บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ศาสนาอิสลามกับอาหารฮาลาล

อาหารถือได้ว่าเป็นสิ่งที่สำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ และเป็นหนึ่งในปัจจัย 4 ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพ โดยอาหารที่นำมาบริโภคนั้นต้องไม่เป็นพิษหรือบั่นทอนสุขภาพอนามัย เนื่องจากอาหารนั้นควรหมายถึงสิ่งที่บริโภคและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งการบริโภคอาหารโดยทั่วไปในแต่ละมื้อควรจะบริโภคสารอาหารให้ครบทั้ง 5 หมู่ คือ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ ซึ่งถือได้ว่าเป็นสารอาหารที่จำเป็นและมีประโยชน์ต่อร่างกาย สำหรับมุสลิมการบริโภคอาหารนอกจากให้ครบสารอาหารดังกล่าวแล้วยังต้องถือปฏิบัติภายใต้บทบัญญัติของศาสนาอิสลามอย่างเคร่งครัดอีกด้วย อาหารที่อนุญาตให้มุสลิมรับประทานได้จะเรียกว่า อาหารฮาลาล ซึ่งเป็นอาหารซึ่งมีลักษณะตามที่กำหนด และกล่าวอ้างไว้ในคัมภีร์อัลกุรอ่าน และอัลหะดีษ หลักการของศาสนาอิสลามที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคอาหารจึงไม่ใช่เป็นเพียงแต่ความเชื่อ แต่เป็นเหตุผลที่สามารถพิสูจน์ได้ในทางวิทยาศาสตร์ อาหารฮาลาลไม่เพียงแต่มีประโยชน์กับชาวมุสลิมเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์กับผู้บริโภคทุกเชื้อชาติศาสนา อาหารฮาลาลจึงมีความสำคัญทั้งต่อผู้บริโภคในประเทศ และการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ในการผลิตอาหารฮาลาลนอกจากจะคำนึงถึงความสะอาด ปลอดภัย สำหรับผู้บริโภคแล้ว ผู้ผลิตยังต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการบทบัญญัติต่าง ๆ ในการบริโภคอาหารของมุสลิมด้วย เพื่อที่จะผลิตอาหารให้ได้คุณภาพ และมาตรฐานตามที่กำหนดไว้ และเพื่อให้อุตสาหกรรมอาหารฮาลาลไทยเป็นที่ยอมรับในตลาดโลก

1.1 แนวคิดเกี่ยวกับการปฏิบัติตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม

การปฏิบัติตามตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามเป็นหน้าที่ที่มุสลิม ทุกคนต้องพึงปฏิบัติ ไม่ว่าอาศัยอยู่ ณ ที่แห่งใดก็ตาม ซึ่งการปฏิบัติตามบทบัญญัติถือเป็นเรื่องสำคัญมาก เนื่องจากมุสลิมมีความผูกพันอยู่กับอิสลามอย่างแน่นแฟ้น โดยโลกทัศน์ของอิสลามนั้นยืนอยู่บนรากฐานของ "เอกภาพในพระเจ้า" ที่มุ่งสู่หลักการการรวมเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ทำให้อิสลามไม่แยกเป็นเรื่องของทางโลก และเรื่องของศาสนาออกจากกัน ดังนั้นบทบัญญัติของอิสลามจึงครอบคลุมถึงทุกอย่างของกิจกรรมของมนุษย์ และพฤติกรรมของมุสลิมจะต้องอยู่ในกรอบของบทบัญญัติอยู่เสมอ ด้วยเหตุนี้อิสลามจึงไม่ใช่เป็นศาสนาในความหมายที่แคบ ๆ และไม่ใช่เป็นอุดมการณ์ แต่อิสลามมีนัยครอบคลุมระบบชีวิตทั้งหมด รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับพระเจ้าและมนุษย์กับสิ่งทั้งมวลในโลก และด้วยนัยดังกล่าว ในคัมภีร์อัลกุรอ่านจึงไม่เพียงแต่จะ

เกี่ยวข้องกับด้านความเชื่อหรือการเคารพภักดีต่อพระเจ้าเท่านั้น แต่จะเกี่ยวข้องกับด้านสังคม เศรษฐกิจ และการเมืองด้วย เช่นเดียวกันกับเรื่องของการบริโภคอาหาร ได้มีบทบัญญัติเกี่ยวกับการอนุญาต และห้ามในการบริโภคในสิ่งต่าง ๆ ซึ่งมุสลิมทุกคนต้องถือปฏิบัติให้ถูกต้องตามศาสนบัญญัติอย่างเคร่งครัด

อัลกุรอ่านเป็นวิสามัญนามของคัมภีร์อิสลาม เนื้อหาในอัลกุรอ่านได้สอนถึงความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับพระเจ้า และความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์ด้วยกันในอัลกุรอ่านมีเนื้อหาสาระซึ่งพร้อมด้วยสรรพศาสตร์และวิทยาการที่ประสาทความรู้และเพิ่มพูนสติปัญญา ซึ่งอัลกุรอานได้ถูกประทานลงมาเพื่อเป็นสัจธรรมสำหรับมนุษย์ เพื่อเป็นทางนำสำหรับผู้สำรวมตน จากความชั่ว รวมทั้งเพื่อให้เป็นข้อตัดสินระหว่างมนุษย์ในเรื่องที่พวกเขาขัดแย้งกัน อัลหะดิษ คือรายงานที่รวบรวมแบบอย่างหรือแนวทางเกี่ยวเนื่องกับการอธิบายคำสอนในอัลกุรอ่านของท่านบรมศาสดามูฮำหมัด โดยผ่านทางคำพูด และการกระทำของท่าน ซึ่งมีความสำคัญมาก อัลหะดิษถือเป็นแบบอย่างในทางปฏิบัติ เป็นการชี้นำแนวคิดและค่านิยม อันเป็นผลจากการที่ศาสดามูฮำหมัดได้นำเอาความเชื่อ ความศรัทธาที่มีต่ออัลเลาะห์ (ซบ.) ซึ่งมีลักษณะเป็นทฤษฎีแปลออกมาเป็นพฤติกรรมทางปฏิบัติ เพื่อให้มุสลิมสามารถนำเอาอิสลามมาใช้ในการดำเนินชีวิตได้อย่างถูกต้อง

1.2 หลักการและบทบัญญัติของศาสนาอิสลามเกี่ยวกับอาหารฮาลาล

ฮาลาล (Halal) เป็นคำในภาษาอาหรับแปลว่า ถูกต้องตามกฎ (Lawful) หรืออนุญาต (Permit) ซึ่งตรงข้ามกับคำว่า ฮะรอม (Haram) ซึ่งแปลว่าผิดกฎหมาย (Unlawful) หรือต้องห้าม (Prohibit) โดยในการที่จะชี้ลงไปว่าอาหารอะไรเป็นสิ่งอนุญาตหรือสิ่งต้องห้ามนั้น ได้มีหลักการทางศาสนาที่ใช้เป็นแกนในการพิจารณา คือ บทบัญญัติของอัลเลาะห์ (ซบ.) ที่ประทานลงมาในคัมภีร์อัลกุรอ่าน ซึ่งสามารถแบ่งเป็นเกณฑ์ได้ดังนี้

หลักการข้อที่หนึ่ง

สัตว์ทุกชนิดที่ชาวอาหรับเห็นว่ารับประทานได้ในยามปกติสุข และในยุคของท่านบรมศาสดามูฮำหมัด (ซล.) มีการรับประทาน ถือว่าสิ่งนั้นศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ ซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้คือ

ก. สัตว์ที่มีชีวิตอยู่ในน้ำเท่านั้น ได้แก่ พวกปลาทุกชนิด ไม่ว่าจะมีชื่อเรียกว่าอะไรก็ตาม ถือว่าเป็นสิ่งฮาลาล เนื่องจากชาวอาหรับถือว่าเป็นสิ่งน่ารับประทาน

ข.สัตว์ที่ชาวอาหรับพิจารณาแล้วว่ารับประทานได้และมีบัญญัติให้สามารถรับประทานได้ สัตว์เหล่านั้นสามารถรับประทานได้ซึ่งได้แก่ อูฐ วัว แพะ แกะ ม้า กระต่าย เก้ง เป็นต้น แต่สำหรับสัตว์ที่ชาวอาหรับมีความเห็นว่ารับประทานได้ แต่มีบทบัญญัติห้ามรับประทาน

