

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมิโมซีนโดยใช้การออกแบบการทดลอง

Optimization of mimosine extraction using experimental design

เจริญศักดิ์ เลางาม¹ ณัฐพงศ์ มาตย์คำจันทร์¹ สุพรรณี พูลเพิ่ม¹ สุธิศา สมบัติดี¹ วิลาสินี สถิตเดชกัญชร¹
กมณชนก วงศ์สุขสิน¹ และวนิดา ชูหมื่นไวย^{1*}

Chareansak Lao-ngam¹, Nattapong Martkamchan¹, Supanee Poonpoem¹,
Suthisa Sombatdee¹, Wilasinee Sathitdetkunchorn¹,
Kamonchanok Wongsooksin¹ and Vanida Choomuenwai^{1*}

รับบทความ 30 พฤศจิกายน 2567/ ปรับแก้ไข 7 พฤศจิกายน 2568/ ตอรับบทความ 7 พฤศจิกายน 2568
Received: November 30, 2024/ Revised: November 07, 2025/ Accepted: November 07, 2025

บทคัดย่อ

มิโมซีนเป็นกรดอะมิโนอิสระที่พบในกระถิน (*Leucaena leucocephala*) มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านจุลชีพ และควบคุมศัตรูพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมิโมซีนด้วยตัวทำละลายธรรมชาติ (Natural Deep Eutectic Solvent: NADES) โดยใช้สารละลายคลีนคลอไรด์ในน้ำ โดยทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธีบ็อกซ์เบห์นเคน (Box-Behnken Design) ร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของ NADES (0.10 - 0.50 โมลต่อกิโลกรัม) ค่า pH (4 - 10) เวลา (30 - 90 นาที) ปริมาตร (20.00 - 50.00 มิลลิลิตร) และอุณหภูมิ (20 - 50 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์ปริมาณมิโมซีนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีที่มีความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร และยืนยันโครงสร้างด้วย FT-IR ผลการศึกษาพบว่า เวลาและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) สภาวะที่ให้ปริมาณมิโมซีนสูงสุดคือ ความเข้มข้น NADES 0.50 โมลต่อกิโลกรัม pH 6 เวลา 90 นาที (80.03 ± 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนกระถิน) และปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร pH 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (76.46 ± 0.95 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนกระถิน) การสกัดด้วย NADES ให้ผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนและปรับความมีขั้วของระบบได้ดีกว่า แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถทำนายผลการสกัดได้อย่างแม่นยำ ($R^2 > 0.89$) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ NADES ร่วมกับการออกแบบการทดลองเชิงสถิติเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตมิโมซีนซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในด้านเภสัชกรรม การควบคุมศัตรูพืช และการพัฒนาสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำสำคัญ: มิโมซีน การออกแบบการทดลอง วิธีบ็อกซ์เบห์นเคน วิธีพื้นผิวตอบสนอง ตัวทำละลายธรรมชาติ

¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

¹Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University

*Corresponding author E-mail; vanida.c@nrru.ac.th

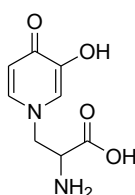
Abstract

Mimosine is a free amino acid found in *Leucaena leucocephala* with significant biological properties, including anticancer, antimicrobial, and pest control activities. This study aimed to optimize the extraction conditions of mimosine using a natural deep eutectic solvent (NADES) based on aqueous choline chloride solution. The experimental design employed the Box-Behnken method coupled with Response Surface Methodology (RSM) to investigate factors affecting extraction efficiency: NADES concentration (0.10 - 0.50 mol per kilogram), pH (4 - 10), time (30 - 90 minutes), volume (20.00 - 50.00 mL), and temperature (20 - 50 °C). Mimosine content was quantified using UV-visible spectroscopy at 282 nm, and structural confirmation was performed by FT-IR. Results revealed that extraction time and temperature were the primary factors significantly influencing extraction efficiency ($p < 0.001$). Optimal extraction conditions were achieved at NADES concentration of 0.50 mol per kilogram, pH 6-, and 90-minutes extraction time, yielding mimosine 80.03 ± 2.29 mg/g of dry weight, and at 50.00 mL volume, pH 7, and 50°C, yielding mimosine 76.46 ± 0.95 mg/g of dry weight. NADES extraction demonstrated significantly higher yields compared to conventional hot water extraction due to enhanced hydrogen bonding capacity and tunable solvent polarity. The developed mathematical model accurately predicted extraction outcomes ($R^2 > 0.89$). This study demonstrates that NADES combined with statistical experimental design provides an efficient approach for enhancing mimosine extraction, with potential applications in agriculture, pest control, and bioactive compound development.

Keywords: Mimosine, Experimental design, Box-Behnken method, Response Surface Methodology, Natural deep eutectic solvent

บทนำ

มิโมซิน (Mimosine) หรือที่เรียกในชื่ออื่น เช่น ลิวซีนอล (Leucenol) และลิวคานีน (Leucaenine) เป็นกรดอะมิโนชนิดแอลฟาที่ไม่ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน มีชื่อ IUPAC ว่า 3-Hydroxy-4-oxo-1(4H)-pyridinealanine (Brewbaker & Hylin, 1965) ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังในรูปที่ 1 สารนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1936 (Renz, 1936) จัดเป็นอนุพันธ์ของอลานีนไพรีดิน พบมากในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะกระถิน (*Leucaena leucocephala*) และไมยราพ (*Mimosa pudica*) มิโมซินมี 2 ไอโซเมอร์ ได้แก่ D- และ L- แต่มีการรายงานการค้นพบเฉพาะ L-mimosine และสารผสมราซิมีกในธรรมชาติ (Nguyen & Tawata, 2016)



รูปที่ 1 โครงสร้างของมิโมซิน

สารประกอบนี้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะ G1-S phase (Watson et al., 1991; Méchali, 2010) การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ผ่านการกระตุ้นไมโทคอนเดรียซึ่งเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Chang et al., 1999; Hallak et al., 2008) และฤทธิ์ลดการอักเสบจากการยับยั้ง cytokines หลายชนิด ได้แก่ TNF- α , IFN- γ และ IL-6 (Kubota et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Anitha et al., 2005) ต้านไวรัส (Dai et al., 1994) รวมทั้งสามารถยับยั้งเอนไซม์สำคัญ เช่น ribonucleotide reductase และมีการพัฒนาอนุพันธ์เพื่อใช้ร่วมกับสารอื่นในการรักษามะเร็ง (Nguyen & Tawata, 2016) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มิโมซินยังถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืช (Nguyen et al., 2015; Sahid et al., 2017) โดยพบว่ายอด

กระถินเป็นแหล่งที่มีปริมาณสารสูงที่สุด (Honda & Borthakur, 2019) จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาและการหาปริมาณมิโมซินสามารถทำได้ด้วยหลายเทคนิค เช่น ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) (Puchala et al., 1996; Wu et al., 2011), เทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบางสมรรถนะสูง (High performance thin layer chromatography; HPTLC) (Nair et al., 2007) เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวต่อกับแมสสเปกโตรเมทรี (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS-MS) (Champanerkar et al., 2010) อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวมีความซับซ้อนและต้องเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน จึงมีการพัฒนาเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว เช่น ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี (UV-Vis spectrometry) ตามที่ Ilham et al. (2015) รายงานว่ามีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เบื้องต้น

แม้มิโมซินจะมีศักยภาพสูงทั้งด้านชีวภาพและเกษตรกรรม แต่การสกัดในระดับห้องปฏิบัติการยังมีข้อจำกัด เช่น ได้ผลผลิตต่ำ ใช้เวลานาน (Honda & Borthakur, 2019; Wu et al., 2011) นอกจากนี้ งานส่วนใหญ่ยังคงพึ่งการปรับเปลี่ยนปัจจัยทีละตัว (One-Factor-at-a-Time; OFAT) ซึ่งไม่สะท้อนปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร ทำให้ยังไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดได้ เพื่อแก้ไขข้อจำกัดนี้ การประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment: DOE) จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสม เพราะช่วยวิเคราะห์ปัจจัยหลายตัวพร้อมกัน ลดจำนวนการทดลอง และเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลลัพธ์ (Montgomery, 2017; ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และพงศชนัน เหลืองไพบุลย์, 2551) โดยเฉพาะวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) เช่น Box-Behnken Design (BBD) และ Central Composite Design (CCD) ที่ได้รับความนิยมในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Ilham et al., 2015) อย่างไรก็ตาม สำหรับมิโมซินจากวัตถุดิบท้องถิ่นไทย ยังไม่พบรายงานที่ใช้ DOE เพื่อหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมอย่างเป็นระบบ

