

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบ ปริมาณสารสำคัญของหญ้าหวาน

Comparative Study on Botany and Biochemical Characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni

สุพัฒน์กิจ โพธิ์สว่าง^{1*} พัชราวดี ขุนไกร¹ เกษม ทองขาว¹ จันทร์เพ็ญ แสนพรหม¹
พิจิตร ศรีปิ่นตา¹ ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์² และ สายชล โนสุวรรณ¹

Supattanakij Posawang^{1*} Pattawadee Khunkrai¹ Kaseam Tongkhaw¹ Chanpan
Saenphom¹ Phichit Sripinta¹ Laddawan Insung² and Saichon Nosuwan¹

¹ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ 313 หมู่ 12 ตำบลหนองควาย อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ 50230

¹ Royal Agricultural Research Center, Chiang Mai 313 Moo 12, NongKhwai Sub-district, Hang Dong District, Chiang Mai 50230

² สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² Horticulture Research Institute Department of Agriculture, Bangkok 50 Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author : weerapon99@hotmail.com

(Received: 17 February 2020; Revised: 25 March 2020; Accepted: 9 April 2020)

Abstract

A study of botanical characteristics and agricultural characteristics of stevia at Chiang Mai Royal Agricultural Research Center (Mae-John-Loang) revealed that there were for 4 sample groups of stevia as of 1) big leaf with leaf hair stevia (BLHS), 2) purple young shoot stevia (PYSS), 3) long narrow leaves stevia (LNLS) and 4) small shrub stevia (SSS). The analysis of genetic correlations of four sample groups showed that they were all genetic differences. The yields were harvested every 45 days after that all of sample groups of stevia were maintained for the next harvest. The analysis of stevioside content showed that PYSS has the highest stevioside content (40.58 g/gDW), followed by SNLS, BLHS and SSS (5.99, 5.94, 5.27 g/gDW, respectively). The saponins contents in LNLS group was the highest as of 52.00 mg/gDW, followed by, SSS, PYSS and BLHS (51.1, 50.82, and 45.20 mg/gDW, respectively). The antioxidant capacity of stevia was detected in early pre-flowering.

It was found that antioxidant capacity in SSS group was the highest as 77.43 percent, followed by PYSS, BLHS and LNLS (76.60, 75.20 and 73.40 percent, respectively). For the phenolic content, it was found that BLHS group contained the highest phenolic content as of 0.058 mg /gDW, followed by PYSS, SSS and LNLS (0.052, 0.050 and 0.041 mg/gDW, respectively).

Keywords: *Stevia rebaudiana* Bertoni, stevioside, antioxidant, phenolic compounds