ก็ไม่อนุญาตให้รับประทาน เช่น ล่อ และ ลา เป็นต้น ส่วนในกรณีของสัตว์ที่เกิดจากการผสมระหว่างสัตว์ที่ศาสนาอนุญาตให้รับประทานและสัตว์ที่ศาสนาไม่อนุญาตให้รับประทานนั้น เช่น ล่อซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างม้า และ ลา ศาสนาอิสลามไม่อนุญาตให้รับประทาน สำหรับสัตว์ทุกชนิดที่ชาวอาหรับในสมัยท่านบรมศาสดามูฮำหมัด (ซล.) มีความเห็นว่าสกปรก เช่น พวกสัตว์เลื้อยคลาน ถือเป็นสิ่งที่ศาสนาห้ามรับประทาน โดยทั้งนี้ได้มีการยกเว้นสำหรับสัตว์ที่มีการระบุอย่างชัดเจนว่าอนุญาตให้รับประทานได้ เช่น จิงโจ้ แย้ ซัมมูร (สัตว์รูปร่างคล้ายแมว) วับร์ (สัตว์ชนิดหนึ่งตัวเล็กกว่าแมว เบ้าตามีสีดา ไม่มีหาง) อิบนุ อัรส์ (สัตว์ชนิดหนึ่งตัวเล็ก เป็นศัตรูกับหนู สามารถจับหนูออกมาจากรูได้) สามารถรับประทานได้

ทั้งนี้การที่ได้นำประเพณีนิยมของชาวอาหรับมาพิจารณาในเรื่องสิ่งที่อนุญาต (ฮาลาล) และไม่อนุญาต (ฮะรอม) ในการรับประทานนั้น เนื่องจากพวกอาหรับเหล่านี้เป็นกลุ่มแรกที่ถูกบัญชาด้วยบัญญัติของศาสนา รวมทั้งท่านบรมศาสดามูฮำหมัด (ซล.) ได้ถูกแต่งตั้งมาในหมู่พวกเขา และคัมภีร์อัลกุรอ่านได้ถูกประทานมาในหมู่พวกเขาเป็นอันดับแรก

หลักการข้อที่สอง

ห้ามรับประทานสัตว์ที่ดุร้าย ซึ่งได้แก่ สัตว์ที่มีเขี้ยวงาแข็งแรง และใช้เขี้ยวงาทำร้าย เช่น สุนัข สุกร หมาป่า หมี แมว เสือ และลิง เป็นต้น รวมทั้งห้ามรับประทานนกทุกชนิดที่มีกงเล็บที่แข็งแรง โดยสามารถใช้กงเล็บนั้นทำร้ายได้ เช่น เหยี่ยวชนิดต่าง ๆ นกอินทรีย์ เป็นต้น สาเหตุที่ห้ามรับประทานสัตว์ร้ายและนกเหล่านี้ เนื่องจากสัตว์เหล่านี้รับประทานซากสัตว์ที่ตาย จึงทำให้เป็นสัตว์ที่สกปรกไปด้วย

หลักการข้อที่สาม

ห้ามรับประทานสัตว์ที่ปรากฏชัดว่าเป็นอันตราย เช่น งู แมงป่อง อีกา เหยี่ยว หนู เป็นต้น

นอกจากหลัก 3 ข้อดังกล่าวมาแล้ว บทบัญญัติของศาสนาได้ห้ามรับประทานซากสัตว์ ไม่ว่าจะตายด้วยสาเหตุใดก็ตาม โดยซากสัตว์ในที่นี้มีความหมายคือ สัตว์ที่เสียชีวิตโดยไม่ได้ทำการเชือดอย่างถูกต้องตามบัญญัติศาสนา ไม่ว่าจะเสียชีวิตเองหรือตายด้วยการกระทำของผู้อื่น เช่น ทุบตี หรือ รัดคอ จมน้ำ เป็นต้น รวมทั้งได้ห้ามรับประทานเลือดสัตว์ทุกชนิดด้วย ทั้งนี้มีข้อยกเว้นสำหรับ ปลา และตับแดนที่ตาย ศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ เพราะได้รับการยกเว้นจากการเป็นซากสัตว์ที่ห้ามรับประทาน รวมทั้งตับและม้ามถือเป็นเลือดที่ ศาสนาอนุญาตให้รับประทานได้ ข้อกำหนดที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น สามารถยกเว้นได้ในกรณีของผู้ที่ตกอยู่ในยามคับขัน โดยศาสนาได้อนุญาตให้รับประทานเพียงพอที่จะประทังชีวิตให้สามารถดำรงชีวิตต่อไป

1.3. วิธีการเชือดหรือฆ่าสัตว์ตามหลักการศาสนาอิสลาม

ในการเชือดสัตว์ตามหลักการของศาสนาอิสลามนั้นต้องมีการเชือดที่ถูกต้องตามบทบัญญัติของศาสนา และสัตว์ที่ถูกเชือดต้องเป็นสัตว์ที่รับประทานได้ตามบัญญัติของศาสนาด้วย เงื่อนไขเกี่ยวกับตัวผู้เชือด มีดังนี้ ผู้เชือดต้องเป็นมุสลิมหรือเป็นผู้ศรัทธาในคัมภีร์ ถ้าหากผู้เชือดไม่ได้เป็นมุสลิม และไม่ได้เป็นผู้ศรัทธาในคัมภีร์ สัตว์ที่เขาเชือดไม่อนุญาตให้รับประทานได้ ผู้เชือดจะต้องเป็นผู้นับถือศาสนาคริสต์หรือยิวตั้งแต่ดั้งเดิม คือมีบรรพบุรุษที่นับถือศาสนาดังกล่าวมาตั้งแต่เริ่มแรก โดยไม่ใช่เป็นผู้ที่เปลี่ยนเข้ามานับถือใหม่ และผู้เชือดจะต้องไม่เชือดสัตว์เพื่อสิ่งอื่นนอกจากอัลเลาะห์ (ซบ.) หรือเอ่ยนามอื่นนอกจากนามของอัลเลาะห์ (ซบ.)

เงื่อนไขเกี่ยวกับสัตว์ที่ถูกเชือด คือ สัตว์ที่จะถูกเชือดนั้น ต้องอยู่ในสภาพที่มีชีวิตอยู่อย่างมั่นคง ถ้าหากทำการเชือดสัตว์ที่อยู่ในสภาพอ่อนเปลี้ยเหมือนสัตว์ใกล้ตาย ไม่ถือว่าเป็นการเชือดที่ถูกต้องตามบัญญัติศาสนาและไม่อนุญาตให้รับประทาน ต้องตัดหลอดลมและหลอดอาหารให้ขาด ถ้าหากตัดหลอดลมและหลอดอาหารไม่ขาด สัตว์ตัวนั้นก็ไม่อนุญาตให้รับประทาน ต้องรีบตัดหลอดเลือดและหลอดลมให้ขาดเพียงครั้งเดียว โดยถ้าหากผู้เชือดทำการเชือดอย่างช้า ๆ จนสัตว์ที่ถูกเชือดอยู่ในสภาพอ่อนเปลี้ยใกล้ตาย ก่อนที่จะตัดหลอดลมและหลอดอาหารจนขาดหมด สัตว์ที่ถูกเชือดนั้นไม่อนุญาตให้รับประทานได้ ทั้งนี้การที่จะทราบว่าสัตว์ที่ถูกเชือดอยู่ในสภาพที่มีชีวิตอยู่อย่างมั่นคงหรือเป็นสัตว์ที่อ่อนเปลี้ยใกล้ตาย ให้พิจารณาจากลักษณะการดิ้น สัตว์ที่มีชีวิตอย่างมั่นคงภายหลังที่ถูกเชือดแล้ว จะมีการดิ้นอย่างรุนแรง ส่วนสัตว์ที่มีสภาพอ่อนเปลี้ยนั้น เมื่อถูกเชือดแล้วจะไม่สามารถดิ้นได้

