การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในผลตะคร้อจากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง

Determination of Organic Acids in *Schleichera oleosa* (Lour.) Oken from Different Provinces in Northeastern Region of Thailand Using HPLC Technique

ชลธิชา นิวาสประกฤติ[1] ปิยานี รัตนชำนอง[1] อรทัย อร่ามพงษ์พันธ์[2] และ ทักษิณ อาชวาคม[3]

Cholticha Niwaspragrit[1], Piyanee Ratanachamnong[1], Auratai Aramphongphan[2] and Taksin Artchawakom[3]

บทคัดย่อ

Schleichera oleosa (Lour.) Oken เป็นพืชในตระกูล Sapindaceae ในประเทศไทยเรียกว่า ตะคร้อ ซึ่งถูกบริโภคโดยคนพื้นบ้านและเป็นผลไม้ป่ามีรสเปรี้ยว จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงตั้งสมมุติฐานว่า ผลตะคร้อน่าจะมีกรดอินทรีย์สูงและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ควรสนับสนุนให้เป็นผลไม้บำรุงสุขภาพ จึงวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของกรดอินทรีย์จากผลตะคร้อที่ได้จากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ทำการสกัดสารสำคัญด้วยน้ำและกรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่า มีปริมาณกรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดฟอร์มิก กรดแลคติก กรดซิตริก อยู่ระหว่าง 0.04-0.07, 0.12-0.21, 1.82-2.57, 21.13-39.27 และ 16.35-19.58 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากการศึกษา พบว่า ผลตะคร้อจากจังหวัดหนองบัวลำภูและอุดรธานีมีปริมาณกรดอินทรีย์โดยรวมมากกว่าผลตะคร้อจากจังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น และนครราชสีมา ผลตะคร้อจากจังหวัดที่ใกล้กันหรือติดกันน่าจะมาจากพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้มีปริมาณกรดอินทรีย์ในผลตะคร้อที่ใกล้เคียงกันด้วย จะเห็นได้ว่าผลตะคร้อมีกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์ จึงควรสนับสนุนให้ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพและประชาสัมพันธ์ให้ประชากรในท้องถิ่นเห็นคุณค่า อนุรักษ์สายพันธุ์ของต้นตะคร้อต่อไป

ABSTRACT

Schleichera oleosa (Lour.) Oken is classified in Sapindaceae family, commonly called as Ta-khro in Thailand. Its fruits are consumed by the traditional people and taste sour. According to the taste characteristic, it was hypothesized that Ta-khro fruits contained high level of organic acids that may serve as antioxidants and promote human health. Organic acids in this fruits from different provinces in northeastern region of Thailand were investigated using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. They were extracted from *S. oleosa* with water and the fruit extracts were filtered through 0.45 micron filter membrane before injecting into HPLC. Results revealed that the major components of organic acids were oxalic acid, tartaric acid, formic acid, lactic acid and citric acid

[1]ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[1]Agricultural Technology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

[2]ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University

[3]ฝ่ายเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและทรัพยากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

[3]Environment and Resources Technology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

(0.04-0.07, 0.12-0.21, 1.82-2.57, 21.13-39.27 and 16.35-19.58 g/100gDW, respectively). Results revealed that Ta-Khro fruits from Nongbualamphu and Udonthani had higher amounts of organic acids compared to those from Chaiyaphum, Khonkaen and Nakhonratchasima. The fruits from neighbor provinces would have similar genetic characteristics, resulting in similar amount of organic acids. The data shown that *S. oleosa* fruits are nourished with organic acids, and therefore it may have potential to develop as commercial food supplements. According to the beneficial effects of *S. oleosa*, either in health or economic aspect, the campaign conducted to promote the conservation of this parental species is required in order to preserve biodiversity as well as enhance well-being of local populations.