ดังนั้น งานวิจัยนี้มุ่งหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมิโมซินจากยอดกระถิน โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงสถิติศึกษาผลของตัวแปรหลัก ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย เวลา และอุณหภูมิ พร้อมทั้งสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายปริมาณสารที่สกัดได้ เพื่อพัฒนาระบบการสกัดให้มีประสิทธิภาพ ลดต้นทุน และเพิ่มศักยภาพในการนำมิโมซินไปใช้ในด้านเกษตร อุตสาหกรรม และชีวการแพทย์ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ประกอบการทดลอง ได้แก่ เครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UH – 5300, Hitachi, Japan), เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) SI – 234, Denver Instrument, อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) WNE45, Memmert, Germany, กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และชุดกรองสุญญากาศ, เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น TENSOR27, Bruker, เครื่องเขย่าสารละลาย (Shaker) รุ่น OS-300, Hanyang Scientific

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; AR grade, RCI-Labscan), กรดไฮโดรคลอริก (HCl; AR grade, RCI-Labscan), แอมโมเนีย 30% v/v (NH_3 ; AR grade, RCI-Labscan), โคลินคลอไรด์ ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$; AR grade, Sigma aldrich) และ น้ำกลั่น (Distilled water; H_2O), เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, FeCl_3 , AR grade, Sigma Aldrich)

3. ตัวอย่างพืช

ยอดอ่อนใบกระถิน (*Leucaena leucocephala*) ถูกเก็บจากพื้นที่ตำบลสุนารี อำเภอมือง จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย ภาพยอดกระถินแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ยอดกระถิน

4. การเตรียมตัวอย่าง

นำยอดอ่อนกระถิน (*Leucaena leucocephala*) มาอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนแห้งสนิท หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นก่อนบดด้วยเครื่องบดจนได้ผงละเอียด และเก็บไว้ในขวดโหลพลาสติกที่ปิดสนิท เพื่อใช้ในการสกัดในขั้นตอนต่อไป

5. การออกแบบการทดลอง

การศึกษานี้ใช้แบบการทดลอง Box–Behnken design (BBD) ร่วมกับวิธี Response Surface Methodology (RSM) เพื่อวิเคราะห์ผลของตัวแปรอิสระต่อประสิทธิภาพการสกัดมีโมซิน ตัวแปรอิสระที่ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของ NADES (X_1), pH (X_2), เวลา (X_3), ปริมาตร NADES (X_4) และอุณหภูมิ (X_5) โดยกำหนดแต่ละปัจจัยที่ 3 ระดับ (-1, 0, +1) ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 การทดลองทั้งหมด 17 ชุดการทดลอง ตามที่โปรแกรมออกแบบไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 1 ระดับของตัวแปรอิสระสำหรับความเข้มข้นของ NADES, pH และเวลา

ตัวแปร	สัญลักษณ์	ระดับของตัวแปร		
		-1	0	+1
ความเข้มข้นตัวทำละลาย NADES (โมลต่อกิโลกรัม)	X_1	0.10	0.30	0.50
pH	X_2	4	6	8
เวลา (นาท)	X_3	30	60	90

ตารางที่ 2 ระดับของตัวแปรอิสระสำหรับปริมาตร NADES, pH และอุณหภูมิ

ตัวแปร	สัญลักษณ์	ระดับของตัวแปร		
		-1	0	+1
ปริมาตรตัวทำละลาย NADES (มิลลิลิตร)	X_4	20.00	35.00	50.00
pH	X_2	4	7	10
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	X_5	20	35	50

ตารางที่ 3 ลำดับการทดลองตาม Box–Behnken design สำหรับ X_1 , X_2 และ X_3 -ของตัวแปรความเข้มข้นตัวทำละลาย NADES pH และเวลา ตามลำดับ

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	ความเข้มข้นตัวทำละลาย NADES (โมลต่อกิโลกรัม) (X_1)	pH (X_2)	เวลา (นาที) (X_3)
1	-1	-1	0	0.10	4	60
2	+1	-1	0	0.50	4	60
3	-1	+1	0	0.10	8	60
4	+1	+1	0	0.50	8	60
5	-1	0	-1	0.10	6	30
6	+1	0	-1	0.50	6	30
7	-1	0	+1	0.10	6	90
8	+1	0	+1	0.50	6	90
9	0	-1	-1	0.30	4	30
10	0	+1	-1	0.30	8	30
11	0	-1	+1	0.30	4	90
12	0	+1	+1	0.30	8	90
13	0	0	0	0.30	6	60
14	0	0	0	0.30	6	60
15	0	0	0	0.30	6	60
16	0	0	0	0.30	6	60
17	0	0	0	0.30	6	60

ตารางที่ 4 ลำดับการทดลองตาม Box-Behnken design สำหรับ X_4 , X_2 และ X_5 ของตัวแปรปริมาตรตัวทำละลาย NADES pH และอุณหภูมิ ตามลำดับ

การทดลอง	X_4	X_2	X_5	ปริมาตรตัวทำละลาย NADES (มิลลิลิตร) (X_4)	pH (X_2)	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส) (X_5)
1	-1	-1	0	20.00	4	35
2	+1	-1	0	50.00	4	35
3	-1	+1	0	20.00	10	35
4	+1	+1	0	50.00	10	35
5	-1	0	-1	20.00	7	20
6	+1	0	-1	50.00	7	20
7	-1	0	+1	20.00	7	50
8	+1	0	+1	50.00	7	50
9	0	-1	-1	35.00	4	20
10	0	+1	-1	35.00	10	20
11	0	-1	+1	35.00	4	50
12	0	+1	+1	35.00	10	50
13	0	0	0	35.00	7	35
14	0	0	0	35.00	7	35
15	0	0	0	35.00	7	35
16	0	0	0	35.00	7	35
17	0	0	0	35.00	7	35

6. การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับสารประกอบเชิงซ้อนของมิโมซีน

วิธีการถูกประยุกต์จากงานวิจัยของ Ilham et al. (2015) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานมิโมซีนเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานมิโมซีนปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม มา 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ปิเปต 0.10 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายมิโมซีนที่เตรียมไว้ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จะได้สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปวัดด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาค่าความยาวคลื่นสูงสุด เพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดที่สารมาตรฐานดูดกลืนแสงได้

7. การสร้างกราฟมาตรฐานมิโมซีน

เตรียมสารละลายมาตรฐานมิโมซีนความเข้มข้น 25.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 15.00 12.50 10.00 7.50 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานมิโมซีนที่เตรียมไว้ปริมาตร 6.00 5.00 4.00 3.00 และ 2.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น สูงสุดจากข้อ 6 และนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมิโมซีน

8. การเตรียมตัวทำละลายโคลีนคลอไรด์ (NADES) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชั่งน้ำหนักโคลีนคลอไรด์ในบีกเกอร์ขนาด 250.00 มิลลิลิตร จำนวน 17.25 10.47 และ 3.49 กรัม ละลายสารด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น สุดท้ายจะได้ตัวทำละลายโคลีนคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 0.30 และ 0.50 โมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