เงื่อนไขที่เกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้เชือด เครื่องมือที่ใช้เชือดต้องทำให้เกิดบาดแผลด้วยคมของเครื่องมือที่ใช้ ไม่ว่า เครื่องมือนั้นจะเป็นเหล็ก ทองแดง ตะกั่ว หรือสิ่งใดก็ตาม ดังนั้น การทุบสัตว์ให้ตายโดยใช้ก้อนหินหรือสิ่งอื่นใดที่ไม่มีคม ไม่ถือว่าเป็นการเชือดที่ถูกต้องตามบัญญัติของศาสนาอิสลาม เครื่องมือที่ใช้ในการเชือดจะต้องไม่ใช่เป็นฟันและเล็บ (โดยกระดูกทุกชนิดของมนุษย์และสัตว์รวมอยู่ในคำว่าฟันและเล็บด้วย) (1)

2. มาตรฐานและการผลิตอาหารฮาลาล

การผลิตอาหารฮาลาลมีความสำคัญต่อผู้บริโภค ทั้งที่เป็นมุสลิม และผู้บริโภคศาสนาอื่นๆ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศในแง่การส่งออก เนื่องจากประเทศที่นับถือศาสนาอิสลามมีมากกว่าร้อยประเทศ และประชากรมุสลิมทั่วโลกมีจำนวนกว่า 2000 ล้านคน หรือประมาณ 1 ใน 4 ของประชากรโลก สำหรับในประเทศไทยมีชาวมุสลิมราว 10

ล้านคนเศษ ซึ่งผู้บริโภคกลุ่มนี้มักจะประสบกับปัญหาการตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากไม่มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีกระบวนการผลิตถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลามที่เรียกว่า ฮาลาล และถูกสุขลักษณะปลอดภัยปราศจากการปนเปื้อนต่อการบริโภคหรือไม่ ประกอบกับนโยบายของรัฐบาลที่ต้องการผลักดันให้ประเทศไทยเป็นครัวของโลก ผู้ประกอบการไทยจึงจำเป็นต้องสร้างความมั่นใจ และดำเนินการให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภคชาวมุสลิม ดังนั้นการผลิตอาหารฮาลาลไทยในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออก ในการผลิตและการประกอบอาหารฮาลาลนั้นจะต้องเป็นไปตามหลักการที่ถูกต้องตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม จะต้องแยกสถานที่ผลิต กระบวนการผลิต สถานที่เก็บรักษาให้เป็นคนละส่วนกับการผลิตอาหารที่ไม่ฮาลาล ป้องกันไม่ให้เกิดการปนหรือมีการสัมผัสใดๆ ระหว่างอาหารฮาลาลและอาหารไม่ฮาลาล ในขั้นตอนการเตรียมการผลิต กระบวนการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษาอาหารที่ฮาลาลนั้น จะต้องมีการตรวจสอบอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตทุกขั้นตอน ทั้งนี้เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดในเรื่องของความสะอาด และต้องมีมาตรฐานในระดับสากล เพื่อที่จะทำให้อาหารฮาลาลไทยสามารถแข่งขันได้ในระดับโลก มาตรฐานคุณภาพที่เกี่ยวข้องกับอาหารฮาลาล ที่มีอยู่แล้วและอยู่ในระหว่างการพัฒนาหรือการรอการยืนยันการใช้งาน ได้แก่ มาตรฐานของคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารของ FAO/WHO ที่เรียกว่า Codex Alimentarius, มาตรฐานฮาลาลจีเอ็มพี/เอชเอซีซีพี (Halal GMP/HACCP), ร่างมาตรฐานฮาลาลอาเซียน และมาตรฐานฮาลาลัน ตอยยีบา

2.1.มาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius)

การดำเนินการเพื่อให้การจัดเตรียมอาหารฮาลาลในทางอุตสาหกรรมมีมาตรฐานเป็นไปตามมาตรฐานสากล(ในความหมายที่กำหนดโดยโลกตะวันตก) เริ่มมานานหลายปีสำเร็จลงเมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2540 ผู้รับหน้าที่ในจัดทำคือคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศหรือ Codex Alimentarius Commission (CAC) ซึ่งเป็นหน่วยงานของคณะทำงานร่วมทางด้านอาหารขององค์การอนามัยโลก(World Health Organization หรือ WHO) และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ(Food and Agriculture Organization หรือ FAO) มีประเทศที่เป็นภาคีสมาชิกของหน่วยงานในขณะนั้น 162 ประเทศ และในปี พ.ศ. 2542 เพิ่มเป็น 165 ประเทศ โคเด็กซ์จึงเป็นองค์กรระหว่างประเทศที่มีบทบาทสำคัญในด้านการวางมาตรฐานและการควบคุมอาหาร ตลอดจนสภาวะการณ์ด้านการค้าของตลาดโลกที่กำลังเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะเป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับการค้าระหว่างประเทศในปัจจุบันและอนาคต การทำงานของโคเด็กซ์มีเป้าหมายเพื่อจัดระเบียบ ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารทั่วทั้งโลกมีมาตรฐานอย่าง

เดียวกัน ทำให้ง่ายต่อการควบคุม และเป็นที่ยอมรับของประเทศต่างๆ วัตถุประสงค์ที่แท้จริงของโคเด็กซ์ คือการคุ้มครองสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค และเพื่อให้เกิดความเป็นธรรมในด้านการค้าระหว่างประเทศ นอกจากนี้บ่อยครั้งโคเด็กซ์ยังถูกใช้เป็นเวทีระงับข้อพิพาททางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย

โคเด็กซ์จัดแบ่งการดำเนินงานออกเป็น 5 ภูมิภาคทั่วโลก ได้แก่ กลุ่มยุโรป กลุ่มละตินอเมริกาและเคริบเบียน กลุ่มอาฟริกา กลุ่มเอเชีย กลุ่มอเมริกาเหนือและแปซิฟิคตะวันตกเฉียงใต้ จัดแบ่งมาตรฐานอาหารออกเป็น 2 หมวด คือเรื่องทั่วไปซึ่งมี 8 สาขา และหมวดมาตรฐานอาหารที่เป็นสินค้า ซึ่งมี 17 สาขา ในกรณีของมาตรฐานฮาลาล โคเด็กซ์กำหนดงานนี้ไว้ในหมวดเรื่องทั่วไปในสาขา"ฉลากอาหาร" โดยร่างของเรื่องนี้ถูกเสนอเข้าสู่โคเด็กซ์ ผ่านทางโคเด็กซ์กลุ่มเอเชียซึ่งมีแนวทางของโคเด็กซ์รวมทั้งสิ้น 8 ขั้นตอนการพิจารณาเรื่องมาตรฐานฮาลาลทำกันอย่างละเอียดและรอบคอบจนกระทั่งมีการรับรองร่างในที่สุดก่อนที่จะมีการประกาศใช้โดยแต่ละประเทศสมาชิกต่อไป

ในการรวบรวมข้อมูลเรื่องฮาลาลดังกล่าวองค์กรตัวแทนของโคเด็กซ์ในแต่ละประเทศได้ส่งร่างมาตรฐานที่จัดทำขึ้น โดยโคเด็กซ์ให้นักวิชาการทางศาสนาอิสลามในประเทศของตนตรวจสอบและแก้ไข ในกรณีของประเทศไทยองค์กรตัวแทนของโคเด็กซ์ในประเทศไทยคือสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม(สมอ.) กระทรวงอุตสาหกรรม ได้ส่งร่างมาตรฐานนี้ให้สำนักจุฬาราชมนตรียุคท่านประเสริฐ มะหะหมัด (ซึ่งล่วงลับไปแล้ว) ขณะดำรงตำแหน่งจุฬาราชมนตรี เป็นผู้ตรวจสอบและแก้ไขเมื่อปลายปี พ.ศ. 2539 มาตรฐานอาหารฮาลาลใช้เวลาในการดำเนินการเริ่มตั้งแต่ขั้นการผลักดันในการประชุมกลุ่มย่อย จนกระทั่งถึงขั้นตอนสุดท้ายคือการรับรองจากคณะกรรมการโคเด็กซ์ยาวนานถึง 15 ปี กระทั่งในที่สุดได้รับการยกขึ้นเป็นมาตรฐานของโคเด็กซ์ จึงนับเป็นครั้งแรกที่หลักการในศาสนาอิสลามถูกเรียบเรียงและ กำหนดเป็นมาตรฐาน ในทางสากลอย่างเป็นทางการ เนื่องจากอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารทั่วโลกมีอยู่มากมาย ผลิตภัณฑ์ในแต่ละประเทศใช้มาตรฐานแตกต่างกัน การสร้างมาตรฐานร่วมกันจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้บริโภคทั่วโลกช่วยกันเพื่อสร้างความสะดวกในทางการค้าระหว่างประเทศ