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์และลักษณะทางการเกษตรของหญ้าหวาน ณ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่-แม่จอนหลวง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าช่วงฤดูหนาวการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า เมื่อเทียบกับช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน จากการปลูกรวบรวมหญ้าหวานที่ได้จากการสำรวจ สามารถแยกลักษณะความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาได้ 4 กลุ่มลักษณะ คือ 1) กลุ่มใบใหญ่มีขน (BLHS) 2) กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง (PYSS) 3) กลุ่มใบแคบยาว (ไต้หวัน, LNLS) และ 4) กลุ่มทรงพุ่มเล็ก (SSS) ด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าหวานจำนวน 4 กลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมทั้งหมด ด้านผลผลิตพบว่าสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตหญ้าหวาน ทุก 45 วัน ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสเตวิโอไซด์ พบว่าหญ้าหวานกลุ่มยอดอ่อนสีม่วง มีปริมาณสารสเตวิโอไซด์มากที่สุด คือ 40.58 g/gDW รองลงมาคือ กลุ่มใบแคบยาว, กลุ่มใบใหญ่มีขน และกลุ่มทรงพุ่มเล็ก ที่มีปริมาณสารสเตวิโอไซด์เท่ากับ 5.99, 5.94 และ 5.27 g/gDW ตามลำดับ ส่วนปริมาณซาโปนินในต้นหญ้าหวาน พบว่าในหญ้าหวานกลุ่มใบแคบยาว มีปริมาณสารซาโปนินสูงสุดที่ 52.00 mg/gDW รองลงมาคือ กลุ่มทรงพุ่มเล็ก, กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง และกลุ่มใบใหญ่มีขน ที่มีปริมาณสารซาโปนินเท่ากับ 51.13, 51.12, 50.82 และ 45.20 mg/gDW ตามลำดับ ด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของหญ้าหวานในช่วงก่อนออกดอก พบว่าหญ้าหวานกลุ่มทรงพุ่มเล็กมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 77.43 รองลงมาคือ หญ้าหวานกลุ่มยอดอ่อนสีม่วง, กลุ่มใบใหญ่มีขน และกลุ่มใบแคบยาว คิดเป็นร้อยละ 76.60, 75.20 และ 73.40 ตามลำดับ และพบว่าในหญ้าหวานกลุ่มใบใหญ่มีขนที่เก็บเกี่ยวระยะก่อนออกดอก มีปริมาณสารฟีนอลิกเฉลี่ยสูงสุดที่ 0.058 ± 0.01 mg/gDW รองลงมาได้แก่ หญ้าหวานกลุ่มยอดอ่อนสีม่วง, กลุ่มทรงพุ่มเล็กและกลุ่มใบแคบยาว ที่มีปริมาณสารฟีนอลิกเฉลี่ยเท่ากับ 0.052, 0.050 และ 0.041 mg/gDW ตามลำดับ

คำสำคัญ: หญ้าหวาน สารสเตวิโอไซด์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก

คำนำ

หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) จัดอยู่ในวงศ์ Asteracea (Compositae) เป็นพืชล้มลุกระยะยาว มีลักษณะคล้ายต้นกะเพราหรือต้นแมงลัก มีสาร Stevioside ที่ให้ความหวานคล้ายน้ำตาลทรายมาก และมีความหวานประมาณ 300 เท่าของน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีแคลอรีต่ำมาก เมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย เนื่องจากไม่ถูกย่อยให้เกิดพลังงานในร่างกาย จากคุณสมบัติดังกล่าวในปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นสารที่ให้ความหวานสำหรับอาหารและเครื่องดื่มบางประเภท โดยใช้แทนน้ำตาลทรายบางส่วนหรือทั้งหมด ซึ่งวัตถุประสงค์สำคัญคือลดปริมาณแคลอรีในอาหาร และเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วนหรือผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งไม่สามารถบริโภคน้ำตาลในปริมาณมากๆ ได้ ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อนุญาตให้นำสารสกัดสตีวียอไซด์มาขึ้นทะเบียนเป็นสารหวานแทนน้ำตาลได้ หญ้าหวานจึงเป็นที่ต้องการมากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ประเทศญี่ปุ่นมีการส่งออกสารสตีวียอไซด์ถึง 50 ตันในแต่ละปี ซึ่งมีมูลค่าถึง 220 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Brandle and Rosa, 1992) มีการอนุญาตให้ใช้สารสกัดจากหญ้าหวานเป็นสารทดแทนน้ำตาลในประเทศต่างๆ ไม่น้อยกว่า 30 ประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี แคนาดา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาและกลุ่มประเทศในยุโรปอนุญาตให้มีการใช้สารหวานจากหญ้าหวานเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่ม ตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 และ พ.ศ.2554 ตามลำดับ ประเทศไทย โดยกระทรวงสาธารณสุข ประกาศอนุญาตให้มีการผลิต และจำหน่ายหญ้าหวานในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2545

(ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 262) และประกาศให้สารสกัดสตีวียอไซด์เป็นวัตถุเจือปนอาหารตั้งแต่ปี พ.ศ.2556 (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 360) โดยอ้างอิงข้อมูลของคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญว่าด้วยวัตถุเจือปนอาหารขององค์การอาหารและเกษตรและองค์การอนามัยโลกแห่งสหประชาชาติ (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) ซึ่งได้ประเมินและกำหนดค่าความปลอดภัย (Acceptable Daily Intake, ADI) แล้วตามประกาศกระทรวงฯ ดังกล่าว สตีวียอไซด์ หมายความว่า สารสกัดบริสุทธิ์จากใบหญ้าหวาน ซึ่งประกอบด้วยสตีวียอไซด์, รีบาวติโอไซด์เอ, รีบาวติโอไซด์บี, รีบาวติโอไซด์ซี, รีบาวติโอไซด์ดี, รีบาวติโอไซด์โคไซด์เอ, รูบิโซไซด์ และสตีวียอลไบโอไซด์ สารสกัดจากหญ้าหวานที่อนุญาตให้ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารต้องมีปริมาณสารในกลุ่มสตีวียอไซด์รวมทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 95 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งอ้างอิงจากมาตรฐานองค์การอาหารและเกษตร และองค์การอนามัยโลกแห่งสหประชาชาติ (Codex, 2010)

หญ้าหวานจัดเป็นพืชเศรษฐกิจทางเลือกที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง เพราะเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตสารปรุงรสหวานเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะผู้บริโภคที่มีปัญหาของโรคอ้วน โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง ที่นับวันจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังใช้ทดแทนน้ำตาลเทียมในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร และเครื่องดื่มสุขภาพ ซึ่งขยายตัวเร็วมาก รวมทั้งอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและอาหารในต่างประเทศต้องการสารที่สกัดได้จากใบหญ้าหวานเป็นจำนวนมาก อาทิในประเทศญี่ปุ่นและบราซิล ได้มีการใช้สารสกัดจากหญ้าหวานทดแทนน้ำตาลกันอย่างแพร่หลาย ส่วนประเทศจีนมีการผลิตหญ้าหวานเพื่อส่งประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา

อนุญาตให้ Rebaudioside A วางจำหน่ายได้ตั้งแต่ปี 2008 และบริษัทโคคา-โคล่า (Coca-Cola) ใช้สารสกัดหญ้าหวานผลิตเครื่องดื่มในประเทศที่มีการอนุญาตแล้วหลายประเทศ สำหรับประเทศไทยพบว่ามิเกลตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ผลิตหญ้าหวานส่งไปจำหน่ายยังประเทศเยอรมนีในส่วนวงการอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มของไทยก็กำลังมีการเปลี่ยนแปลงไปใช้สารสกัดจากหญ้าหวานแทนน้ำตาลกันมากขึ้น (พิสมัย, 2557) ปัจจุบันมีการใช้สารสตีวิโอไซด์เป็นสารแต่งรสหวานสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและใช้เป็นสารปรุงแต่งรสหวานในเครื่องดื่ม ขนม ลูกอม ยาสีฟัน และน้ำยาบ้วนปาก เป็นต้น สารสตีวิโอไซด์ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร (food additives) ในหลายประเทศ เช่น บราซิล เกาหลี และญี่ปุ่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) ส่วนในประเทศไทยในปี พ.ศ.2545 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้อนุญาตให้สารสตีวิโอไซด์ที่สกัดได้จากหญ้าหวานเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และอาหารที่มีส่วนผสมของสารสตีวิโอไซด์ต้องใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (สายดณีย์, 2554) หญ้าหวานยังจัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีค่าดัชนีแอนติออกซิเดนท์สูงและพบว่าในหญ้าหวานมีสารประกอบฟีนอลิกค่อนข้างสูงถึง 448.59 มิลลิกรัม ส่วนปริมาณเบต้าแคโรทีน 5.10 มิลลิกรัม แซนโทฟิลล์ 5.30 มิลลิกรัม และวิตามินซี 16.50 มิลลิกรัม จึงคาดว่าสารที่โดดเด่นที่น่าจะทำให้หญ้าหวานมีดัชนีแอนติออกซิเดนท์สูงน่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิก หญ้าหวานนำมาใช้เป็นเครื่องดื่มชาสมุนไพร ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน เนื่องจากในใบของหญ้าหวานมีสารที่เรียกว่าสตีวิโอไซด์ (stevioside) ซึ่งเป็นสารที่ให้

ความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 250-300 เท่า แต่สารดังกล่าวไม่ให้พลังงานจึงไม่ทำให้อ้วน นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่า กากหญ้าหวานที่ผ่านการสกัดสารหวาน (ที่พัฒนาเป็นผงแห้งบรรจุซองสำหรับเติมลงในชา กาแฟ หรืออาหาร) ยังคงมีความหวานสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลในการให้ความหวานในเครื่องดื่มชาชงได้ ซึ่งบรรจุเป็นถุงสำเร็จพร้อมซองดื่มได้ทุกช่วงเวลา ดื่มได้ง่าย ช่วยดับกระหายจากการประเินความพึงพอใจผลิตภัณฑ์จากกากหญ้าหวาน ผสมอัลมอนด์ มะลิ กระเจี๊ยบแดง และเตยหอม พบว่า ชาจากหญ้าหวานผสมมะลิ ซึ่งประกอบด้วยกากหญ้าหวาน 250 มิลลิกรัม และมะลิ 80 มิลลิกรัม เป็นสูตรที่มีสี กลิ่น และรสชาติเป็นที่น่าพึงพอใจที่สุด นอกจากหญ้าหวานจะเป็นสารปรุงรสหวานอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากธรรมชาติ มีรสขมเล็กน้อย ไม่ให้พลังงานและไขมัน ไม่เกิดการสะสมในร่างกายผู้บริโภค รวมทั้งไม่เกิดการดูดซึมในระบบการย่อยทำให้มีผลต่อผู้บริโภคที่ต้องการลดน้ำหนักและที่เป็นโรคเบาหวานประเภท 2 สารให้ความหวานจากหญ้าหวานทนความร้อนได้สูงถึง 200 องศาเซลเซียส ทนต่อภาวะความเป็นกรด-เบส ในช่วง 3-9 ให้ความหวานคงตัวตลอดกระบวนการผลิต ป้องกันการหมักทำให้ไม่เกิดการเน่าบูด และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยชะลอความแก่แล้ว ยังจัดเป็นโภชนาการบำบัดที่ดีเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังต่อสัตว์ทดลอง ไม่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง รวมทั้งทางระบาดวิทยายังไม่เคยมีรายงานการป่วยหรือปัญหาต่อสุขภาพ ที่เกิดจากการบริโภคหญ้าหวานเป็นประจำแต่อย่างไร ในทางตรงกันข้าม หญ้าหวานช่วยย่อยอาหาร ป้องกันฟันผุและปริทันต์ รักษาบาดแผล มีดัชนีไกลซีมิก เท่ากับศูนย์ ดังนั้นจะไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากบริโภค และยัง

ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง อหิวาตกโรค และโรคท้องร่วงอื่นๆ และลดคอเลสเตอรอล เป็นต้น (สายคนีย์, 2554) ใบหญ้าหวานยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 52.8 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 6.2 เปอร์เซ็นต์ สตีวีโอไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ ลิพิด 5.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 20.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกลุ่มไคเทอร์พีน กลุ่มไตรเทอร์พีน กลุ่มสตีรอล กลุ่มฟลาโวนอยด์ น้ำมันหอมระเหย สารสี เช่น คลอโรฟิลล์ และแคโรทีน แร่ธาตุต่างๆ เช่น ฟอสฟอรัส แคลเซียม โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม สังกะสี เหล็ก กรดไขมัน กรดอะมิโนต่างๆ เช่น อาร์จินิน ไลซีน ฮิสทีดิน ฟีนิล-อะลานีน ลิวซีน เมไทโอนีน แอลานีน ไอโซลิวซีน กรดแอสพาร์ติก กรดกลูตามิก โพรลีน โกลซีน อะลานีน ซีสทีน ไทโรซีน และทรีโอนีน วิตามินซี วิตามินเอ เส้นใย และยางไม้ มีการนำสารสกัดจากหญ้าหวานมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท ปัจจุบันในประเทศไทยมีการผลิตสารสตีวีโอไซด์ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งกระบวนการผลิตได้จากการวิจัย มีโครงการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกไร่หญ้าหวานให้มากขึ้นโดยเฉพาะพื้นที่บริเวณเขาใหญ่ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยรับซื้อหญ้าหวานสดหรือแห้งนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดสารหวานบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรมจำหน่ายแก่ผู้ผลิตอาหารและเครื่องดื่มทั้งในและต่างประเทศ และผู้บริโภคโดยตรงเพื่อใช้ประกอบอาหารและเครื่องดื่มในครัวเรือน ช่วยลดการนำเข้าและผลักดันให้หญ้าหวานเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรมีรายได้ที่มั่นคงและเติบโตอย่างยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลองและการจัดการแปลง

พันธุ์หญ้าหวานที่รวบรวมปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (แม่จอนหลวง) ตำบลแม่ณาจระ อำเภอมะแม่ม จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 4 กลุ่มตัวอย่าง ปลูกขยายพันธุ์โดยวิธีปักชำในแปลงปลูกขนาด 1×3 เมตร ระยะปลูก 30×30 เซนติเมตร ปลูกลึก 10 เซนติเมตร ปลูกแปลงละ 1 กลุ่มตัวอย่าง ภายใต้โรงเรือนหลังคาพลาสติก

วิธีการทดลอง

ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นโดยการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโต ตามแบบบันทึกของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช (2542) เช่น ลักษณะต้นและทรงพุ่ม ลักษณะใบ ดอก ก้าน การเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์และวิธีการใช้ประโยชน์ เป็นต้น รวมถึงการศึกษาสารสำคัญต่างๆ เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวในหญ้าหวาน ได้แก่ปริมาณสารสตีวีโอไซด์ โดยวิธี HPLC รายงานเป็นกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่าง (g/gDW) สารฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent รายงานผลเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อกรัมน้ำหนักแห้งพืชตัวอย่าง (mg/gDW) และสารซาโปนินโดยวิธี Total saponin colourimetry assay รายงานผลเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง (mg/gDW) สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รายงานเป็นร้อยละหรือสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ (%) การสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยการเก็บตัวอย่างจากใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธีของ Doyle and Doyle (1987) จากนั้น

ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอ ตัวอย่าง โดยใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Agglomerative hierarchical clustering (AHC)

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เทคนิค RAPD

นำใบอ่อนหรือยอดอ่อน มาทำการสกัด ดีเอ็นเอโดยนำมาแช่ให้ได้ 0.2 กรัม แล้วบดในโกร่ง ที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เสร็จแล้วเทใส่หลอด ทดลอง จากนั้นเติม 2XCTAB buffer จำนวน 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้ แล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์ม (chloroform): ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24 : 1 จำนวน 800 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยง (centrifuge) ที่ระดับความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นดูดเฉพาะน้ำที่ใสส่วนบนลงใน หลอดทดลองใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็นจัด จำนวน 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไป แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วและ อุณหภูมิเท่าเดิม เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้น เทไอโซโพรพานอลทิ้งไป แล้วเติมแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 800 ไมโครลิตร แล้วนำไป เหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วเทแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไป และทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 ครั้ง ปั่นย่อยให้ตะกอนแห้ง โดยการเปิดฝาทิ้งไว้ เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้น นำมาละลายใน TE buffer จำนวน 50-100 ไมโครลิตร เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการวัดคุณภาพและปริมาณ

สารละลายดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตร โฟริซิส (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้นของเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1XTAE buffer เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโต

จากการปลูกรวบรวมหญ้าหวานที่ได้จากการสำรวจ สามารถแยกลักษณะความแตกต่างกันทาง สันฐานวิทยาได้ 4 กลุ่มลักษณะ คือ 1) ใบใหญ่มีขน (BLHS) 2) ยอดอ่อนสีม่วง (PYSS) 3) ใบแคบยาว (ใต้ห้วน, LNLS) และ 4) ทรงพุ่มเล็ก (SSS) แต่เมื่อ บันทึกลักษณะทางการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ตามข้อกำหนดต่างๆ ตามแบบบันทึกของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช (2542) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันมากนัก โดยหญ้าหวาน ทุกกลุ่มตัวอย่างมีลักษณะเป็นไม้พุ่มตั้งตรง ขนาดเล็กลำต้นเป็นสีเขียว ความสูง 2-50 เซนติเมตร มีการแตกกอดี ใบสีเขียวและดอกมีสีขาว ช่อดอก เป็นลักษณะ corymb ระยะที่เหมาะสมสำหรับ เก็บเกี่ยวอยู่ในช่วงก่อนออกดอก อายุดอกประมาณ 4 เดือนหลังปลูก (Fig. 1, Table 1)

ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของหญ้าหวานทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ ใบใหญ่มีขน, ยอดอ่อนสีม่วง, ใบแคบยาว และ ทรงพุ่มเล็ก ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 8 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุล ชนิด ISSR จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แยกดีเอ็นเอ จำนวนทั้งหมด 63 แล็บ เมื่อนำแล็บดีเอ็นเอที่ได้มา วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Agglomerative hierarchical clustering (AHC) พบว่าหญ้าหวาน ทั้ง 4 ตัวอย่างมีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งหมด (Fig. 2)



Figure 1 Leaf and flower of *Stevia rebaudiana* Bertoni

Table 1 Botanical characteristics and agricultural characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni

<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	
Planting date	12/2/2559
Evaluation environment	Tropical
Type of planting	seed
Vigour of the plant	good
environment	
- Topography	Mountainous
- Country of characterization and /or evaluation	Higher-level landform
- Crop agriculture	Perennial field cropping
- Soil moisture	Slightly moist
- Soil fertility	Moderate
- Light requirement	sunny
leaf	
- Blade shape of mature leaf	cuneate
- Leaf colour	green
- Leaf colour variegation	Present
- Number of lobes in mature leaf	Few

Table 1 Botanical characteristics and agricultural characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Cont.)

<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	
- Terminal leaflet	Present
- Foliation density	dense
- leaf margin colour	light green
- vein colour	light green
- leaf density	High
- leaf type	simple
- margin	crenate
- venation	longitudinal
stem	
- stem branching	Semi-erect
- Plant growth habit	Erect
- Stem growth habit	Erect
- Plant height	5-20 cm.
- Crown number per plant	high
- stem color	green
- Type of material received	seed
flower	
- Flower color	white
- Intensity of flower color	light
- Length of peduncle	≤ 5 cm.
- Number of inflorescences per plant	11-29
- Time of flowering	4 month after planting
- Type of flower	corymb
- Length of picking season	before flowering
- Fertility of first flowers	good
- flowering	every year
- days to flowering after emergence	20
- sex	Female and male