9. การสกัดสารมิโมซีนจากยอดอ่อนใบกระถิน

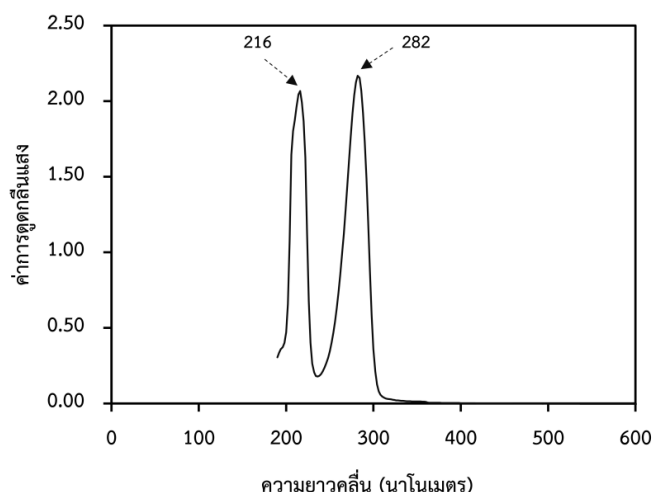
ชั่งผงใบกระถินแห้งบดละเอียดจำนวน 0.50 กรัม เติมตัวทำละลาย NADES ตามปริมาตรและความเข้มข้นที่กำหนดในตารางที่ 3 และ 4 จากนั้นปรับ pH ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก หรือแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร นำไปสกัดด้วยวิธีแช่สกัด โดยควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิและเขย่าด้วยความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมารองแยกกากตัวอย่างและสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ Whatman No.1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี - วิสเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นสูงสุดจากข้อ 6

10. การนำสารสกัดมิโมซีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR นำมิโมซีนที่สกัดได้ด้วยน้ำร้อน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR โดยตั้งค่าการสแกน ที่ $4000-650\text{ cm}^{-1}$ ที่ 16 scans มีค่า resolution 4 cm^{-1} จะได้สเปกตรัมที่พล็อตระหว่าง % Transmittance กับเลขคลื่น (cm^{-1}) จากนั้นนำผลสเปกตรัมที่ได้ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของพีค และประมวลผลการทดลองต่อไป

ผลการวิจัย

1. ความยาวคลื่นสูงสุดของมิโมซีน

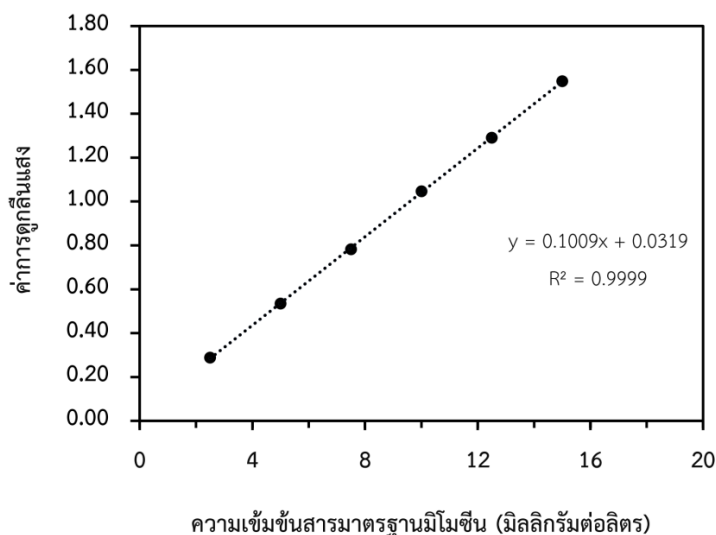
จากรูปที่ 3 พบว่าสารมาตรฐานมิโมซีนมีการดูดกลืนแสงสูงสุดปรากฏอยู่สองช่วง คือที่ความยาวคลื่น 216 นาโนเมตร และ 282 นาโนเมตร โดยที่บริเวณ 216 นาโนเมตร สัญญาณการดูดกลืนมีความไม่คงที่และมักถูกรบกวนด้วยการซ้อนทับของแถบการดูดกลืนอื่น จึงอาจส่งผลต่อความถูกต้องของผลวิเคราะห์ ขณะที่บริเวณ 282 นาโนเมตรให้สัญญาณที่คมชัดและเสถียรมากกว่า ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร เป็นค่าหลักสำหรับการวิเคราะห์ เนื่องจากให้สัญญาณที่ชัดเจนและคงที่มากกว่า อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่ามิโมซีนมีการดูดกลืนในช่วงใกล้เคียง 280 - 282 นาโนเมตร (Tangendjaja & Wills, 1980; Wu et al., 2012; Lalitha & Kulothungan, 2004)



รูปที่ 3 แถบการดูดกลืนคลื่นแสงยูวีสารตัวอย่างมิโมซีน

2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารมิโมซีน

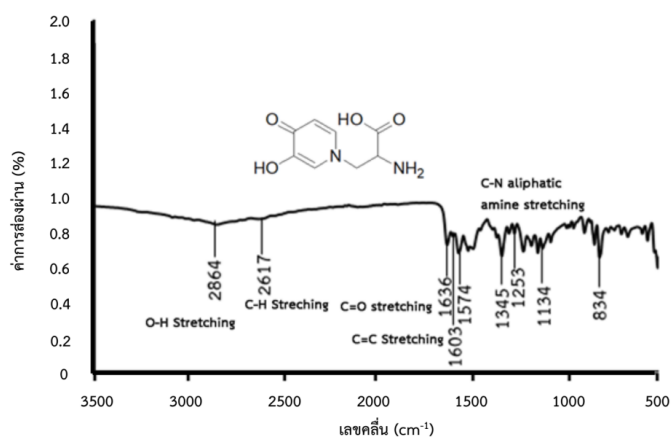
จากรูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิโมซีน (ช่วง 5-15 มิลลิกรัมต่อลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่มีความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างชัดเจน โดยสมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = 0.1009x + 0.0319$ โดยมีค่าสหสัมพันธ์กำลังสอง (R^2) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งบ่งชี้ถึงความถูกต้องและความแม่นยำของกราฟมาตรฐานในการใช้เป็นเกณฑ์สำหรับการคำนวณหาปริมาณมิโมซีนในตัวอย่างจริงต่อไป



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานมิโมซีน

3. ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดมิโมซีนด้วยเทคนิค FTIR

ผลของสเปกตรัม FT-IR ของสารมิโมซีนที่สกัดจากยอดกระถินภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แสดงดังรูปที่ 5 พบว่าปรากฏแถบการสั่นที่สอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันของมิโมซีน โดยปรากฏพีคที่กว้างประมาณ 3000 cm^{-1} แสดงการสั่นแบบยืดของพันธะ -O-H ส่วนเลขคลื่นที่ตำแหน่ง 2864 และ 2617 cm^{-1} เป็นการสั่นของพันธะ C-H อีกทั้งยังพบแถบการสั่นในช่วง 1603 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการสั่นของพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน (C=C) การสั่นแบบงอของพันธะ N-H (ของแอมโมเนียมไอออน) ที่ 1574 cm^{-1} และแถบการสั่นที่ตำแหน่ง 1636 cm^{-1} สอดคล้องกับการสั่นของพันธะคาร์บอนิล (C=O) นอกจากนี้เลขคลื่นที่ตำแหน่ง 1345 cm^{-1} และ 1134 cm^{-1} สอดคล้องกับการสั่นแบบงอของพันธะ C-O (Ramesh et al., 2021) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดได้จากยอดกระถินคือมิโมซีน



รูปที่ 5 สเปกตรัม FT-IR ของมิโมซีนที่ไดจากการสกัดจากยอดอ่อนใบกระถิน

4. ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถิน

4.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลาย NADES pH และเวลาที่มีผลต่อการสกัดมิโมซิน

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ NADES (0.10 0.30 และ 0.50 โมลต่อกิโลกรัม) ค่า pH (4 6 และ 8) และเวลาในการสกัด (30 60 และ 90 นาที) พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยปริมาณมิโมซินจากการทดลองอยู่ในช่วง 62.79 - 80.03 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งค่าต่ำสุดพบในสภาวะที่ใช้ NADES ความเข้มข้น 0.30 โมลต่อกิโลกรัม ที่ pH 4 และเวลา 30 นาที ซึ่งให้ปริมาณมิโมซิน 62.79 ± 1.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน ในขณะที่ค่าสูงสุดพบในสภาวะที่ใช้ NADES ความเข้มข้น 0.50 โมลต่อกิโลกรัม ที่ pH 6 และเวลา 90 นาที โดยสามารถสกัดมิโมซินได้สูงถึง 80.03 ± 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แสดงดังตารางที่ 6 แสดงว่าให้เห็นว่า เวลาในการสกัด เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ต่อปริมาณมิโมซิน โดยการเพิ่มเวลาในการสกัดจาก 30 นาที เป็น 90 นาที ส่งผลให้ค่ามิโมซินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับค่า Coefficient ที่เป็นบวก (5.43)