มาตรฐานโคเด็กซ์จะกล่าวถึงข้อเสนอแนะทั่วไป และมาตรการในการดำเนินการสำหรับการใช้คำ "ฮาลาล" หรือคำอื่นที่เทียบเท่าเพื่ออวดอ้างบนฉลากอาหาร ตามที่กำหนดในมาตรฐานทั่วไปสำหรับการแสดงฉลากของอาหารบรรจุหีบห่อ (General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods) และรวมถึงการใช้เครื่องหมายการค้าชื่อยี่ห้อและชื่อทางธุรกิจ และใช้เป็นส่วนเสริมของร่างข้อแนะนำทั่วไปสำหรับการอวดอ้างฉบับแก้ไข (Draft Revision of the Codex General Guidelines on Claims) แต่ไม่สามารถใช้แทนข้อห้ามใดๆ ในร่าง

ข้อแนะนำดังกล่าวได้ มาตรฐานฮาลาลภาคภาษาไทยเป็นการถอดความหมายของมาตรฐานฮาลาลโคเด็กซ์จากภาษาอังกฤษ ซึ่งจัดแปลโดย สมอ. กระทรวงอุตสาหกรรม ข้อแนะนำนี้ได้รับการรับรองแล้วจากคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ โดยทั่วไปแล้วจะอ้างอิงจากบทบัญญัติทางศาสนา แต่คณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) ยอมรับว่าอาจมีความแตกต่างเล็กน้อยทางด้านความคิดในการแปลความหมายของสัตว์ที่ฆ่าถูกกฎตามกฎหมายว่าด้วยการฆ่าสัตว์ของศาสนาอิสลาม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างด้านความคิดของสำนักคิดทางศาสนาอิสลาม (Islamic School of Thought) ซึ่งทางมาตรฐานโคเด็กซ์นี้ได้ให้คำนิยามของอาหารฮาลาลเพิ่มเติมจากบทบัญญัติของศาสนาอิสลามดังนี้

อาหารฮาลาล หมายถึง อาหารที่ได้รับอนุญาตตามบทบัญญัติศาสนาอิสลามและควรมีคุณสมบัติครบถ้วน ดังนี้ ไม่ประกอบด้วยหรือไม่บรรจุสิ่งใดที่ไม่ถูกต้องตามบทบัญญัติศาสนาอิสลาม ต้องไม่ถูกเตรียม แปรรูป ขนส่ง หรือเก็บรักษาโดยใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ไม่ได้ปลอดจากสิ่งผิดบทบัญญัติศาสนาอิสลาม และต้องไม่อยู่ในขั้นตอนการเตรียม การแปรรูป การขนส่งหรือการเก็บรักษาโดยสัมผัสโดยตรงกับอาหารที่ไม่ถูกเกณฑ์ดังที่กล่าวข้างต้น นอกจากนี้อาหารฮาลาลต้องเตรียม แปรรูป หรือเก็บรักษาในบริเวณที่แยกออกจากกันหรือสายการผลิตที่แยกจากกันภายในสถานที่ผลิตเดียวกันกับการผลิตอาหารที่ไม่ฮาลาล ทั้งนี้โดยจัดหามาตรการที่จำเป็นที่ควรดำเนินการป้องกันการสัมผัสกันระหว่างอาหารฮาลาลกับอาหารที่ไม่ใช่ฮาลาล และอาหารฮาลาลต้องเตรียม แปรรูป ขนส่ง หรือเก็บรักษาโดยใช้อุปกรณ์ที่แยกจากอุปกรณ์ที่ใช้กับอาหารที่ไม่ฮาลาล โดยจัดหาวิธีล้างทำความสะอาดที่เหมาะสมตามข้อกำหนดของศาสนาอิสลาม และยังมีข้อเพิ่มเติมในเรื่องฉลากด้วยคือ เมื่ออวดอ้างว่าอาหารเป็นอาหารฮาลาล คำว่า ฮาลาล หรือคำที่เทียบเท่า ควรปรากฏอยู่บนฉลากอาหาร ตามร่างข้อแนะนำทั่วไป เกี่ยวกับการอวดอ้างบนฉลากฉบับแก้ไข (Draft Revision of the Codex General Guidelines on Claims) การอวดอ้างฮาลาล ไม่ควรใช้ในทางที่อาจทำให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารที่คล้ายคลึงกัน หรืออวดอ้างว่าอาหารฮาลาลมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่า หรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ (2, 3)

2.2. มาตรฐานฮาลาลจีเอ็มพี/เอชเอซีซีพี (Halal-GMP/HACCP)

แนวคิดการบูรณาการระบบ Codex-Halal เข้ากับระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤตหรือ HACCP เริ่มจัดทำขึ้นครั้งแรกในการแข่งขันกีฬาอาเซียนเกมส์ในปี พ.ศ. 2541 หลังจากนั้นได้มีการร่วมมือกับสถาบันอาหารพัฒนาระบบ Halal-HACCP ขึ้นและจัดทำ

เป็นหนังสือในปี พ.ศ.2542 และยังคงมีการพัฒนาต่อเนื่องมาเป็นลำดับ จนกระทั่งกลายเป็นระบบ Halal-GMP/HACCP ของศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลในปัจจุบัน โดยมีการจัดทำคู่มือขึ้น 3 เล่มในปี พ.ศ.2548 คือ

1. Halal-GMP/HACCP 5000 : 1426 ระบบบริหารเพื่อเตรียมการอาหารฮาลาล : หลักการพื้นฐานและคำศัพท์

2. Halal-GMP/HACCP 5001 : 1426 ระบบบริหารเพื่อเตรียมการอาหารฮาลาล : ข้อกำหนด

3. Halal-GMP/HACCP 5004 : 1426 ระบบบริหารเพื่อเตรียมการอาหารฮาลาล : แนวทางสำหรับจัดทำ

โดยสรุปแล้วมาตรฐานฮาลาลจีเอ็มพี/เอชเอซีซีพี (Halal-GMP/HACCP) เป็นระบบคุณภาพที่ใช้หลักเกณฑ์ที่ดีในการผลิต (General manufacturing practice ; GMP) ของ Codex ซึ่งได้รับการพิจารณาว่าเป็นโปรแกรมพื้นฐานที่ควรปฏิบัติมาใช้เป็นพื้นฐาน ในการกำหนดหัวข้อเรียงลำดับตามขั้นตอนในห่วงโซ่อาหาร เริ่มจากการผลิตวัตถุดิบเรื่อยไปตลอดจนถึงขั้นสุดท้ายคือ ผู้บริโภค และเน้นการควบคุมสุขลักษณะที่สำคัญและคุณภาพฮาลาลในแต่ละขั้นตอนตามหลักเกณฑ์ของการวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (Hazard analysis and critical control point; HACCP) ดังรายละเอียดพอสังเขปต่อไปนี้

1. **การผลิตในขั้นต้น** (Primary Production)

ครอบคลุมถึงการจัดการกับวัตถุดิบที่จะรับเข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต เพื่อให้มั่นใจว่าวัตถุดิบนั้น ๆ มีความปลอดภัยจากอันตรายทั้งทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ เพียงพอสำหรับการบริโภค และที่สำคัญคือให้เป็นไปตามบทบัญญัติของอาหารฮาลาล นั่นคือไม่เป็นสิ่งที่ต้องห้ามหรือจัดอยู่ในข่ายฮารอม ไม่เป็นพิษ ไม่ถูกพลีกรรม หรือถวายทานอื่นนอกแนวทางอิสลาม ไม่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์และทราบแหล่งที่มาชัดเจน

การจัดซื้อวัตถุดิบเพื่อใช้สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาล นอกจากจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานโคเด็กซ์ที่กำหนดไว้ จะต้องถูกต้องตามบทบัญญัติศาสนาอิสลามด้วย โดยคัดเลือกวัตถุดิบหรือแม้แต่ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่มีแหล่งที่มาจากสัตว์อย่างพิถีพิถัน ตรวจสอบฉลากหรือเอกสารองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์หรือวัตถุดิบ สิ่งใดที่มั่นใจว่ามีองค์ประกอบที่ฮารอมให้ยกเลิกการใช้ทั้งหมด สิ่งใดที่ต้องสงสัยหรือไม่มั่นใจให้ทำการตรวจสอบ

