วารสารผลิตกรรมการเกษตร
JOURNAL OF AGRICULTURAL PRODUCTION
MJU

ว. ผลิตกรรมการเกษตร 4(1):77-90
J. Agri. Prod. 2022

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและอัตราส่วนของสารสกัดที่แตกต่างกันต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในกระชายดำ

Comparison of Different Extraction Methods and Solvent Ratios on Yield, Content of Total Phenolic and Flavonoid in *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker

นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์[1*] ภาวิณี อารีศรีสม[1] กอบลาภ อารีศรีสม[1] วิกานดา ใหม่เฟย[2] วรภัสสรณ์ คงธนจารุอนันต์[3] และ ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล[4]

Narin Taokaenchan[1*] Pawinee Areseesom[1] Koblab Aresesom[1] Vikanda Maifaey[2] Raphassorn Kongtanajaruanun[3] and Sakchai Sateinperakul[4]

[1] สาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[1] Division of Medicinal Plant Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, ChiangMai 50290

[2] สาขาการจัดการชุมชน มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดแพร่ 54140

[2] Division of Community Management, Maejo University, Phrae Campus, Phrae 54140

[3] สาขาวิชาวิชาเศรษฐศาสตร์ คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[3] Division of Economics, Faculty of Economics, Maejo University, Chiang Mai 50290

[4] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[4] Division of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, ChiangMai 50290

[*] Corresponding author: narin_t15@hotmail.com

(Received: 30 September, 2021; Revised: 7 December, 2021; Accepted: 28 January, 2022)

Abstract

This research compared the different extraction methods (maceration, sonication, and microwave) with the ratio of ethanol and water (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, and 0:100) on yield of extraction, contents of total phenolic, and flavonoid in *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker. The results showed that the yield of extraction, total phenolic compound, and flavonoid contents in *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker had a

significantly difference (P<0.05) on different extraction methods with the ratios of ethanol and water. The maximum yield (12.23±1.03 %) of the crude extract was observed at the maceration method with an ethanol to water ratio of 60:40 while the maximum total phenolic compound and flavonoid content were obtained by the microwave extraction method. The highest total phenolic compound (65.60±4.62 μgGAE/ mg extract) was obtained when extracted with ethanol to water ratio of 60:40. Furthermore, using ethanol to water ratio of 100:0 yielded the highest flavonoid content with 93.43±9.78 μgQE/ mg extract.

Keywords: Phenolic, flavonoid, extraction, microwave

บทคัดย่อ

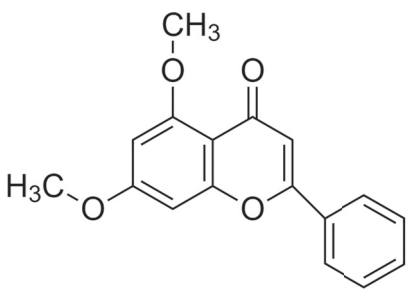
งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน (การแช่หมัก อัลตราโซนิค และไมโครเวฟ) ด้วยอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำ (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100) ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในกระชายดำ ผลศึกษาพบว่าน้ำหนักสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในกระชายดำ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ต่อวิธีการสกัดด้วยอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำต่างกัน โดยน้ำหนักสารสกัดหยาบมีปริมาณมากที่สุด (12.23±1.03%) เมื่อทำการสกัดด้วยวิธีการแช่หมัก และใช้เอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน (60:40) ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์มีปริมาณมากที่สุดเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีค่าสูงที่สุด (65.60±4.62 มคก.สมมูลของกรดแกลลิกต่อ มก.สารสกัดหยาบ) เมื่อสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 60:40 นอกจากนี้เมื่อใช้เอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 100:0 จะสกัดสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 93.43±9.78 มคก.สมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มก.

