รายงานฉบับสมบูรณ์
ปีที่ 2 งบประมาณ พ.ศ. 2555

แผนงานวิจัย

การผสมผสานเทคนิคการวิเคราะห์ด้านโอมิกส์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนวัตถุต้องห้ามในผลิตภัณฑ์ฮาลาลที่เป็นอาหารและมิใช่อาหารเพื่อการส่งออก
Combination of Omics Analytical Techniques for Adulteration Inspection of Unpermitted Substances in Halal Food and Non-Food Products for Export
(โครงการต่อเนื่อง 3 ปี 2554-2556)

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน ผศ.ดร.วนิดา นพพรพันธุ์
น.ส.นัจวา สันติวรกุล นายภาณุมาศ ซันอาลี
อ.ดร.สุกฤต ศิริขวัญพงศ์ อ.ดร.สถาพร งามอุโฆษ

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเสนอต่อ
คณะสหเวชศาสตร์ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์
ปีที่ 2 งบประมาณ พ.ศ. 2555

แผนงานวิจัย

การผสมผสานเทคนิคการวิเคราะห์ด้านโอมิกส์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนวัตถุต้องห้ามในผลิตภัณฑ์ฮาลาลที่เป็นอาหารและมิใช่อาหารเพื่อการส่งออก

Combination of Omics Analytical Techniques for Adulteration Inspection of Unpermitted Substances in Halal Food and Non-Food Products for Export

(โครงการต่อเนื่อง 3 ปี 2554-2556)

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.วินัย ดะห์ลัน ผศ.ดร.วนิดา นพพรพันธุ์
น.ส.นัจวา สันติวรกุล นายภาณุมาศ ซันอาลี
อ.ดร.สุกฤต ศิริขวัญพงศ์ อ.ดร.สถาพร งามอุโฆษ

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเสนอต่อ
คณะสหเวชศาสตร์ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย "การผสมผสานเทคนิคการวิเคราะห์ด้านโอมิกส์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนวัตถุต้องห้ามในผลิตภัณฑ์ฮาลาลที่เป็นอาหารและมิใช่อาหารเพื่อการส่งออก" ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555 ผลผลิตเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี (โครงการวัยประยุกต์) ผ่านคณะสหเวชศาสตร์ นอกจากนี้ยังใช้งบประมาณบางส่วนจาก สำนักงบประมาณ และกระทรวงศึกษาธิการ ผ่านแผนงานวิจัย "การพัฒนาระบบบูรณาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีฮาลาลเชิงองค์รวมเพื่อยกระดับคุณภาพและเสริมภาพลักษณ์ผลิตภัณฑ์และบริการฮาลาลของประเทศไทยในตลาดฮาลาลโลกเพื่อขยายโอกาสการส่งออก" ของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2554-2555

งานทั้งหมดดำเนินการร่วมกันระหว่างทีมงานวิจัยและบุคลากรสนับสนุน โดยบุคลากรกลุ่มหลัง ได้แก่ นิสิตหลักสูตรโภชนาการและการกำหนดอาหาร คณะสหเวชศาสตร์ และนักวิทยาศาสตร์ของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล ในขณะที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้การเอื้อเฟื้อเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สถานที่ ตลอดจนเงินทุนบางส่วน

แนวคิดในการพัฒนางานดังกล่าวเกิดจากความร่วมมืออย่างใกล้ชิดระหว่างศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กับสำนักงานคณะกรรมการอิสลามประจำกรุงเทพมหานครและสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทยที่มีมาอย่างยาวนาน ในกิจกรรมการรับรองฮาลาลตามแนวทาง "ศาสนารับรอง วิทยาศาสตร์รองรับ" การสนับสนุนในกิจกรรมดังกล่าวอย่างต่อเนื่องได้รับจากสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ศูนย์อำนวยการบริหารจังหวัดชายแดนภาคใต้ กรมเศรษฐกิจระหว่างประเทศ กระทรวงการต่างประเทศ สำนักงบประมาณ ตลอดจนสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลและหน่วยงานที่ร่วมสนับสนุนทั้งทางตรงและทางอ้อมจนกระทั่งโครงการเกิดความสำเร็จ

บทคัดย่อ

สภาพฮาลาลของเนื้อสัตว์ตามหลักศาสนบัญญัติอิสลามมิได้พิจารณาเฉพาะการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งหะรอมเท่านั้น แต่รวมถึงศีลธรรมการได้มาของเนื้อสัตว์นั้นqด้วย ในที่นี้คือการสร้างความเครียดแก่สัตว์ก่อนการเชือด ตัวอย่างเช่น การทรมานสัตว์และการทำร้ายสัตว์ย่อมจัดว่าหะรอมเช่นเดียวกัน ดัชนีบ่งชี้ความเครียดของสัตว์ที่นิยมตรวจสอบในเลือดและเนื้อเยื่อของสัตว์ ได้แก่ ฮอร์โมนเครียดบางชนิด เป็นต้นว่า "คอร์ติซอล" การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จากการทดลองใช้เทคนิค HPLC ตรวจสอบปริมาณคอร์ติซอลในเลือดวัวที่เชือดจากโรงเชือดสองแห่งๆละ 10 ตัว พบว่าคอร์ติซอลในเลือดอยู่ในปริมาณที่ตรวจพบได้แต่มีความเข้มข้นน้อยมาก การตรวจฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิค HPLC จึงมีความไวไม่เพียงพอ การศึกษาขั้นตอนต่อไปอาจนำเทคนิคทาง LC-MS-MS ที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่ามาประยุกต์ใช้ อีกหนทางหนึ่งคือการตรวจสอบทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนความเครียดในที่นี้คือจีน 11-Beta Hydroxylase จากฐานข้อมูล NCBI สามารถออกแบบ Forward primer คือ 5'TGAAGGCGAGGGTGCTG 3' และ Reverse primer คือ 5' ACTTCAACATGGCCTCCAG 3' ซึ่งมีความจำเพาะต่อจีนดังกล่าว การสกัด RNA หยาบ จากตัวอย่างเลือดวัวด้วยเทคนิค **Gel Electrophoresis** พบว่าสามารถสกัด RNA ในปริมาณมากพอต่อการสังเคราะห์ cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณและศึกษาความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อไปได้ เทคนิคชีวโมเลกุลด้วยการศึกษาจีน 11-Beta Hydroxylase จึงเป็นทางเลือกแทนการตรวจคอร์ติซอลในเลือดหรือเนื้อเยื่อซึ่งยุ่งยากกว่าโดยจะดำเนินการในปีต่อไป อีกเทคนิคหนึ่งซึ่งใช้เป็นทางเลือกกรณีศึกษาสภาพความเครียดในเนื้อเยื่อสัตว์คือการตรวจด้วยเทคนิคทาง FTIR spectrophotometer การศึกษาครั้งนี้พบว่าความแตกต่างของ C-H stretching ที่เกิดขึ้นบนโมเลกุลของเม็ดเลือดแดงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ได้ โดยพบว่า Olefinic v= (CH), v_{as} (CH_3), v_{as} (CH_2) และ v_s (CH_3) จากเม็ดเลือดแดงแยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method มีแนวโน้มต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของหมู่ฟังก์ชั่นจากเม็ดเลือดแดงแยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Non-Islamic method อย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* < 0.05) อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังไม่สามารถใช้ระบุว่าสัตว์ตัวใดมีความเครียดมากกว่า

เฉพาะ
เลขทะเบียน 017868
วัน, เดือน, ปี 31 ส.ค. 61

Abstract

Halalness of meat according to Islamic Law is not considered only by the existence of unlawful or haram ingredients adulteration. The moral of the acquisition of the meat itself is also employed as approval index. In this case, the stress of the animal prior to be slaughtered can be used for indicating sign of animal torture or animal abuse. Indicators of animal stress at check in blood and tissues of animals, including the stress hormone of "cortisol". This study utilized HPLC technique for assaying cortisol in the blood of slaughtered cattle obtained from 2 abattoirs: 10 by Islamic method from Nonthaburi and other 10 by non Islamic method from Prathumthani. Cortisol in blood was traced but in very low concentrations indicating that HPLC was not sensitive tool for such assay. LC-MS-MS with much higher sensitivity and specificity is possibly a way of choice. Another mean is to examine by molecular biology technique utilizing gene involving in stress hormone such as 11-Beta Hydroxylase. In order to design specific primers for such gene, NCBI database searching was used and found 5' TGAAGGCGAGGGTGCTG 3' for forward primer and 5' ACTTCAACATGGCCTCCAG 3' for reverse one. RNA extracted from blood samples of cattle by rough technique with Gel Electrophoresis verification was achieved in ample amount for further cDNA synthesis in order to increase the quantity and specificity of primer in the next process. Molecular biology technique for studying 11-Beta Hydroxylase gene was thus selected as an alternative to cortisol in the blood or tissues for the following year trial. Another technique employed for detecting stress in animal tissue was FTIR spectrophotometer. The preliminary data showed that the difference of the CH stretching that occurs on a molecule of hemoglobin could be used as an indicator. Accordingly, the Olefinic v = (CH), vas (CH3), vas (CH2) and vs (CH3) of the red blood cell separation from cows slaughtered in Islamic method was significantly lower than those of red blood cells isolated from cows slaughtered in Non-Islamic method (p-value <0.05). However, this result is not indicate the magnitude of stress occurred in animal.

สารบัญตาราง

- ตารางแสดงแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย
- ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหมู่ฟังก์ชันของวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method และ Non-Islamic method

สารบัญภาพ

- รูปที่ 1 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 ppm (HPLC conditions: mobile phase 60% acetonitrile, flow rate 1 ml/min)
- รูปที่ 2 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัว (HPLC conditions: mobile phase 60% acetonitrile, flow rate 1 ml/min)
- รูปที่ 3 แสดง Chromatogram ของ stock คอร์ติซอลที่ความเข้มข้น 2 ppm (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 4 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่หนึ่ง (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัว
- รูปที่ 6 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สอง (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 7 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สาม (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 8 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สี่ (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่ห้า (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 10 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่หก (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 11 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่เจ็ด (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 12 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่แปด (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 13 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่เก้า (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 14 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สิบ (HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)
- รูปที่ 15 แสดงการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 11-Beta Hydroxylase ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W
- รูปที่ 16 แสดงแถบ RNA จากการทำ 1% Gel Electrophoresis
- รูปที่ 17 ค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของอนุพันธ์ลำดับที่สอง (Secondary derivatives) ของ C-H stretching ของเม็ดเลือดแดงที่แยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method และ Non-Islamic method

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยพึ่งพารายได้จากการส่งออกอย่างมากในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศ ตลาดส่งออกสำคัญของประเทศไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันตกและอัฟริกาผลิตภัณฑ์ส่งออกส่วนใหญ่ยังคงเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่มีมูลค่าเพิ่มให้กับประเทศค่อนข้างต่ำเนื่องจากเป็นอุตสาหกรรมลักษณะรับจ้างผลิตที่คนไทยมิได้เป็นเจ้าของเทคโนโลยี เป็นต้นว่า อุตสาหกรรมยานยนต์ สิ่งทอ ชิ้นส่วนคอมพิวเตอร์ วงจรไฟฟ้า อัญมณี คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 78% ในปี พ.ศ.2550 ในขณะที่การส่งออกผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร กลับมีมูลค่าต่ำเพียง 16% โดยมีสัดส่วนลดลงมาอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาสิบปีที่ผ่านมา

เมื่อเกิดวิกฤติร้ายแรงทางเศรษฐกิจในหมู่ประเทศพัฒนาแล้วเริ่มโดยสหรัฐอเมริกาที่เรียกกันว่าวิกฤติแฮมเบอร์เกอร์หรือวิฟฤติอสังหาริมทรัพย์ในปี พ.ศ.2551 อันเป็นที่รับรู้กันทั่วไป ตลาดส่งออกในประเทศพัฒนาเหล่านี้ทั้งในสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย เกิดภาวะหดตัวอย่างรุนแรง ส่งผลกระทบอย่างกว้างขวางแก่ประเทศที่พึ่งพาการส่งออกไปยังตลาดของประเทศพัฒนาแล้ว ซึ่งเห็นได้จากปัญหาทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นในเกาหลีใต้ ญี่ปุ่น ไต้หวัน ตอนปลายปี พ.ศ.2551 และภายหลังจากนั้นพบอีกว่าผลกระทบรุนแรงได้เกิดขึ้นกับประเทศไทยและอาเซียน