Key Words : *Schleichera oleosa* (Lour.) Oken, Organic acid, HPLC

e-mail address: cholticha@tistr.or.th

คำนำ

ตะคร้อมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Schleichera oleosa* (Lour.) Oken เป็นพืชในตระกูล Sapindaceae เป็นพรรณไม้พื้นบ้าน มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบ สูงถึง 25 เมตร ขึ้นอยู่ในป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ออกผลเป็นช่อยาวประมาณ 15 เซนติเมตร เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีเหลือง มีรสเปรี้ยว หรือเปรี้ยวอมหวาน ปัจจุบันในประเทศไทยการบริโภคและใช้ประโยชน์ตะคร้อมีอยู่จำกัดพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ต่างประเทศได้มีนักวิจัยเห็นประโยชน์และศึกษาคุณสมบัติของตะคร้อในหลายด้าน ดังจะเห็นได้จากการศึกษาสารสกัดจากเปลือกและลำต้นของต้นตะคร้อพบว่าสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการตายของเซลล์มะเร็ง (Pettit *et al.*,2000, Thind *et al.*, 2010) มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย (Ghosh *et al.*, 2011) และการใช้น้ำมันสกัด (*Kusum* oil or Macassar oil) จากเมล็ดตะคร้อ รักษาอาการคัน สิว แผลไหม้ เป็นน้ำมันสำหรับนวดแก้การปวดไขข้อ (Palanuvej and Vipunngeun, 2008) และยังพบว่าน้ำต้มเปลือกของต้นตะคร้อยังรักษาอาการปวดประจำเดือนอีกด้วย (Mahaptma and Sahoo, 2008)

กรดอินทรีย์ (organic acids) พบอย่างแพร่หลายในพืชผัก ผลไม้ (Joslyn, 1970) ซึ่งเรารู้จักกันดีในกลุ่มของ AHA (Alpha Hydroxyl Acids) นิยมนำมาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางค์ โดย AHA จะออกฤทธิ์ทำให้เซลล์ผิวหนังชั้นบนของหนังกำพร้าหลุดลอกและกระตุ้นให้ผิวหนังชั้นล่างสร้างผิวหนังใหม่ ไม่เกิดการอุดตันของสารตกค้าง (พรพรรณ, 2542) ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูงใช้หลักการแลกเปลี่ยนไอออน (Frayne, 1986) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูง นิยมนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย เช่น ในสตรอเบอร์รี่ (Perez *et al.*, 1997) และมะกอก (Ergonul and Nergiz, 2010) เป็นต้น

ในประเทศไทยพบมีการนำไปใช้ประโยชน์เฉพาะในแหล่งที่มีต้นตะคร้อขึ้นอยู่ตามธรรมชาติเท่านั้น การนำไปใช้ประโยชน์นิยมนำมาบริโภคสดและเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มในผลิตภัณฑ์หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติและองค์ประกอบของตะคร้ออย่างจริงจัง หากมีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติและองค์ประกอบของผลตะคร้อ น่าจะทำให้ตะคร้อถูกนำไปใช้ประโยชน์ตามคุณสมบัติและองค์ประกอบอย่างกว้างขวาง งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ในผลตะคร้อจากจังหวัดต่างๆ ที่นิยม

บริโภคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ เพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเสริมสุขภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

รวบรวมผลตะคร้อสดจาก 5 จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี หนองบัวลำภู และนครราชสีมา ทั้งหมด 35 สายต้น นำส่วนเนื้อตะคร้อมาบดให้ละเอียดแล้วนำเข้ากระบวนการทำให้สารที่เปียกให้แห้งโดยทำให้สารนั้นเย็นจนแข็งตัวและระเหยเอาน้ำแข็งออกไป (freeze drying) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง

สารละลายมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ได้แก่ กรดออกซาลิก (oxalic acid), กรดทาร์ทาริก (tartaric acid), กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแลคติก (lactic acid) และกรดซิตริก (citric acid) โดยเตรียมสารละลายกรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 12.5-100 ppm กรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 25-200 ppm กรดฟอร์มิกความเข้มข้น 50-400 ppm กรดแลคติกและกรดซิตริกความเข้มข้น 100-800 ppm ส่วนสารตัวอย่างละลายด้วยน้ำให้มีความเข้มข้น 2,500 ppm กรองสารสกัดที่ได้ด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ทั้งสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างฉีดเข้าเครื่องด้วยปริมาตร 10 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์

เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์คือ เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC-UV ของ *Waters® 2695* Separations Module, USA) และ detector ใช้ photodiode array detector (PDA) และใช้ Prevail™ Organic Acid column ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน mobile phase ใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 25 mM, pH 2.5 อัตราการไหล (flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ใช้ PDA เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (Shui and Leong., 2002)

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% recovery)

จากสูตร % Recovery = [(A - B)/C] x 100

โดยที่ A = ความเข้มข้นของตัวอย่างตะคร้อที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample)

B = ความเข้มข้นของตัวอย่างตะคร้อไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspike sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่างตะคร้อ

ค่าสหสัมพันธ์ของกรดอินทรีย์กับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

การหาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดอินทรีย์จากพื้นที่ในจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการวิเคราะห์ Principal component analysis บนพื้นฐาน correlation matrix โดยโปรแกรม PAST version 2.14 (http://folk.uio.no/ ohammer/past/)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์จากผลตะคร้อจากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีกรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดทาร์ทาริก(tartaric acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแลกติก (lactic acid) และกรดซิตริก (citric acids) เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน แสดงใน Table 1 สำหรับค่า Retention time,

%Recovery, Equation, และ R^2 แสดงใน Table 2 ผลของการฉีดสารสกัดน้ำจากผลตะคร้อเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานได้โครมาโตแกรมแสดงใน Figure 1 และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอินทรีย์อธิบายโดยใช้เมตริกซ์สหสัมพันธ์ แสดงใน Figure 2

Table 1 Amount of organic acids in *S. oleosa* from different provinces of northeastern region

Locations	Concentration (g/100g DW)				
	oxalic acid	tartaric acid	formic acid	lactic acid	citric acid
Chaiyaphum	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.03	1.91 ± 0.27	21.39 ± 3.24	16.35 ± 4.11
Khonkaen	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.03	1.82 ± 0.17	26.13 ± 11.87	17.07 ± 1.98
Udonthani	0.07 ± 0.01	0.15 ± 0.06	2.27 ± 0.78	31.94 ± 7.28	19.58 ± 2.12
Nongbualamphu	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.05	2.57 ± 0.37	39.27 ± 8.28	18.17 ± 2.10
Nakhonratchasima	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.03	2.08 ± 0.18	21.13 ± 6.96	18.22 ± 1.95
Average	0.54 ± 0.01	0.16 ± 0.39	2.18 ± 0.35	27.97 ± 7.57	17.87 ± 2.45

Values are expressed as mean ± standard deviation of duplicate analysis

Table 2 Retention times, recovery, calibration parameters for analysis of different organic acids

Organic acid	Retention time (min)	Recovery (%)	Equation	R^2
Oxalic acid	2.706 ± 0.005	95.02	Y = 6.85e+003 X	0.999831
Tartaric acid	3.442 ± 0.016	100.00	Y = 1.73e+003 X	0.999959
Formic acid	3.715 ± 0.038	99.31	Y = 3.68e+003 X	0.999975
Lactic acid	5.566 ± 0.018	104.08	Y = 2.83e+002 X	0.999579
Citric acid	9.652 ± 0.128	99.81	Y = 5.65e+002 X	0.997858

