

## บทที่ 3

### การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารระเหยและข้อมูลพันธุกรรมของกระเทียม

ก่อนที่จะกล่าวถึงการวัดกลิ่นของกระเทียมด้วยจมูกอิเล็กทรอนิกส์นั้น ในบทนี้จะกล่าวถึงการตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเทียมตัวอย่างเพื่อยืนยันความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระเทียมด้วยการสร้างไฟโลจีเนติกส์และทดสอบสมมติฐานว่ากระเทียมต่างพันธุ์กันจะมีองค์ประกอบทางเคมีหรือกลิ่นที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองหาองค์ประกอบทางเคมีในสารระเหยของกระเทียมพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยการวิเคราะห์ GC-MS ตามลำดับ

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างกระเทียม

ในขั้นการทดลองได้นำตัวอย่างกระเทียมในประเทศไทยจาก 3 แหล่ง ได้แก่ อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ, อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์ และ อ.บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน ซึ่งเป็นแหล่งปลูกกระเทียมที่มีชื่อเสียงดังแสดงตัวอย่างกระเทียมในรูปที่ 3.1 เพื่อความเชื่อมั่นว่าจะได้กระเทียมพันธุ์ที่ปลูกในท้องถิ่นนั้นจริง การจัดหากระเทียมเหล่านี้จะซื้อโดยตรงจากเกษตรกรที่รู้จักในพื้นที่นั้น ๆ มาทำการเก็บข้อมูลด้วยวิธีต่าง ๆ



รูปที่ 3.1 กระเทียมที่นำมาใช้ในการทดลอง

### 3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียม

เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogeny) ระหว่างกระเทียมตัวอย่างที่มาจากแหล่งปลูกต่าง ๆ กัน ดังนั้นตัวอย่างกระเทียมทั้งหมดจึงถูกนำไปหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ณ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ด้วยวิธี AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

วิธี AFLP นี้เป็นการใช้เทคนิค RFLP และ PCR เข้าด้วยกัน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอก่อนและเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นไม่เกิน 20 เบส แล้วจึงเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยไพรเมอร์จะจับเฉพาะเจาะจงกับ adapter นั้นๆ จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้พอลิอะคิลาไมด์เจล และจะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบ

#### 3.2.1 ขั้นตอนการทดลอง

##### 3.2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1. นำกระเทียมบดในโกร่งที่เย็น โดยเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผง
2. นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (CTAB 2%, NaCl 1.4 mM, PVP 2%, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris HCl pH 8.0 100 mM และ 2-mercaptoethanol 2%) ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 15 นาที
3. เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่า แรง ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับโพแทสเซียมไอโอดีอะตอไรด์ เหลือกรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล (chloroform:isoamyl, 24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท pH 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเขย่าเบา ๆ แล้วเติมเอทานอล 95% ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
6. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

### 3.2.1.2 การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี (AFLP)

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อ adapter ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส และ เอนไซม์ *MseI* ที่มีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ (1) ชิ้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (2) ชิ้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* และ (3) ชิ้นที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* จากนั้นนำ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ มาต่อเข้ากับปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อใช้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการนำดีเอ็นเอต้นแบบ 100-150 นาโนกรัม มาตัดส่วนปลายด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* ชนิดละ 5 ยูนิต พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ A 5.0 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ยูนิต 10 mM ATP 1.5 ไมโครลิตร ร่วมกับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ปริมาณ 5 และ 50 พิโคโมลตามลำดับเพื่อเป็นการต่อเชื่อม adapter เข้ากับปลายดีเอ็นเอต้นแบบ ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 30 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionized นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน
2. การทำพีซีอาร์ I หรือ preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ ทำโดยนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้วมาเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำ deionize ใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าที่ปลาย 3' จำนวน 1 เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อ 28 ไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1.0 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2.0 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionize แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ I ดังนี้ 28 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที 1 รอบ : extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที ผลผลิตที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ การเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *EcoRI* และ ปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *MseI* ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคัดเลือกลง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้รับการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนนี้จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ selective amplification ต่อไป
3. การทำพีซีอาร์ II หรือ selective amplification ใช้ดีเอ็นเอจากพีซีอาร์ I ที่เจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำ deionized เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร

1.0 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยากับ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบส คัดเลือกที่ ปลาย 3' จำนวน 3 เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1.0 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2.0 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionize แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรม ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ II ดังนี้ 13 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลง 0.7 องศาเซลเซียสต่อรอบหลังจากเสร็จรอบแรก) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที 25 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (เพิ่มเวลารอบ ละ 1 วินาที)