นักเศรษฐศาสตร์ที่มีชื่อเสียงชาวอเมริกัน เช่น ดร.สตีเฟน เอส โรช (Spephen S. Roach) อดีตประธานกรรมการบริหารบริษัทมอร์แกน สเตนลีย์ เอเชีย เคยทำนายวิกฤติการณ์ทางเศรษฐกิจมาก่อนหน้านี้แล้วว่าวิกฤติทางเศรษฐกิจจะเกิดขึ้นกับสหรัฐอเมริกาและประเทศพัฒนาแล้วอย่างแน่นอน เห็นควรที่ประเทศที่พึ่งพาการส่งออกไปยังประเทศพัฒนาเหล่านี้พึงตั้งรับทางเศรษฐกิจด้วยการขยายตลาดภายในประเทศของตนให้สูงขึ้นและด้วยการแสวงหาตลาดใหม่ ซึ่งในประการหลังนั้น หลายฝ่ายเห็นต้องตรงกันว่าตลาดฮาลาลทั้งที่เป็นผลิตภัณฑ์อาหารและมิใช่อาหารนับเป็นตลาดทางเลือกที่ดีที่สุดเนื่องจากโลกมุสลิมโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มประเทศรอบอ่าวเปอร์เซีย เอเชียตะวันตก เอเชียกลางและอัฟริกาเหนือ ได้รับผลกระทบจากวิกฤติทางเศรษฐกิจครั้งนี้ต่ำที่สุด การมุ่งสู่ตลาดฮาลาลจึงนับเป็นทางออกที่ดีที่สุดสำหรับประเทศไทยในการหลีกเลี่ยงผลกระทบจากวิกฤติเศรษฐกิจดังกล่าวตลอดจนครั้งต่อๆไป

การรุกเข้าสู่ตลาดฮาลาลให้ประโยชน์แก่ประเทศไทยอย่างน้อยที่สุดสองประการ ได้แก่ การลดการพึ่งพาตลาดหลักที่เคยมีอยู่ทั้งตลาดสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและตลาดพัฒนาแล้วอื่นๆ และเป็นการเพิ่มมูลค่าที่ได้รับจากผลกำไรเนื่องจากตลาดฮาลาลที่ประเทศไทยมีความเชี่ยวชาญมากที่สุดคือผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมการเกษตรและอาหารซึ่งให้สัดส่วนกำไรสูงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมอื่นๆ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเฉพาะการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตรของประเทศไทยกลับพบว่าประเทศไทยแม้มีส่วนแบ่งในตลาดระหว่างประเทศเมื่อปี พ.ศ.2550 อยู่สูงถึงร้อยละ 2 คิดเป็นลำดับที่ 12 ของโลก โดยส่งออกได้สูงถึง 14,000 ล้านเหรียญ คิดเป็นร้อยละ 12 ของมูลค่าการส่งออกการส่งออกของประเทศไทยทั้งหมด กลับมีส่วนแบ่งในตลาดประเทศมุสลิมที่เป็นสมาชิกขององค์การความร่วมมือประเทศอิสลามหรือ OIC ที่มีสมาชิกอยู่ 57 ประเทศเพียง 1,700 ล้านเหรียญหรือคิดเป็นเพียง 12% ของการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตรทั้งหมด ทั้งๆที่ตลาดอาหารฮาลาลระหว่างประเทศมีมูลค่าสูงถึง 265,000 ล้านเหรียญสหรัฐโดยคิดเป็นมูลค่า 20% ของตลาดอาหารระหว่างประเทศ ย่อมหมายความว่าประเทศไทยมีส่วนแบ่งอยู่ในตลาดแห่งนี้เพียง 0.64% เท่านั้น

หากประเทศไทยมีส่วนแบ่งในตลาดฮาลาลเท่าเทียมกับตลาดอาหารโลกทั้งหมดเช่นที่เป็นอยู่ย่อมหมายความว่าประเทศไทยจะต้องมีส่วนแบ่งในตลาดฮาลาลระหว่างประเทศ 2% ซึ่งเท่ากับว่าประเทศไทยสูญเสียมูลค่าในตลาดอาหารฮาลาลเท่ากับ 2-0.64 = 1.36% คิดเป็นมูลค่าที่หายไปเท่ากับ 3,612.5 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งถือเป็นการขาดทุนที่ประเทศไทยมิทันได้คิดเป็นมูลค่ามหาศาล

สิ่งที่ประเทศไทยจำเป็นจะต้องทำ ประการที่หนึ่งคือพยายามกู้คืนส่วนแบ่งที่หายไปและประการที่สองคือเพิ่มพูนส่วนแบ่งในตลาดอาหารฮาลาลโลกให้ได้มากกว่า 2% ที่ประเทศไทยได้จากตลาดทั่วไป การดำเนินการเพื่อให้ได้ตามเป้าประสงค์นี้แม้ทำได้ยากแต่มีความเป็นไปได้ โดยประเทศไทยต้องทำการศึกษาและทำความเข้าใจกับลักษณะของตลาดอาหารฮาลาลให้ได้เสียก่อน

คู่แข่งที่ยึดครองตลาดอาหารฮาลาลระหว่างประเทศมูลค่า 265,000 ล้านเหรียญสหรัฐปัจจุบันนี้ ได้แก่ ประเทศมหาอำนาจทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร ได้แก่ บราซิล ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี สหรัฐอเมริกา ยูเครน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา ซึ่งล้วนเป็นประเทศพัฒนาแล้วและกึ่งพัฒนาและมิใช่ประเทศมุสลิมทั้งสิ้น ประเทศเหล่านี้มีมาตรฐานการผลิตอาหารที่สูง ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมุสลิมส่วนใหญ่ การเข้าไปแข่งขันในตลาดอาหารฮาลาลจึงน่าเชิญชวนเนื่องจากเป็นตลาดระดับสูงที่ให้ผลกำไรคุ้มค่าและท้าทายเนื่องจากต้องแข่งขันกับประเทศพัฒนาแล้วทั้งหลาย ด้วยเหตุนี้การยกระดับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตรของประเทศไทยจึงนับเป็นเรื่องจำเป็นและต้องกระทำอย่างเร่งด่วน

ความปลอดภัยอาหารเป็นประเด็นสำคัญ ในส่วนความปลอดภัยด้านกายภาพที่กำหนดกันอยู่ตามมาตรฐานอาหาร เช่น ปลอดภัยจากอันตรายทางเคมี ชีวภาพและกายภาพ ซึ่งภาคอุตสาหกรรมอาหารดำเนินการกันอยู่ด้วยระบบ Good Manufacturing Practices หรือ GMP ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤติหรือ HACCP และระบบอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ในกรณีของตลาดอาหารฮาลาลมีความปลอดภัยอีกด้านหนึ่งที่ทางอุตสาหกรรมมักละเลยนั่นคือความปลอดภัยด้านจิตวิญญาน (spiritual safety) อันได้แก่ การปนเปื้อนสิ่งที่ขัดแย้งกับหลักการในศาสนาอิสลาม อันได้แก่ การปนเปื้อนสารจากสัตว์ 9 ประเภทตามมาตรฐานฮาลาลของโคเด็กซ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสุกรและสิ่งมึนเมา หากประสงค์จะเข้าไปแข่งขันในตลาดฮาลาลทั้งที่เป็นอาหารและมิใช่อาหาร ผลิตภัณฑ์จากประเทศไทยจำเป็นต้องสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภคว่าปราศจากการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในทางศาสนาอิสลามเหล่านั้น

การปนเปื้อนดังกล่าวนับวันยิ่งมีความซับซ้อนเนื่องจากอุตสาหกรรมอาหารและสิ่งที่เกี่ยวเนื่องจากอาหารเปลี่ยนสภาพจากต้นกำเนิดเป็นอย่างมาก เครือข่ายการค้าที่ครอบคลุมไปทั่วโลกทำให้การตรวจสอบย้อนกลับถึงต้นกำเนิดมีความยุ่งยากมากขึ้น นอกจากนี้ผู้ประกอบการทางอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยส่วนใหญ่มิใช่มุสลิมที่มีความเข้าใจความอ่อนไหวด้านความปลอดภัยทางจิตวิญญานของมุสลิมหรือผู้นับถือศาสนาอิสลาม จำเป็นอย่างยิ่งที่การตรวจสอบด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์หรือการใช้ห้องปฏิบัติการทางนิติวิทยาศาสตร์จะต้องเข้าไปมีส่วนร่วม

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดตั้งขึ้นอย่างเป็นทางการในปี พ.ศ.2547 โดยก่อนหน้านั้นดำเนินการในรูปของห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ฮาลาลภายในคณะสหเวชศาสตร์ นับตั้งแต่ปี พ.ศ.2538 สะสมประสบการณ์ด้านงานนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาล (Halal forensic laboratory) มาอย่างยาวนาน กระทั่งได้รับการยอมรับจากนานาประเทศว่าเป็นศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลแห่งแรกในโลก ได้รับรางวัลระดับนานาชาติจากการประชุมฮาลาลโลก ณ ประเทศมาเลเซียเมื่อปี พ.ศ.2549 จากนายกรัฐมนตรีมาเลเซีย

อย่างไรก็ตาม แม้ทางศูนย์ฯจะพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาลเพื่อตรวจวิเคราะห์สภาพการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ฮาลาลกระทั่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการวิเคราะห์แก่

นักวิทยาศาสตร์ของประเทศสมาชิกอาเซียนได้ในการอบรมเมื่อเดือนสิงหาคม 2551 กระทั่งโครงการของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลได้รับการยอมรับให้จัดเป็นโครงการของกลุ่มความร่วมมือทางเศรษฐกิจสามฝ่ายอินโดนีเซีย-มาเลเซีย-ประเทศไทย (IMT-GT) จากผลการประชุมระดับรัฐมนตรีของ IMT-GT เมื่อวันที่ 23 ตุลาคม 2551 ในการประชุม ณ เมืองปาเล็มบัง เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย กลับปรากฏว่ายังมีสิ่งปนเปื้อนที่ซับซ้อนอยู่จำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ด้วยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ฮาลาลระดับปกติอันเนื่องมาจากความซับซ้อนในกระบวนการผลิตองค์ประกอบของอาหารตลอดจนการเลือกใช้แหล่งวัตถุดิบ จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ซับซ้อนโดยการใช้เทคโนโลยีการตรวจที่ทันสมัยร่วมกันหลายเทคนิค สิ่งนี้เป็นเหตุผลทำให้ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลขอเสนอโครงการเพื่อรับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยในครั้งนี้ ทั้งนี้เพื่อคงสถานะผู้นำด้านวิทยาศาสตร์ฮาลาลให้คงอยู่กับประเทศไทย อันนับเป็นการสร้างภาพลักษณ์ใหม่ให้แก่ประเทศไทยในการก้าวเข้าสู่การเป็นศูนย์กลางด้านอุตสาหกรรมฮาลาลดังที่ประเทศไทยมุ่งหวังไว้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อศึกษาปัญหาการปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามในศาสนาอิสลามในผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นอาหารและมิใช่อาหารเพื่อแสวงหาแนวทางในการป้องกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนที่ซับซ้อน ดังเช่น สารอนุพันธุ์ที่ผลิตจากสิ่งต้องห้าม ได้แก่ สุกร สุนัข สัตว์ดุร้าย นกล่าเหยื่อ ฯลฯ สิ่งมึนเมา ฮอร์โมนที่หลั่งในสัตว์ขณะผ่านกระบวนการเชือดที่ไม่ถูกต้อง
- เพื่อพัฒนาเทคนิคทางด้านโอมิกส์ อันได้แก่ เทคนิคทางโปรตีโนมิกส์ ลิพิโดมิกส์ จีโนมิกส์ ทรานส์คริปโตมิกส์ เมแทบอโลมิกส์ เพื่อนำมาประยุกต์ในการตรวจวิเคราะห์สารอนุพันธุ์ชนิดต่างๆ ที่เบี่ยงเบนไปในสัตว์จากภาวะปกติอันเป็นผลเกี่ยวเนื่องมาจากการเลี้ยงดูอย่างไม่ถูกต้อง ความเครียดอันเกิดจากการทรมาน ฯลฯ อันขัดแย้งมิเพียงแต่หลักการในศาสนาอิสลามแต่กับหลักการความรับผิดชอบต่อสังคม (corporate social responsibility หรือ CSR) ซึ่งรวมถึงเรื่องของสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) ซึ่งได้กลายเป็นแนวทางสำคัญในการค้าของโลกปัจจุบันและอนาคต
- เพื่อพัฒนาแนวทางบูรณาการเทคนิคทางโอมิกส์เพื่อความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนที่ซับซ้อนเพื่อให้เป็นไปตามหลักการในศาสนาอิสลาม
- เพื่อสร้างภาพลักษณ์ให้แก่ประเทศไทยด้านการเป็นผู้นำด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีฮาลาลอันส่งผลทางอ้อมต่อการเพิ่มยอดการส่งออกตลอดจนความเชื่อมั่นของผู้บริโภคมุสลิมในตลาดต่างประเทศ
- เพื่อสร้างความก้าวหน้าในสาขาวิทยาศาสตร์ฮาลาลให้แก่สังคมวิชาการของโลกโดยมีประเทศไทยเป็นศูนย์กลางอันเป็นการสร้างเกียรติภูมิอย่างสูงให้แก่ประเทศไทยให้เป็นที่ประจักษ์ในสายตาโลกมุสลิม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- การศึกษาเชิงเอกสารทั้งเอกสารทางวิทยาศาสตร์อาหาร สัตวศาสตร์และเอกสารทางศาสนาอิสลามเพื่อวิเคราะห์ประเด็นปัญหาสิ่งที่ปนเปื้อนหรือเสี่ยงต่อการปนเปื้อนตามหลักการในศาสนาอิสลามโดยปรึกษาหารืออย่างใกล้ชิดกับผู้รู้ทางศาสนาอิสลามที่มีความเชี่ยวชาญด้านอุตสาหกรรมอาหารและสัตวแพทย์ที่เชี่ยวชาญด้านฮอร์โมนและสารคัดหลั่งในสัตว์

- การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนระดับที่สอง (secondary) ซึ่งสูงกว่าการตรวจวิเคราะห์แบบธรรมดาหรือระดับที่หนึ่ง (primary) โดยปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สิ่งปนเปื้อนที่ไม่ซับซ้อนด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ขั้นสูงทางโอมิกส์ ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์คือการตรวจหา finger print โปรตีนในเจลาตินด้วยเทคนิค LC-ESI, LC-MS-MS, FTIR-HTS-XT, การตรวจวิเคราะห์ทางลิพิโดมิกส์คือการตรวจหา finger print แอลกอฮอล์และอนุพันธุ์ในเครื่องดื่มที่ให้ความมึนเมา การตรวจวิเคราะห์ทางจีโนมิกส์โดยวิเคราะห์ชนิดดีเอ็นเอในสัตว์ด้วย real-time PCR
- การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามทางศาสนาอิสลามระดับที่สาม (tertiary) เช่นการตรวจสารฮอร์โมนหรือสารกึ่งฮอร์โมนหรือโปรตีนบางชนิดที่หลั่งออกมาจากสัตว์ที่เครียดหรือถูกทรมาน โดยใช้เทคโนโลยีทางโอมิกส์ เป็นต้นว่าการตรวจด้วย LC-MS-MS, FTIR-HTS-XT, GC-MS-MS ตัวอย่างเช่น glucocorticosteroids (ตัวหลักคือ cortisol และ corticosterone) epinephrine (a neurohormone) และ norepinephrine (a neurotransmitter) เป็นต้น
- การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสิ่งต้องห้ามทางศาสนาอิสลามระดับที่สี่ (quarternary) ได้แก่ การตรวจในเชิงเมแทบอโลมิกส์ วิเคราะห์สารโปรตีนที่หลั่งจากการทำงานของยีนบางชนิดอันเป็นผลมาจากความเครียด หรือการวิเคราะห์ฮอร์โมนที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงในระดับที่สองและสาม เป็นต้นว่า insulin like growth factor- 1 (IGF-1) และ luteinizing hormone (LH) ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้อง
- การวิเคราะห์ผลการวิจัยและการรายงานในรูปของรายงานทั่วไปและการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ การจัดประชุมวิชาการ การเผยแพร่ทางสื่อมวลชน การนำไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติ

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยของโครงการนี้ประกอบไปด้วยกิจกรรมต่างๆ ดังนี้

- กิจกรรมการศึกษาทางเอกสารด้านวิทยาศาสตร์ควบคู่ไปกับด้านศาสนาอิสลาม
- กิจกรรมการประชุมปรึกษาหารือกับนักวิชาการทางศาสนาและนักวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้รู้ทางด้านสัตวศาสตร์และสัตวบาล
- กิจกรรรมการพัฒนาเทคนิคทางด้านโอมิกส์เพื่อการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนเชิงซับซ้อนในระดับต่างๆ
- การประมวลผลจากการศึกษาวิจัยนำไปสู่การตีพิมพ์ผลงานในวารสาร
- การจัดการประชุมทางวิชาการระดับเล็กสำหรับนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง
- การนำองค์ความรู้นำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์อย่างง่าย เพื่อนำไปสู่การจดสิทธิบัตร

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาคอุตสาหกรรมฮาลาลในเขตต่างๆทั่วประเทศ

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

- ระยะเวลาทำการวิจัย: 1 ตุลาคม พ.ศ. 2553 – 30 กันยายน พ.ศ. 2556
- แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย เป็นไปดังนี้

รายการและงบประมาณที่ใช้ [บาท/ปี]	ปีที่ 1 ตค 53-กย 54				ปีที่ 2 ตค 54-กย 55				ปีที่ 3 ตค 55-กย 56			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. กิจกรรมการศึกษาทางเอกสารเชิงวิทยาศาสตร์และศาสนา	X	X	X									
1.1 การตรวจสอบเอกสารวิชาการ	X											
1.2 การประชุมปรึกษาหารือกับผู้รู้ทางศาสนาและวิทยาศาสตร์	X	X										
1.3 การสรุปผลเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเทคนิค		X	X									
2. กิจกรรมการพัฒนาเทคนิคโอมิกส์ระดับที่สอง		X	X	X								
2.1 การพัฒนาเทคนิคทาง LC-MS-MS ในการตรวจวิเคราะห์ finger print ของโปรตีนในเจลาติน		X	X	X								
2.3 สรุปและวิเคราะห์ผลและการจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับ			X	X	X							
3. กิจกรรมการพัฒนาเทคนิคโอมิกส์ระดับที่สาม					X	X	X	X				
3.1 การพัฒนาเทคนิคทาง LC-MS-MS, FTIR และอื่นๆในการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนและสารกึ่งฮอร์โมนบางชนิดในสัตว์ที่เกิดจากความเครียด					X	X	X	X				
3.2 สรุปและวิเคราะห์ผลและการจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับ						X	X	X	X			
4. กิจกรรมการพัฒนาเทคนิคโอมิกส์ระดับที่สี่							X	X	X	X	X	
4.1 การพัฒนาเทคนิคทาง PCR ควบคู่ LC-MS-MS, FTIR และอื่นๆ ในการตรวจวิเคราะห์ยีนและฮอร์โมนและสารกึ่งฮอร์โมนบางชนิดในสัตว์ที่เกิดจากความเครียด							X	X	X	X		
4.2 สรุปและวิเคราะห์ผลและการจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับ									X	X	X	
5. กิจกรรมการสรุปและรายงานผล										X	X	X
5.1 การประมวลผล การจัดประชุมวิชาการระดับเล็ก										X	X	
5.2 การสรุปผลในรูปการจัดทำนิพนธ์ต้นฉบับ											X	X

3. กิจกรรมการพัฒนาเทคนิคระดับที่สาม (เทคนิคโอมิกส์)

3.1 การพัฒนาเทคนิคทาง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างพลาสมาของวัวที่เกิดจากความเครียด

ที่มาและความสำคัญ

คอร์ติซอลเป็นฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการเกิดความเครียดในสัตว์ ฮอร์โมนคอร์ติซอลมีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายสารอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน และกรดไขมันเพื่อรักษาสมดุลในเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด เกือบทั้งหมดหรือร้อยละ 90 ของคอร์ติซอลในกระแสเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกาะกับโปรตีนในพลาสมา โดยเฉพาะโปรตีน cortisol-binding globulin (CGB) ในขณะที่คอร์ติซอลที่เหลือจะอยู่ในรูปอิสระในกระแสเลือด เมื่อสัตว์ตอบสนองต่อความเครียดจะมีการหลั่งของฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรฟิก (adrenocorticotrophic hormone) ไปยังส่วนนอกของไต โดยการหลั่งของฮอร์โมนชนิดนี้มีผลไปกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนตัวอื่นๆในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) ในเลือดเพิ่มขึ้น (Blahova และคณะ 2007; Mostl และคณะ 1999) จากงานวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์คอร์ติซอลในเลือดเป็นตัวชี้วัดที่เหมาะสมในการศึกษาความเครียดในสัตว์หลายสปีชีส์ซึ่งรวมไปถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Palme และคณะ 1999) การวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลในเลือดทำได้หลายวิธี นักวิจัยบางกลุ่มใช้ Radioimmunoassay (RIA) หรือ Enzyme immunoassay (EIA) ในการศึกษาหาระดับคอร์ติซอลในเลือดเพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจจับสูง อย่างไรก็ตาม เทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางด้านชีวภาพที่ซับซ้อน

Gas chromatography- Mass spectrometry (GC-MS) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจหาคอร์ติซอลซึ่งมีความไวและความจำเพาะค่อนข้างดีแต่เนื่องจากต้องนำอนุพันธ์ของสารมาใช้ อีกทั้งมีการเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อนจึงเป็นเทคนิคที่ไม่ได้รับความนิยมมากนัก เทคนิคทาง Chromatography เป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ UV detector ที่มีการใช้งานที่ง่ายและไม่ซับซ้อน (Izquierdo-Hornillos และคณะ 2005) จากงานวิจัยของ Blahova และคณะ (2007) ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคทาง HPLC สามารถวิเคราะห์หาระดับคอร์ติซอลในพลาสมาของเลือดปลาได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทาง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับคอร์ติซอลในพลาสมาของเลือดวัว

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลในพลาสมาของเลือดวัวและเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลในวัวพันธุ์ลูกผสมบราห์มันและชาร์โรเล่ส์ที่ผ่านการเชือดแบบอิสลามและแบบทั่วไป

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

ช่วงที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือดวัวตัวผู้ พันธุ์ลูกผสมบราห์มันและชาร์โรเล่ส์เพื่อตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลในพลาสมาด้วยเทคนิคทาง HPLC

1.1 เก็บตัวอย่างเลือดวัวจากโรงเชือดสัตว์จังหวัดนนทบุรีซึ่งเป็นการเชือดตามหลักการศาสนาอิสลามและปทุมธานีซึ่งแม้เป็นการเชือดแบบศาสนาอิสลามแต่กลับพบการปฏิบัติที่ไม่ถูกต้องนักจึงอาจนับว่ามิใช่วิธีการทางศาสนบัญญัติอิสลาม โดยนำเลือดวัวสด 10 ตัวอย่างจากที่เก็บได้ในแต่ละโรงเชือดมาเก็บในหลอดทดลองที่มีสาร heparin เป็นองค์ประกอบแล้วนำไปเก็บในกล่องทำความเย็นที่มีอุณหภูมิต่ำ

1.2 เมื่อกลับมาถึงห้องปฏิบัติการให้นำตัวอย่างเลือดวัวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงทันทีโดยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกชั้นพลาสมาออกจากตัวอย่างเลือด

1.3 ดูดเก็บตัวอย่างพลาสมาที่แยกชั้นมาใส่ในหลอดทดลองและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน

ช่วงที่ 2 การเตรียมตัวอย่าง stock คอร์ติซอลมาตรฐานและคอร์ติซอลจากเลือดก่อนนำมาใช้กับเทคนิคทาง HPLC