คำสำคัญ: ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ การสกัด ไมโครเวฟ

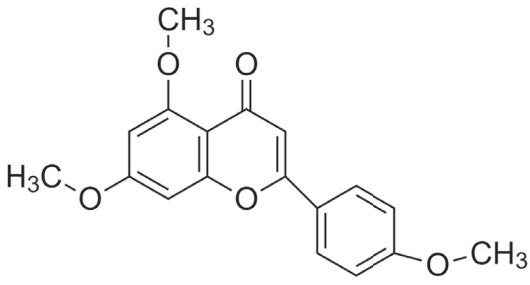
คำนำ

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker) เป็นพืชในตระกูล Zingiberaceae เช่นเดียวกับขิง ข่า และขมิ้น มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อนชื้น และในประเทศไทย เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นอยู่ใต้ดิน (rhizome) ที่เรียกกันทั่วไปว่าหัว หรือเหง้า โดยเหง้าหรือหัวมีสีเข้มแตกต่างกัน ตั้งแต่สีม่วงจาง ม่วงเข้มและดำสนิท กระชายดำมีใบขนาดใหญ่ และมีสีเขียวเข้มกว่ากระชายทั่วไป ขนาดใบกว้างประมาณ 7-15 เซนติเมตร ยาว 30-35 เซนติเมตร ลำต้นมีความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร (Eungpinichpong *et al*., 2018) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเหง้ากระชายดำ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ 5,7-dimethoxyflavone และ 5,7,4-trimethoxyflavone (Sutthanut *et al.,* 2007) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้

ยังพบสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยเช่นกัน (Chivapat *et al.,* 2004) เหง้ากระชายดำนั้นมีสรรพคุณ และคุณสมบัติทางด้านเภสัชวิทยามากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง และมีสรรพคุณด้านบำรุงกำลัง (Saokaew *et al.,* 2017) เป็นต้น



5,7-dimethoxyflavone



5,7,4-trimethoxyflavone

Figure 1 Structure of flavonoid compounds in *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker

การสกัดเป็นกระบวนการที่สำคัญอันดับแรกในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากพืชสมุนไพร ในปัจจุบันมีวิธีการสกัดที่นำมาใช้เพื่อทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หลายวิธี เช่น การสกัดแบบแช่หมัก การสกัดแบบซอกเลท ซึ่งเป็นกระบวนการสกัดที่ถูกใช้มานานแล้ว ข้อเสียของวิธีการดังกล่าวคือ ใช้สารเคมีที่ค่อนข้างมาก และใช้ระยะเวลาในการสกัดที่นาน (Masota *et al.,* 2020) จึงทำให้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟ อัลตราโซนิค หรือการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid CO_2 extraction) (Liu *et al.,* 2016) เป็นต้น แต่วิธีการสกัดด้วย supercritical fluid CO_2 เป็นวิธีการที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และต้องอาศัยนักวิจัยผู้ที่มีความชำนาญในการทำการสกัด จึงทำให้วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ และอัลตราโซนิคถูกนำมาใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรมากกว่า (Baghdikian *et al.,* 2016; Vinatoru *et al.,* 2017; Siramon *et al.,* 2020) ปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ได้แก่ เวลาในการสกัด อุณหภูมิ ตัวทำละลาย อัตราส่วนของแข็งต่อตัวทำละลาย ทั้งหมดล้วนอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด (Zhang *et al.,* 2018) และในปัจจุบันนี้การทำงานที่ช่วยประหยัดเวลา ลดค่าใช้จ่าย ที่เรียกว่าการสกัดแบบสีเขียว (green extraction) และไม่ยุ่งยากซับซ้อน ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่นำมาคิดทบทวนพร้อมกับประสิทธิภาพในการสกัดพร้อมกันไปด้วย ถึงแม้การศึกษาและวิจัยในเรื่องของกระบวนการสกัดสารสำคัญในกระชายดำมีมาอย่างต่อเนื่องเช่น Wongsrikaew *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาการสกัดสาร polymethoxyflvonne ในกระชายดำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด หรือ Sudwan *et al.* (2006) ทำการสกัดสารสกัดหยาบด้วยเครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet extraction) เป็นต้น แต่ในการศึกษาถึงกระบวนการสกัด โดยใช้เครื่อง

มือมีราคาไม่แพง ไม่ยุ่งยากซับซ้อน รวมทั้งใช้สารละลายในการสกัดที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และนอกจากนี้สามารถนำไปต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม อาหาร เครื่องดื่ม ยา และเครื่องสำอาง ควรยังคงต้องมีการศึกษา และพัฒนาต่อไป

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินผลของวิธีการสกัด (แช่หมัก อัลตราโซนิค และไมโครเวฟ) และตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ) ต่อปริมาณน้ำหนักสารสกัดหยาบ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในเหง้ากระชายดำ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรดังกล่าว และเพื่อสามารถผลิตสารสกัดจากกระชายดำอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อนำไปต่อยอดในการผลิตเป็น ยา เครื่องสำอาง หรืออาหารเสริมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างกระชายดำ