#### 4. การแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

##### การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

- 1) นำแผ่นกระจกสำหรับเทเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 % ให้สะอาด ทั้ง 2 แผ่น
- 2) เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ เอธานอล 95 % 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก
- 3) กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหุกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย clear view เพื่อป้องกันไม่ให้เจล เกาะติดกับกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที
- 4) นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดกัน โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทำ bind silane และ clear view เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่
- 5) เตรียมโพสิอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยนำ 4.5 % acrylamide gel 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 % 250 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamide) 20 ไมโครลิตร ผสมในขวดสำหรับเทเจลให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- 6) เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วใส่หัวเข่า ด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

##### 3.2.1.3 การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

- 1) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส และเติมบัฟเฟอร์ 1x TBE (100 mM Tris HCl pH 8.0, 10mM

boric acid, 2 mM EDTA) ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

- 2) ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ เปิดกระแสไฟฟ้าทำ pre-run ที่กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ เป็นเวลา 20-30 นาที จนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส
- 3) ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ใส่หัวแบบพินฉลามโดยให้หัวด้านที่เป็นพื้นลงไปสัมผัสกับผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย และใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่ช่องหัวแต่ละช่องออกให้หมด
- 4) หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอจากการทำ PCR II ที่เติม sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 0.01% (w/v) xylene cyanol) 5 ไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมเจล จากนั้นเปิดเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้กำลังไฟคงที่ 60 วัตต์ เป็นเวลา 80 นาที จนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล
- 5) ปิดเครื่อง เทบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน เจลจะติดกับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมสีด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

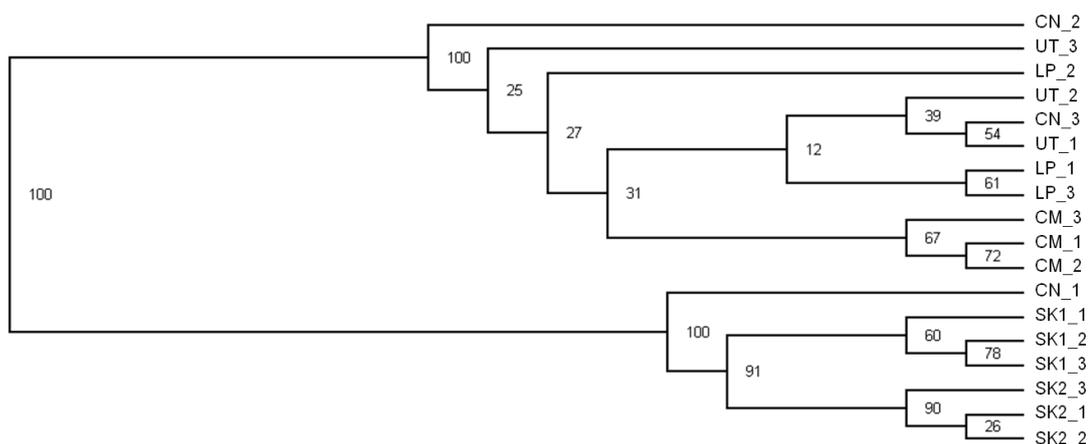
#### 3.2.1.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

- 1) นำกระจกเจลมาเขย่าในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 30 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บนเครื่องเขย่า
- 2) นำแผ่นกระจกเจลย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver strain, 0.56% formaldehyde) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที กรณีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรทซ้ำอาจเพิ่มเวลาได้จนถึง 1 ชั่วโมง เขย่าอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา ภาดที่ใช้ย้อมซิลเวอร์ไม่ควรใช้ติดต่อกับ fixation เพราะอาจมีการปนเปื้อนของกรดอะซิติก ทำให้ย้อมได้ไม่ดี
- 3) นำแผ่นกระจกเจลออกล้างด้วยน้ำ deionized อย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก
- 4) นำแผ่นกระจกเจลใส่ลงในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเขย่าอย่างสม่ำเสมอประมาณ 5-10 นาที จนมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน
- 5) หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลายกรดอะซิติก 10 % เป็นเวลา 3- 5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionized 10 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศ
- 6) นำแผ่นกระจกมาวิเคราะห์ผล

#### 3.2.2 ผลการทดลอง

ตัวอย่างกระเทียมที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ได้แก่ กระเทียมศรีสะเกษ ที่ได้จากแหล่งปลูกที่ 1 (SK1) และ แหล่งปลูกที่ 2 (SK2) กระเทียมเชียงใหม่ (CM), กระเทียมลำพูน (LP) กระเทียมอุตรดิตถ์ (UT) และกระเทียมจีนที่หาซื้อจากท้องตลาด (CN) โดยทำการทดลองซ้ำตัวอย่าง

ละ 3 ครั้ง ซึ่งจะแสดงเลขกำกับลำดับครั้งของแต่ละตัวอย่างกระเทียม ยกตัวอย่างเช่น SK1\_2 หมายถึง ตัวอย่างกระเทียมศรีสะเกษจากแหล่งปลูกที่ 1 ลำดับที่ 2 ผลการทดลองที่ได้สามารถนำมาสร้างไฟโลจีเนติกทรีแบบมีรากโดยวิธี UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean) ได้ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ไฟโลจีเนติกทรีแบบมีรากโดยวิธี UPGMA