2.1 การเตรียม stock คอร์ติซอลมาตรฐาน 20 ppm

2.1.1 ละลาย 4 มิลลิกรัมของคอร์ติซอลบริสุทธิ์ใน 200 มิลลิลิตรของสารละลาย 60 % acetonitrile (สารละลายนี้มีความคงตัวเป็นเวลา 2 เดือน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C)

2.2 การสกัดตัวอย่างให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ SPE (Solid Phase Extraction) โดยมีการอ้างอิงวิธีการสกัดตัวอย่างจากงานวิจัยของ Blahova และคณะ (2007) เป็นดังนี้:

2.2.1 นำคอลัมน์ SPE SPEC C18AR (3 ml, 30 mg, Varian Inc.) ต่อเข้ากับเครื่อง manifold

2.2.2 เติมสารละลาย methanol ในคอลัมน์ SPE 1 มิลลิลิตร

2.2.3 ตามด้วยการเติมน้ำ DI (Deionized water) 1 มิลลิลิตร

2.2.4 จากนั้นเติมตัวอย่าง stock คอร์ติซอลมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ในคอลัมน์ SPE 1 มิลลิลิตร

2.2.5 หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ DI 1 มิลลิลิตรตามด้วย 20% methanol 1 มิลลิลิตร

2.2.6 ทิ้งคอลัมน์ให้แห้งไว้ 5 นาทีโดยปรับความดันของเครื่อง manifoldให้มีค่าลดต่ำลงมา

2.2.7 ชะสารคอร์ติซอลมาตรฐานจากคอลัมน์ด้วย acetonitrile 1 มิลลิลิตร

2.2.8 เก็บตัวอย่างไว้ในขวด vial เพื่อรอสำหรับการฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.2.9 ทำในลักษณะเดียวกันกับตัวอย่างพลาสมาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

ช่วงที่ 3 การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือด

3.1 นำ stock คอร์ติซอลที่เตรียมไว้ในช่วงที่ 2 มาทำให้เป็นความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 0.0625 ppm, 0.125 ppm, 0.25 ppm,0.5 ppm, 1 ppm, และ 2 ppm เก็บตัวอย่างคอร์ติซอลมาตรฐานไว้ในขวด vial เพื่อนำไปดำเนินการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ต่อไป

ช่วงที่ 4 การตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวด้วยเทคนิคทาง HPLC

4.1 ในการทดลองนี้ได้มีการใช้เครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น 20A มาวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยมีระบบ HPLC เป็นดังนี้:

UV Detector: 243 nm

Column: reverse-phase C18 column

Flow rate: 1.9 ml/min

Temparature: 35 °C

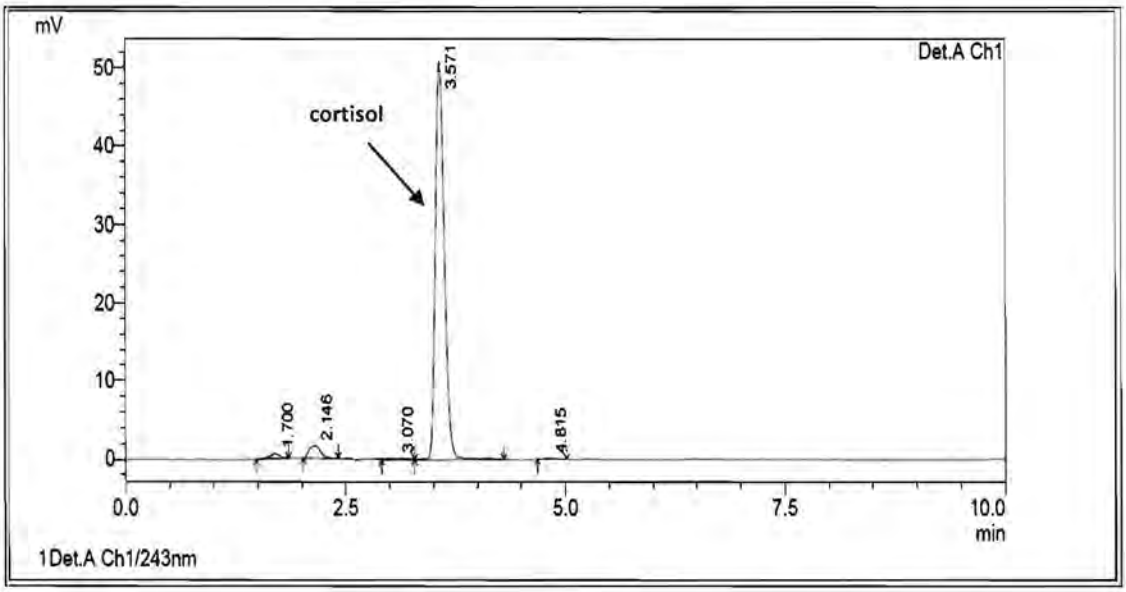
Mobile phase: 32% Acetonitrile: 68% Water

4.2 ฉีด single run สารละลาย stock คอร์ติซอลเพื่อหาค่า retention time ของตัวอย่างคอร์ติซอล

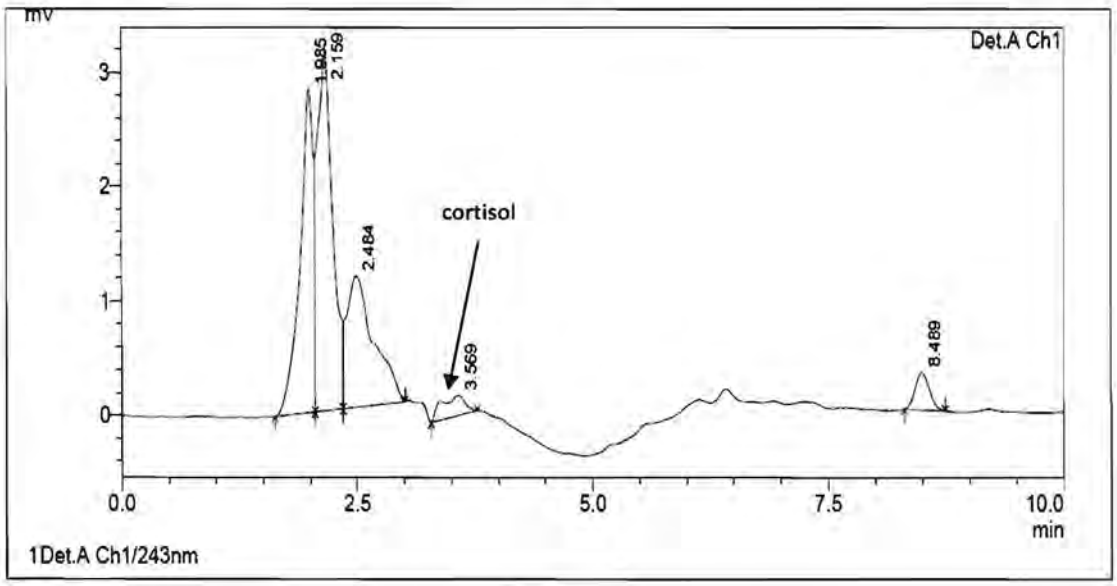
4.3 ฉีดสารละลายคอร์ติซอลที่เตรียมไว้โดยตั้งค่าความเข้มข้นในเครื่องเป็น 0.0625 ppm, 0.125 ppm, 0.25 ppm,0.5 ppm, 1 ppm, และ 2 ppm เรียงตามลำดับเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการหาความเข้มข้นคอร์ติซอล

4.4 นำตัวอย่างพลาสมาที่ผ่านคอลัมน์ SPE ในช่วงที่ 2 มาฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวิเคราะห์หาคอร์ติซอลในเลือดวัว โดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

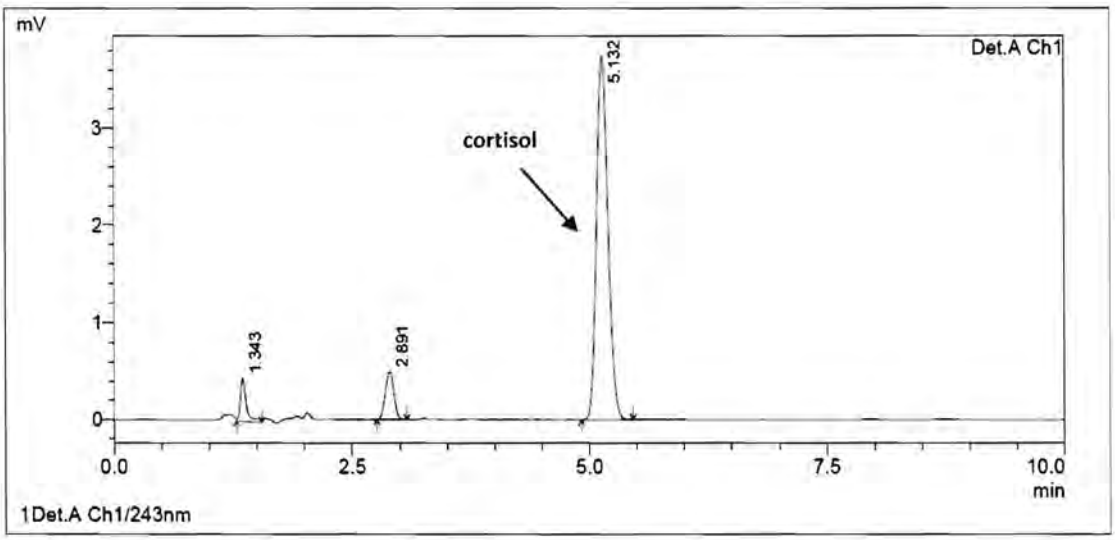
ผลการทดลอง



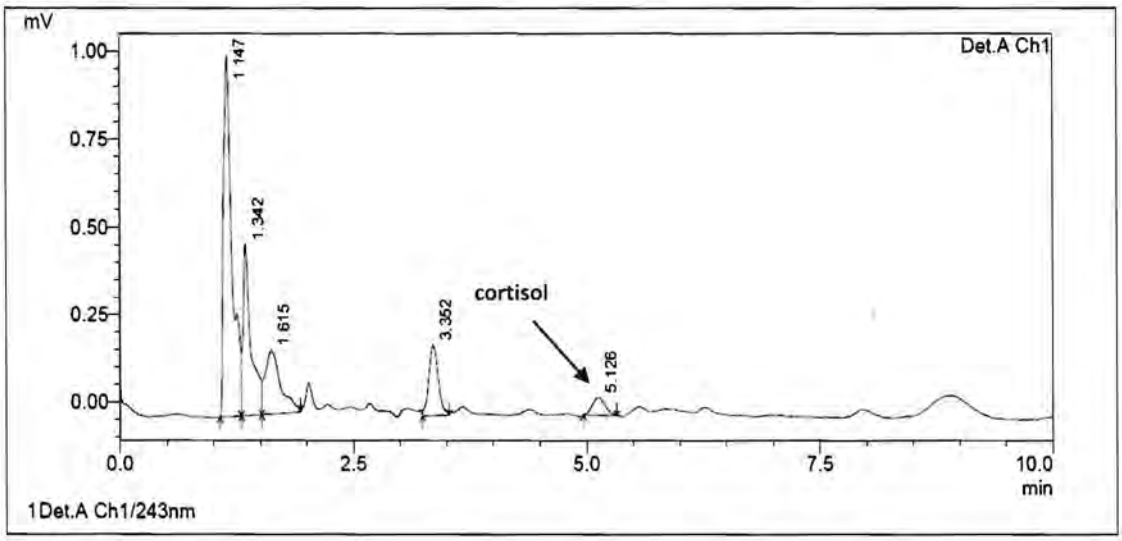
รูปที่ 1 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 ppm
(HPLC conditions: mobile phase 60% acetonitrile, flow rate 1 ml/min)



รูปที่ 2 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัว
(HPLC conditions: mobile phase 60% acetonitrile, flow rate 1 ml/min)

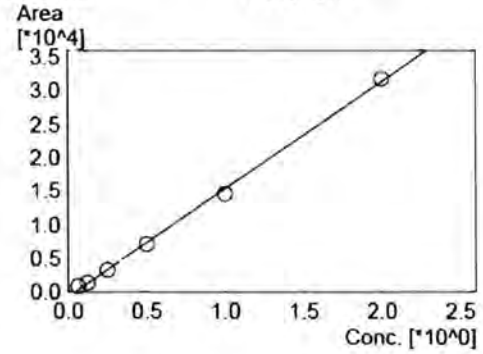


รูปที่ 3 แสดง Chromatogram ของ stock คอร์ติซอลที่ความเข้มข้น 2 ppm
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