ตารางที่ 5 ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของความเข้มข้นของ NADES ค่า pH และเวลาแตกต่างกัน

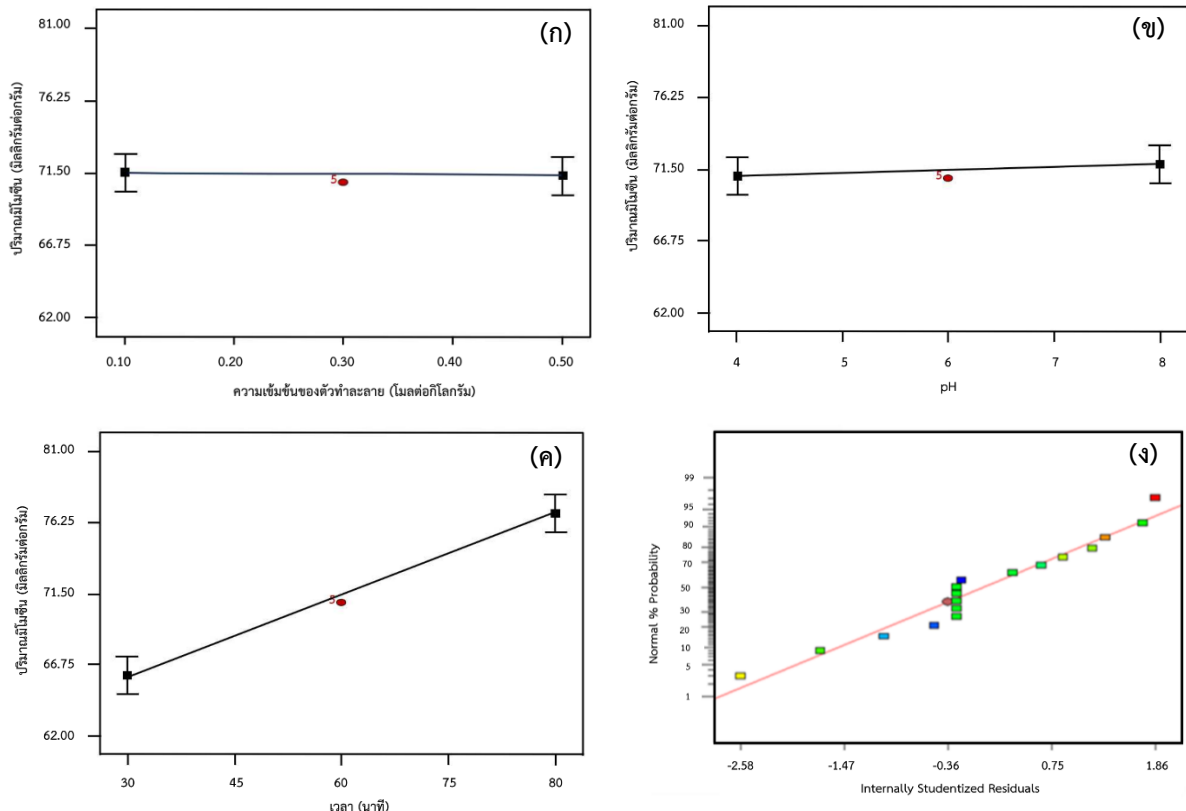
ครั้งที่	ความเข้มข้น NADES (โมลต่อกิโลกรัม)	pH	เวลา (นาที)	ปริมาณมิโมซิน	
				จากการทำนาย (มิลลิกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้งของยอด กระถิน)	จากการทดลอง (มิลลิกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้งของยอด กระถิน)
1	0.10	4	60	69.61	71.72 ± 2.04
2	0.50	4	60	72.42	73.87 ± 2.00
3	0.10	8	60	73.42	74.49 ± 2.65
4	0.50	8	60	70.21	70.62 ± 1.61
5	0.10	6	30	67.10	65.83 ± 0.63
6	0.50	6	30	64.88	64.27 ± 1.03
7	0.10	6	90	75.94	77.55 ± 0.07
8	0.50	6	90	77.76	80.03 ± 2.29
9	0.30	4	30	63.05	62.79 ± 1.75
10	0.30	8	30	68.93	69.71 ± 0.74
11	0.30	4	90	78.98	75.85 ± 0.45
12	0.30	8	90	74.71	72.61 ± 0.28
13	0.30	6	60	71.42	70.95 ± 1.94
14	0.30	6	60	71.42	70.95 ± 1.94
15	0.30	6	60	71.42	70.95 ± 1.94
16	0.30	6	60	71.42	70.95 ± 1.94
17	0.30	6	60	71.42	70.95 ± 1.94

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์การถดถอยและความแปรปรวนทางสถิติของสภาวะในการสกัดมิโมซินที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในสภาวะที่หนึ่ง

Source	Coefficient	F-value	p-value	
Model	-	13.73	0.0020	Significant
Intercept	71.42	-	-	
A – โมเดล	- 0.10	0.024	0.8801	
B - pH	0.40	0.38	0.5500	
C – เวลา	5.43	70.35	< 0.0001	
AB	-1.50	2.70	0.1316	
AC	1.01	1.22	0.2952	
BC	-2.54	7.69	0.0197	
A ²	1.70	4.34	0.0757	
B ²	0.023	7.706E - 004	0.9786	
C ²	- 0.73	0.81	0.3987	
Residual	0.0017	-	-	
Lack of fit	-	1566.39	< 0.0001	Significant
Pure Error	-	-	-	

หมายเหตุ R – Squared 0.9367, Adj R – Squared 0.8553

ผลการวิเคราะห์ ความเข้มข้น NADES ค่า pH และ เวลาในการสกัดต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ แสดงดังรูปที่ 6 พบว่าความเข้มข้นของตัวทำละลาย NADES เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ 0.8801) (รูปที่ 6 (ก)) ในทำนองเดียวกันค่า pH ที่แม้อยู่ในช่วง 4 - 8 ก็ยังเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ 0.5500) ในทางตรงกันข้าม การเพิ่มเวลาในการสกัดกลับส่งผลให้ปริมาณมิโมซินสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ < 0.0001) (รูปที่ 6 (ค)) นอกจากนี้ จากรูปที่ 6(ง) แสดงกราฟความสัมพันธ์เพื่อทดสอบความเหมาะสม พบว่า ลักษณะจุดบนกราฟของสภาวะที่เหมาะสมมีการกระจายตัวอยู่ในลักษณะแนวเส้นตรงของค่าที่ได้จากการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า ยืนยันว่าเวลาในการสกัดเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดประสิทธิภาพการสกัดมิโมซิน



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (ก) ความเข้มข้น NADES และปริมาณมิโมซิน, (ข) ค่า pH และปริมาณมิโมซิน, (ค) เวลา และปริมาณมิโมซิน และ (ง) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความน่าจะเป็นจริงปกติและความสามารถในการสกัดมิโมซิน จากจากยอต่ออันใบกระถิน