### 3.2.3 วิเคราะห์ผลการทดลอง

แม้ว่ากระเทียมตัวอย่างจะมีทั้งหมดในการทดลองนี้จะมี 6 ตัวอย่างด้วยกัน แต่ในที่นี้จะขอพิจารณาผลการทดลองเฉพาะของกระเทียมศรีสะเกษ ลำพูน และอุตรดิตถ์เท่านั้น เมื่อพิจารณาไฟโลจีเนติกทรีแบบมีรากในรูปที่ 3.2 จะเห็นว่ากิ่งก้านส่วนล่างนั้นมีแทกซอน (taxon) เป็นกระเทียมศรีสะเกษทั้งหมด โดยตัวอย่างกระเทียมศรีสะเกษจากแต่ละแหล่งปลูกมีความใกล้ชิดกัน และจากไฟโลจีเนติกสามารถกล่าวได้ว่ากระเทียมพันธุ์ศรีสะเกษมีความใกล้ชิดกับกระเทียมพันธุ์อื่น ๆ ในระดับต่ำหรือกล่าวได้ว่ากระเทียมศรีสะเกษมีพันธุกรรมต่างจากกระเทียมจากพื้นที่ภาคเหนือ เมื่อพิจารณากระเทียมในกลุ่มภาคเหนือ จะพบว่าสามารถแยกกระเทียมจากเชียงใหม่ออกจากกระเทียมจากลำพูนและอุตรดิตถ์ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่กระเทียมลำพูนและอุตรดิตถ์มีความใกล้ชิดกันในระดับที่สูงที่สุดได้ แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นพันธุ์เดียวกัน

### 3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบในสารระเหย

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานที่ว่ากระเทียมแต่ละพันธุ์จะมีองค์ประกอบในสารระเหยแตกต่างกันจึงทำการตรวจสอบองค์ประกอบในสารระเหยของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง GC-MS ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิศวกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดด้วยเครื่อง GC-MS นั้นจะทำการสกัดเย็นโดยใช้ไนโตรเจนเหลว โดยในเบื้องต้นจะเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างของปริมาณขององค์ประกอบในกลิ่นของกระเทียมแบบสัมพัทธ์จากการวัดด้วย GC-MS จากนั้นการทดสอบซ้ำเพื่อหาวิเคราะห์เชิงปริมาณจะทำเพิ่มเติมต่อไป

### 3.3.1 ขั้นตอนการทดลอง

การเตรียมตัวอย่าง

นำกระเทียมสดที่ลอกเปลือกออกและบดด้วยช้อนจนละเอียดปริมาณ 1 g บรรจุลงในขวด จากนั้นเติม Dichloromethane 5.0 mL เพื่อสกัดองค์ประกอบทางเคมีของกระเทียม และทำการกรองด้วยไนลอนฟิลเตอร์ขนาด 0.2  $\mu\text{m}$  นำสารละลายที่กรองแล้วประมาณ 2  $\mu\text{L}$  ฉีดเข้าสู่เครื่อง GC – MS โดยเตรียมตัวอย่างสารละลายของกระเทียมแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 3 ตัวอย่าง

