirical formula	$C_{24}H_{39}NaO_5$
Molecular weight	430.55
Description	white to off-white powder
Solubility	soluble in water (150 g/L at 20 °C)
Chemical structure	chemical structure of sodium cholate is shown in <b>Figure A.3</b>



**Figure A.3** Chemical structure of sodium cholate

#### 4. Sodium deoxycholate

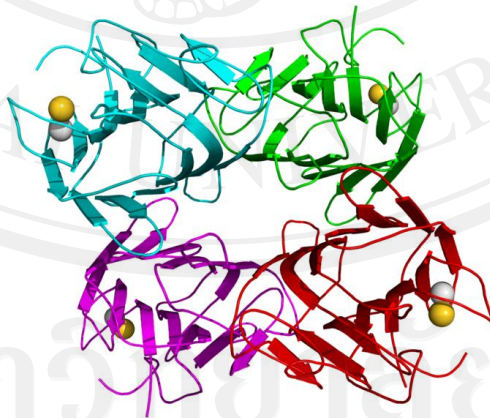
Chemical name	Cholan-24-oic acid, 3,12-dihydroxy-, monosodium salt
Synonyms	Oxide extract, Deoxycholic acid sodium salt
Empirical formula	$C_{24}H_{39}NaO_4$
Molecular weight	414.55
Description	white to cream crystalline powder
Solubility	soluble in water (330 g/L at 15 °C)
Chemical structure	chemical structure of sodium deoxycholate is shown in <b>Figure A.4</b>



**Figure A.4** Chemical structure of sodium deoxycholate

### 5. Concanavalin A

Synonyms	Con A type IV, <i>Canavalia ensiformis</i> , Con A, Jack bean
Molecular weight	26,000 (237 amino acids)
Description	white to white with a yellow cast powder
Solubility	soluble in water (10 mg/ml)
Structure	Structure of concanavalin A is shown in <b>Figure A.5</b>



**Figure A.5** Structure of concanavalin A

**APPENDIX B**  
**CALCULATION OF NANOVESICULAR COMPOSITIONS**

The amount of each composition in nanovesicular formulations was calculated from the following equation:

Required amount (g) = molar ratio in the formulation × concentration of the nanovesicles (Molar) × required volume (L) × molecular weight

For example, to prepare 100 ml of non-elastic niosomes (5 mM) composed of Tween 61 and cholesterol at 1:1 molar ratio

The required amount of Tween 61 and cholesterol was as follows:

$$\text{Tween61 (g)} = \frac{1}{2} \times 5 \times 10^{-3} \times 100 \times 10^{-3} \times 1,311.7 = 0.3279 \text{ g}$$

$$\text{cholesterol (g)} = \frac{1}{2} \times 5 \times 10^{-3} \times 100 \times 10^{-3} \times 386.67 = 0.0967 \text{ g}$$

For example, to prepare 100 ml of 0.25% NaC elastic niosomes (5 mM) composed of Tween 61, cholesterol and sodium cholate at 1:1:0.012 molar ratio

The required amount of Tween 61, cholesterol and sodium cholate was as follows:

$$\text{Tween61 (g)} = \frac{1}{2.012} \times 5 \times 10^{-3} \times 100 \times 10^{-3} \times 1,311.7 = 0.3260 \text{ g}$$

$$\text{cholesterol (g)} = \frac{1}{2.012} \times 5 \times 10^{-3} \times 100 \times 10^{-3} \times 386.67 = 0.0961 \text{ g}$$

$$\text{sodium cholate (g)} = \frac{0.012}{2.012} \times 5 \times 10^{-3} \times 100 \times 10^{-3} \times 430.55 = 0.0001 \text{ g}$$

**Table B.1** Amounts of the compositions in the prepared nanovesicles

Formulation	Amounts of the composition*				
	Tween 61 (g)	Cholesterol (g)	Sodium cholate (g)	Sodium deoxycholate (g)	Ethanol (ml)
Non-elastic niosomes (Tween 61/CHL = 1:1)					
- 5 mM	0.3279	0.0967	-	-	-
- 10 mM	0.6558	0.1934	-	-	-
- 15 mM	1.3117	0.3867	-	-	-
5 mM NaC elastic niosomes					
- 0.25% NaC (Tween 61/CHL/ NaC = 1:1:0.012)	0.3260	0.0961	0.0001	-	-
- 0.5% NaC (Tween 61/CHL/ NaC = 1:1:0.025)	0.3239	0.9547	0.0003	-	-
- 2.5% NaC (Tween 61/CHL/ NaC = 1:1:0.05)	0.3199	0.9431	0.0005	-	-
- 5% NaC (Tween 61/CHL/ NaC = 1:1:0.1)	0.3123	0.9206	0.0010	-	-
- 10% NaC (Tween 61/CHL/ NaC = 1:1:0.2)	0.2981	0.8788	0.0020	-	-
5 mM NaDC elastic niosomes					
- 0.25% NaDC (Tween 61/CHL/ NaDC = 1:1:0.012)	0.3260	0.0961	-	0.0001	-
- 0.5% NaDC (Tween 61/CHL/ NaDC = 1:1:0.025)	0.3239	0.9547	-	0.0003	-
- 2.5% NaDC (Tween 61/CHL/ NaDC = 1:1:0.05)	0.3199	0.9431	-	0.0005	-
- 5% NaDC (Tween 61/CHL/ NaDC = 1:1:0.1)	0.3123	0.9206	-	0.0010	-
- 10% NaDC (Tween 61/CHL/ NaDC = 1:1:0.2)	0.2981	0.8788	-	0.0020	-
Ethanol elastic niosomes					
- 10% ethanol (Tween 61/CHL = 1:1)	0.3279	0.0967	-	-	10
- 20% ethanol (Tween 61/CHL = 1:1)	0.3279	0.0967	-	-	20
- 25% ethanol (Tween 61/CHL = 1:1)	0.3279	0.0967	-	-	25
- 30% ethanol (Tween 61/CHL = 1:1)	0.3279	0.0967	-	-	30