นำตัวอย่างกระชายดำจากท้องตลาดที่มีช่วงอายุ 10-12 เดือน ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ นำมาทำการล้าง และทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หลังจากนั้นนำไปอบจนแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (UN30, Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนมีปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 บดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น และร่อนผ่านตะแกรงกรองขนาด 40 เมช เก็บผงตัวอย่างไว้ในภาชนะปิดสนิท รอทำการทดลองในขั้นต่อไป

การสกัดตัวอย่างกระชายดำ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษา เปรียบเทียบผลของวิธีการสกัด ได้แก่ การแช่หมัก อัลตราโซนิค และไมโครเวฟ และอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกัน (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 (v/v)) เพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระชายดำ

การสกัดด้วยวิธีแช่หมัก

ชั่งผงตัวอย่างกระชายดำ 5.0 กรัม ลงในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เติมสารสกัดเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนเท่ากับ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการสกัดในเอทานอลต่อน้ำในแต่ละอัตราส่วน 3 ซ้ำ นำสารละลายที่สกัดได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (Rotavap R-3, Buchi, Switzerland) บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดหยาบที่สกัดได้ในภาชนะปิดสนิททึบแสง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกต่อไป

การสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค

สกัดผงกระชายดำด้วยวิธีอัลตราโซนิค (Prommajak *et al.,* 2014) โดยชั่งผงตัวอย่างกระชายดำ 5.0 กรัม เติมสารสกัดเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนเท่ากับ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (Sonica 2200 S3, Soltec, Italy) ที่ความถี่ 40 กิโลเฮิรตซ์ (kHz) เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำผงกระชายดำเดิมเติมสารละลายเอทานอลลงไปในปริมาตรเท่าเดิม สกัดซ้ำแบบเดิมอีกสองรอบ โดยใช้เอทานอลต่อน้ำแต่ละอัตราส่วน 3 ซ้ำ นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

(Rotavap R-3, Buchi, Switzerland) บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดหยาบที่สกัดได้ในภาชนะปิดสนิททึบแสง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกต่อไป

การสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ

สกัดผงกระชายดำด้วยวิธีไมโครเวฟ (กาญจนา และคณะ, 2560) ชั่งผงตัวอย่างกระชายดำ 5.0 กรัม เติมสารสกัดเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนเท่ากับ 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (ME81KS-1, Samsung, Korea) โดยใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 4 นาที และที่คลื่นความถี่เท่ากับ 450 วัตต์ ทำการสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำแต่ละอัตราส่วน 3 ซ้ำ กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (Rotavap R-3, Buchi, Switzerland) บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดหยาบที่สกัดได้ในภาชนะปิดสนิททึบแสง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ด้วย Folin-ciocalteu's reagent (Rabeta and Vithyia, 2013; Ueda *et al.,* 2019) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากกระชายดำที่ได้ทำการสกัดในแต่ละวิธีให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) หลังจากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มา 0.3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocaltue ความเข้มข้น 1:10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำสารตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างแกน X คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแกน Y คือค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ($Y = 8.6616X - 0.0029$, $R^2 = 0.9950$) ที่สร้างขึ้นเอง รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วย ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม (microgram gallic acid equivalent per milligram extract weight µgGAE/ mg extract)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (TFC) โดยใช้วิธี Aluminium Chloride Colorimetric (Chang *et al.,* 2006) มีกระบวนการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากกระชายดำที่สกัดได้ในแต่ละวิธีให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้อย่างละ 250 ไมโครลิตร นำไปผสมกับน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้น

จึงเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิตินที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างแกน X คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแกน Y คือค่าดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ($Y = 0.6634X - 0.0179$, $R^2 = 0.9950$) ที่สร้างขึ้นเอง รายงานผลเป็นปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ในหน่วยไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม (microgram quercetin equivalent per milligram extract weight, µgQE/ mg extract)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's new multi range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0