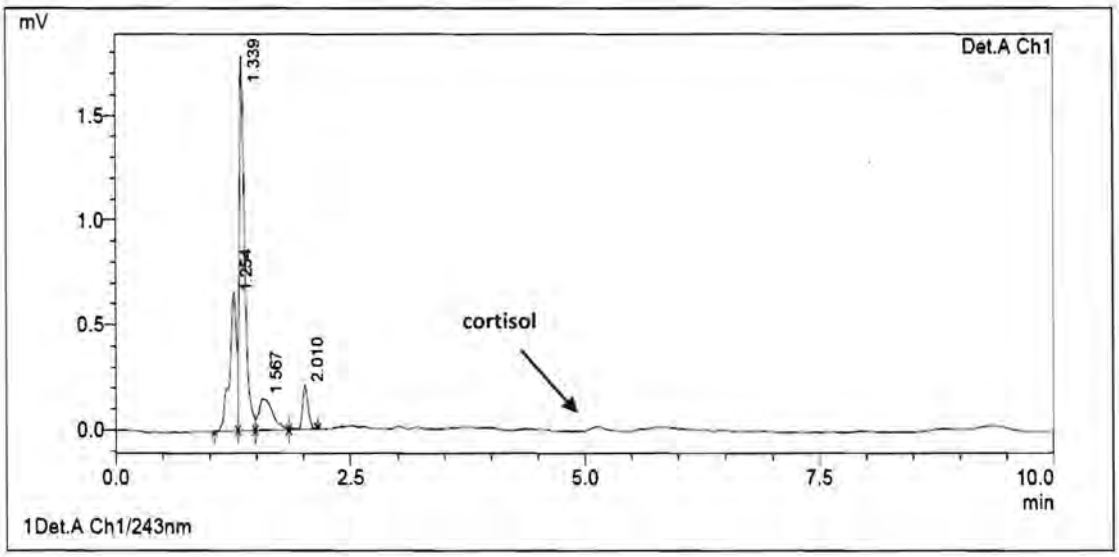
รูปที่ 4 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่หนึ่ง
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)

ID# : 1
Name : Cortisol
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=16045.4*x-678.558
Rr1=0.9991522 Rr2=0.9983051
MeanRF:13876.3 RFSD:1546.09 RFRSD:11.1419
FitType : Linear
ZeroThrough : Not Through
WeightedRegression : None
Detector Name : Detector A

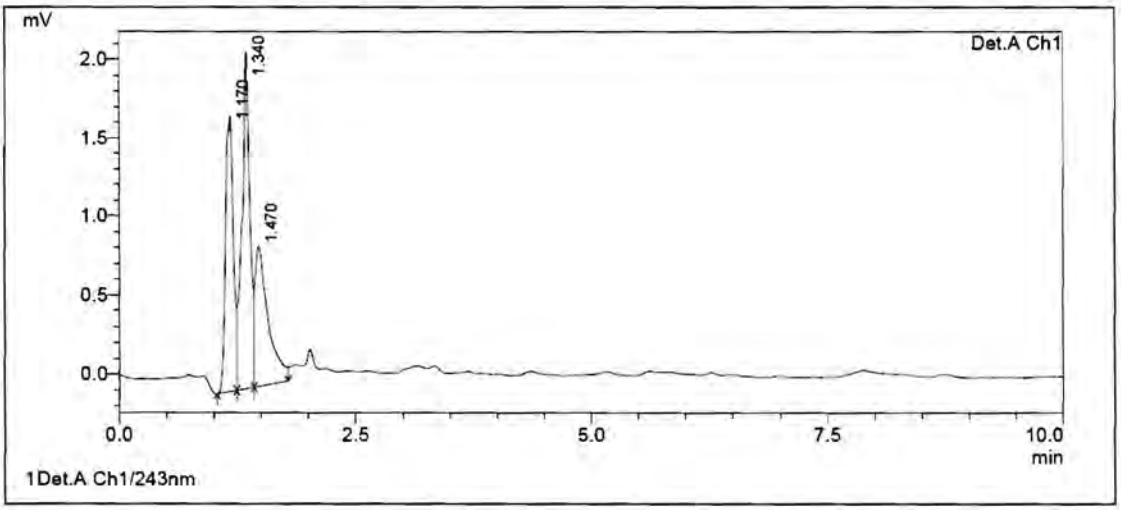


#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.063	881.3	881
2	0.125	1413.5	1413
3	0.250	3289.7	3290
4	0.500	7094.2	7094
5	1.000	14576.2	14576
6	2.000	31852.7	31853

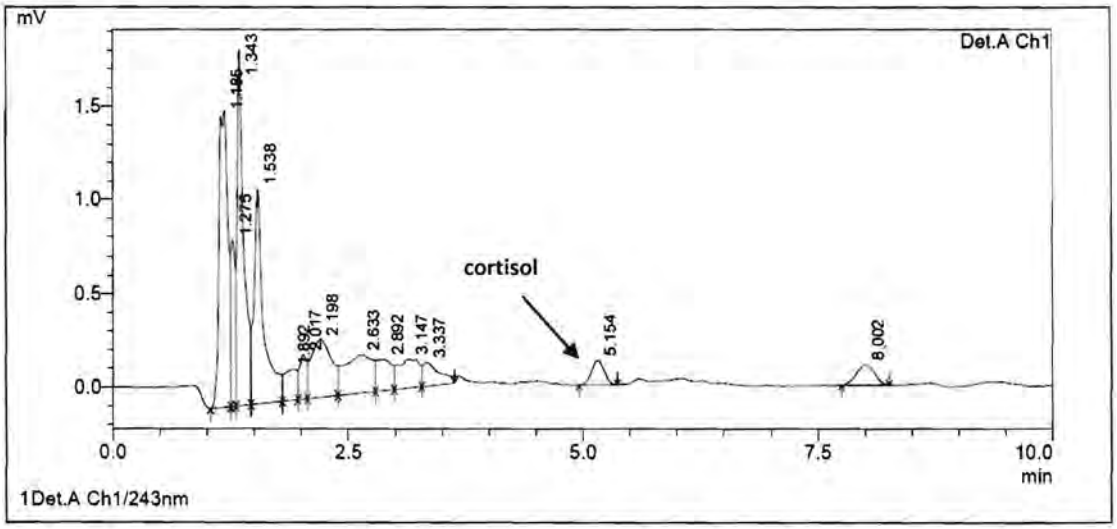
รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัว



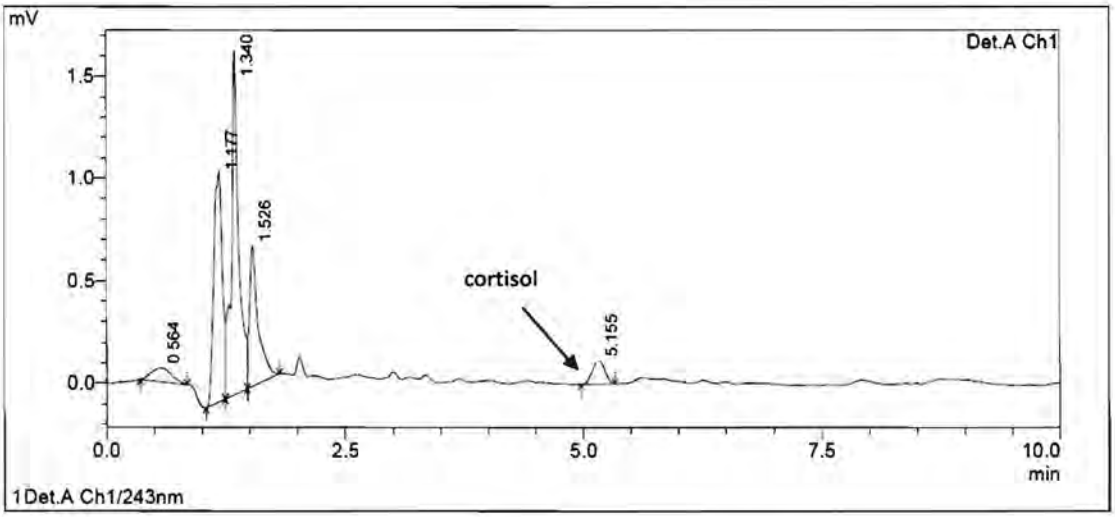
รูปที่ 6 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สอง
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



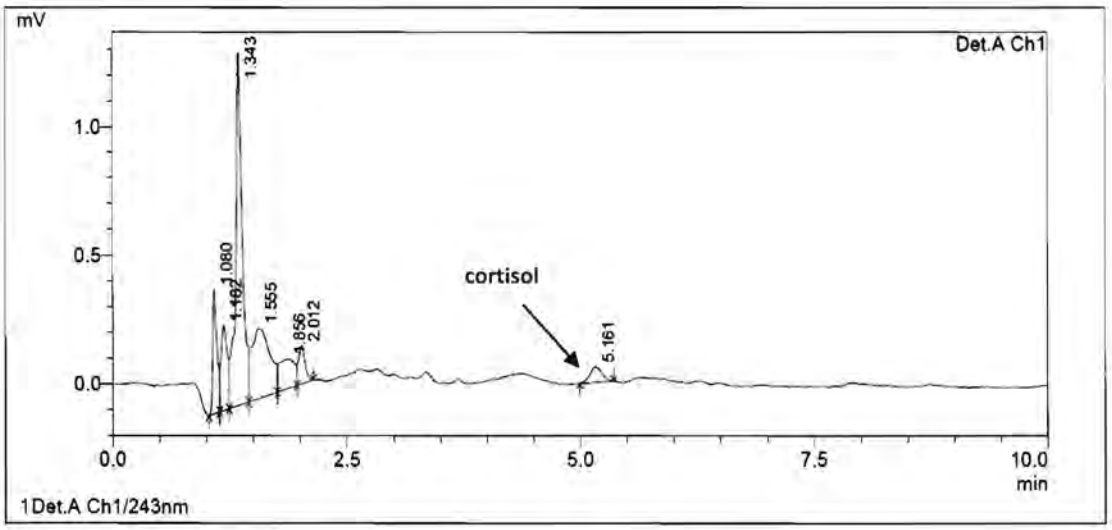
รูปที่ 7 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สาม
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



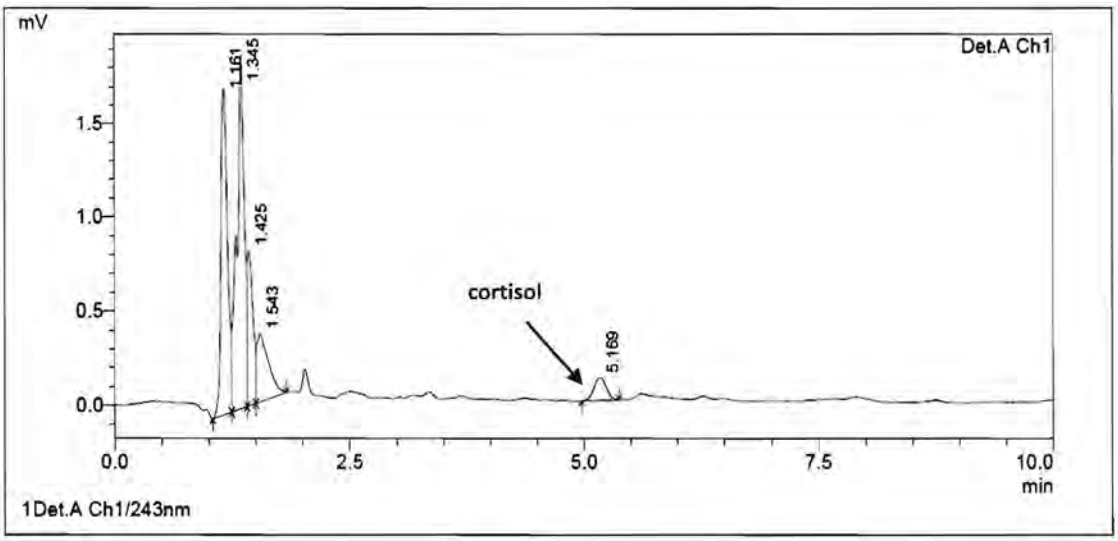
รูปที่ 8 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สี่
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