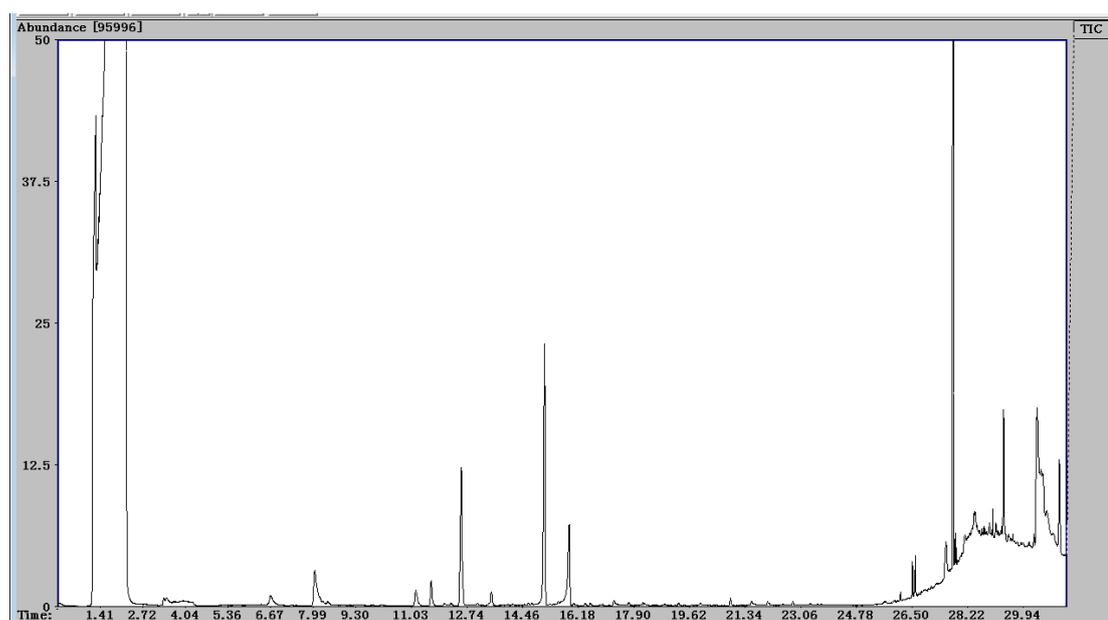
GC – MS

เครื่อง GC – MS ที่ใช้ผลิตโดยบริษัท Agilent ซึ่งประกอบด้วย Network GC system รุ่น 6890N และ Mass selective detector รุ่น 5973 โดยใช้คอลัมน์ DB-5 และใช้ He เป็นก๊าซพาด้วย อัตราการไหล 51 cm/sec และอุณหภูมิของเตาอบจะเพิ่มจาก 50  $^{\circ}\text{C}$  จนถึง 150  $^{\circ}\text{C}$  ด้วยอัตรา 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  และคงค่าไว้ที่ 150  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มไปเป็น 250  $^{\circ}\text{C}$  ด้วยอัตรา 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  และคงค่าไว้ที่ 250  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที โหมด electron ionization (EI) ตั้งค่าไว้ที่ 70 eV

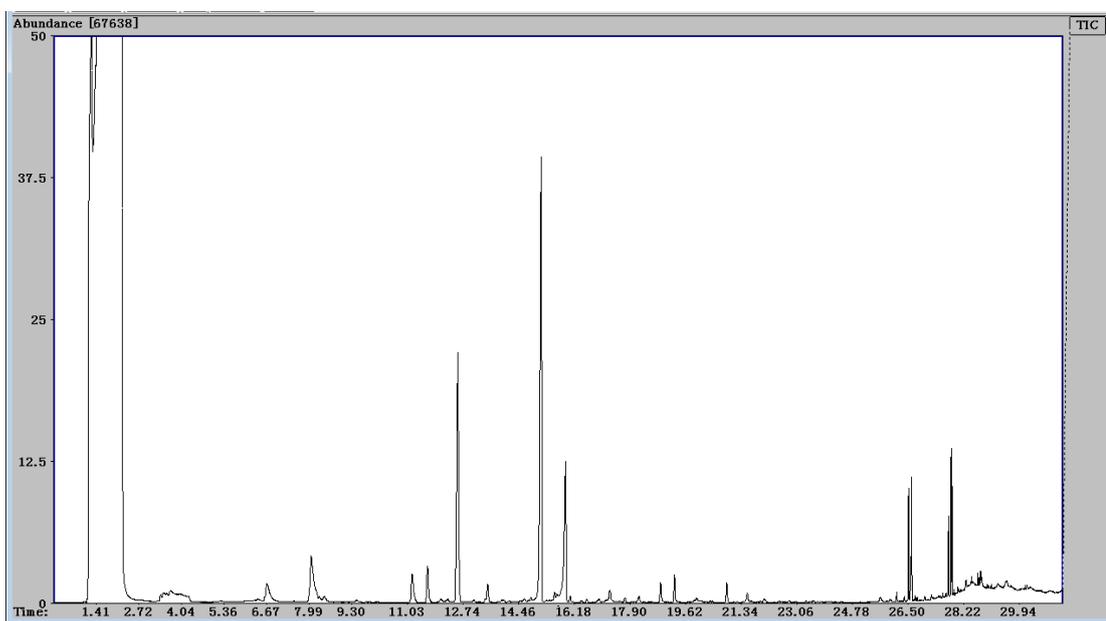
### 3.3.2 ผลการทดลอง

จากการทดลองฉีดสารละลายที่สกัดจากกระเทียมเข้าเครื่อง GC-MS ตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะแสดงด้วยไอออนโครมาโตแกรม (Ion chromatogram) โดยแกนนอนแสดงลำดับเวลาและแกนตั้งแสดงเปอร์เซ็นต์ Abundance ขององค์ประกอบในสารละลาย โดยแต่ละองค์ประกอบในสารละลายจะมีตำแหน่งพีก (Peak) ที่แตกต่างกัน และพื้นที่ใต้กราฟของพีกจะแสดงถึงปริมาณขององค์ประกอบนั้น