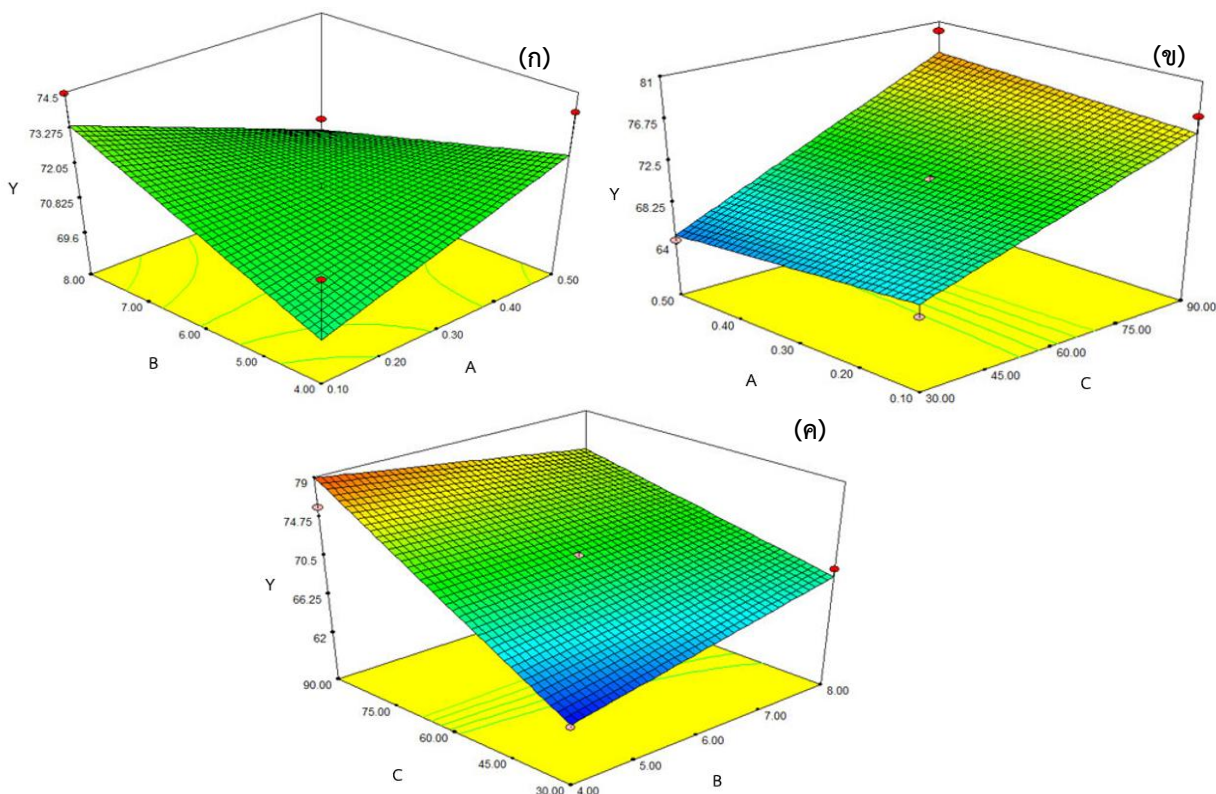
โดยที่ – คือแนวเส้นตรงในการทำนาย และ □ คือการทดลอง

จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ (3D response surface plot) แสดงดังรูปที่ 7 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ NADES ค่า pH และเวลาในการสกัด ต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ พบว่าเวลาในการสกัด เป็นตัวแปรที่มีอิทธิพลสูงสุด เนื่องจากเมื่อเวลาสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ก็เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 7(ข)) ในขณะที่ความเข้มข้นของ NADES และ ค่า pH แม้จะแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าที่ได้ แต่ไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 7(ก) และ (ค)) ลักษณะของกราฟยังสะท้อนถึงความโค้งของสมการกำลังสองที่ได้จากการวิเคราะห์ RSM ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตัวแปรทั้งสามมีปฏิสัมพันธ์กัน แต่มีเพียงเวลาเท่านั้นที่ส่งผลเด่นชัดต่อประสิทธิภาพการสกัดมิโมซิน

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) สามารถสร้างสมการเชิงคณิตศาสตร์เพื่อทำนายผลการสกัดมิโมซินได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณมิโมซิน} = + 71.42 - 0.10A + 0.40B + 5.43C - 1.50AB + 1.01AC - 2.54BC + 1.70A^2 + 0.023B^2 - 0.73C^2$$

เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของ NADES B คือ ค่า pH และ C คือ เวลาในการสกัด พบว่าสมการดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า เวลา (C) เป็นตัวแปรหลักที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณมิโมซิน ขณะที่ ความเข้มข้นของ NADES (A) และ ค่า pH (B) มีผลเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ การปรากฏของตัวแปรกำลังสองและผลปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรยังสะท้อนถึงความโค้งของผิวตอบสนอง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของกราฟในรูปที่ 5 และ 6 และช่วยให้สามารถทำนายแนวโน้มของผลการสกัดได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 7 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ แสดงผลของ (ก) ความเข้มข้นของ NADES (A) และ pH (B), (ข) ความเข้มข้นของ NADES (A) และเวลา (C), และ (ค) pH (B) และเวลา (C) ต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ (Y) โดยที่ A = ความเข้มข้นของ NADES (โมลต่อกิโลกรัม), B = pH, C = เวลา (นาที) และ Y = ปริมาณมิโมซิน (มิลลิกรัมต่อกรัม) น้ำหนักแห้งของยอดกระถิน

4.2 ผลการศึกษาปริมาตรตัวทำละลาย NADES pH และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถิน

การศึกษาค่าผลของปริมาตรของ NADES (20.00 35.00 และ 50.00 มิลลิลิตร) ค่า pH (4 7 และ 10) และ อุณหภูมิ (20 35 และ 50 °C) พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้แตกต่างกัน โดยปริมาณ มิโมซินที่สกัดได้จากการทดลองอยู่ในช่วง 60.82 – 76.46 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอดกระถิน ดังแสดงใน ตารางที่ 7 ค่าต่ำสุดพบในสภาวะที่ใช้ NADES 20.00 มิลลิลิตร ที่ pH 4 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ ปริมาณมิโมซิน 60.82 ± 1.15 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอดกระถิน ขณะที่ค่าสูงสุดพบในสภาวะที่ใช้ NADES 50.00 มิลลิลิตร ที่ pH 7 และอุณหภูมิ 50 °C โดยสามารถสกัดมิโมซินได้ถึง 76.46 ± 0.95 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอดกระถิน

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาตร NADES ค่า pH และอุณหภูมิ แสดงดังตารางที่ 8 พบว่า อุณหภูมิ เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยการเพิ่มอุณหภูมิ จาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ เป็นปัจจัยหลักที่กำหนดประสิทธิภาพการสกัด ขณะที่ ปริมาตรของ NADES และ ค่า pH แม้จะแสดงแนวโน้ม การเปลี่ยนแปลงของผลผลิต แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 7 ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของปริมาตร NADES ค่า pH และอุณหภูมิ

ครั้งที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	pH	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ปริมาณมิโมซิน	
				จากการทำนาย (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนัก แห้งของยอดกระถิน)	จากการทดลอง (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของยอด กระถิน)
1	20.00	4	35	66.10	65.39±0.58
2	50.00	4	35	67.52	64.22±1.81
3	20.00	10	35	66.29	69.60±2.65
4	50.00	10	35	67.27	67.98±3.10
5	20.00	7	20	68.34	67.04±2.39
6	50.00	7	20	68.55	69.85±9.23
7	20.00	7	50	72.97	71.67±4.98
8	50.00	7	50	75.16	76.46±0.95
9	35.00	4	20	60.92	62.93±2.96
10	35.00	10	20	60.04	58.03±1.81
11	35.00	4	50	65.69	67.71±1.60
12	35.00	10	50	66.52	64.51±2.27
13	35.00	7	35	74.55	74.55±0.26
14	35.00	7	35	74.55	74.55±0.26
15	35.00	7	35	74.55	74.55±0.26
16	35.00	7	35	74.55	74.55±0.26
17	35.00	7	35	74.55	74.55±0.26

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์การถดถอยและความแปรปรวนทางสถิติของสภาวะในการสกัดมิโมซินที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในสภาวะที่สอง