ในกรณีของการขนส่งวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์เข้าสู่สถานประกอบการ หากมีวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์บางส่วนเป็นฮารอมจะต้องแยกภาชนะบรรจุออกจากกันอย่างเด่นชัด

ป้องกันการปนเปื้อนในทุกวิถีทาง หรือแบ่งส่วนการขนส่งโดยต้องระมัดระวังการสัมผัสระหว่างวัตถุดิบฮาลาลจากวัตถุดิบฮารอม

2. **สถานที่ประกอบการ : การออกแบบและสิ่งอำนวยความสะดวก**

ครอบคลุมการออกแบบโครงสร้างอาคารสถานที่ประกอบการ รวมถึงสิ่งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ให้เหมาะสมสำหรับการควบคุมอันตรายทั้งทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ รวมถึงควบคุมกิจกรรมที่ขัดต่อบทบัญญัติของศาสนาอิสลาม เช่น การจัดแบ่งบริเวณ High care area กับ Low care area ซึ่งหมายถึง การแบ่งบริเวณที่ต้องได้รับการควบคุมสุขลักษณะอย่างเข้มงวดจากบริเวณทั่วไป หรือบริเวณที่ไม่ได้ใช้ในการผลิตอาหารฮาลาล ออกจากกันอย่างเด็ดขาด ทำการแยกสถานที่ผลิตอาหารฮาลาลและอาหารไม่ฮาลาลในทุกขั้นตอนตั้งแต่การเตรียมการผลิต กระบวนการผลิต และสถานที่เก็บรักษา

สถานที่ผลิตรวมถึงอุปกรณ์อำนวยความสะดวกต้องถูกออกแบบให้เหมาะสมและสะดวกต่อการทำความสะอาด ถูกสุขลักษณะและเป็นไปตามบัญญัติของศาสนา คนงานที่ผลิตอาหารฮารอม หรือมีโอกาสสัมผัสโดยตรงกับวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์อาหารฮารอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อสุกรและผลิตภัณฑ์จากสุกร จะต้องไม่เข้าไปในบริเวณผลิตอาหาร นอกจากจะทำความสะอาดชำระล้างร่างกายถูกต้องตามหลักการอิสลามแล้ว เครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตฮารอมต้องแยกออกจากเครื่องมือที่ผลิตอาหารฮาลาลอย่างเด็ดขาด

3. **การควบคุมการปฏิบัติงาน**

ครอบคลุมถึงการปฏิบัติงานที่เป็นไปอย่างเหมาะสมในทุกขั้นตอน นับตั้งแต่การจัดหา/จัดซื้อวัตถุดิบ การรับวัตถุดิบ การควบคุมกระบวนการ (Process control) การบรรจุ ตลอดจนการจัดส่งที่ถูกสุขอนามัย ให้เป็นไปตามมาตรฐานการผลิต สามารถควบคุมอันตรายให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนที่ออกแบบมาเพื่อลดหรือกำจัดอันตราย รวมถึงฮารอมและนะยิสให้หมดสิ้นไปหรืออยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และขั้นตอนที่ถูกกำหนดว่า ให้ปฏิบัติตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามว่า หากไม่ปฏิบัติตามจะทำให้อาหารนั้นไม่ฮาลาล เช่น ขั้นตอนการเชือดสัตว์ที่อนุมัติให้บริโภคได้ (ยกเว้นปลาและสัตว์น้ำที่ไม่ต้องเชือด) ขั้นตอนการเก็บรักษาต้องปลอดภัยจากสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ฮาลาลและสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ ที่เป็นข้อรังเกียจของศาสนาอิสลาม ขั้นตอนการทำความสะอาด เป็นต้น

4. **สถานที่ประกอบการ : การบำรุงรักษาและสุขาภิบาล**

ครอบคลุมถึงการดูแลรักษาเครื่องมือเครื่องจักรให้อยู่ในสภาพดี เพื่อการปฏิบัติงานอย่างมีประสิทธิภาพ และถูกสุขลักษณะ ลดความสูญเสียของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากความบกพร่องของเครื่องจักร การดูแลรักษาเครื่องมือ เครื่องจักรอย่างถูกต้อง จะมีผลต่อการยืด

อายุการใช้งานเครื่องมือเครื่องใช้ ช่วยในการลดค่าใช้จ่ายของหน่วยงานได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังครอบคลุมถึงระบบการจัดการสุขลักษณะในโรงงานตั้งแต่ การทำความสะอาดที่เหมาะสม เพื่อลดหรือกำจัดอันตรายจากการสะสมของสิ่งสกปรกแหล่งเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายทางเคมีจากสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาด และเป็นไปตามบทบัญญัติของศาสนา โดยเฉพาะในขั้นตอน หรือกระบวนการที่ผ่านการผลิตอาหารที่ไม่ฮาลาลมาก่อน หากจำเป็นจะต้องใช้สถานที่หรือเครื่องมือเหล่านั้นในการผลิตอาหารฮาลาล จะต้องมีการควบคุมการทำความสะอาดอย่างใกล้ชิด และทางหน่วยงานจะต้องมีระบบที่ใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำความสะอาดอย่างเหมาะสมและแม่นยำ การฆ่าเชื้อทำความสะอาด หากจำเป็นต้องใช้แอลกอฮอล์ให้ใช้แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ เพื่อฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นให้ทำความสะอาดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้การฉีดน้ำหรือเช็ดออกด้วยน้ำหลายครั้ง หากเห็นว่าขั้นตอนยุ่งยากให้เลี่ยงการใช้แอลกอฮอล์แต่ใช้สารเคมีฆ่าเชื้อชนิดอื่นแทน

การควบคุมน้ำใช้ น้ำแข็ง ไอน้ำ ทั้งที่สัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมกับผลิตภัณฑ์จะต้องได้รับการควบคุมให้มีการผลิตน้ำ น้ำแข็ง ไอน้ำที่ถูกสุขลักษณะ โดยให้ปลอดภัยจากอันตรายทางชีวภาพ เคมี กายภาพที่อาจปนเปื้อนมากับน้ำใช้นั้น ๆ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงแหล่งน้ำนั้น ๆ ด้วย โดยต้องไม่ขัดต่อบทบัญญัติทางศาสนาและไม่ปนเปื้อนต่อวัตถุฮารอม ตลอดกระบวนการผลิตน้ำและน้ำแข็งนั้น ๆ ในกรณีที่น้ำใช้ปนเปื้อน สิ่งที่ฮารอมอย่างไม่จงใจ เช่น มีการปนเปื้อนเลือดจากเนื้อหรือสิ่งที่เป็นนะยิสปนเปื้อนลงในน้ำโดยไม่ตั้งใจ หากน้ำมีปริมาณมากกว่า 216 ลิตร และการปนเปื้อนไม่มีผลทำให้น้ำเปลี่ยน สี กลิ่น รส ให้ยังคงใช้น้ำนั้นได้โดยถือว่าน้ำนั้นไม่เป็นนะยิส แต่หากน้ำมีน้อยกว่าปริมาณที่กล่าว ถึงแม้น้ำจะไม่เปลี่ยนสี กลิ่น รส ให้เลิกใช้น้ำนั้นทันที การควบคุมขยะของเสียในโรงงาน จะต้องมีการควบคุมให้มีการกำจัดขยะของเสียนอกบริเวณผลิตทุกวันหลังการผลิต เพื่อป้องกันให้เกิดเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค รวมถึงเป็นแหล่งเรียกสัตว์ แมลงพาหะหรือเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์พาหะนำโรคต่าง ๆ ด้วย นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึงวิธีการขนย้าย การกำจัดให้เหมาะสม ไม่ก่อให้เกิดอันตรายจากการปนเปื้อนต่อผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการดังกล่าว การกำจัดสัตว์และพาหะโรงงาน ต้องมีการควบคุมให้มีการกำจัดสัตว์และแมลงพาหะนำโรคต่าง ๆ ภายในโรงงานอย่างเหมาะสม ไม่ให้เกิดปัญหาปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ทั้งจากสัตว์ แมลงพาหะนั้น และสารเคมีที่ใช้ในการทำการกำจัดด้วย นอกจากนี้ต้องมีมาตรการที่ชัดเจนในการป้องกันไม่ให้สุนัขหรือสัตว์เลี้ยงอื่น ๆ เข้ามาในบริเวณโรงงานสถานที่ผลิตเด็ดขาด การควบคุมการใช้สารเคมีในโรงงาน ต้องควบคุมให้มีการใช้อย่างเหมาะสม ถูกต้องตามวัตถุประสงค์และไม่ก่อให้เกิดอันตรายปนเปื้อนไปสู่ผลิตภัณฑ์ กรณีที่สารเคมีมีส่วนประกอบที่ไม่ถูกต้องตามข้อบัญญัติของศาสนาอิสลามให้แยกการเก็บอย่างชัดเจน