ผลการวิจัยและวิจารณ์

น้ำหนักสารสกัดหยาบในกระชายดำต่อวิธีการสกัดที่อัตราส่วนของสารสกัดที่ต่างกัน

เมื่อนำกระชายดำไปทำการสกัดด้วยวิธีการแช่หมัก อัลตราโซนิค และไมโครเวฟ ด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนแตกต่างกันตามวิธีการทดลองข้างต้น จากผลการทดลองที่ได้พบว่า น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 5-12 (Table 1) โดยกรรมวิธีการสกัดแบบแช่หมักได้น้ำหนักสารสกัดหยาบอยู่ในช่วงร้อยละ 5-12 เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 60:40 จะทำการสกัดได้น้ำหนักมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 12.23±1.03 สำหรับการสกัดแบบอัลตราโซนิคนั้น ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบอยู่ในช่วงร้อยละ 6-11 และน้ำหนักสารสกัดหยาบมากที่สุดเมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 60:40 และ 40:60 (ร้อยละ 10.62±0.47 และ 10.67±0.86 ตามลำดับ) ในขณะที่การสกัดด้วยไมโครเวฟพบว่า มีน้ำหนักสกัดหยาบอยู่ในช่วงร้อยละ 5-11 เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 60:40 และ 40:60 จะทำให้สามารถสกัดได้น้ำหนักมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 10.95±0.67 และ 11.01±0.28 ตามลำดับ

นำข้อมูลของน้ำหนักสารสกัดหยาบทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ต่อวิธีการสกัด และอัตราส่วนของสารละลายเอทานอลต่อน้ำ โดยพบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีแช่หมัก และสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนเท่ากับร้อยละ 60 จะทำให้สามารถสกัดได้น้ำหนักสารสกัดหยาบมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 12.23±1.03 ผลการทดลองที่ได้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Hikmawanti *et al.* (2021) ที่พบว่าเมื่อใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดสารสกัดหยาบได้มากกว่า เอทานอลที่ความเข้มข้นอื่น ๆ (70 และ 96 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลายผสมของเอทานอลที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบมีความเป็นขั้วมากกว่าสารละลายที่เป็นเอทานอลเพียง

อย่างเดียว จึงทำให้สามารถสกัดสารกลุ่มโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่พบในกระชายดำ ส่งผลให้สามารถสกัดสารสกัดหยาบได้น้ำหนักที่มาก (Do *et al.,* 2014)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในกระชายดำต่อกระบวนการสกัดและอัตราส่วนของสารสกัดที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของกระชายดำที่ผ่านกระบวนการสกัดที่อัตราส่วนของสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่ต่างกัน (Table 1) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีค่าอยู่ในช่วงเท่ากับ 29-66 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนร้อยละ 60 จะทำให้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 65.60±4.62 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม

เมื่อทำการพิจารณาถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในแต่ละวิธีการสกัด พบว่าการสกัดด้วยวิธีแช่หมัก การสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิค และการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 48.75±2.62 59.18±2.91 และ 65.60±4.62 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อใช้สารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนเท่ากับ 60:40 และจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ทั้งสามวิธีมีแนวโน้มที่สอดคล้องกันคือ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของปริมาณน้ำจนถึงร้อยละ 40 จะทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกได้ดีที่สุด (Figure 2)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในกระบวนการสกัดสารสำคัญในพืช และพืชสมุนไพรมีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชนิดของสารสกัด ความมีขั้วของสารสกัด และวิธีการสกัด เป็นต้น (Dent *et al.,* 2013) การสกัดแบบแช่หมัก ถือเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม โดยวิธีการดังกล่าวนี้ จะอาศัยคุณสมบัติของตัวทำละลาย และอาจจะต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในขณะทำการสกัด เพื่อช่วยทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพที่ดี จึงมีโอกาสที่สารสำคัญหลายชนิดเกิดการสูญเสียในขณะที่ทำการสกัด นอกจากนี้แล้วยังใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ค่อนข้างนาน (Mandal *et al.,* 2007) จากการทดลองในการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าการสกัดแบบแช่หมักใช้เวลาในการสกัด 7 วันต่อหนึ่งตัวอย่าง และจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิก มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสองวิธีที่ได้ทำการทดลอง คือ อัลตราโซนิค และวิธีไมโครเวฟ จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ จะทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์มีปริมาณมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดด้วยไมโครเวฟ เป็นวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งใช้พลังงานไมโครเวฟเพื่อผลิตความร้อน และส่งผ่านคลื่นไมโครเวฟไปยังเซลล์พืชทำให้โมเลกุลของน้ำ หรือความชื้นที่มีอยู่ในเซลล์พืชเกิดการสั่นสะเทือน เกิดแรงดันขึ้นภายในเซลล์ทำให้เซลล์แตก และทำให้ปล่อยสารฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาผสมกับตัวทำละลายที่ใช้สกัด ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการสกัดสั้น ไม่เปลืองตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสัมผัสกับความร้อนที่สั้น (Rosa *et al.,* 2019) ซึ่งการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ

Table 1 Yield of crude extraction, total phenolic compound and flavonoid content in *Kaempferia parviflora Wallich*. ex Baker from different of extraction method and solvent ratio

No.	Extraction methods with ethanol/water ratios (v/v)	Extraction time/sample	Yield of crude extraction (%)	Total phenolic compound (μgGAE/ mg extract)	Flavonoid content (μgQE/ mg extract)
1	maceration–100:0	7 days	6.57±0.13^{ef}	29.20±2.38^{j}	45.69±4.15^{d}
2	maceration–80:20		10.07±0.30^{bc}	50.98±3.36^{de}	47.60±5.05^{d}
3	maceration–60:40		12.23±1.03^{a}	48.75±2.62^{def}	26.80±1.82^{fg}
4	maceration–40:60		10.67±0.86^{b}	41.52±2.86^{ghi}	17.25±1.84^{hi}
5	maceration–20:80		7.59±0.62^{de}	36.36±1.86^{i}	17.65±2.04^{hi}
6	maceration–0:100		5.26±1.34^{g}	39.86±2.71^{hi}	19.46±1.58^{ghi}
7	sonication–100:0	30 minutes	6.29±0.14^{fg}	43.51±1.86^{fgh}	57.25±4.41^{b}
8	sonication–80:20		9.42±0.36^{c}	46.32±4.88^{efg}	37.45±3.21^{e}
9	sonication–60:40		10.62±0.47^{b}	59.18±2.91^{b}	22.98±1.67^{fghi}
10	sonication–40:60		10.67±0.86^{b}	52.56±3.25^{cd}	25.29±1.97^{fgh}
11	sonication–20:80		7.59±0.62^{de}	46.36±1.64^{efg}	19.46±2.48^{ghi}
12	sonication–0:100		7.71±0.22^{def}	48.05±0.05d^{ef}	19.77±1.45^{ghi}
13	microwave–100:0	12 minutes	5.29±0.14^{g}	46.86±1.03e^{fg}	93.43±9.78^{a}
14	microwave–80:20		9.42±0.36^{c}	47.17±1.94^{cdef}	55.74±5.14^{c}
15	microwave–60:40		10.95±0.67^{b}	65.60±4.62^{a}	29.11±1.84^{f}
16	microwave–40:60		11.01±0.28^{b}	55.94±4.47^{bc}	40.17±3.93^{de}
17	microwave–20:80		7.92±0.97^{d}	57.86±3.01^{b}	23.28±1.91^{fghi}
18	microwave–0:100		7.51±0.51^{de}	38.55±2.24^{hi}	16.15±1.46^{i}
	F-test 0.05		*	*	*

N= 3, * Means within a column followed by different alphabets were significantly different at P<0.05 by DMRT