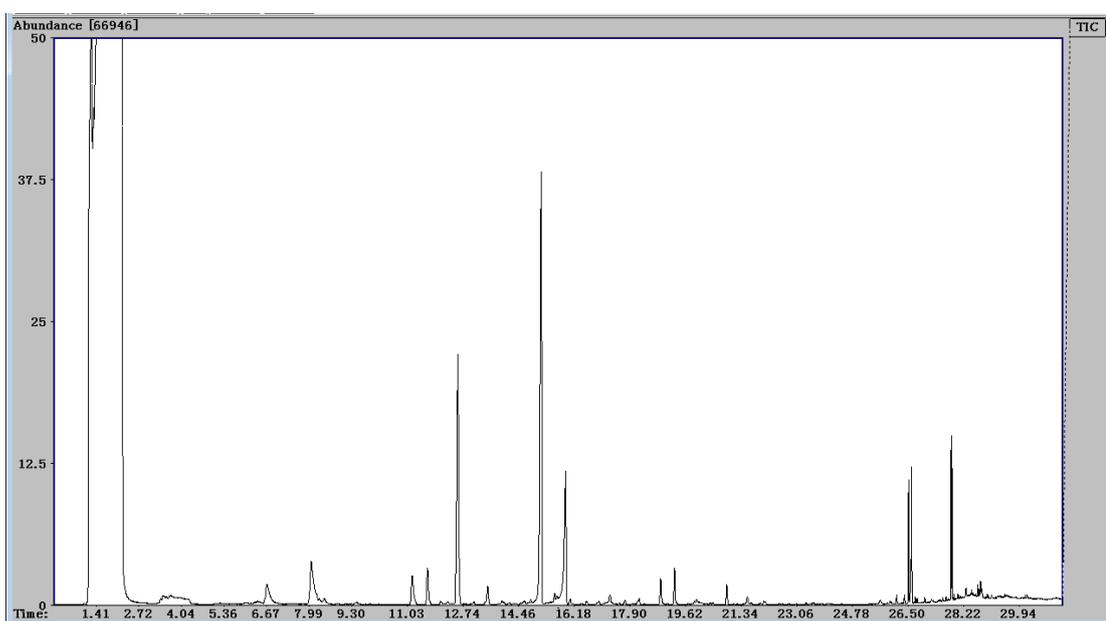
รูปที่ 3.3 – 3.5 แสดงไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากศรีสะเกษ ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.3 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากศรีสะเกษครั้งที่ 1

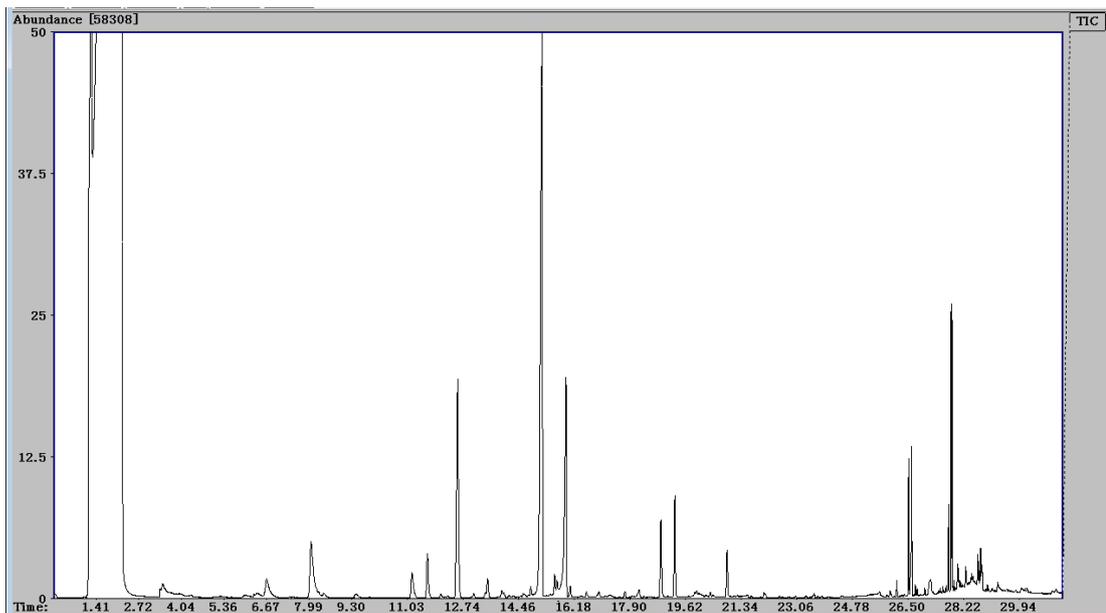


รูปที่ 3.4 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากศรีสะเกษครั้งที่ 2