5. **สถานที่ประกอบการ : สุขลักษณะส่วนบุคคล**

ครอบคลุมถึงสุขลักษณะในส่วนของสุขภาพ การแต่งกาย รวมถึงการปฏิบัติและข้อห้ามต่าง ๆ ตั้งแต่ก่อนเข้าบริเวณผลิตของพนักงาน ตลอดจนผู้ที่เข้าไปในบริเวณการผลิตทุกคนที่สัมผัสผลิตภัณฑ์ทั้งทางตรงและทางอ้อม เพื่อป้องกันไม่ให้พนักงานหรือบุคคลที่เข้าสู่บริเวณการผลิตเป็นสาเหตุทำให้เกิดอันตรายทั้งทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ ปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์อาหาร

นอกจากนั้นยังต้องพิจารณาถึงกระบวนการผลิตที่ระบุตามบทบัญญัติของศาสนาในการผลิตอาหารฮาลาลด้วยว่า ขั้นตอนใดบ้างต้องถูกควบคุมหรือกระทำโดยชาวมุสลิมเท่านั้น เช่น ในขั้นตอนการเชือดสัตว์ซึ่งศาสนาอิสลามกำหนดไว้ว่า ต้องกระทำโดยบุคลากรที่เป็นมุสลิมที่มีความรู้ในทางศาสนาเท่านั้น หรือในกรณีที่โรงงานผลิตอาหารที่ไม่ฮาลาลและต้องเปลี่ยนกระบวนการผลิตอาหารฮาลาล จะต้องล้างเครื่องมือทุกชิ้นให้สะอาดตามหลักศาสนา ในกระบวนการล้างดังกล่าวควรจัดให้ผู้เชี่ยวชาญทางศาสนาอิสลามที่อาจเป็นนักวิชาการศาสนาอิสลามจากภายนอกหรือบุคลากรที่เป็นมุสลิมที่ทางโรงงานหรือหน่วยงานกำหนดตัวให้เข้าไปดูแล (ในกรณีของประเทศสิงคโปร์และมาเลเซีย มีข้อกำหนดให้องค์กรศาสนาอิสลามส่งผู้แทนเข้าไปทำการล้างหรือควบคุมการล้างด้วย) นอกจากนี้ตามข้อกำหนดของบางประเทศ ยังกำหนดให้เจ้าหน้าที่ระดับหัวหน้าสายการผลิตอาหารฮาลาลต้องเป็นมุสลิม หรือกำหนดให้เจ้าหน้าที่ในระดับหัวหน้าสายการผลิตอย่างน้อย 2 คน หรือมีคนงานในสายการผลิตอย่างน้อยร้อยละ 10 ที่เป็นมุสลิม ในกรณีนี้องค์กรหลักทางศาสนาอิสลามในประเทศไทยมีแผนที่จะกำหนดนโยบายดังกล่าวเช่นกัน

6. **การขนส่ง**

ครอบคลุมถึงกระบวนการขนส่งที่สามารถป้องกันอาหารจากแหล่งที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อน ทั้งอันตรายทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ สิ่งที่เป็นของต้องห้ามในการผลิตอาหารฮาลาล และการป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการขนส่ง มีสภาพแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของจุลินทรีย์ในอาหารด้วย ในกรณีของการขนส่งนั้น มาตรฐานอาหารฮาลาลอาเซียนได้กำหนดให้ทำการแยกผลิตภัณฑ์ฮาลาลออกจากผลิตภัณฑ์ที่ไม่ฮาลาลอย่างเด็ดขาดและชัดเจน

2.3. ร่างมาตรฐานฮาลาลอาเซียน

ร่างมาตรฐานฮาลาลอาเซียน แปลจากร่างสุดท้ายของคณะทำงานเฉพาะกิจของอาเซียนว่าด้วยแนวทางอาหารฮาลาลอันเป็นผลจากการประชุม The Third Meeting of ad-Hoc Working Group on ASEAN Halal Food Guidelines ระหว่างวันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2540 ณ

กรุงเทพมหานคร ร่างดังกล่าวยังไม่มีผลในทางปฏิบัติและการแปลนี้ทำขึ้นอย่างไม่เป็นทางการโดย รองศาสตราจารย์ ดร.วินัย ดะห์ลัน และเผยแพร่ในหนังสือ Halal-HACCP เพื่อให้ผู้ผลิตสินค้าฮาลาลได้เข้าใจแนวทางการดำเนินงานด้านการผลิตและจำหน่ายอาหารฮาลาลในกลุ่มประเทศอาเซียนและทั่วโลกในอนาคต

ในร่างมาตรฐานฮาลาลอาเซียนนั้นจะเน้นในเรื่องของอนามัยและสุขาภิบาลอย่างมาก ซึ่งในที่นี้รวมความถึงสภาวะต่าง ๆ ของอนามัยส่วนบุคคล ผ้าที่ใช้ เครื่องมือ และสถานที่ทำงานที่ใช้ในการประกอบการผลิตอาหาร วัตถุประสงค์ก็เพื่อสร้างความมั่นใจว่า อาหารที่ผลิตออกมานั้นสะอาด ถูกอนามัยและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ อนามัยสามารถนิยามได้ว่าปราศจากนะยิส สิ่งปนเปื้อน และเชื้อโรคที่เป็นอันตราย อาหารทุกชนิดควรเตรียม ปรุง ผ่านกระบวนการบรรจุ ขนส่ง และเก็บให้เป็นไปตามรูปแบบที่กำหนดเกี่ยวกับเรื่องอนามัยและสุขาภิบาลของในแต่ละประเทศสมาชิกและตามกฎระเบียบทั่วไปของโคเด็กซ์ ว่าด้วยอนามัยอาหารและตามมาตรฐานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ตามแนวทางที่กำหนดข้างต้นทั้งหมด ประเทศสมาชิกแต่ละประเทศอาจจะติดต่อระหว่างกันเพื่อเพิ่มเติมเนื้อหาบางประการจำเพาะเจาะจงไปได้ การปรับปรุงและทบทวนแนวทางข้างต้นจะทำเป็นระยะตามที่เห็นสมควร

2.4. มาตรฐานฮาลาลัน ตอยยีบา

สำนักงานรับรองระบบคุณภาพ (สสร.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย บริษัท อิลฮัม ดาบา คอนโซลิเดท (ไทยแลนด์) จำกัด ได้ร่วมมือกันดำเนินการให้การตรวจประเมิน และรับรองมาตรฐานที่มีการนำข้อกำหนดที่เกี่ยวกับหลักการหรือกฎหมายอิสลามมาบูรณาการหรือมาดำเนินการร่วมกันกับมาตรฐานด้านความปลอดภัยและระบบคุณภาพที่เป็นสากลในปัจจุบัน ที่เรียกว่า ฮาลาลัล ตอยยีบา (Halalan Thoyyiba Global Standard) ที่มีการนำหลักศาสนามาประยุกต์รวมกับระบบ GMP & HACCP โดยยฮาลาลัล คือ GMP และ ตอยยีบา คือ HACCP เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้ประกอบการในการเพิ่มข้อได้เปรียบในการแข่งขันทางธุรกิจ และเข้าถึงตลาดผู้บริโภคที่นับถือศาสนาอิสลามทั้งภายในและต่างประเทศ

ซึ่งมาตรฐานนี้จะประกอบไปด้วย 6 หลักการด้วยกัน คือ

หลักการที่ 1 คือ คำมั่นสัญญา

ความตั้งใจในการกำหนดนโยบายตั้งแต่ระดับผู้บริหารสูงสุดขององค์กร จะต้องให้ความสนใจหรือความสำคัญกับเรื่องของการจัดโครงสร้างขององค์กร ไม่ว่าจะเป็นโรงงานที่ใช้ในการผลิต เครื่องมือ เครื่องใช้ต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องเตรียมการ หรือมีการสั่งเฉพาะเจาะจงลงไปว่า