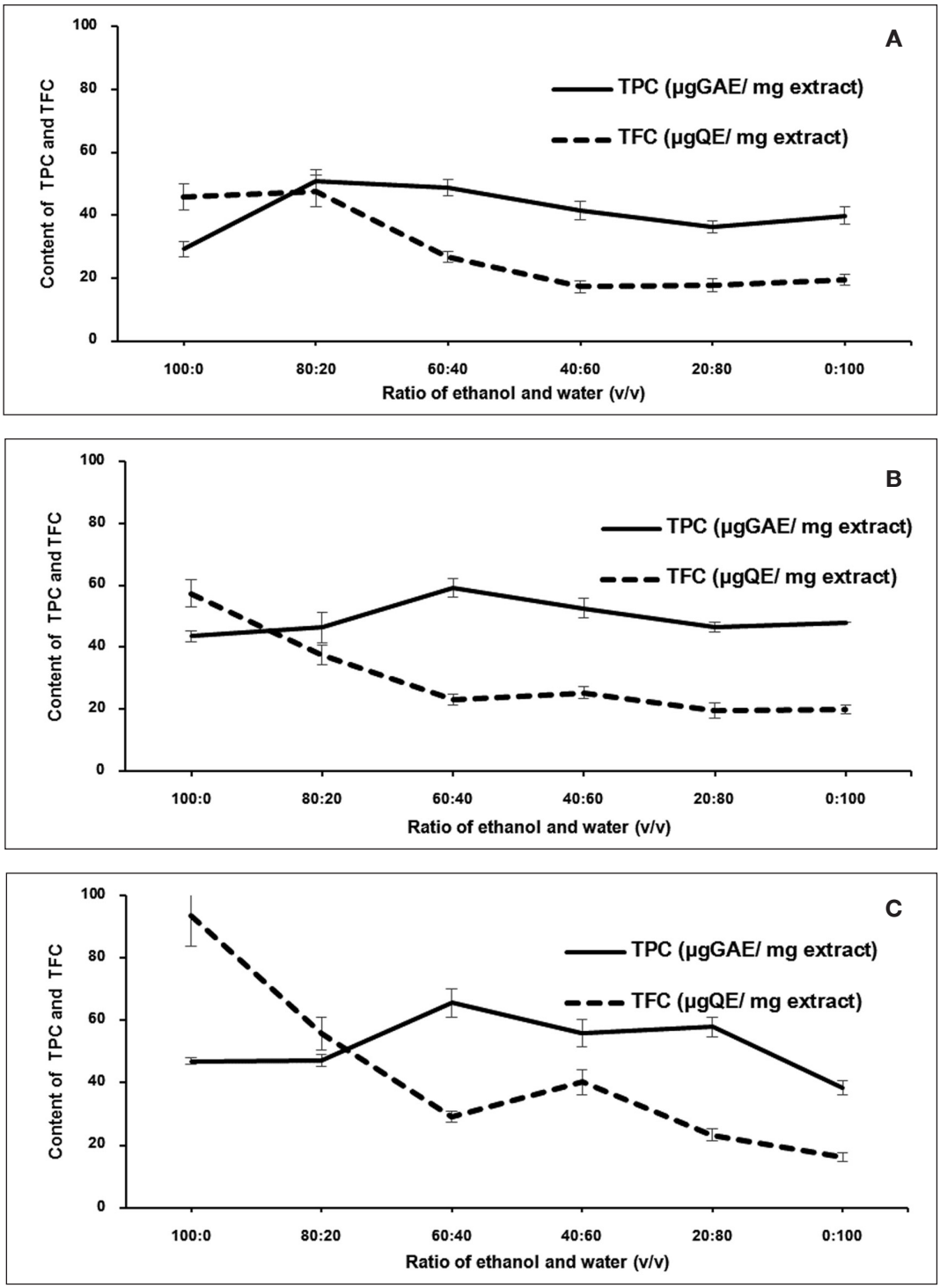


Figure 2 Effect of different extraction methods as maceration method (A), sonication method (B), and microwave method (C) with different solvent ratios on total phenolic compounds and flavonoid contents in *Kaempferia parviflora Wallich.* ex Baker

ใช้ระยะเวลาการสกัดสั้นที่สุด เท่ากับ 12 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีแบบอัลตราโซนิค ใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 30 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งทำให้มีโอกาสที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสัมผัสกับความร้อนที่เกิดขึ้นในขณะที่ทำการสกัดนานกว่าวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ อาจส่งผลทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระชายดำเกิดการเสื่อมสลายไปในขณะที่ทำการสกัด นี่จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การสกัดด้วยวิธีของไมโครเวฟมีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิค และวิธีการแช่หมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลาย ๆ ชิ้นที่พบว่า การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช และพืชสมุนไพรด้วยวิธีไมโครเวฟมีประสิทธิภาพดีที่สุด (Lianfu and Zelong, 2008; Golmakani and Rezaei, 2018)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในกระชายดำที่ผ่านกระบวนการสกัดที่แตกต่างกัน

จากปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ทำการวิเคราะห์ได้ (Table 1) พบว่า เมื่อทำการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันด้วยสารละลายเอทานอลที่อัตราส่วนต่างกัน ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ทำการสกัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 16-94 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม เมื่อนำผลการทดลองทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยพบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 100:0 สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 93.43±9.78 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากข้างต้น และจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ทั้งสามวิธีมีแนวโน้มที่สอดคล้องกันคือเมื่อทำการสกัดด้วยเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 100:0 มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนอื่น ๆ (Figure 2)