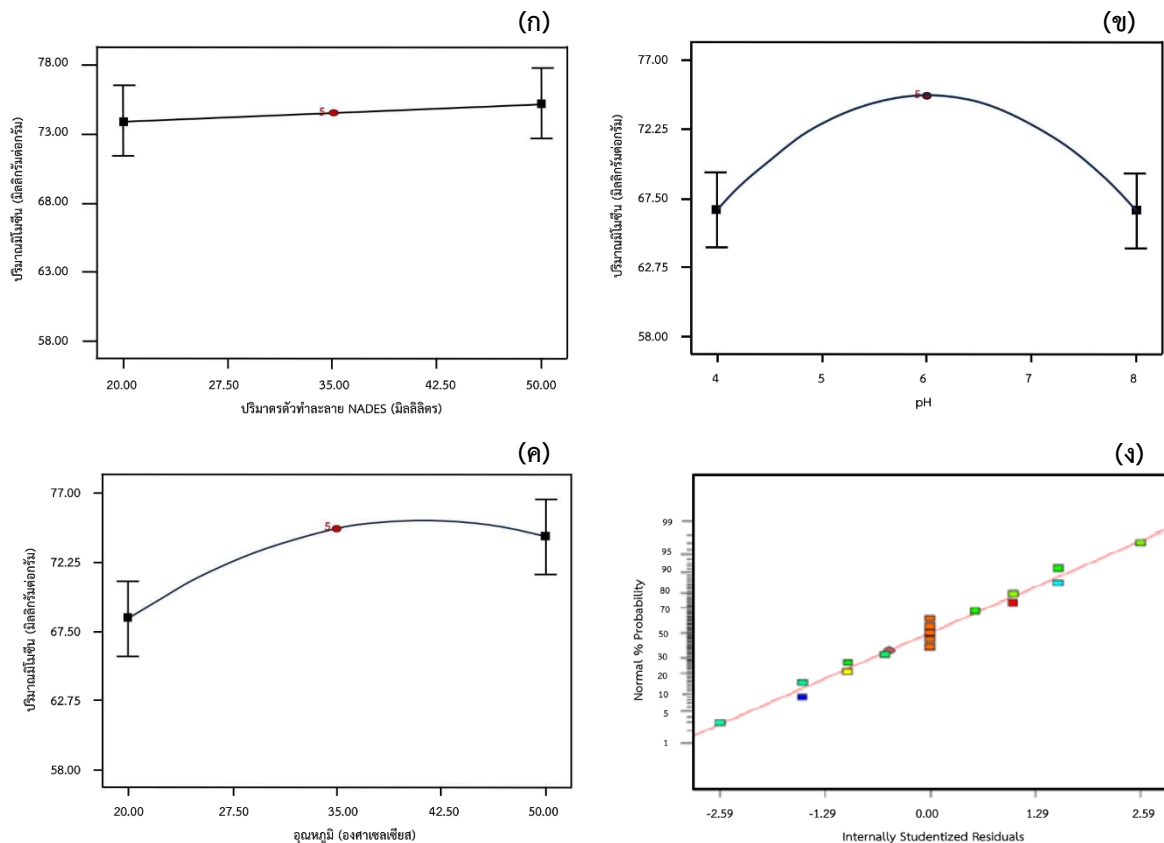
Source	Coefficient	F-value	p-value	
Model	-	6.63	0.0104	Significant
Intercept	74.55	-	-	
A – ปริมาตร	0.60	0.44	0.5277	
B - pH	- 0.015	2.829E - 004	0.9870	
C – อุณหภูมิ	2.81	9.67	0.0171	
AB	- 0.11	7.577E - 003	0.9311	
AC	0.49	0.15	0.7110	
BC	0.43	0.11	0.7488	
A ²	0.11	7.206E - 003	0.9331	
B ²	-7.86	39.77	0.0004	
C ²	-3.40	7.43	0.0295	
Residual	0.0017	-	-	
Lack of fit	-	-	-	
Pure Error	-	-	-	

หมายเหตุ R – Squared 0.8951

Adj R – Squared 0.7601

จากตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์การถดถอยและความแปรปรวนทางสถิติของความสามารถในการสกัดมิโมซินที่สภาวะต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสามารถอธิบายผลการทดลองของแต่ละตัวแปรที่ทำการศึกษาได้ดังนี้

จากรูปที่ 8 (ก) พบว่าปริมาตรของตัวทำละลาย NADES เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยความสำคัญทางสถิติ (p -value เท่ากับ 0.5277) การทดลองทั้งหมด เมื่อใช้ตัวทำละลาย NADES ปริมาตร 20.00 – 50.00 มิลลิลิตร จะสามารถสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถินเท่ากับ 58.03 - 76.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน จากการทดลองข้างต้นพบว่าปริมาตรของตัวทำละลาย NADES ไม่มีผลต่อการทดลอง ส่วนรูปที่ 8 (ข) พบว่า pH เป็นปัจจัยที่ไม่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยความสำคัญทางสถิติ (p -value เท่ากับ 0.9870) การทดลองทั้งหมด เมื่อใช้ pH อยู่ในช่วง 4 - 10 จะสามารถสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถินเท่ากับ 58.03 - 76.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน จากการทดลองข้างต้นพบว่า pH ไม่มีผลต่อการทดลอง จากรูปที่ 8 (ค) จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณมิโมซินอย่างมีนัยความสำคัญทางสถิติ (p - value เท่ากับ 0.0171) การทดลองทั้งหมด เมื่อใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 - 50 องศาเซลเซียส จะสามารถสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถินเท่ากับ 58.03 - 76.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน จากผลการทดลองของแต่ละตัวแปรที่ทำการศึกษา พบว่า ปริมาตรของตัวทำละลาย NADES และ pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถิน ส่วนอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถในการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถิน เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดให้สูงขึ้น จะทำให้มีความสามารถในการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถินเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (ก) ปริมาตรของ NADES และปริมาณมิโมซิน, (ข) ค่า pH และปริมาณมิโมซิน, (ค) อุณหภูมิ และปริมาณมิโมซิน และ (ง) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความน่าจะเป็นจริงปกติและความสามารถในการสกัดมิโมซิน จากยอดอ่อนใบกระถิน

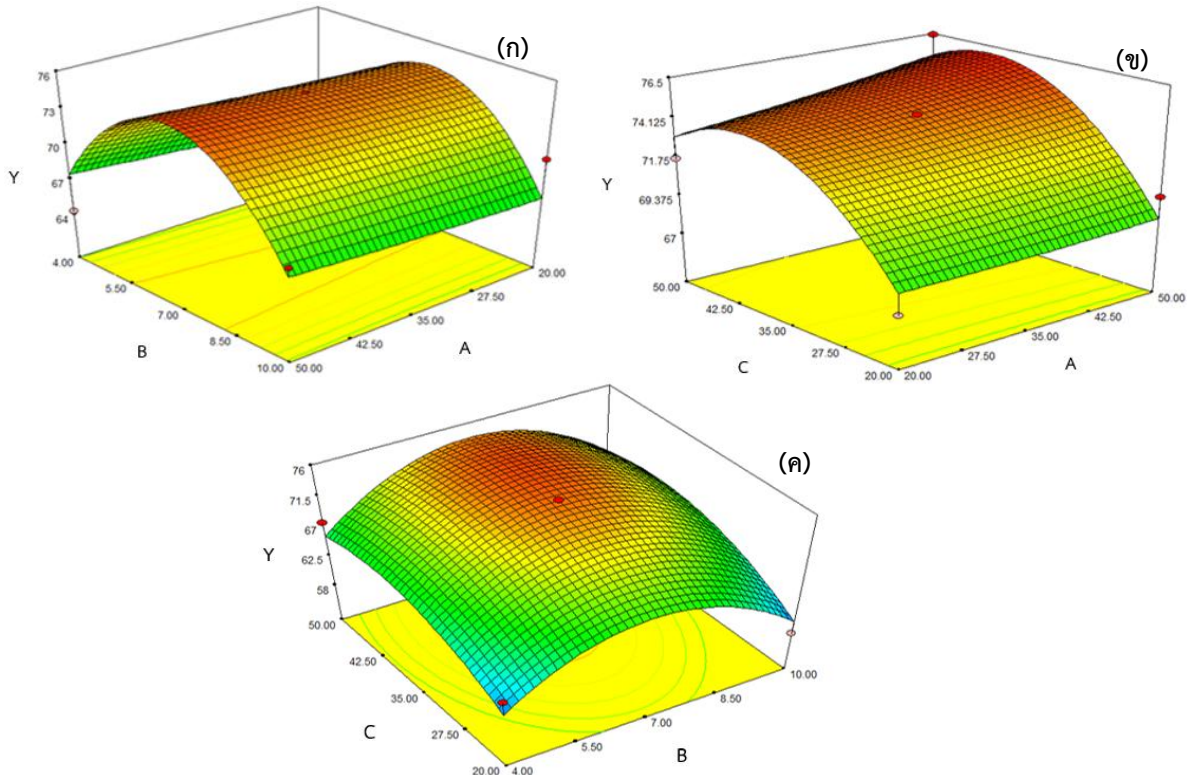
โดยที่ – คือแนวเส้นตรงในการทำนาย และ □ คือการทดลอง

จากกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ (3D response surface plot) ที่แสดงใน รูปที่ 9 พบว่า อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ก็เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 9 (ข) และ (ค)) ในทางตรงข้ามพบว่าปริมาตรของ NADES และค่า pH แม้จะแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 9 (ก)) นอกจากนี้พบว่า ลักษณะของกราฟยังสะท้อนถึงความโค้งของสมการกำลังสองที่ได้จากการวิเคราะห์ RSM ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวแปรทั้งสามมีปฏิสัมพันธ์กัน แต่มีเพียงอุณหภูมิเท่านั้นที่ส่งผลเด่นชัดต่อประสิทธิภาพการสกัดมิโมซิน

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) สามารถสร้างสมการเชิงคณิตศาสตร์เพื่อทำนายปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณมิโมซิน} = + 74.55 + 0.60A - 0.015B + 2.81C - 0.11AB + 0.49AC + 0.43BC + 0.11A^2 - 7.86B^2 - 3.40C^2$$

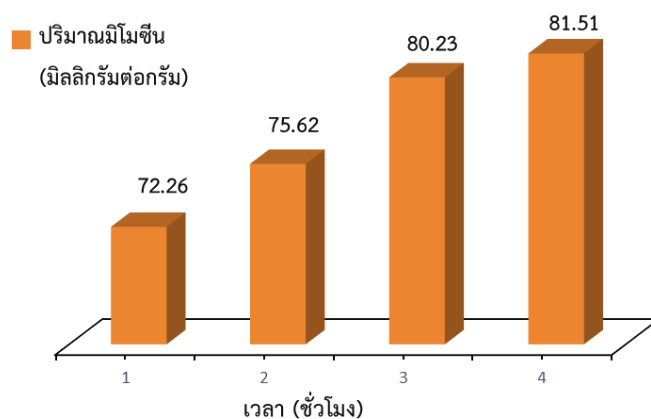
เมื่อ A คือ ปริมาตรของ NADES, B คือ ค่า pH และ C คือ อุณหภูมิ ซึ่งสมการดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ (C) เป็นตัวแปรหลักที่กำหนดประสิทธิภาพการสกัด ขณะที่ ปริมาตร NADES (A) และ ค่า pH (B) มีอิทธิพลเพียงเล็กน้อย โดยความโค้งและผลปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรสะท้อนถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่สามารถใช้ทำนายผลการสกัดได้อย่างแม่นยำ



รูปที่ 9 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ แสดงผลของ (ก) ปริมาตรของ NADES (A) และ pH (B), (ข) ปริมาตรของ NADES (A) และอุณหภูมิจาก (C), และ (ค) pH (B) และอุณหภูมิจาก (C) ต่อปริมาณมิโมซินที่สกัดได้ (Y) โดยที่ A = ปริมาตรของ NADES (มิลลิลิตรต่อกรัม), B = pH, C = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และ Y = ปริมาณมิโมซิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน)

4.3 การศึกษาการเพิ่มเวลาในการสกัดมิโมซิน

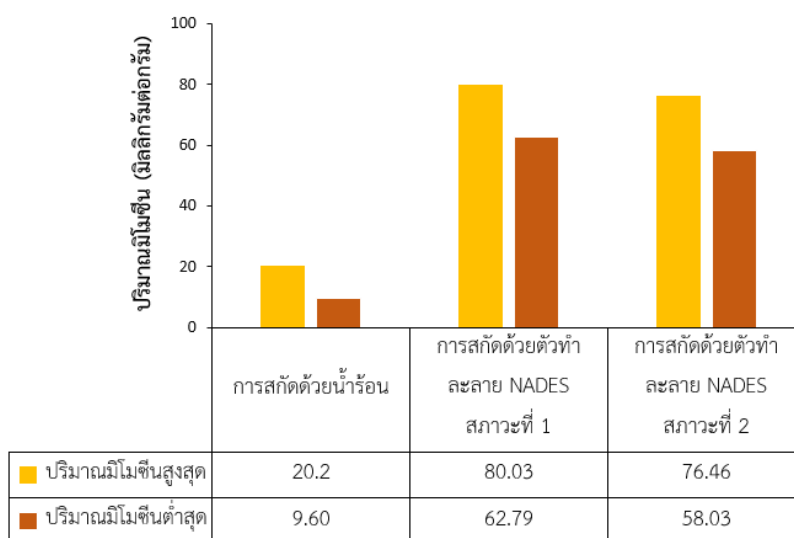
การศึกษาค่าของเวลาในการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถิน ภายใต้สภาวะที่ควบคุมความเข้มข้นของ NADES ที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัม และค่า pH 6 แสดงดังรูปที่ 10 พบว่าการเพิ่มเวลาในการสกัดตั้งแต่ 1 ชั่วโมง (ทำให้ได้มิโมซิน 72.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน) จนถึง 4 ชั่วโมง (ทำให้ได้ 81.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน) ส่งผลให้ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของปริมาณมิโมซินมีแนวโน้มเข้าสู่สมดุลเมื่อเวลาสกัดอยู่ระหว่าง 3 - 4 ชั่วโมง โดยค่าที่ได้จาก 3 ชั่วโมง (80.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน) และ 4 ชั่วโมง (81.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน) แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แสดงว่ากระบวนการสกัดได้เข้าสู่สภาวะสมดุล (equilibrium) แล้วในช่วงเวลาดังกล่าว สำหรับการสกัดในระยะเริ่มต้น การแพร่ของมิโมซินจากเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ตัวทำละลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีความต่างศักย์ของความเข้มข้น (Concentration gradient) ที่สูง แต่เมื่อเวลาผ่านไปความต่างศักย์ดังกล่าวลดลงจนเข้าสู่สภาวะสมดุล ทำให้ปริมาณมิโมซินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (Lalitha & Kulothungan, 2004; Wu et al., 2011) ดังนั้น เวลาในการสกัดที่เหมาะสมจึงอยู่ที่ประมาณ 3 ชั่วโมง เนื่องจากให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการสกัด 4 ชั่วโมง แต่ใช้เวลาน้อยกว่าและช่วยลดการสิ้นเปลืองพลังงาน ทำให้กระบวนการมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Tangendjaja & Wills, 1980; Lalitha & Kulothungan, 2004)



รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบปริมาณมิโมซินต่อเวลาการสกัดที่เพิ่มขึ้น

4.4 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนและการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนซึ่งเป็นวิธีสกัดแบบธรรมดาและการสกัดด้วยตัวทำละลาย NADES สภาวะที่ 1 และ ตัวทำละลาย NADES สภาวะที่ 2 แสดงดังรูปที่ 11 พบว่าการใช้ NADES ให้ปริมาณมิโมซินสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนอย่างเห็นได้ชัดทั้ง 2 สภาวะ เนื่องจากคุณสมบัติของ NADES ที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน การปรับระดับคุณสมบัติความมีขั้วของระบบตัวทำละลาย (Tuning solvent polarity) และเพิ่มความสามารถในการละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งดีกว่าน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว (Dai et al., 2013)



รูปที่ 11 กราฟเปรียบเทียบปริมาณมิโมซินต่ำสุด และสูงสุด จากการสกัดแบบธรรมดา และสกัดด้วยสภาวะที่ศึกษา