เครื่องมือหรืออุปกรณ์ชนิดนี้เท่านั้นที่ใช้ในการทำระบบฮาลาลัน ตอยยีบา เช่น อุปกรณ์การเชือด ใบมีดที่ใช้ เครื่องมือที่จะทำให้สลบ หรือแม้กระทั่งอุปกรณ์ที่ใช้ในการขนย้ายอย่างรถเข็น เพื่อให้สอดคล้องกับหลักการของศาสนาอิสลาม

หลักการที่ 2 คือ ระบบฮาลาลัน ตอยยีบา

จะต้องมีการกำหนดทีมงานที่มีความรู้เกี่ยวเนื่องและหลากหลายเข้ามาทำงาน เพื่อให้เกิดการควบคุมที่ดีในทุกขั้นตอนของการจัดการให้เป็นไปตามระบบฮาลาล

หลักการที่ 3 คือความสอดคล้อง

เนื่องจากหลักของฮาลาลัน ตอยยีบา เป็นหลักการที่เป็นมาตรฐานสากล ฉะนั้น ต้องมีความสอดคล้องไม่ขัดต่อข้อกำหนดต่าง ๆ ที่เป็นสากล เช่น ระบบของฮาลาลบอกว่าการเชือดจะต้องเชือดโดยการให้เลือดหลั่งออกมาโดยถูกต้อง สัตว์ที่จะเชือด ก่อนเชือดก็จะต้องอยู่ในสภาพที่ปกติ ไม่มีอาการซึม เศร้าหรือตกใจใด ๆ จะเห็นได้ว่าหลักการนี้เหมือนกับหลักสากล คือ HACCP จะมีความสอดคล้องกัน และจะต้องมีความปลอดภัยและมีระบบคุณภาพ

หลักการที่ 4 คือ การตรวจประเมินภายในองค์กร

จะต้องจัดทำระบบตรวจประเมินภายในองค์กร เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของระบบและความสอดคล้องตามมาตรฐาน ควรมีการตรวจอย่างน้อยปีละสองครั้ง และผู้ตรวจจะต้องเป็นผู้ที่อยู่นอกเหนือจากการควบคุมของผู้ดูแลระบบ เพื่อไม่ให้เกิดการลำเอียงหรือผลประโยชน์เกิดขึ้น

หลักการที่ 5 คือ ระบบเอกสาร

จะต้องมีระบบเอกสารเพื่อใช้แสดง สำหรับการตรวจประเมินจากภายนอกองค์กร

หลักการที่ 6 คือ ความโปร่งใสของการตรวจสอบ

มาตรฐานฮาลาลัน ตอยยีบา จะมีความแตกต่างไปจากมาตรฐานฮาลาลไทยของสำนักงานคณะกรรมการกลางอิสลามแห่งประเทศไทย เนื่องจากการรับรองฮาลาลไทยที่ใช้อยู่จะเป็นลักษณะของการตรวจสอบเฉพาะกิจเมื่อมีการยื่นขอ และเมื่อได้รับการรับรองแล้ว จะมีการติดตามและประเมินผลโดยการตรวจสินค้าในตลาด หรือวิเคราะห์ข้อมูลจากรายงานการปฏิบัติของที่ปรึกษาประจำสถานประกอบการ หรือการเข้าตรวจโดยไม่มีการนัดหมาย ซึ่งอาจไม่สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่า สถานประกอบการมีกระบวนการที่ถูกต้องตามมาตรฐานอย่างต่อเนื่องหรือไม่ ในขณะที่มาตรฐานฮาลาลัน ตอยยีบา มีระบบเอกสารที่ครอบคลุมการปฏิบัติงานในทุกขั้นตอน และสามารถตรวจสอบได้ตลอดเวลา เนื่องจากมีระบบเอกสารและระบบการบริหารการจัดการที่เป็นสากล จึงคาดว่าจะสามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับกลุ่มประเทศมุสลิมได้มากขึ้น (2)

ดังนั้นการที่จะทำให้อาหารฮาลาลไทยสามารถแข่งขันได้ในระดับโลกนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนา การผลิตอาหารไทยให้ได้มาตรฐานในระดับสากล เนื่องจากตรามาตรฐานฮาลาลของไทยยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายในตลาดมุสลิมจึงจำเป็นที่ภาครัฐและเอกชนจะต้องร่วมมือกันสร้างความคุ้นเคยและการยอมรับในตราฮาลาลของไทย มีระบบการผลิตอาหารตามมาตรฐานสากล เช่น มาตรฐานเกี่ยวกับสุขอนามัยและมีกระบวนการผลิตให้ถูกต้องทั้งหลักศาสนาและหลักทางวิทยาศาสตร์ และต้องปฏิบัติตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามอย่างเคร่งครัด ทั้งด้านแหล่งที่มาของอาหาร วิธีการฆ่าสัตว์ การเตรียมอาหาร การแปรรูปอาหาร การบรรจุหีบห่อ การขนส่ง การเก็บรักษาอาหาร และต้องระมัดระวังไม่ให้มีสิ่งต้องห้าม(หะรอม)เจือปน ดังนั้นในการรับรองมาตรฐานการผลิตจึงจำเป็นต้องมีกระบวนการตรวจสอบมาตรฐานที่น่าเชื่อถือด้วย

3. การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์

พัฒนาการในการตรวจวิเคราะห์สำหรับการตรวจหาเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ จะใช้วิธีการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ต่างสปีชีส์ ออกจากกัน ซึ่งวิธีที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ ของเนื้อสัตว์จากอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์นั้นได้ถูกพัฒนาเป็นลำดับ เนื่องจากกระบวนการผลิตอาหารในปัจจุบันมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้นโดยเฉพาะในกรณีของเนื้อสัตว์มักมีปัญหาที่ซับซ้อนกว่าอาหารฮาลาล
กลุ่มอื่นๆ เพราะมักเกิดเหตุการณ์เนื้อฮาลาลสัมผัสกับเนื้อไม่ฮาลาลอยู่เสมอ หรือการติดฉลากที่ไม่ตรงกับความเป็นจริง ดังนั้นเพื่อเป็นการสร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภค และเป็นการพัฒนาอาหารฮาลาลของไทยให้เข้าสู่การแข่งขันในระดับโลกได้จึงต้องมีการสร้างมาตรฐานให้เป็นที่น่าเชื่อถือ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์จึงเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างหนึ่ง การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ที่สำคัญที่สุดคือการวิเคราะห์การปนเปื้อนจากเนื้อสุกร ซึ่งเป็นสิ่งต้องห้ามทางศาสนาและมีโอกาสปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารมากที่สุด ดังนั้นวิธีการตรวจวัดจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องดังนี้

3.1. โครมาโตรกราฟฟี (Chromatography)

การตรวจวัดด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโตรกราฟฟี มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีหนึ่งของการตรวจวัดเนื้อสุกร และน้ำมันสุกรที่เจือปนในเนื้อวัว และเนื้อแกะ โดยที่ไตรกลีเซอไรด์ที่ไม่อิ่มตัวในไขมันจะถูกไอออไนซ์ได้สารอนุพันธ์ ซึ่งสารอนุพันธ์กับไตรกลีเซอไรด์ที่อิ่มตัวจะถูกวิเคราะห์โดยลิควิดโครมาโตรกราฟฟี แบบ reverse-phase column และตรวจวัดด้วยยูวี โดยที่ไขมันของสุกรจะมีจำนวนไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 มากกว่าไขมันใน