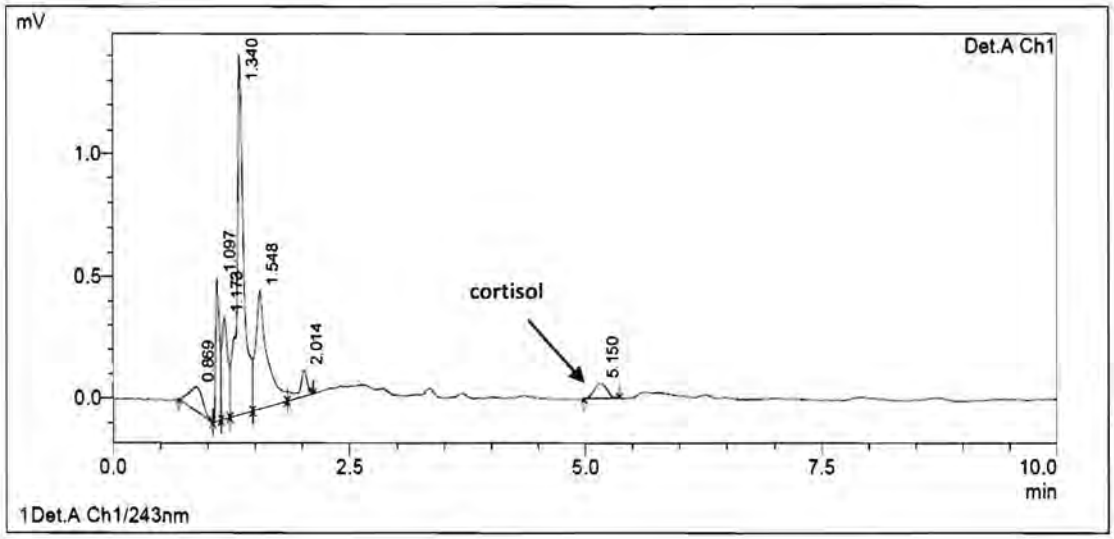
รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่ห้า
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



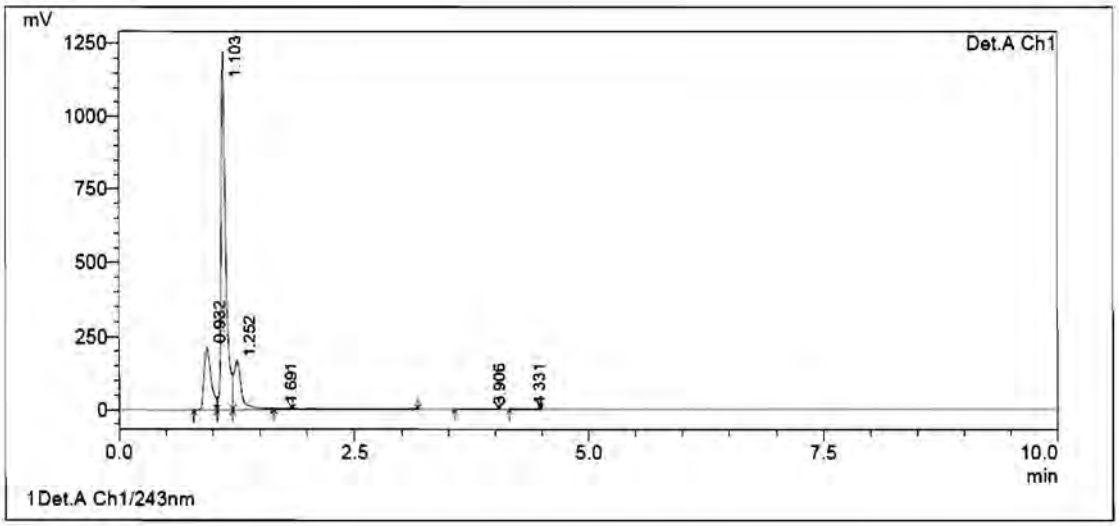
รูปที่ 10 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่หก
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



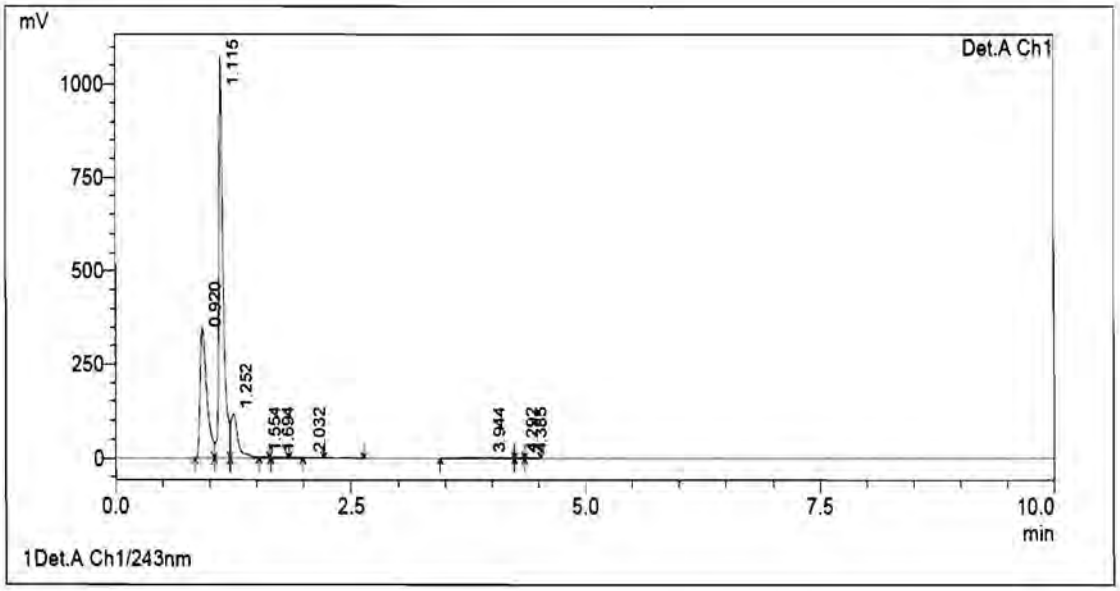
รูปที่ 11 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่เจ็ด
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



รูปที่ 12 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่แปด
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



รูปที่ 13 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่เก้า
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)



รูปที่ 14 แสดง Chromatogram ของคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สิบ
(HPLC conditions: mobile phase 32% acetonitrile, flow rate 1.9 ml/min)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction (SPE) ตามด้วยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (UV-Detector) โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Blahova และคณะ (2007) พบว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีอัตราส่วนของ Acetonitrile ต่อน้ำเป็น 60:40 และอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า Retention time (RT) ของสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานจะมีค่าเท่ากับ 3.5 (รูปที่ 1) ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างเลือดวัวมาวิเคราะห์หาฮอร์โมนคอร์ติซอลที่สภาวะเดียวกันจะพบว่าที่ RT ที่ 3.5 มีพีคเกิดขึ้นเช่นกันแต่การแยกพีคของสารคอร์ติซอลและสารอื่นๆในเลือดไม่ชัดเจน (รูปที่ 2) ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับตัวอย่างเลือดวัว โดยได้มีการปรับอัตราส่วนของ Acetonitrile ต่อน้ำเป็น 32:68 และอัตราการไหลเป็น 1.9 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าเมื่อนำตัวอย่างเดียวกันมาวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานคอร์ติซอลจะได้ค่า RT เท่ากับ 5.1 ตรงกันโดยสามารถแยกพีคของคอร์ติซอลจากสารประกอบอื่นๆในตัวอย่างเลือดได้ชัดเจน (รูปที่3-4) จากการทดลองจะได้กราฟมาตรฐานของสารละลายคอร์ติซอลที่สร้างจากความเข้มข้น 0.0625 ppm ถึง 2 ppm มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ค่า R^2 เท่ากับ 0.998 (รูปที่ 5) ทั้งนี้ในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์หาฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวที่ผ่านการเชือดจากโรงเชือดจังหวัดนนทบุรีและปทุมธานีรวมทั้งสิ้นเป็นจำนวนสิบตัวซึ่งผล chromatogram ที่ได้ (รูปที่ 4, รูปที่ 8-12) ชี้ให้เห็นว่ามีพีคเกิดขึ้นที่ค่า RT ที่ 5.1 ซึ่งตรงกับสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าในบางตัวอย่างเลือดวัวมีพีคที่มีขนาดใกล้เคียง baseline เกิดขึ้นที่ค่า RT ที่ 5.1 (รูปที่ 6) ในขณะที่ในบางตัวอย่าง(รูปที่ 7, รูปที่ 13-14) ไม่พบการเกิดพีคของสารคอร์ติซอลที่ค่า RT ที่ 5.1 จากข้อมูลเบื้องต้นเราจึงสรุปได้เพียงว่าพีคที่เราพบนั้นเป็นพีคของสารคอร์ติซอล แต่เนื่องจากว่าปริมาณความเข้มข้นของคอร์ติซอลในตัวอย่างมีน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างเลือดวัวตัวที่สอง (รูปที่ 6) ซึ่งมีพีคเกิดขึ้นแต่เกินขีดจำกัดของเครื่องที่จะสามารถวัดได้ การวิเคราะห์หาฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างเลือดวัวด้วยเครื่องมือ HPLC จึงไม่สามารถตอบโจทย์ทั้งหมดได้ ดังนั้นในอนาคตจึงต้องนำเทคนิคทาง LC-MS-MS ที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าเทคนิค HPLC มาประยุกต์ใช้เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในครั้งนี้

การดำเนินงานในขั้นตอนต่อไปในปีที่ 3

1. ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารคอร์ติซอลด้วยเทคนิค LC-MS-MS

3.2 การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุล ในการตรวจวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดความเครียด

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

ช่วงที่ 1 ทำการออกแบบไพรเมอร์บนบรรทัดฐานของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดความเครียด

1.1 ทำการหาข้อมูลของยีน 11 beta-hydroxylase ใน NCBI database

1.2 นำนิวคลีโอไทด์ของยีน 11 beta-hydroxylase ที่ได้จาก NCBI ทั้งหมดมาเรียง ในรูปแบบ FASTA

1.3 หลังจากนั้นเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 11 beta-hydroxylase ด้วย program Clustal W เพื่อจะทำการหา conserved region ในลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4 หลังจากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ที่สนใจจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

ช่วงที่ 2 การสกัดกรดนิวคลีอิก (RNA) จากตัวอย่างเลือดวัว โดยใช้ชุดสกัด RNA mini YRB 50

2.1 นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 500 ไมโครลิตรมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (RBC lysis buffer) 1.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา

2.2 นำหลอดทดลองดังกล่าว ไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที และทำการพลิกหลอดไปมา 2-3 ครั้งระหว่างการบ่ม

2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

2.4 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (RBC lysis buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในส่วนของตะกอน และทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้เข้ากัน

2.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และเทสารละลายส่วนใสทิ้ง

2.6 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (RB buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในส่วนของตะกอน และทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortexให้เข้ากัน

2.7 บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.8 เทสารละลายตัวอย่างผสมลงไปในเซ็ตฟิลเตอร์คอลัมน์ (Filter Column Set)

2.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

2.10 ถอดส่วนของฟิลเตอร์คอลัมน์ทิ้ง และดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์คอลัมน์ลงในหลอดทดลองใหม่ (microcentrifuge tube)

2.11 เตรียมเซ็ตคอลัมน์อาร์บี (RB column set)

2.12 เติมสารละลาย 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากันทันทีโดยใช้การปิเปต

2.13 ดูดสารสะลายตัวอย่างที่เติมเอทานอลแล้ว 500 ไมโครลิตรใส่ในคอลัมน์อาร์บี (RB column)

2.14 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

2.15 เทสารละลายที่ชะคอลัมน์ (flow-through solution) ทิ้งและนำสารละลายตัวอย่างที่เติมเอทานอลที่เหลือมาใส่คอลัมน์เดิม

