

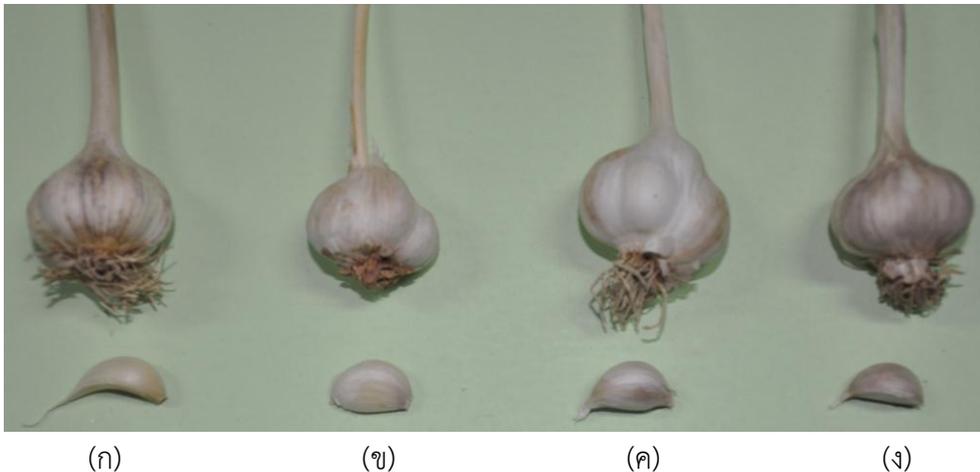
## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

ในบทนี้จะกล่าวถึงวิธีการทดลองซึ่งเริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่างกระเทียม วิธีการตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเทียม วิธีการทดลองหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสารระเหยของกระเทียมพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยการวิเคราะห์ GC-MS และวิธีการตรวจวัดกลิ่นกระเทียมด้วยจมูกอิเล็กทรอนิกส์ โดยผลการทดลองของแต่ละวิธีนั้นจะกล่าวถึงในบทต่อไป

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างกระเทียม

ตัวอย่างกระเทียมสดนำมาจาก 4 แหล่งปลูก ได้แก่ อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ, อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์, อ.บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน และ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกกระเทียมที่มีชื่อเสียงในประเทศไทย ดังแสดงตัวอย่างกระเทียมในรูปที่ 3.1 เพื่อความเชื่อมั่นว่าจะได้กระเทียมพันธุ์ที่ปลูกในท้องถิ่นนั้นจริง การจัดหากระเทียมเหล่านี้จะซื้อโดยตรงจากเกษตรกรที่รู้จักในพื้นที่นั้น ๆ มาทำการเก็บข้อมูลด้วยวิธีต่าง ๆ จากรูป 3.1 จะสังเกตเห็นว่ากลีบกระเทียมศรีสะเกษนั้นมีลักษณะเรียวยาวและผิวมันกว่ากระเทียมจากแหล่งปลูกอื่น แต่อย่างไรก็ตามโดยรวมแล้วกระเทียมจากทั้ง 4 แหล่งปลูกมีรูปร่างลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันซึ่งยากแก่การจำแนกด้วยสายตา



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างกระเทียมที่นำมาใช้ในการทดลอง (ก) อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ, (ข) อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์, (ค) บ้านโฮ้ง จ.ลำพูน และ (ง) อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

#### 3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเทียม

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogeny) ระหว่างกระเทียมตัวอย่างที่มาจากแหล่งปลูกต่าง ๆ กันถูกตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างกระเทียมทั้งหมดไปหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 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 จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้ฟอลิอะคิลาไมด์เจล และจะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบ

### 3.2.1 ขั้นตอนการทดลอง

#### 3.2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Doyle, 1990)

1. นำกระเทียมบดในโกร่งที่เย็น โดยเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผง
2. นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำเฟอรัปริมาตร 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. เติมน้ำละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับโพแทสเซียมดีเตทซิลลเฟต เหลือกรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
4. ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมน้ำคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล (chloroform:isoamyl, 24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมน้ำละลายโซเดียมอะซิเตท 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 จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 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 การวิเคราะห์ AFLP (Vos et al., 1995)