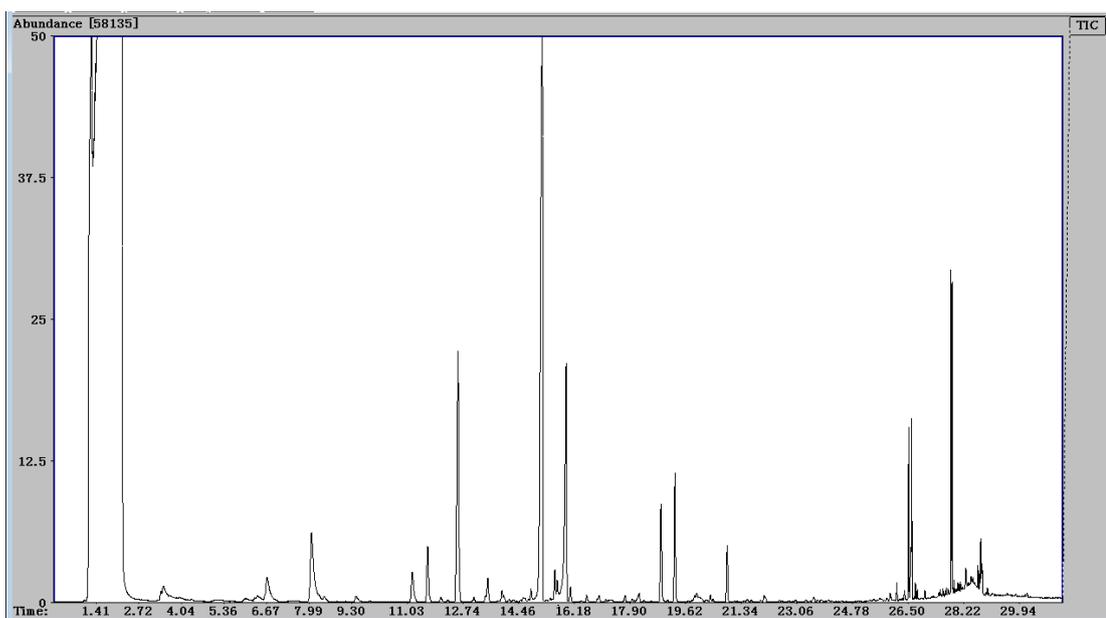


รูปที่ 3.5 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากศรีสะเกษครั้งที่ 3

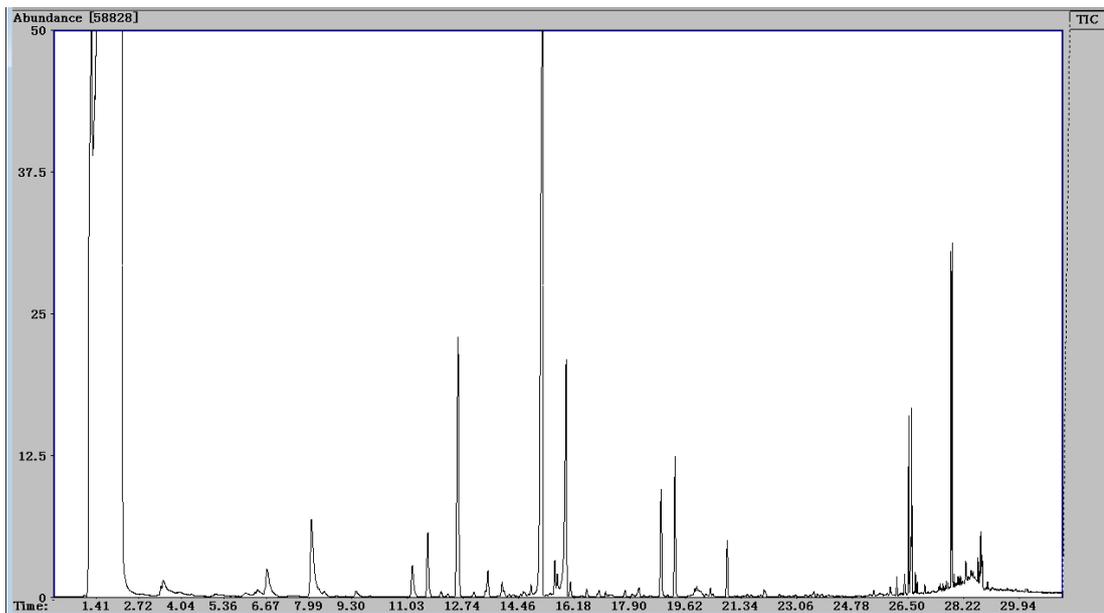
รูปที่ 3.6 – 3.8 แสดงไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากอุดรดิตถ์ ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.6 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากอูตรดิตถ์ครั้งที่ 1