Values are expressed as mean ± standard deviation of duplicate analysis

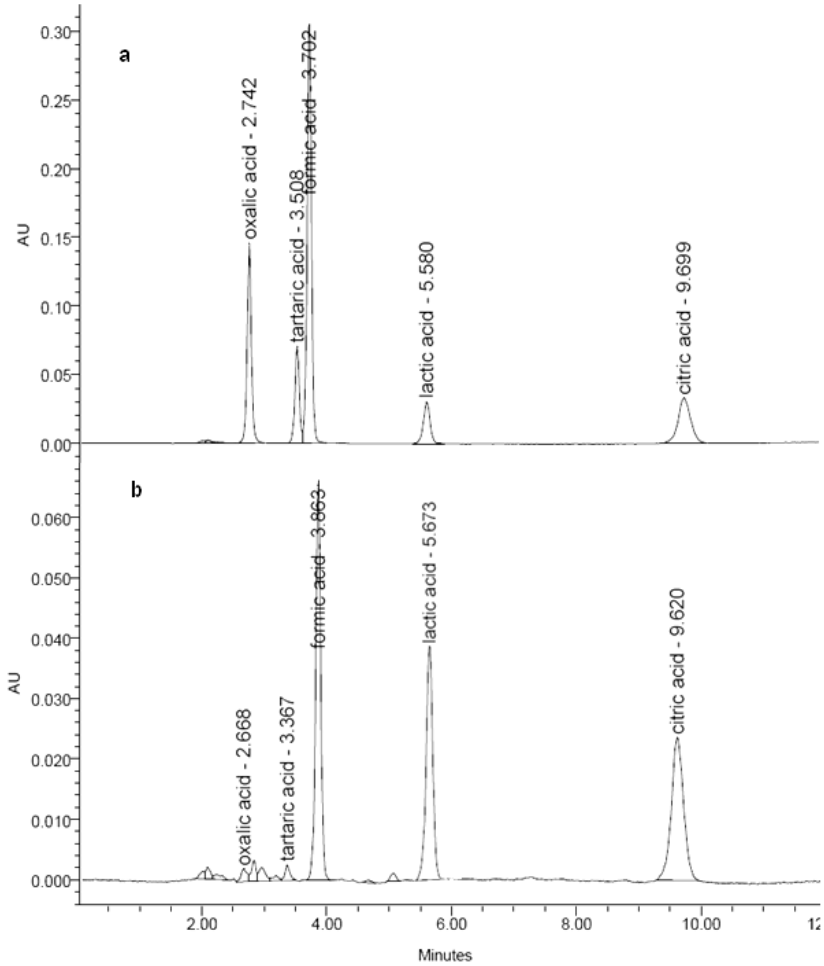

Figure 1 HPLC chromatogram of a) mixture standard solutions of organic acids, b) an extract sample from *S. oleosa* using Prevail™ Organic Acid column (150 x 4.6mm.) with 25mM KH_2PO_4, pH 2.5, and PDA detection at 210 nm

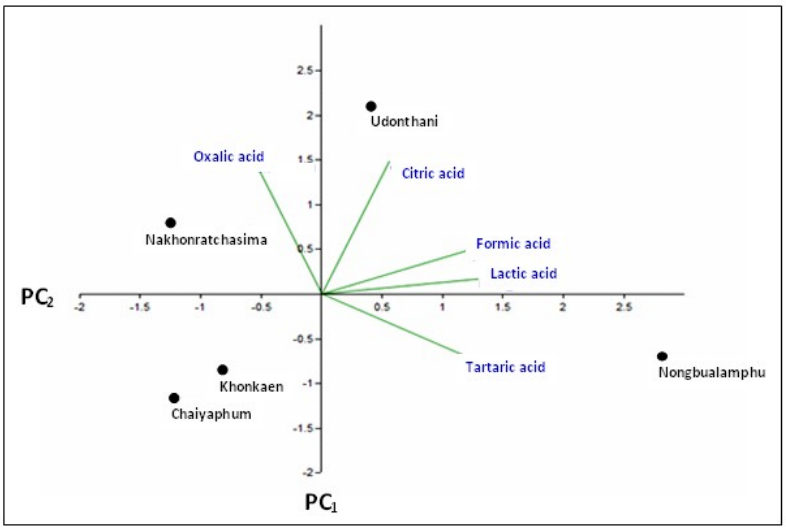

Figure 2 Principal component analysis (PCA) based on correlation between 5 organic acids

จากการศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ของผลตะคร้อที่มาจากพื้นที่ในจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง และได้ทดสอบความแม่นยำโดยหาค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนของกรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดฟอร์มิก กรดแลคติกและกรดซิตริก พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืน(% recovery) ดัง Table 2 ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับของ AOAC (AOAC, 2002) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ต่าง ๆ กับปริมาณกรดอินทรีย์โดยใช้ Principal component analysis พบว่า ผลตะคร้อแต่ละพื้นที่มีปริมาณของกรดอินทรีย์แตกต่างกัน โดยผลตะคร้อจากอุดรธานี และหนองบัวลำภู มีปริมาณกรดอินทรีย์โดยรวมสูงกว่าผลตะคร้อจากพื้นที่อื่นๆ โดยเฉพาะผลตะคร้อจากหนองบัวลำพู มีปริมาณกรดทาร์ทาริก กรดฟอร์มิก กรดแลคติกและกรดซิตริก สูงโดดเด่น รองลงมาคือผลตะคร้อจากอุดรธานี จากการจัดกลุ่มตะคร้อตามปริมาณกรดอินทรีย์ที่สะสมอยู่เป็นไปตามพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เนื่องจากหนองบัวลำภูและอุดรธานี มีพื้นที่ที่ใกล้เคียงกันมาก อีกทั้งเดิมหนองบัวลำภูเป็นอำเภอหนึ่งในจังหวัดอุดรธานี จึงมีความเป็นไปได้ว่าการกระจายพันธุ์ตะคร้อทั้งสองจังหวัด อาจมาจากพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก เช่นเดียวกับจังหวัดขอนแก่นและชัยภูมิ ที่มีพื้นที่ติดต่อกัน การกระจายพันธุ์ของตะคร้อจึงอาจมาจากพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันเช่นกัน

สรุป

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานครั้งแรกของกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในผลตะคร้อโดยปริมาณกรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ามีความแปรปรวนในองค์ประกอบของกรดอินทรีย์ของผลตะคร้อตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามในการเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษาไม่มีข้อมูลอายุผลหลังจากติดดอกซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างข้างต้นได้ จึงควรที่จะมีการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอินทรีย์และอายุของผลตะคร้อเพื่อที่จะได้ข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ในการสนับสนุนการคัดเลือกพันธุ์ การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ตะคร้ออย่างยั่งยืนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและขอขอบคุณ ดร.อัญมณี อาวุชานนท์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่กรุณาให้คำปรึกษาและตรวจทานงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

พรพรรณ สุนทรธรรม. 2542. วงการเสริมสวยและความงามมีความตื่นเต้นกับสารเอ เอช เอ (AHAs) อะไรคือ AHAs. **วารสารอาหารและยา** 6(1): 14-23.

AOAC. 2002. **AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. Available source: http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf, Nov 5, 2010.

Ergonul, P.G. and C. Nergiz. 2010. Determination of Organic Acids in Olive Fruit by HPLC. **Czech J. of Food Sci.** 28: 202-205.

Frayne, R.F. 1986. Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. **Am J Enol Vitic.** 37: 281–*287*.

Ghosh, P., P. Chakraborty, A. Mandal, M.G. Rasul, M. Chakraborty and A. Saha. 2011. Triterpenoids from *Schleichera oleosa* of Darjeeling Foothills and Their Antimicrobial Activity. **Indian J Pharm Sci.** 73: 231–233.

Joslyn, M.A. 1970. **Methods in Food Analysis**. Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis; Acidimetry. Berkeley, California.

Mahaptma, S.P. and H.P. Sahoo. 2008. An ethano medico botanical study of Bolangi, Orissa, India: Native plant remedies against Gynaecological diseases. **Ethanobot Leafl**. 12: 846–854.

Palanuvej, C. and N. Vipunngeun. 2008. Fatty acid constituents of *Schleichera oleosa* (Lour) Oken seed oil. **J Health Res.** 22: 203–212.

Perez, A.G., R. Olias, J. Espada, J.M. Olias and C. Sanz, C. 1997. Rapid Determination of Sugars, Nonvolatile Acids, and Ascorbic Acid in Strawberry and Other Fruits. **J Agric Food Chem.** 45:3545-3549

Pettit, G.R., A. Numata, G.M. Cragg, D.L. Herald, T. Takada and C. Iwamoto. 2000. Isolation and Structures of Schleicherastatins 1-7 and Schleicheols 1 and 2 from the Teak Forest Medicinal tree *chleichera oleosa*. **J Nat Prod.** 63: 72–75.

Shui, G. and L.P. Leong. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **J. of Chromatography A** 977: 89–96.

Thind, T.S., G. Rampal, S.K. Agrawal, A.K. Saxena and S. Arora. 2010. Diminution of free radical induced DNA damage by extracts/fractions from bark *of Schleichera oleosa* (Lour.) Oken. **Drug Chem Toxicol.** 33: 329-336.