\*The specified amount was for the preparation of 100 ml nanovesicles formulation

## APPENDIX C

### FORMULATIONS OF BUFFER AND SOLUTION 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	$\mu\text{l}$
10% ammonium persulfate	100	$\mu\text{l}$
TEMED	10	$\mu\text{l}$

## 7. Stacking gel (5% acrylamide) for zymogram

Distilled water	1.128	ml
30% acrylamide solution	400	$\mu\text{l}$
Upper gel buffer pH 6.8	500	$\mu\text{l}$
10% sodium dodecyl sulfate	10	$\mu\text{l}$
10% ammonium persulfate	20	$\mu\text{l}$
TEMED	10	$\mu\text{l}$

**APPENDIX D**

**CERTIFICATE OF THE APPROVAL FOR THE USE OF ANIMALS**



Certificate of Approval

For Use of Animals

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: 22 / 2554  
Title of project: Transdermal Absorption and *In Vivo* Irritation of Natural Peptides Loaded in Nanoparticle Products  
Principal investigator: Professor Aranya Manosroi , 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 6 September 2011

Bannakij Lojanapiwat, M.D.

Professor

Chair

Date 20 September 2011

Niwes Nantachit , M.D.

Associate Professor

Dean

Date 20 September 2011



หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หมายเลขโครงการ: ๒๒ / ๒๕๕๔  
ชื่อโครงการวิจัย: การทดสอบประสิทธิภาพซีมผ่านผิวหนังและการแพ้ การก่อความ  
ระคายเคืองของผลิตภัณฑ์เปปไทด์จากธรรมชาติเก็บกักนาโนใน  
สัตว์ทดลอง  
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ อรุณญา มโนสร้อย  
สังกัด: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์  
ได้พิจารณาโครงการวิจัย แล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางสากลและประเทศในการปฏิบัติเกี่ยวกับการ  
ดูแลและใช้สัตว์

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมาได้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่ ๖ กันยายน ๒๕๕๔

(ศาสตราจารย์นายแพทย์บรรณกิจ โลจนาภิวัฒน์) (รองศาสตราจารย์ นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต)

ประธานคณะกรรมการ  
จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง  
วันที่ ๒๐ ก.ย. ๒๕๕๔

คณบดี  
วันที่ ๒๐ ก.ย. ๒๕๕๔



Certificate of Approval

For Use of Animals

Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Protocol Number: 6 / 2555

Title of project: Scar Reduction Performance Test of Natural Peptides Loaded in Nanoparticle products in the Rabbit Ear Model

Principal investigator: Professor Aranya Manosroi, 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 20 July 2012

*Bannakij Lojanapiwat*

Bannakij Lojanapiwat, M.D.

Professor

Chair

Date...10 August 2012

*N. Nantachit*

Niwes Nantachit, M.D.

Associate Professor

Dean

Date...10 August 2012



หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หมายเลขโครงการ: ๖ / ๒๕๕๕  
ชื่อโครงการวิจัย: การทดสอบประสิทธิภาพการรักษาแผลเป็นชนิดนูนของผลิตภัณฑ์เปปไทด์จากธรรมชาติเก็บกักในอนุภาคนาโนในใบหูกกระทาย  
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ อรุณญา มโนสร้อย  
สังกัด: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ ได้พิจารณาโครงการวิจัย แล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางสากลและประเทศในการปฏิบัติเกี่ยวกับการดูแลและใช้สัตว์

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมานี้ได้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่ ๒๐ กรกฎาคม ๒๕๕๕

(ศาสตราจารย์นายแพทย์บรรณกิจ โฉมนานวิวัฒน์) (รองศาสตราจารย์นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต)