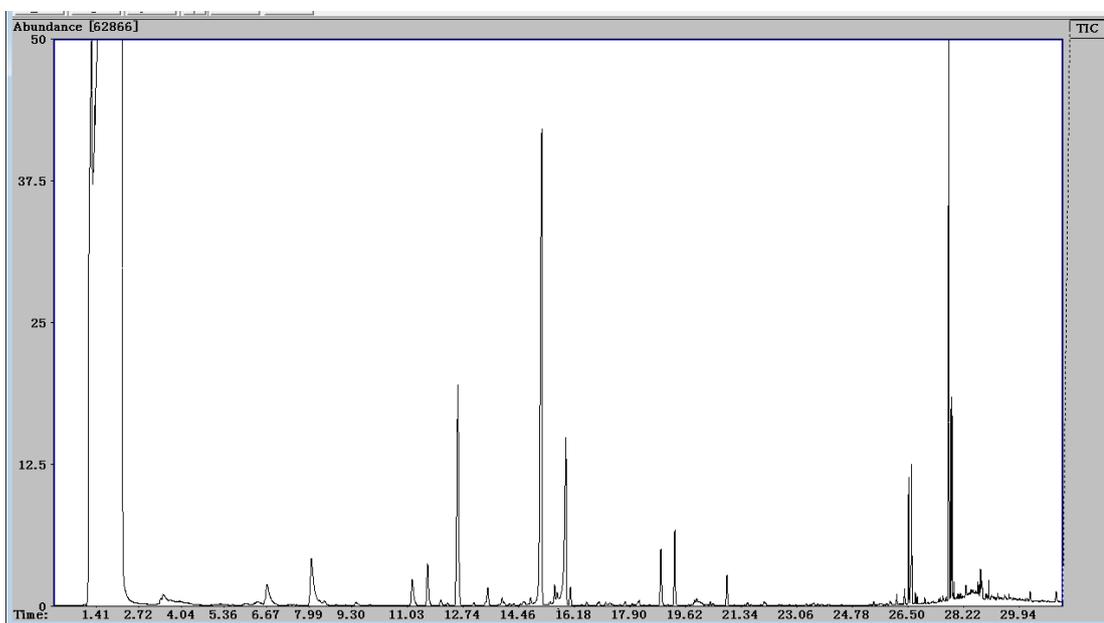


รูปที่ 3.7 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากอูตรดิตถ์ครั้งที่ 2

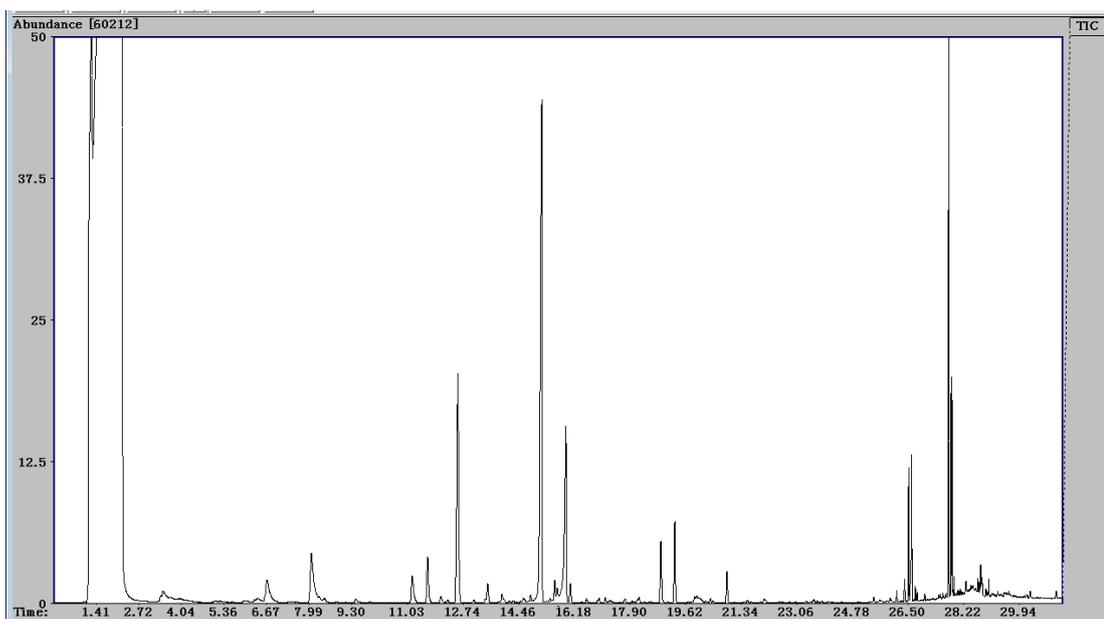


รูปที่ 3.8 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากอูตรดิตถ์ครั้งที่ 3