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) ชั้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (2) ชั้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* และ (3) ชั้นที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* จากนั้นนำ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ซึ่งเป็นชั้นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ มาต่อเข้ากับปลายทั้ง 2 ด้านของชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 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 เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชั้นดีเอ็นเอ 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 การเพิ่มจำนวนของชั้นดีเอ็นเอเฉพาะที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *EcoRI* และ ปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *MseI* ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการคัดเลือกลง ชั้นดีเอ็นเอที่ได้รับการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนนี้จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ 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* ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าที่ปลาย 3' จำนวน 3 เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชั้นดีเอ็นเอ 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 แล้วจึงนำไปทำ

ปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 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 (เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที)

#### 4. การแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

##### การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

- 1) นำแผ่นกระจกสำหรับเทเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 % ให้สะอาด ทั้ง 2 แผ่น
- 2) เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ เอทานอล 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) เตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 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 แล้วใส่หัวเข้านับบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

##### 3.2.1.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 1) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส และเติมบัฟเฟอร์ 1x TBE (100 mM Tris HCl pH 8.0, 10mM boric acid, 2 mM EDTA) ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ที่กระจก
- 2) ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เปิดกระแสไฟฟ้าทำ pre-run ที่กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ เป็นเวลา 20-30 นาที จนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส
- 3) ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ใส่หัวแบบพันฉลามโดยให้หัวด้านที่เป็นพื้นลงไปสัมผัสกับผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย 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 จากนั้นเปิดเครื่องอิลคโตรโฟรีซิส 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) นำกระจกเจลมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 30 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บนเครื่องแช่
- 2) นำแผ่นกระจกเจลย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver stain, 0.56% formaldehyde) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที กรณีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรทซ้ำอาจเพิ่มเวลาได้จนถึง 1 ชั่วโมง แช่อย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา ภาตที่ใช้ย้อมซิลเวอร์ไม่ควรใช้ภาตเดียวกับ fixation เพราะอาจมีการปนเปื้อนของกรดอะซิติก ทำให้ย้อมได้ไม่ดี
- 3) นำแผ่นกระจกเจลออกล้างด้วยน้ำ deionized อย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก
- 4) นำแผ่นกระจกเจลใส่ลงในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสแช่อย่างสม่ำเสมอประมาณ 5-10 นาที จนมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน
- 5) หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลายกรดอะซิติก 10 % เป็นเวลา 3- 5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionized 10 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศ
- 6) นำแผ่นกระจกมาวิเคราะห์ผล

### 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

### 3.4 ระบบจุ่มกิโลเล็กทรอนิกส์

จากโครงการวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าจุ่มกิโลเล็กทรอนิกส์แต่ละตัวมีความไวในการตอบสนองต่อกลิ่นของกระเทียมแตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้จุ่มกิโลเล็กทรอนิกส์ที่มีความไวในการตอบสนองต่อกลิ่นของกระเทียมสูงและเพิ่มเติมจุ่มกิโลเล็กทรอนิกส์ชนิดสารกึ่งตัวนำตัวอื่น ๆ อีก รวมทั้งหมด 8 ตัว ได้แก่ MQ-2, MQ135 (Hanwei Inc., China), TGS822, TGS826, TGS2600, TGS2602, TGS2611 และ TGS2620 (Figaro Inc., Japan) ซึ่งค่าความต้านทานของเซนเซอร์เหล่านี้ จะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของก๊าซตัวอย่างที่ทำการวัดดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดของเซนเซอร์

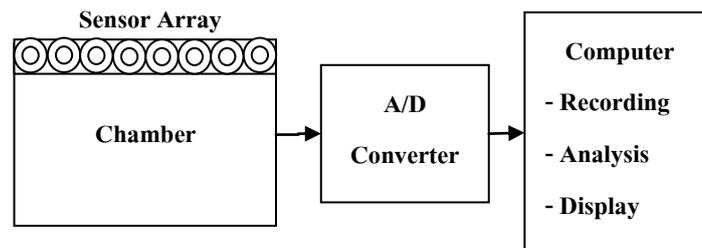
Sensor	Code	Material	Selectivity
S1	MQ-2	SnO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> , LPG, Methane, CO, Alcohol, Propane
S2	MQ-135	SnO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , NO <sub>x</sub> , Alcohol, Benzene
S3	TGS822	SnO <sub>2</sub>	Acetone, Ethanol, Benzene, Carbon monoxide
S4	TGS826	Metal oxide	Ammonia
S5	TGS2600	Metal oxide	Hydrogen, Carbon monoxide
S6	TGS2602	Metal oxide	Hydrogen sulphide, Ammonia
S7	TGS2611	Metal oxide	Methane, Iso-butane, Hydrogen, Ethanol
S8	TGS2620	Metal oxide	Ethanol, Hydrogen, Iso-butane, CO, Methane