ในแต่ละกรรมวิธีการสกัดจะได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ต่างกันคือ การสกัดแบบแช่หมักมีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 17-48 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม และทำการสกัดได้สารฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 45.69±4.15 และ 47.60±5.05 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 100:0 และ 80:20 ตามลำดับ สำหรับการสกัดแบบอัลตราโซนิค สกัดสารฟลาโวนอยด์ได้อยู่ในช่วง 19-57 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดเมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 100:0 (57.25±4.41 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม) ในขณะที่การสกัดด้วยไมโครเวฟพบว่า มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 16-94 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 100:0 ทำให้สามารถสกัดได้สารฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 93.43±9.78 ไมโครกรัมสมมูลเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม

ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดคือความมีขั้วของสารละลายที่ใช้ทำการสกัด โดยหลักการพื้นฐานของการสกัด คือตามกฎ Like dissolves like

โดยสารที่มีขั้วจะถูกสกัดออกมาได้ดีด้วยตัวทำลายที่มีขั้ว จากการทดลองนี้ได้ทำการเลือกใช้เอทานอลกับน้ำ ซึ่งน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด โดยมีค่า polar index เท่ากับ 10.2 ในขณะที่เอทานอลมีค่า polar index เท่ากับ 5.2 ซึ่งความเป็นขั้วของสารละลายจะลดลงมา (Kkeiman *et al.,* 2016) ดังนั้นเมื่อนำไปทำการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบเป็นองค์ประกอบในกระชายดำนั้น (Yenjai *et al.,* 2004; Azuma *et al.,* 2008) เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารสำคัญทั้งสองกลุ่มพบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีคุณสมบัติของความมีขั้วมากกว่า เมื่อเทียบกับสารกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลอัตราส่วนที่มีปริมาณน้ำผสมเพิ่มมากขึ้น (ที่อัตราส่วน 60:40) มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกได้ดีที่สุด ในขณะที่กลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถละลายออกมาได้มากกว่าเมื่อใช้สารละลายที่เป็นเอทานอลเท่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Do *et al*. (2014) ที่พบว่าการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ใน *Limnophila aromatica* ด้วยสารละลายเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดได้แก่ การแช่หมัก อัลตราโซนิค และไมโครเวฟ ด้วยอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่แตกต่างกัน (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 และ 0:100) เพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระชายดำ จากผลการวิจัย พบว่าปริมาณของน้ำหนักสารสกัดหยาบมีน้ำหนักมากที่สุดเมื่อสกัดด้วยวิธีแช่หมักโดยใช้สารละลายเอทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนร้อยละ 60 สำหรับสารฟลาโวนอยด์เมื่อสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟ ด้วยสารละลายเอทานอลต่อน้ำอัตราส่วน 100:0 มีประสิทธิภาพในสกัดได้ดีที่สุด ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกจะใช้สารละลายเอทานอลต่อน้ำอัตราส่วน 60:40 และสกัดด้วยวิธีไมโครเวฟจะให้ผลได้ดีที่สุดเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสาขาวิชาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา นาคประสม จตุรภัทร วาฤทธิ์ อุมาพร อุประ หยาดฝน ทนงการกิจ และนักรบ นาคประสม. 2560. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวมจากดอกบัวหลวง โดยใช้เทคนิคสกัดด้วยไมโครเวฟ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 45(2): 328-342.

Azuma, T., Y. Tanaka and H. Kikuzuki. 2008. Phenolic glycosides from Kaempferia parviflora. Phytochemistry. 69(15): 2743-2748.

Baghdikian, B., A. Filly, A.S.F. Tixier, E. Petitcolas, F. Mabrouki, E. Chemat, and E. Ollivier. 2016. Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from Harpagophytum procumbens and comparison with conventional solvent extraction methods. CR. CHIM. 19(6): 692-698.

Chang, C. H., H.Y. Lin, C.Y. Chang and Y.C. Liua. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. J. Food. Eng. 77: 478-485.

Chivapat, S., P. Chavalittumrong, A. Attawish and A. Rungsipipat. 2004. Chronic toxicity study of Kaempferia parviflora Wall ex. extract. Thai. J. Vet. Med. 40(4): 377-383.

Dent, M., V.D. Uzelac, M. Penic, M. Branic, T. Bosiljkov and B. Levaj. 2013. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. Food. Technol. Biotechnol. 51(1): 84-91.