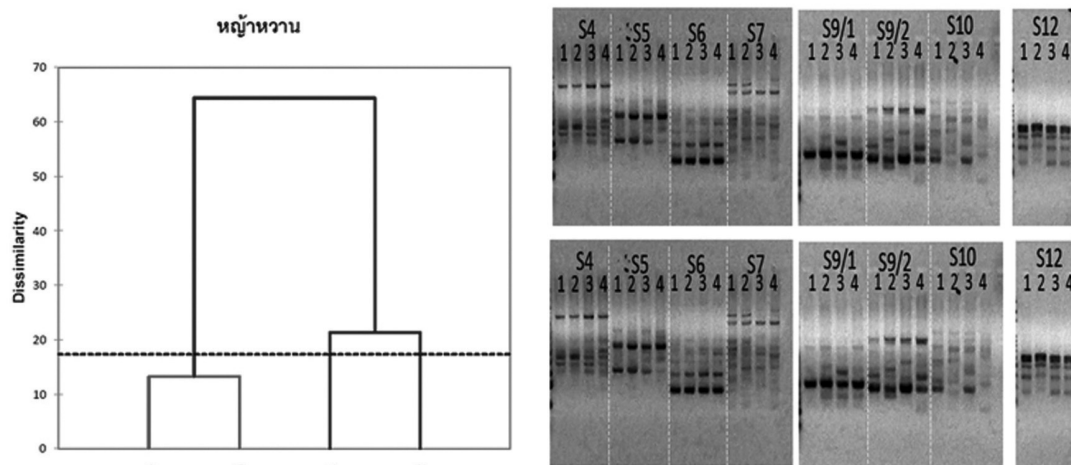


Figure 2 The analysis of genetic correlations of *Stevia rebaudiana* Bertoni

ปริมาณสารสตีวิโอไซด์ทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณสตีวิโอไซด์ทั้งหมด โดยใช้เทคนิค HPLC Assay ในต้นหญ้าหวานแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่าหญ้าหวานที่มีปริมาณสารสตีวิโอไซด์มากที่สุด ได้แก่ หญ้าหวานกลุ่มยอดอ่อน

สีม่วง มีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 40.58 g/gDW รองลงมา ได้แก่ กลุ่มใบแคบยาว (ได้หัว), กลุ่มใบใหญ่มีขน และกลุ่มทรงพุ่มเล็ก ที่มีปริมาณสารสตีวิโอไซด์ เท่ากับ 5.99, 5.94, และ 5.27 g/gDW ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Stevioside content (HPLC Assay) of *Stevia rebaudiana* Bertoni

Groups of sample	Stevioside content (g/gDW)
1. long narrow leaves stevia (LNLS)	5.99
2. purple young shoot stevia (PYSS)	40.58
3. big leaf with leaf hair stevia (BLHS)	5.94
4. small shrub stevia (SSS)	5.27

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าหญ้าหวานกลุ่มทรงพุ่มเล็ก มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คิดเป็น

ร้อยละ 77.43 รองลงมาได้แก่ กลุ่มยอดอ่อนใบสีม่วง, กลุ่มใบใหญ่มีขน และกลุ่มใบแคบยาว คิดเป็นร้อยละ 76.60, 75.20, 73.40 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 Antioxidant capacity of *Stevia rebaudiana* Bertoni in early pre-flowering

Groups of sample	Antioxidant capacity (%)
1. long narrow leaves stevia (LNLS)	73.40±0.01
2. purple young shoot stevia (PYSS)	76.60±0.01
3. big leaf with leaf hair stevia (BLHS)	75.20±0.02
4. small shrub stevia (SSS)	77.43±0.01

ปริมาณซาโปนินและปริมาณฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินในต้นหญ้าหวานพบว่า หญ้าหวานกลุ่มใบแคบยาวมีปริมาณสารซาโปนินสูงสุดเท่ากับ 52.00 mg/gDW รองลงมาได้แก่ กลุ่มทรงพุ่มเล็ก, กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง และกลุ่มใบใหญ่มีขน ที่มีปริมาณสารซาโปนินมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51.12, 50.82 และ 45.20 mg/gDW ตามลำดับ (Table 4) เมื่อทำการวิเคราะห์หา

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Folin Ciocalteu Colorimetric Assay พบว่าหญ้าหวานกลุ่มใบใหญ่มีขน มีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 0.058 mg/gDW รองลงมาได้แก่ กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง, กลุ่มทรงพุ่มเล็ก, และ กลุ่มใบแคบยาว ที่มีปริมาณสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 0.052, 0.050 และ 0.041 mg/gDW ตามลำดับ (Table 5)

Table 4 Total saponin of *Stevia rebaudiana* Bertoni in early pre-flowering

Groups of sample	Total saponins (mg/gDW)
1. long narrow leaves stevia (LNLS)	52.00 ± 1.35
2. purple young shoot stevia (PYSS)	50.82 ± 1.80
3. big leaf with leaf hair stevia (BLHS)	45.20 ± 2.50
4. small shrub stevia (SSS)	51.12 ± 1.05