ระบบที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกออกแบบขึ้นใหม่ประกอบไปด้วยส่วนวงจรวัดและส่วนวิเคราะห์ผลดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยในส่วนของระบบวัดนี้จะวัดสัญญาณตอบสนองของเซนเซอร์เป็นค่าแรงดันจากวงจรแบ่งแรงดัน ซึ่งดังรูปที่ 3.3

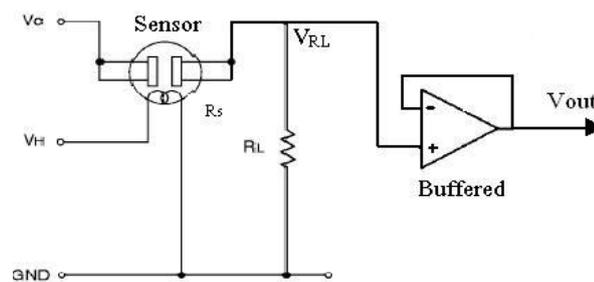
จากรูปที่ 3.3 สัญญาณที่วัดได้คือแรงดันไฟฟ้าที่ตกคร่อมความต้านทานโหลด  $R_L$  ( $V_{RL}$ ) ซึ่งความสัมพันธ์ของ  $V_{RL}$  กับแรงดันขาเข้า ( $V_C$ ) จะเป็นไปตามสมการ (3.1)

$$V_{RL} = R_L V_C / (R_L + R_S) \quad (3.1)$$

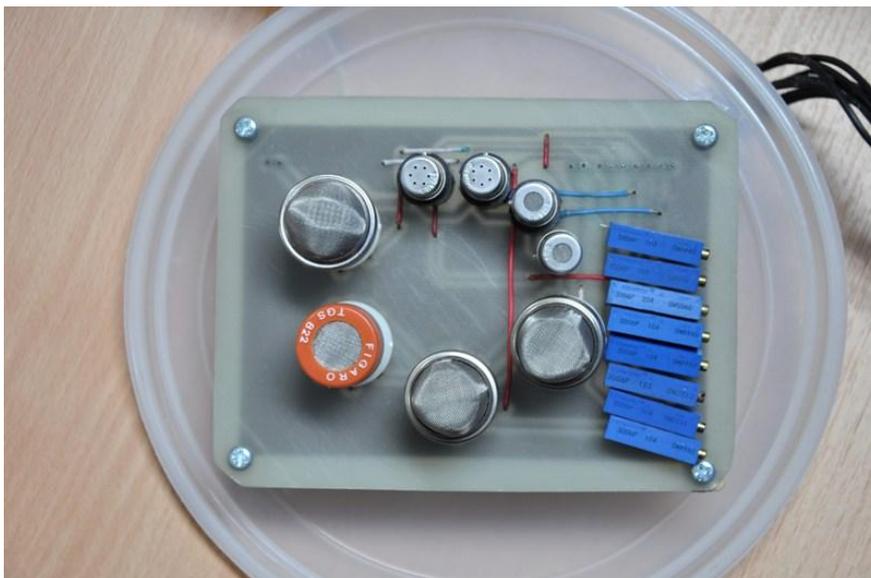
โดยที่  $R_S$  คือความต้านทานภายในของเซนเซอร์ และ  $R_L$  คือความต้านทานโหลดที่ต่อในวงจร ในระบบวัดนี้จะวัดสัญญาณตอบสนองของเซนเซอร์เป็นค่าแรงดันจากวงจรแบ่งแรงดัน รูปที่ 3.4 แสดงวงจรวัดที่ประกอบไปด้วยเซนเซอร์ทั้ง 8 ตัวบนแผ่น PCB