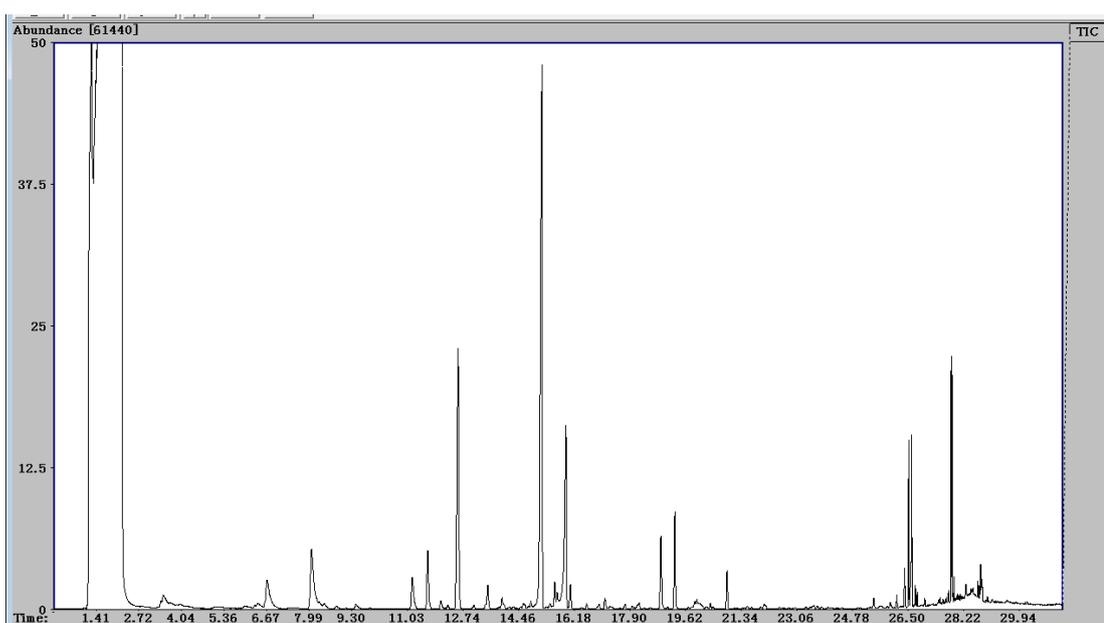
รูปที่ 3.9 – 3.11 แสดงไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากลำพูน ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากลำพูนครั้งที่ 1



รูปที่ 3.10 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากลำพูนครั้งที่ 2



รูปที่ 3.11 ไอออนโครมาโตแกรมของตัวอย่างกระเทียมจากลำพูนครั้งที่ 3

### 3.2.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

โดยทั่วไปแล้วการวิเคราะห์จะเปรียบเทียบผลจากไอออนโครมาโตแกรมที่ได้กับฐานข้อมูลทางเคมี (Library) แต่เนื่องจากโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นขาดไลบรารีขององค์ประกอบทางเคมีหลักในสารระเหยกระเทียม เช่น 3-Viny-1,2-dithiocyclohex-5-ene, Allyl sulfide, 1,3-Benzenedithiol, 2-Vinyl-1,3-dithiane, 2-Vinyl-4H-1,3-dithiin, 3,4-Dihydro-3-vinyl-1,2-

dithiin, 3-vinyl-[4H]-1,2-dithiin, Diallyl disulphide, Methyl allyl disulfide และ Methyl allyl trisulfide เป็นต้น จึงต้องใช้เวลาในการจัดหาแหล่งฐานข้อมูลหรือนำข้อมูลไปวิเคราะห์

อย่างไรก็ตาม จากไอออนโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลองซ้ำสามครั้งของกระเทียมแต่ละพันธุ์จะเห็นได้ว่าไอออนโครมาโตแกรมของกระเทียมแต่ละพันธุ์จะมีรูปแบบที่เหมือนกันทั้งตำแหน่งของพีคและสัดส่วนระหว่างความสูงของพีคที่ตำแหน่งต่าง ๆ และมีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์กระเทียม ยกตัวอย่างเช่น เมื่อหาสัดส่วนระหว่างยอดคลื่นของพีคเวลา 12.74 นาที และที่เวลาประมาณ 14.46 นาที ของกระเทียมศรีสะเกษในรูปที่ 3.3 เปรียบเทียบกับค่าสัดส่วนเดียวกันนี้ที่ได้จากกระเทียมอุดรดิตถ์ในรูปที่ 3.6 จะพบว่า ค่าสัดส่วนที่ได้จากกระเทียมศรีสะเกษจะมีค่ามากกว่าที่ได้จากกระเทียมอุดรดิตถ์ ในขณะที่ค่าสัดส่วนนี้ของกระเทียมศรีสะเกษและกระเทียมลำพูนจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาที่เวลา 19.62 นาที จะพบว่าค่าพีคขององค์ประกอบที่เวลานี้ของกระเทียมลำพูนจะมีค่าสูงกว่าของกระเทียมศรีสะเกษ

นอกจากนี้แล้วผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในรูปที่ 3.3 โดยจะเห็นว่ารูปแบบของไอออนโครมาโตแกรมของกระเทียมอุดรดิตถ์จะมีความคล้ายคลึงกับของกระเทียมลำพูนมากกว่าของกระเทียมศรีสะเกษ

กล่าวโดยสรุปได้ว่า แม้จะยังไม่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอนได้ แต่จากรูปแบบของไอออนโครมาโตแกรมที่ได้จากผลการทดลองนี้ก็สามารถยืนยันได้ว่าแม้กระเทียมแต่ละสายพันธุ์จะมีองค์ประกอบหลักในสารระเหยเหมือนกันแต่ก็มีในปริมาณที่แตกต่างกัน หรืออาจกล่าวได้ว่าความแตกต่างของสัดส่วนขององค์ประกอบเคมีในกระเทียมแต่ละพันธุ์นั้นเป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์นั้น ๆ