ประธานคณะกรรมการ

คณบดี

จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

วันที่ ๒๐ กรกฎาคม ๒๕๕๕

วันที่ ๒๐ สิงหาคม ๒๕๕๕

## CURRICULUM VITAE

<b>Name</b>	Ms. Charinya Chankhampan
<b>Date of birth</b>	19 September 1983
<b>Education</b>	1999-2001 High School Certificate from the Prince Royal College Chiang Mai, Thailand 2002-2006 Bachelor's Degree in Pharmacy (B. Pharm, Second Class Honor) from Chiang Mai University, Thailand 2007-2012 A Ph.D. Candidate at Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand under the RGJ-Ph.D. Program of TRF
<b>Scholarships and Awards</b>	
2001	The Best Academic Award Certificate from the Prince Royal College, Chiang Mai, Thailand
2007	The Royal Golden Jubilee Scholarship under Ph.D. Program, 2007- 2012 (Thailand Research Fund)

## Publications

1. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Enhancement of chemical stability and transdermal absorption of salmon

- calcitonin loaded in elastic niosomes. *Advanced Science Letters*, 2012; 5(1): 314-319. (Impact Factor 1.253)
2. **Charinya Chankhampan**, Jiradej Manosroi, Hiromitsu Yamamoto, Kohei Tahara, Worapaka Manosroi, Yoshiaki Kawashima and Aranya Manosroi. Chemical stability enhancement and cytotoxicity reduction of papain loaded in PLGA nanospheres. *Journal of Experimental Nanoscience*, 2012; X(X): XX-XX. (Impact Factor 1.011)
  3. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Hamideh Ofoghi, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Low cytotoxic elastic niosomes loaded with salmon calcitonin on human skin fibroblasts. *Human and Experimental Toxicology*, 2012; X(X): XX-XX. (Impact Factor 1.772)
  4. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Kassara Pattamapun, Witchapong Issarangporn, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Biological activities of the extracted papain and bromelain from plants. *Journal of Food Science and Technology*. Under reviewed (Impact Factor 0.498)
  5. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Toxicity reduction and MMP-2 stimulation of papain and bromelain loaded in elastic niosomes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012; 8(5): 720-729. (Impact factor = 4.216)
  6. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Submitted. (Impact factor = 4.304)

7. Aranya Manosroi, Bang-on Kietthanakorn, Narinthorn Khositsuntiwong, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi, Masahiko Abe and Jiradej Manosroi Physical characteristics and biological activities of Thai flower extracts loaded in niosomes. *Chiang Mai Journal of Science*. Under reviewed (Impact Factor 0.34)
8. Aranya Manosroi, Kulthida Kumguan, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi Nanoscale MMP-2 inhibition of Longkong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012; X(X): XX-XX. (Impact factor = 1.563)
9. Aranya Manosroi, Bang-on Kietthanakorn, **Charinya Chankhampan**, Sittisak Chuenpitayaton, Warintorn Ruksiriwanich, Puxvadee Chaikul, Korawinwich Boonpisuttinant, Kulthida Kumguan, Mathukorn Sainakham, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Biological activities of Hemp (*Cannabis sativa* L var. sativa) leaf and seed extracts. *Pharmaceutical Biology*. Under reviewed. (Impact factor = 0.878)
10. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan**, Worapaka Manosroi and Jiradej Manosroi. Anti-proliferative and matrix metalloproteinase-2 inhibition of the extracts from Longkong (*Lansium domesticum*) on human mouth epidermal carcinoma. In preparation.

#### Scientific Presentations

1. Aranya Manosroi, **Charinya Chankhampan** and Jiradej Manosroi. Development of calcitonin entrapped in elastic niosomal formulations, The RGJ Seminar Series LXII:



Biodiversity, Utilization and Global warming solution, Faculty of Science, Chiang Mai University and The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, September 16<sup>th</sup> 2009 (Oral presentation)/The 35<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT35): Science and Technology for a Better Future, The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand, October 15th-17th 2009 (Poster presentation)/The 5th Chiang Mai university Conference, Chiang Mai university at Chiang Mai, Thailand, November 26th-27th, 2009 (Poster presentation)/RGJ-Ph.D. Congress XI : Research Towards Sustainability, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand, April 1st-3rd, 2010 (Poster presentation)

2. **Charinya Chankhampan**, Jiradej Manosroi, Hiromitsu Yamamoto, Yoshiaki Kawashima and Aranya Manosoi. Physico-chemical stability enhancement of papain loaded in PLGA nanospheres for scar treatment, RGJ-Ph.D. Congress XII : Discovery and Diversity, Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand, April 1st-3rd, 2011 (Oral presentation)/Seminar in Nanotechnology for Health Science, Chiang Mai Hill, Chiang Mai, Thailand, February 27th-29th, 2012 (Oral presentation)

3. **Charinya Chankhampan**, Jiradej Manosroi, Worapaka Manosroi, Yoshiaki Kawashima and Aranya Manosroi Transdermal absorption enhancement of gel containing papain in elastic niosomes, Perspectives in Percutaneous Penetration Thirteenth International Conference, Palais des Congrès, La Grande Motte, Montpellier, France, April 10th-14th, 2012 (Poster presentation)