รูปที่ 3.2 ระบบวัดด้วยจุ่มกือเล็กทรอนิกส์



รูปที่ 3.3 วงจรแบ่งแรงดัน

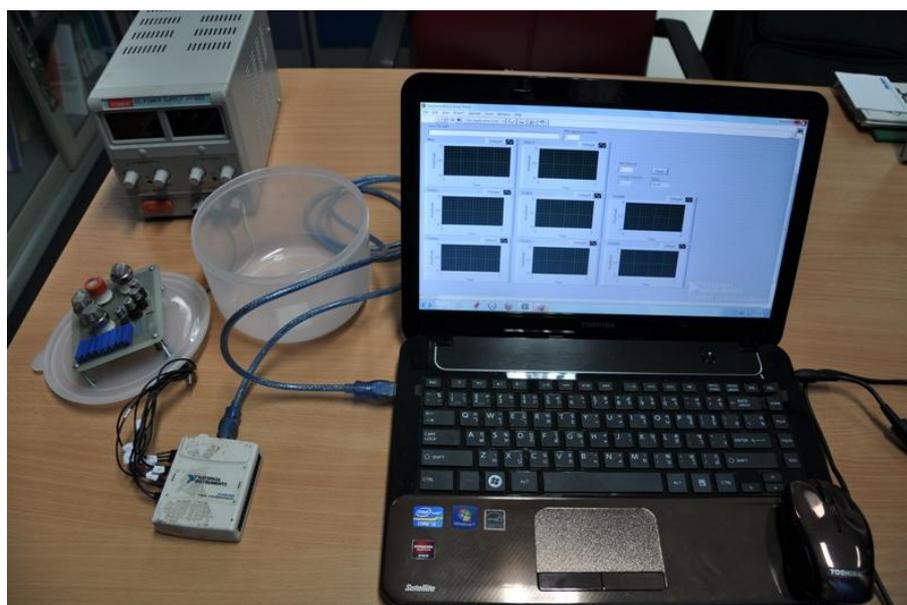


รูปที่ 3.4 วงจรวัดที่ออกแบบ

ในการทดลองจะทำให้ระบบปิดโดยมีแชมเบอร์ (Chamber) สำหรับบรรจุกระเทียมซึ่งทำจากกล่องพลาสติกสำหรับบรรจุอาหาร โดยมีเซนเซอร์ติดอยู่ที่ฝาด้านบน รูปที่ 3.5 แสดงตัวอย่างแชมเบอร์สำหรับการวัดคลื่นกระเทียม สัญญาณที่ได้จากวงจรวัดจะถูกแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัลโดย A/D card (USB6009, National Instrument Inc.) ซึ่งมีความละเอียด 14 บิต ข้อมูลจะถูกเก็บและแสดงผลบนคอมพิวเตอร์ทุกวินาทีตลอดช่วงเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นเวลานานเพียงพอที่จะสามารถสังเกตเห็นความแยกตัวของผลตอบสนองของเซนเซอร์แต่ละตัวได้ โดยการทำงานของระบบถูกควบคุมด้วยโปรแกรมที่พัฒนาบน LabView ดังในรูปที่ 3.6 ซึ่งแสดงส่วนประกอบของระบบวัดทั้งหมด



รูปที่ 3.5 แชมเบอร์บรรจุกระเทียม



รูปที่ 3.6 ระบบวัดคลื่นกระเทียมด้วยจูนิกอิเล็กทรอนิกส์

### 3.4.1 ขั้นตอนการทดลอง

1. ลอกเปลือกด้วยความระมัดระวังและบดกระเทียมด้วยช้อน
2. ชั่งกระเทียมที่บดแล้วน้ำหนัก 1.5 กรัม
3. นำกระเทียมที่บดแล้วใส่เข้าไปในกล่องพลาสติกแล้วปิดฝาให้สนิท
4. ตั้งค่าในโปรแกรม LabView กำหนดเวลาในการวัด 15 นาที และอัตราสุ่มข้อมูล 1 ครั้งต่อวินาที
5. บันทึกและแสดงค่าแรงดันจากเซนเซอร์บนโปรแกรม LabView

จะเห็นว่าขั้นตอนการวัดของระบบจุ่มกือเล็กทรอนิกส์นั้นไม่ยุ่งยากซับซ้อนเมื่อเทียบกับวิธีการทดลองทั้งสองวิธีที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ จากนั้นเทคนิคการประมวลผลสัญญาณและการวิเคราะห์ทางสถิติ (MATLAB) จะถูกนำมาใช้ในการหาคุณลักษณะเฉพาะของผลตอบสนองทางไฟฟ้าที่ได้จากจุ่มกือเล็กทรอนิกส์ของกระเทียมแต่ละชนิด ค่าคุณลักษณะที่ได้นั้นจะนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กระเทียมด้วยเทคนิคการจัดกลุ่มโดยวิธี Principal component analysis (PCA) การทำงานของระบบวัด การจัดเก็บข้อมูล และระบบประมวลผลทั้งหมดจะทำการเชื่อมต่อและควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้นเองบนโปรแกรม LabVIEW