2.16 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

2.17 เทสารละลายที่ชะคอลัมน์ (flow-through solution) ทิ้ง และนำคอลัมน์ดังกล่าวใส่ในหลอดเก็บสารละลาย (collection tube)

2.18 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (R-W1 buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2.19 เทสารละลายที่ชะคอลัมน์ (flow-through solution) ทิ้ง และนำคอลัมน์ใส่ในหลอดเก็บสารละลาย (collection tube)

2.20 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ผสมเอทานอลแล้ว (R-Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2.21 เทสารละลายที่ชะคอลัมน์ (flow-through solution) ทิ้ง และนำคอลัมน์ใส่ในหลอดเก็บสารละลาย (collection tube)

2.22 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้เมตริกซ์ (Matrix) ในคอลัมน์แห้ง

2.23 นำคอลัมน์อาร์บี (RB column) ที่แห้งแล้วใส่ในหลอดทดลองใหม่ที่ปราศจาก RNase

2.24 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก Rnase 50 ไมโครลิตรลงตรงส่วนกลางของคอลัมน์ และตั้งทิ้งไว้ให้น้ำดูดซับเข้าสู่เมตริกซ์ (Matrix)ในคอลัมน์เป็นเวลา 3 นาที

2.25 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการชะกรดไรโบนิวคลีอิกบริสุทธิ์ออก (Purified RNA)

2.26 นำสารสกัดที่ได้ (Purified RNA) ใส่ในหลอดทดลองใหม่ และเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

ช่วงที่ 3 การตรวจสอบ RNA ที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis

3.1 นำสารละลายบัฟเฟอร์ (1% TBE buffer) มาอุ่นให้ร้อน จากนั้นเทสารละลายลงในถาดเจล จากนั้นวางหวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องในการหยอดสาร รอให้เจลแข็งตัวจึงนำหวีออก

3.2 นำตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ มาผสมกับสีย้อม (Loading dye) ในอัตราส่วน 4:1 ปริมาตรต่อปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

3.3 จากนั้นนำสารผสมดังกล่าว หยอดลงในช่องว่างบนเจล

3.4 ทำการแยกแถบ RNA ที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Gel Electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.5 จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Gel Star เป็นเวลา 30 นาที

3.6 นำไปส่องดูแถบ RNA ด้วยเครื่อง UV-Transilluminator

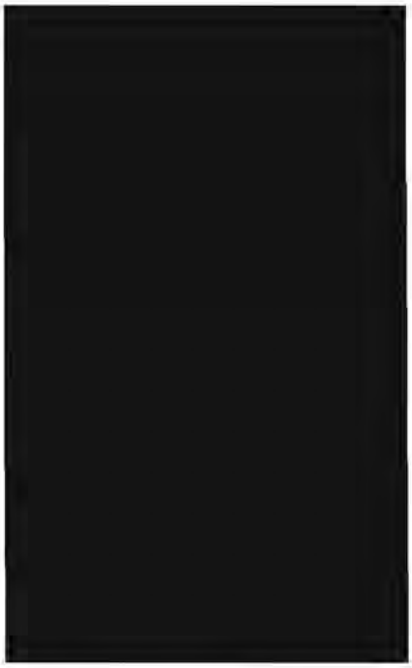
ผลการทดลอง

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

M17843          ----AGGATGGCACTGTGGGCAAAGGCCAGGGTGCGGATGGCAGGGCCCTGGCTGTCCCT 56
AH003250.1      ----AGGATGGCACTGTGGGCAAAGGCCAGGGTGCGGATGGCAGGGCCCTGGCTGTCCCT 56
D00361          GGGCAGGATGGCACTGTGGGCAAAGGCCAGGGTGCGGATGGCAGGGCCCTGGCTGTCCCT 60
                ************************************************************

M17843          GCATGAGGCACGGCTACTGGGCACAAGAGGTGCTGCAGCCCCCAAGGCGGTGCTGCCCTT 116
AH003250.1      GCATGAGGCACGGCTACTGGGCACAAGAGGTGCTGCAGCCCCCAAGGCGGTGCTGCCCTT 116
D00361          GCATGAGGCACGCCTACTGGGCACCAGAGGTGCTGTAGCCCCCAAGGCGGTGCTGCCCTT 120
                ************ *********** *********** *************************

M17843          CGAAGCCATGCCCCGGTGTCCTGGCAACAAGTGGATGCGGATGCTGCAGATCTGGAAGGA 176
AH003250.1      CGAAGCCATGCCCCGGTGTCCTGGCAACAAGTGGATGCGGATGCTGCAGATCTGGAAGGA 176
D00361          CGAAGCCATGCCCCGGTGTCCTGGCAACAAGTGGATGCGGATGCTGCAGATCTGGAAGGA 180
                ************************************************************

M17843          GCAGGGTTCTGAGAACATGCACTTGGACATGCATCAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCCAT 236
AH003250.1      GCAGGGTTCTGAGAACATGCACTTGGACATGCATCAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCCAT 236
D00361          GCAGGGTTCTGAGAACATGCACTTGGACATGCATCAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCCAT 240
                ************************************************************

M17843          TTTCAGGTACGACGTGGGAGGGAGACACATGGTGTTCGTGATGCTGCCCGAGGACGTGGA 296
AH003250.1      TTTCAGGTACGACGTGGGAGGGAGACACATGGTGTTCGTGATGCTGCCCGAGGACGTGGA 296
D00361          TTTCAGGTACGACGTGGGAGGGAGACACATGGTGTTCGTGATGCTGCCCGAGGACGTGGA 300
                ************************************************************

M17843          GAGGCTGCAGCAGGCGGACAGCCATCACCCCCAGCGGATGATCCTGGAGCCCTGGCTGGC 356
AH003250.1      GAGGCTGCAGCAGGCGGACAGCCATCACCCCCAGCGGATGATCCTGGAGCCCTGGCTGGC 356
D00361          GAGGCTGCAGCAGGCGGACAGCCGTCACCCTCAGCGGATGATCCTGGAGCCCTGGCTGGC 360
                ************************ ******* ********************************

M17843          CTACCGACAGGCTCGCGGGCACAAGTGTGGCGTGTTCTTGCTCAACGGGCCCCAGTGGCG 416
AH003250.1      CTACCGACAGGCTCGCGGGCACAAGTGTGGCGTGTTCTTGCTCAACGGGCCCCAGTGGCG 416
D00361          CTACCGACAGGCTCGCGGGCACAAGTGTGGCGTGTTCTTGCTCAATGGGCCCCAGTGGCG 420
                ************************************************ ***************

M17843          TTTGGACCGACTGCGGCTGAACCCAGACGTCCTCTCGCTGCCAGCCCTGCAGAAGTACAC 476
AH003250.1      TTTGGACCGACTGCGGCTGAACCCAGACGTCCTCTCGCTGCCAGCCCTGCAGAAGTACAC 476
D00361          TTTGGACCGACTGCGGCTGAACCCAGACGTCCTCTCGCTGCCAGCCCTGCAGAAGTACAC 480
                ************************************************************

                                                                F3
M17843          GCCCTTGGTGGATGGCGTGGCCAGGGACTTCTCCCAGACCC[redacted]CA 536
AH003250.1      GCCCTTGGTGGATGGCGTGGCCAGGGACTTCTCCCAGACCC[redacted]CA 536
D00361          GCCCTTGGTGGATGGCGTGGCCAGGGACTTCTCCCAGACCC[redacted]CA 540
                ************************************************************

M17843          GAATGCTCGGGGGAGTCTGACCCTGGACATCGCGCCCAGGCTCTTCCGCTACACCATCGA 596
AH003250.1      GAATGCTCGGGGGAGTCTGACCCTGGACATCGCGCCCAGGCTCTTCCGCTACACCATCGA 596
D00361          GAATGCTCGGGGGAGTCTGACCCTGGACATCGCGCCCAGCGTCTTCCGCTACACCATCGA 600
                ****************************************  ********************

M17843          AGCCAGCACCTTAGTCCTTTACGGGGAGCGGCTTGGCCTTTTGACCCAGCAACCAAACCC 656
AH003250.1      AGCCAGCACCTTAGTCCTTTACGGGGAGCGGCTTGGCCTTTTGACCCAGCAACCAAACCC 656
D00361          AGCCAGCACCTTAGTCCTTTACGGGGAGCGGCTTGGCCTTTTGACCCAGCAACCAAACCC 660
                ************************************************************

                                                B3
M17843          TGACAGCCTGAACTTTATCCACGCGCTGGAGGCCATGTTGAAGTCCACCGTGCAGCTCAT 716
AH003250.1      TGACAGCCTGAACTTTATCCACGCGCTGGAGGCCATGTTGAAGTCCACCGTGCAGCTCAT 716
D00361          TGACAGCCTGAACTTTATCCACGCGCTGGAGGCCATGTTGAAGTCCACCGTGCAGCTCAT 720
                ************************************************************

M17843          GTTTGTGCCCAGGCGCCTGTCACGGTGGATGAGCACCAACATGTGGAGGGAGCACTTTGA 776
AH003250.1      GTTTGTGCCCAGGCGCCTGTCACGGTGGATGAGCACCAACATGTGGAGGGAGCACTTTGA 776
D00361          GTTTGTGCCCAGGCGCCTGTCACGGTGGATGAGCACCAACATGTGGAGGGAGCACTTTGA 780
                ************************************************************

M17843          GGCCTGGGACTACATCTTCCAGTATGCCAACAGAGCCATCCAGAGAATCTATCAGGAGCT 836
AH003250.1      GGCCTGGGACTACATCTTCCAGTATGCCAACAGAGCCATCCAGAGAATCTATCAGGAGCT 836
D00361          GGCCTGGGACTACATCTTCCAGTATGCCAACAGAGCCATCCAGAGAATCTATCAGGAGCT 840
                ************************************************************

M17843          GGCCCTCGGCCACCCGTGGCACTACAGCGGCATCGTGGCAGAGCTGCTGATGCGAGCAGA 896
AH003250.1      GGCCCTCGGCCACCCGTGGCACTACAGCGGCATCGTGGCAGAGCTGCTGATGCGAGCAGA 896
D00361          GGCCCTCGGCCACCCGTGGCACTACAGCGGCATCGTGGCAGAGCTGCTGATGCGAGCAGA 900
                ************************************************************

M17843          CATGACCCTGGATACCATCAAGGCCAACACGATCGACCTCACTGCTGGGAGTGTGGACAC 956
AH003250.1      CATGACCCTGGATACCATCAAGGCCAACACGATCGACCTCACTGCTGGGAGTGTGGACAC 956
D00361          CATGACCCTGGATACCATCAAGGCCAACACGATCGACCTCACTGCTGGGAGTGTGGACAC 960
                ************************************************************

M17843          GACAGCCTTCCCCTTGCTGATGACTCTCTTTGAGCTGGCTCGGAACCCGGAGGTGCAGCA 1016
AH003250.1      GACAGCCTTCCCCTTGCTGATGACTCTCTTTGAGCTGGCTCGGAACCCGGAGGTGCAGCA 1016
D00361          GACAGCCTTCCCCTTGCTGATGACTCTCTTTGAGCTGGCTCGGAACCCGGAGGTGCAGCA 1020
                ************************************************************

M17843          GGCGGTGCGCCAGGAGAGCCTCGTGCCTGAGGCCCGGATCTCAGAAAATCCCCAGAGGGC 1076
AH003250.1      GGCGGTGCGCCAGGAGAGCCTCGTGCCTGAGGCCCGGATCTCAGAAAATCCCCAGAGGGC 1076
D00361          GGCGGTGCGCCAGGAGAGCCTGGTGGCTGAGGCCCGGATCTCAGAAAATCCCCAGAGGGC 1080
                ********************** *** ************************************

M17843          CATCACGGAGCTGCCTTTGCTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGAGGCTGTACCCCGT 1136
AH003250.1      CATCACGGAGCTGCCTTTGCTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGAGGCTGTACCCCGT 1136
D00361          CATCACGGAGCTGCCTTTGCTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGAGGCTGTACCCCGT 1140
                ************************************************************
```


128046729