Table 5 Total phenolic compounds of *Stevia rebaudiana* Bertoni in early pre-flowering

Groups of sample	Total phenolic compounds (mg galic/gDW)
1. long narrow leaves stevia (LNLS)	0.041±0.00
2. purple young shoot stevia (PYSS)	0.052±0.01
3. big leaf with leaf hair stevia (BLHS)	0.058±0.01
4. small shrub stevia (SSS)	0.050±0.00

สรุปผลการศึกษา

หญ้าหวานที่ได้จากการสำรวจและรวบรวมจากเขตภาคเหนือตอนบนในปี พ.ศ.2559 พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ทดสอบที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 1200 เมตร โดยเริ่มพบการแตกยอดและแทงช่อดอกตั้งแต่ช่วงต้นฤดูฝน (พฤษภาคม-กรกฎาคม) ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงสุด หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจะลดลงในช่วงฤดูหนาว เกษตรกรจึงมักตัดแต่งและบำรุงด้วยการใส่ปุ๋ยคอกและกำจัดวัชพืชทันทีหลังตัดแต่ง ด้านศัตรูพืชที่เข้าทำลายพบว่าการเข้าทำลายของมดและแมลงค่อมทองโดยการกัดกินใบในช่วงเดือนสิงหาคม สามารถจำแนกลักษณะของต้นหญ้าหวานที่รวบรวมได้ 4 ลักษณะ (กลุ่ม) คือ 1) กลุ่มใบใหญ่มีขน 2) กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง 3) กลุ่มใบแคบยาว (ไต้หวัน) และ 4) กลุ่มทรงพุ่มเล็ก ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าหวาน จากการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์แบบ Agglomerative hierarchical clustering (AHC) พบว่า หญ้าหวานทั้ง 4 ตัวอย่างมีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งหมด ด้านปริมาณสตีวิโอไซด์ที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC Assay พบว่าหญ้าหวานที่มีปริมาณสารสตีวิโอไซด์มากที่สุดได้แก่หญ้าหวานกลุ่มยอดอ่อนสีม่วง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหญ้าหวานระยะก่อนดอกบานพบว่า หญ้าหวานกลุ่มใบใหญ่มีขนมีค่าเฉลี่ยสูงสุด ส่วนหญ้าหวานกลุ่มใบแคบยาว (ไต้หวัน) มีปริมาณซาโปนินในใบมากที่สุด และพบว่าต้นหญ้าหวานกลุ่มทรงพุ่มเล็กมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สำหรับการประโยชน์ของหญ้าหวาน พบว่าเกษตรกรนำส่วนใบในระยะก่อนออกดอกมาอบแห้งและบดผงส่งผู้ประกอบการเอกชนในการสกัดเป็นหญ้าหวานไซรป์และผลิตภัณฑ์อื่นๆ สำหรับผสมในอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อให้ความหวานทดแทนน้ำตาลและใช้ปรุงรสอาหารบางชนิด

เอกสารอ้างอิง

- พิสมัย กุลกาญจนาธร. 2555. หวาน-ธรรมชาติ-
เพื่อสุขภาพ. แหล่งข้อมูล (เอกสารสืบค้น
ออนไลน์): <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/107/หวาน-ธรรมชาติ-เพื่อสุขภาพ>
- สายदनีย์ หวังพัฒนพาณิชย์. 2554. หย้าหวาน
Natural Sweetener. R&D Newsletter 18(2):
9-10.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร. 2542.
แบบบันทึกลักษณะพืชภาคสนาม.
- Brandle, J. E. and N. Rosa. 1992. Heritability
for yield, leaf: Stem ratio and stevioside
content estimated from a landrace
cultivar of *Stevia rebaudiana*. Canadian
Journal of Plant Science 72(4): 1263-
1266.
- Codex. 2010. *Procedural Manual*. 19th ed.
Rome: Codex Alimentarius, Food and
Agriculture Organisation of the United
Nations (FAO).
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA
isolation procedure for small quantities
of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull.
19: 11-15.