อภิปรายผล

ผลการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนกระถินโดยใช้ตัวทำละลาย NADES (choline chloride–water) พบว่าเวลาและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดต่อผลผลิต ขณะที่ความเข้มข้นและปริมาตรของ NADES รวมถึงค่า pH มีผลเพียงเล็กน้อยหรือไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเพิ่มเวลาในการสกัดตั้งแต่ 30 - 90 นาที ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง โดยพบว่าที่สภาวะความเข้มข้นของ NADES เท่ากับ 0.50 โมลต่อกิโลกรัม ค่า pH 6 และเวลา 90 นาที ปริมาณมิโมซินสูงสุดเท่ากับ 80.03 ± 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน โดยกระบวนการดังกล่าวอธิบายได้ว่าในระยะแรกการแพร่ของมิโมซินจากเนื้อเยื่อสู่ตัวทำละลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเข้าสู่สมดุลการเพิ่มเวลาเกิน 3 ชั่วโมงไม่ก่อให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในทำนองเดียวกัน การเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 20 - 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

โดยให้ผลผลิตสูงสุด 76.46 ± 0.95 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่า pH 7 และปริมาตร NADES 50 มิลลิลิตร การเพิ่มอุณหภูมิช่วยลดความหนืดของตัวทำละลายและเร่งการแพร่ ทำให้การละลายของ มิโมซินในระบบดีขึ้น ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของ NADES และ pH ไม่แสดงผลที่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการใช้ NADES ในการสกัดพบว่าได้ปริมาณมิโมซินสูงกว่าการสกัดแบบธรรมดาที่สกัดด้วยน้ำร้อน เนื่องจากสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนและปรับความมีขั้วของระบบ จึงละลายสารออกฤทธิ์ได้ดีกว่า สอดคล้องกับรายงานของ (Dai et al., 2013)

การยืนยันชนิดสารด้วย FTIR พบแถบการดูดกลืนที่ตรงกับโครงสร้างมิโมซิน ขณะที่กราฟมาตรฐาน ($R^2 = 0.9999$) แสดงถึงความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ นอกจากนี้ การสร้างแบบจำลองเชิงคณิตศาสตร์ด้วย RSM และ Box-Behnken สามารถทำนายผลการสกัดได้อย่างแม่นยำ โดยเน้นให้เห็นชัดเจนว่าเวลาและอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดประสิทธิภาพการสกัด

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลาย NADES (choline chloride–water) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดมิโมซินจากยอดอ่อนใบกระถินได้ดีกว่าการสกัดแบบธรรมดาที่สกัดด้วยน้ำร้อนโดย ปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดคือเวลาและอุณหภูมิ การสกัดโดยใช้ NADES ความเข้มข้น 0.50 โมลต่อกิโลกรัม ค่า pH 6 และเวลา 90 นาที ให้ผลผลิตสูงสุด 80.03 ± 2.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน ขณะที่การสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่า pH 7 และ ปริมาตรของ NADES 50.00 มิลลิลิตร ให้ผลผลิต 76.46 ± 0.95 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของยอดกระถิน การวิเคราะห์ด้วย FTIR ยืนยันว่าสารที่สกัดได้คือมิโมซิน และแบบจำลอง RSM สามารถทำนายผลได้อย่างแม่นยำ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือเวลา 3 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 50 °C ซึ่งให้สมดุลระหว่างผลผลิตและเป็นการใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา และขอขอบคุณชั้นปฏิบัติการเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา สำหรับอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และพงศ์ชนัน เหลืองไพบุลย์. (2551). *การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง (Design and Analysis of Experiments)*. สมุทรปราการ: สำนักพิมพ์ท็อป.
- Anitha, R., Jayavelu, S., & Murugesan, K. (2005). Antidermatophytic and bacterial activity of mimosine. *Phytotherapy Research*, 19(11), pp.992-993. <https://doi.org/10.1002/ptr.1761>
- Brewbaker, J. L., & Hylin, J. W. (1965). Variation in mimosine content among *Leucaena* species and related Mimosaceae. *Crop Science*, 5(4), pp.348-351. <https://doi.org/10.2135/cropsci1965.0011183X000500040019x>
- Champanerkar, P.A., Vaidya, V.V., Shailajan, S. & Menon, S.N. (2010). A sensitive, rapid and validated liquid chromatography ? tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for determination of Mimosine in *Mimosa pudica* Linn. *Natural Science*, 2(7), pp.689-695. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.27088>
- Chang, H. C., Liu, L. T., Hung, W. C., & Wang, C. J. (1999). Mimosine inhibits proliferation of hepatoma cells by inducing apoptosis through mitochondrial stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157(1), pp.52-60. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8677>
- Dai, Y., Gold, B., Vishwanatha, J. K., & Rhode, S. L. (1994). Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase. *Virology*, 205(1), pp.210-216. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1636>
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, pp.61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Hallak, M., Vazana, L., Shpilberg, O., Levy, I., Mazar, J., & Nathan, I. (2008). A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation. *Apoptosis*, 13(1), pp.147-155. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0156-7>

- Honda, M. D. H., & Borthakur, D. (2019). Mimosine concentration in *Leucaena leucocephala* under various environmental conditions. *Tropical Grasslands-Forrajcs Tropicales*, 7(2), pp.164-172.
[https://doi.org/10.17138/TGFT\(7\)164-172](https://doi.org/10.17138/TGFT(7)164-172)
- Ilham, Z., Hamidon, H., & Rosji, N.A. (2015). Extraction and quantification of toxic compound mimosine from biomass residues of *Leucaena leucocephala*. *Procedia Chemistry*, 16, pp.164-170.
<https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.029>
- Kubota, S., Fukumoto, Y., Ishibashi, K., Soeda, S., Kubota, S., Yuki, R., Nakayama, Y., Aoyama, K., Yamaguchi, N., & Yamaguchi, N. (2014). Activation of the prereplication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein without DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), pp.5730-5746.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546655>
- Lalitha, K. & Kulothungan, S. R. (2004). Determination of mimosine by a sensitive indirect spectrophotometric method. *Talanta*, 63(3), pp.635-640.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.12.006>
- Méchal, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: Many choices for appropriate answers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), pp.728-738. <https://doi.org/10.1038/nrm2976>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Nair, L. S., Menon, S. N., Shailajan, S., Baing, M. M., & Sane, R. T. (2007). Reverse phase high performance thin layer chromatographic quantification of mimosine from whole plant of *Mimosa pudica* Linn. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 20(1), pp.49-51.
<https://doi.org/10.1556/jpc.20.2007.1.7>
- Nguyen, B. C. Q., Chompoo, J., & Tawata, S. (2015). Insecticidal and Nematicidal Activities of Novel Mimosine Derivatives. *Molecules*, 20(9), pp.16741-16756.
<https://doi.org/10.3390/molecules200916741>
- Nguyen, V. H., & Tawata, S. (2016). Mimosine: Biosynthesis and biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), pp.4237-4245. <https://doi.org/10.1002/ptr.5636>
- Puchala, R., Davis, J. J., & Sahl, T. (1996). Determination of mimosine and 3,4-dihydropyridine in milk and plasma of goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), pp.375-378.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00221-6)
- Ramesh, S., Venkatesan, G., Karthikeyan, K., Sundari, C. K., & Chandran, C. (2021). Studies on the active components of sensitive plant *Mimosa pudica* L. (Mimosaceae). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(57&58), pp.88-96.
- Renz J. (1936). Über das mimosin. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 244, pp.153-158.
- Sahid, I., Ishak, M. S., Bajrai, F. S., Jansar, K. M., & Yusoff, N. (2017). Quantification and herbicidal activity of mimosine from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Transactions on Science and Technology*, 4(2), pp.62-67.
- Tangendjaja, B. & Wills, R. B. H. (1980). Analysis of mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* . 202(2), pp.317-318.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81746-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81746-X)
- Watson, P. A., Hanauske-Abel, H. H., Fiint, A. & Lalande, M. (1991). Mimosine arrests cell cycle progression at the G1-Sphase border. *Cytometry*, 12(3), pp.242–246. <https://doi.org/10.1002/cyto.990120306>

Wu, C., Yuan, H., Jia G., Wang, Z. & Wu, X. (2011). Determination of Mimosine and 2,3-Dihydroxypyridine in *Leucaena leucocephala* by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Applied Mechanics and Materials*, 140, pp.296-301.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.140.296>