```
M17843          GGGTATCACCTTGGAGCGGGAAGTGAGCTCGGACCTGGTGCTGCAGAACTACCACATCCC 1196
AH003250.1      GGGTATCACCTTGGAGCGGGAAGTGAGCTCGGACCTGGTGCTGCAGAACTACCACATCCC 1196
D00361          GGGTATCACCTTGGAGCGGGAAGTGAGCTCGGACCTGGTGCTGCAGAACTACCACATCCC 1200
                ************************************************************

M17843          AGCTGGGACGCTGGTGAAGGTCCTACTCTATTCCCTGGGTCGAAACCCCGCCGTGTTCGC 1256
AH003250.1      AGCTGGGACGCTGGTGAAGGTCCTACTCTATTCCCTGGGTCGAAACCCCGCCGTGTTCGC 1256
D00361          AGCTGGGACGCTGGTGAAGGTCCTACTCTATTCCCTGGGTCGAAACCCCGCCGTGTTCGC 1260
                ************************************************************

M17843          CAGGCCTGAGAGCTATCACCCCCAGCGCTGGCTGGACCGCCAGGGCTCTGGAAGCAGATT 1316
AH003250.1      CAGGCCTGAGAGCTATCACCCCCAGCGCTGGCTGGACCGCCAGGGCTCTGGAAGCAGATT 1316
D00361          CAGGCCTGAGAGCTATCACCCCCAGCGCTGGCTGGACCGCCAGGGCTCTGGAAGCAGATT 1320
                ************************************************************

M17843          CCCGCACCTGGCCTTTGGCTTTGGCGTACGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCGTGGCTGAGGT 1376
AH003250.1      CCCGCACCTGGCCTTTGGCTTTGGCGTACGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCGTGGCTGAGGT 1376
D00361          CCCGCACCTGGCCTTTGGCTTTGGCGTACGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCGTGGCCGAGGT 1380
                ************************************************************

M17843          GGAGATGCTGCTCCTGCTGCACCATGTGCTGAAGAACTTCCTGGTGGAGACACTGGAGCA 1436
AH003250.1      GGAGATGCTGCTCCTGCTGCACCATGTGCTGAAGAACTTCCTGGTGGAGACACTGGAGCA 1436
D00361          GGAGATGCTGCTCCTGCTGCACCATGTGCTGAAGAACTTCCTGGTGGAGACACTGGAGCA 1440
                ************************************************************

M17843          AGAGGACATAAAGATGGTCTACCGCTTCATACTGATGCCCTCCACCCTGCCCCTCTTCAC 1496
AH003250.1      AGAGGACATAAAGATGGTCTACCGCTTCATACTGATGCCCTCCACCCTGCCCCTCTTCAC 1496
D00361          AGAGGACATAAAGATGGTCTACCGCTTCATACTGATGCCCTCCACCCTGCCCCTCTTCAC 1500

                ************************************************************
```

รูปที่ 15 แสดงการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 11-Beta Hydroxylase ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W



รูปที่ 16 แสดงแถบ RNA จากการทำ 1% Gel Electrophoresis

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษายีน 11-Beta Hydroxylase จากฐานข้อมูล NCBI ทำให้สามารถออกแบบ Forward primer คือ 5' TGAAGGCGAGGGTGCTG 3' และ Reverse primer คือ 5' ACTTCAACATGGCCTCCAG 3' ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีนที่สนใจ จากนั้นทำการสกัด RNA จากตัวอย่างเลือด และทดสอบ RNA ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค **Gel Electrophoresis** พบว่า มี RNA อยู่ในตัวอย่างเลือดวัว ซึ่งสามารถนำสารสกัด RNA มาสังเคราะห์ cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณและศึกษาความจำเพาะของไพร์เมอร์ต่อไป

การดำเนินงานในขั้นตอนต่อไปในปีที่ 3

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือด และทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ด้วยเทคนิค Real-time PCR

3.3 การใช้เทคนิคทาง Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometer ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันในเม็ดเลือดแดงของวัว

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

ช่วงที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือดวัวตัวผู้ พันธุ์ลูกผสมบราห์มันและชาร์โรเล่ส์เพื่อตรวจวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันในเม็ดเลือดแดงของวัวด้วยเทคนิคทาง FTIR spectrometer

1.1 เก็บตัวอย่างเลือดวัวจากโรงฆ่าสัตว์จังหวัดนนทบุรีและปทุมธานี ตามที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 1 โดยนำเลือดวัวสดที่ได้เก็บในหลอดทดลองที่มีสาร heparin เป็นองค์ประกอบแล้วนำไปเก็บในกล่องทำความเย็นที่มีอุณหภูมิต่ำ

1.2 เมื่อกลับมาถึงห้องปฏิบัติการให้นำตัวอย่างเลือดวัวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงทันทีโดยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกชั้นพลาสมาและเม็ดเลือดแดงออกจากกัน

1.3 ดูดตัวอย่างเม็ดเลือดแดงที่แยกชั้นมาใส่ในหลอดทดลองหลังจากนั้นล้างเม็ดเลือดแดงด้วย 0.9% Normal Saline แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงทันทีโดยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำในลักษณะเดียวกันจนกว่าสารละลายส่วนบนใสนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน

ช่วงที่ 2 การเตรียมตัวอย่างเม็ดเลือดแดงก่อนนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง FTIR spectrometer

2.1 นำเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิ -80 °C วางในอุณหภูมิห้อง

2.2 ดูดตัวอย่างเม็ดเลือดแดง ปริมาตร 20 µl ใส่ในmicro tube ที่มีสารละลาย0.2% KSCN ปริมาตร 180 µl

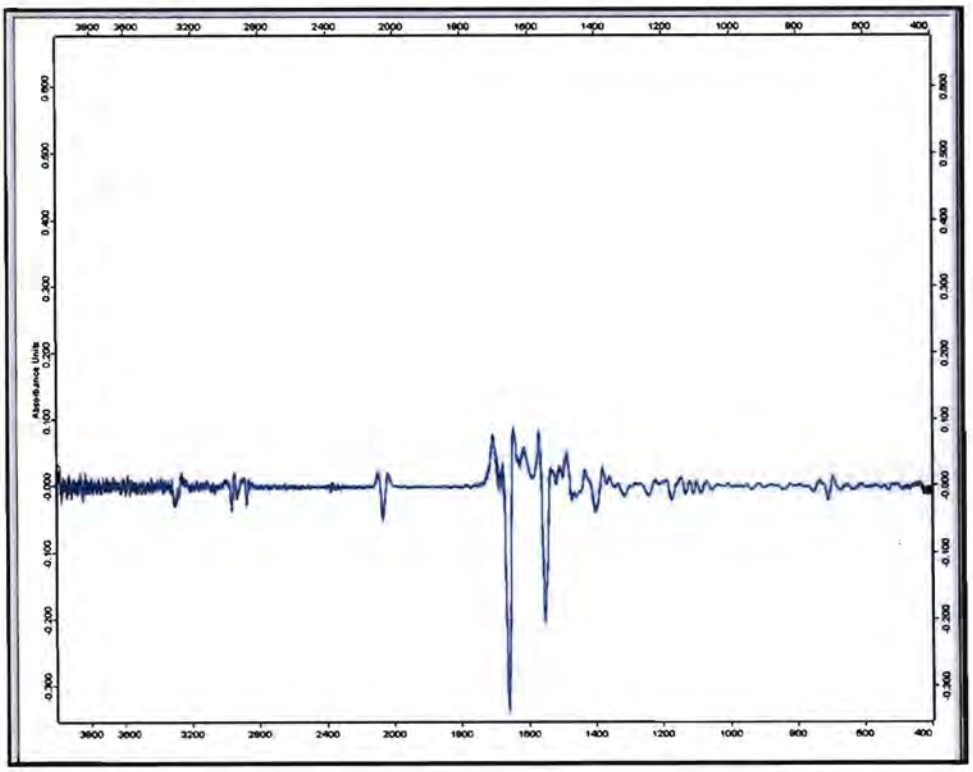
2.3 ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่อง vortex

2.4 ดูดสารตัวอย่าง 10 µl ลงใน silica mirror plate เกลี่ยสารตัวอย่างให้ทั่ว

2.5 นำไปใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อให้ตัวอย่างแห้งอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

2.6 นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง FTIR spectrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) เพื่อวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันในตัวอย่าง

ผลการทดลอง



รูปที่ 17 ค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของอนุพันธ์ลำดับที่สอง (Secondary derivatives) ของ C-H stretching ของเม็ดเลือดแดงที่แยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method และ Non-Islamic method

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหมู่ฟังก์ชันของวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method และ Non-Islamic method

Functional groups	Islamic Method	Non-Islamic Method
1. Olefinic= CH stretching, v= (CH)	0.016 ± 0.003*	0.024 ± 0.013
2. CH_3 asym. streching, $v_{as}(CH_3)$	0.478 ± 0.061*	0.580 ± 0.043
3. CH_2 asym. streching, $v_{as}(CH_2)$	0.400 ± 0.050*	0.450 ± 0.036
4. CH_3 sym. Streching, $v_s(CH_3)$	0.256 ± 0.034*	0.287 ± 0.016
5. CH_2 sym. streching, $v_s(CH_2)$	0.040 ± 0.031	0.038 ± 0.002

Values are expressed as the mean ± SD ***P< 0.05** Islamic Method **vs** Non-Islamic Method

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของอนุพันธ์ลำดับที่สองที่ได้จากการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงด้วยเทคนิคทาง FTIR spectrophotometer ถูกนำมาใช้ระบุความแตกต่างของ C-H stretching ที่เกิดขึ้นบนโมเลกุลของเม็ดเลือดแดงที่แยกได้จากวัว**ที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method และ Non-Islamic method (รูปที่ 17)** จากตารางที่ 1 เม็ดเลือดแดง**ที่แยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method** พบว่า C-H stretching ของ phospholipids **มีค่าเฉลี่ย** Olefinic v= (CH) (0.016 ± 0.003), v_{as} **(CH_3)** (0.478 ± 0.061), v_{as} **(CH_2)** (0.400 ± 0.050), v_s **(CH_3)** (0.256 ± 0.034), v_s **(CH_2)** (0.040 ± 0.031) **ในขณะที่**เม็ดเลือดแดง**ที่แยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Non-Islamic method** พบว่า C-H stretching ของ phospholipids **มีค่าเฉลี่ย** Olefinic v= (CH) (0.024 ± 0.013), v_{as} **(CH_3)** (0.580 ± 0.043), v_{as} **(CH_2)** (0.450 ± 0.036), v_s **(CH_3)** (0.287 ± 0.016), v_s **(CH_2)** (0.038 ± 0.002) **ตามลำดับ**

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย C-H stretching **ของหมู่ฟังก์ชั่นจากเม็ดเลือดแดงของวัวทั้งสองกลุ่ม** พบว่า Olefinic v= (CH), v_{as} **(CH_3)**, v_{as} **(CH_2)** และ v_s **(CH_3)** **มีความแตกต่างในวัวทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (*p-value* < 0.05)** โดยค่าเฉลี่ยC-H stretching **ของหมู่ฟังก์ชั่นจากเม็ดเลือดแดงแยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Islamic method มีแนวโน้มต่ำกว่าค่าเฉลี่ย** C-H stretching **ของหมู่ฟังก์ชั่นจากเม็ดเลือดแดงแยกได้จากวัวที่ผ่านการเชือดแบบ Non-Islamic method**

เอกสารอ้างอิง

Blahova, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Kalab, P. 2007. Simultaneous determination of plasma cortisol by high performance liquid chromatography and radioimmunoassay methods in fish. **Acta Veterinaria Brno** 76: 59–64.

Hagen, I.J., Kusakabe, M., Young, G. 2006. Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11β-hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production. **General and Comparative Endocrinology** 145:254–262.

Izquierdo-Hornillos, R., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., 2005. Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: Application to urine samples of rugby players. **Journal of Chromatographic Science** 43.

Mostl, E., Mesmann, S., Bagu, E., Robia, C., Palme, R., 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. **Journal of Veterinary Medicine** 46:621-631.

Palme, R., Robia, C., Mesmann, S., Hofer, J., Mostl, E. 1999. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. **Wien. Tieraeztl. Mschr.** 86: 237- 241.

Viljoen, F.P., Brand, .L, Smit, E.J., 2012. An optimized method for the analysis of corticosterone in rat plasma by UV-HPLC. **Medical Technology South Africa** 26:2.