Do, Q.D., A.E. Angkawijaya, P.L. Tran-nguyen, L.H. Huynh, F.E. Soetaredjo, S. Ismadji and Y.H. Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatic. J. Food. Drug. Anal. 22(3): 296-302.

Eungpinichpong, W., U. Chatchawan, B. Sripanidkulchai, S. Arunpongpaisal and W. Chompoopan. 2018. Effects of Kaempferia parviflora on physical and psychological stresses in audits. Int. J. GEOMATE. 15(50): 26-31.

Golmakani, M.T. and K. Rezaei. 2018. Comparison of microwave-assisted hydro distillation with the traditional hydro distillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry. 109(4): 925-930.

Hikmawanti, N.P.E., S. Fatmawati and A.W. Asri. 2021. The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of Katuk (Sauropus androgynus (L.) Merr.) leaves extracts. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 755: 1-7.

Kkeiman, M., K.A. Ryu and A.P.E. Kahn. 2016. Determination of factors influencing the wet etching of polydimethylsiloxane using tetra-n-butyl ammonium fluoride. Macromol. Chem. Phys. 217: 284-291.

Lianfu, Z. and L. Zelong. 2008. Optimization and comparison of ultrasound/ microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. Ultrason. Sonochem. 15: 731-737.

Liu, J.L., L.Y. Li and G.H. He. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for five major bioactive compounds from flos sophorae immaturus (Cultivars of Sophora japonica L.) using response surface methodology. Molecules. 21(296): 1-27.

Mandal, V., Y. Mohan and S. Hemalatha. 2007. Microwave assisted extraction

– An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacogn. Rev. 1(1): 7-18.

Masota, N.E., G. Vogg, E. Heller and U. Holzgrabe. 2020. Comparison of extraction efficiency and selectivity between low-temperature pressurized microwave-assisted extraction and prolonged maceration. Arch. Pharm. 353(10): 1-11.

Prommajak, T., S. Surawang and N. Rattanapanone. 2014. Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (Houttuynia cordata Thunb.). Songklanakarin. J. Sci. Technol. 36(1): 65-72.

Rabeta, M.S. and M. Vithyia. 2013. Effect of different drying methods on the antioxidant properties of Vitex negundo Linn.Tea. Int. Food. Res. J. 20(6): 3171-3176.

Rosa, G.S., S.K. Vanga, Y. Gariepy and V. Raghavan. 2019. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). Innov. Food. Sci. Emerg. Technolies. 58: 1-8.

Saokaew, S., P. Wilairat, P. Raktanykan, P. Dilokthornsakul, T. Dhippayom, C. Kongkaew, R. Sruamsiri, A. Chuthaputti and N. Chaiyakunapruk. 2017. Clinical effects of krachaidum (Kaempferia parviflora): A systematic review. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 22(3): 413-428.

Siramon, P., T. Wongsheree and S. Yuadyong 2020. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from coconut endocarp and its radical scavenging activity. Naresaun. Phayao. J. 13(3): 22-28.

Sudwan, P., K. Saenphet, S. Saenphet and S. Suwansirikul. 2006. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker on sexual activity of male rats and its toxicity. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 37(suppl 3): 210-215.

Sutthanut, K., B. Sripanidkulchai, C. Yenja and M. Jay. 2007. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in Kaempferia parviflora by gas chromatography. J. Chromatogr. A. 1143: 227-233.

Ueda, Y., N. Apiphuwasukcharoen, S. Tsutsumi, Y. Matsuda, V. Areekul and S. Yasuda. 2019. Optimization of hot-water extraction of dried yacon herbal tea leaves: enhanced antioxidant activities and total phenolic content by response surface methodology. Food. Sci. Technol. Res. 25(1): 131-139.

Vinatoru, M., J. T. Mason and I. Calinescu. 2017. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assistedextraction

(MAE) of functional compounds from plant materials. Trends. Analyt. Chem. 97: 150-178.

Wongsrikaew, N., H. Kim, K. Vichitphan, S.K. Cho and J. Ha. 2012. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.55: 813-817.

Yenjai, C., K. Prasanphen and S. Daodee, V. Wongpanich and P. Kittakoop. 2004. Bioactive flavonoids from Kaempferia parviflora. Fitoterapia. 75(1): 89-92.

Zhang, Q.W., L.G. Lin and W.C. Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chin. Med. 13(20): 1-26.