เนื้อสัตว์อื่นๆ โดยจะเปรียบเทียบอัตราส่วนไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (SSU/SUS) กับเนื้อสัตว์อื่นๆ โดยที่เนื้อสุกรนั้นอัตราส่วน SSU/SUS จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว 1 เปอร์เซนต์ และ เนื้อสุกรผสมเนื้อแกะ 3 เปอร์เซนต์ และพบว่าไม่มีปัญหาสำหรับเนื้อที่ผ่านความร้อนหรือผ่านการปรุงสุก (4) อีกวิธีหนึ่งโดยใช้เทคนิค HPLC (High performance liquid chromotocraphy) ที่ใช้ตัวตรวจวัดเป็น electrochemical detection ซึ่งสามารถแยกตวามแตกต่างสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ 15 สปีชีส์ คือ โค หรือกระบือ สุกร แพะ กวาง ม้า ไก่ เป็ด นกกระจอกเทศ ปลาซาลมอน ปลาทะเล กุ้ง ปู หอยเชลล์ กบ และจระเข้ โดยดูจากเส้นกราฟ electrochemical profile ที่ต่างกัน และพบว่าการบ่มเนื้อสด คือ เนื้อวัว เนื้อสุกร และเนื้อไก่ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หรือการ frezzing และ thawing จะทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงแต่ไม่ทำให้รูปแบบของเส้นกราฟในแต่ละสปีชีส์เปลี่ยนแปลง (5) สำหรับการศึกษาเบื้องต้นของ Soncin S และคณะ ในการหาสารระเหยของเนื้อสัตว์ดิบ 3 สปีชีส์ คือ สุกร เป็ด และแพะ ด้วยวิธี Gas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) โดยใช้ Solid phase microextraction ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของทั้ง 3 สปีชีส์นั้นมีความแตกต่างกันโดยในเนื้อสุกรจะพบโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ alcohol และ ketones ส่วนเนื้อเป็ดจะพบโครงสร้างของ aldehydes และ hexanoic acid ส่วนในเนื้อห่านนั้นจะมีโครงสร้างหลักคือ carbon disulfide (p-dichlorobenzene) แต่อย่างไรก็ตามวิธี GC-MS นี้ยังไม่เหมาะสมกับเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการทางอาหาร (6)

3.2. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โปรตีนจากเนื้อสุกร และเนื้อสัตว์อื่น ๆ

การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เริ่มแรกจะใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์อาหารดิบที่ยังไม่ผ่านการปรุงสุก เช่น Double-antibody sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) สามารถตรวจวิเคราะห์ เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวได้ในปริมาณ 1-3 เปอร์เซนต์ แต่ยังมีปัญหาสำหรับอาหารที่ปรุงสุก หรืออาหารผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน เนื่องจากโปรตีนถูกทำลาย (7) วิธี Competitive ELISA และ Indirect ELISA สามารถตรวจเนื้อสุกร หรือเนื้อแกะผสมเนื้อวัวได้น้อยที่สุดที่ 5 เปอร์เซนต์ แต่ประสิทธิภาพของการตรวจวัดจะลดลงถึง 70-74 เปอร์เซนต์ สำหรับเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการ หรือการปรุงสุก (8) ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเนื้อสัตว์ที่ทนความร้อน เช่น การตรวจวัดเนื้อไก่ และเนื้อสุกรในอาหารที่ผ่านการปรุงสุก และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ด้วยวิธี ELISA ซึ่งใช้ความจำเพาะต่อสปีชีส์ (species-specific) ของ polyclonal antibody ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อลาย (raw skeletal muscle tissue) ของเนื้อสุกร และเนื้อไก่ หลังจาก

ให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส 15 นาที พบว่าสามารถตรวจวัดเนื้อไก่ ที่ขีดจำกัดต่ำที่สุด 126 ppm และ สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรที่ขีดจำกัดต่ำที่สุด 250 ppm (9) อีกงานวิจัยหนึ่งในการผลิต Monoclonal antibody ต่อ Porcine Thermal-stable Muscle Protein สำหรับเนื้อสุกรดิบและเนื้อสุกรที่ผ่านการปรุงสุก สามารถตรวจวัดเนื้อสุกรและเนื้อสุกรผสมกับเนื้ออื่นที่ความเข้มข้น 10 กรัม/กิโลกรัมได้ (10) อย่างไรก็ตามวิธี ELISA นี้ยังคงมีความไวต่ำสำหรับอาหารที่ผ่านการปรุงสุกที่อยู่ในรูปเนื้อผสม และอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตหลายขั้นตอน

เนื่องจากการตรวจการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์โดยวิธีวิเคราะห์หาโปรตีนที่จำเพาะนั้น มีความไวและความจำเพาะต่ำ อีกทั้งไม่สามารถตรวจวิเคราะห์อาหารที่ผ่านความร้อน และกระบวนการต่างๆ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร การใช้ดีเอ็นเอเป็นแหล่งตรวจวัด พบว่ามีข้อดีกว่าหลายประการ เช่น มีความจำเพาะและความไวสูงกว่า อีกทั้งดีเอ็นเอยังมีความคงทนกว่าโปรตีน และง่ายต่อการตรวจวัด สามารถใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ หรือจำแนกชนิดของเนื้อเยื่อจากแหล่งเดียวกันได้ด้วย

4. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสัตว์

เทคนิคของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อสัตว์เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง และเป็นเทคนิคที่มีความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร การติดฉลากที่ถูกต้อง การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเนื้อสัตว์ และการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์ต้องห้ามสำหรับเหตุผลทางศาสนา ซึ่งการจำแนกสปีชีส์โดยวิธีทางดีเอ็นเอนั้นจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะ โดยบริเวณยีนที่ใช้ในการจำแนกเนื้อสัตว์ในแต่ละสปีชีส์ที่มีการรายงานเป็น Potential markers มี 3 บริเวณ คือบริเวณภายใน Chromosomal, Mitochondrial DNA (mtDNA) และ Ribosomal RNA (rRNA) ซึ่งประกอบไปด้วย 5 ยีนคือ สำหรับ Genomic markers จะใช้ยีน β-*actin* และ *TP53 tumor* สำหรับ Mitochondrial DNA markers จะใช้ยีน *Cytochome b* และ *Hypervariable Displacement Loop* (D-Loop) และ Ribosomal RNA markers จะใช้ยีน 28S rRNA (11)

4.1. DNA hybridization

เทคนิคนี้เป็นการค้นหาดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการจากกลุ่มลำดับเบสที่แตกต่างกันจำนวนมาก โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกติดฉลากด้วยสารรังสีหรือ สารเรืองแสงเป็นโพรบ จับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ติดอยู่บนเมมเบรน ด้วยวิธี Slot blot หรือ Dot blot ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถตรวจได้ในเชิงปริมาณ สามารถวัดได้จากความเข้มข้นของสัญญาณที่ติดฉลาก การทดลองของ Chikuni K. และคณะ ในการตรวจวัดสปีชีส์ ของเนื้อไก่ เนื้อสุกร เนื้อแพะ เนื้อแกะ

และวัว ที่ผ่านความร้อนที่ 80, 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยวิธี Dot-blot hybridization พบว่าสามารถแยกชนิดของเนื้อดังกล่าวได้ และยังสามารถตรวจชนิดของเนื้อสัตว์ที่ผ่านการปรุงสุกที่ 100 หรือ 120 องศาเซลเซียสได้ด้วยโดยพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่วัดได้เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อจุดของดีเอ็นเอตัวอย่าง และสามารถตรวจวัดเนื้อไก่ เนื้อสุกร และเนื้อวัวจากผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องในปริมาณต่ำสุดที่ 50 นาโนกรัม (12) อีกงานวิจัยหนึ่งคือ การใช้ Genomic DNA probe ที่จำเพาะสำหรับการจำแนกสปีชีส์ ระหว่างเนื้อวัว เนื้อแกะ และเนื้อแพะ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสปีชีส์ ได้โดย ระหว่าง เนื้อวัว และเนื้อแกะ หรือเนื้อแพะต่ำที่สุดที่ 0.01เปอร์เซนต์ และระหว่าง เนื้อแพะ และเนื้อแกะขีดจำกัดต่ำสุดที่ 10 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามการตรวจวัดด้วยวิธี DNA hybridization ยังคงมีปัญหาอยู่บ้างเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลานานในการติดฉลาก probe (13)

4.2. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการทำงานของ PCR ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใด แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส Martinez I และ Yman I. M. ได้ใช้เทนิค RAPD fingerprinting สำหรับการตรวจแยกสปีชีส์ ของเนื้อสัตว์ 12 ชนิด คือ โค, ม้า, ล่อ, ลา, กระบือ, กวาง, กวางเรนเดียร์, สุกร, แกะ, แพะ, จิงโจ้ และนกกระจอกเทศ ซึ่งลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของทั้ง 12 สปีชีส์ได้อย่างชัดเจน (14) เช่นเดียวกันกับอีกงานวิจัยหนึ่งที่สามารถใช้เทคนิค RAPD ในการแยกเนื้อสุกร วัว ไก่ แกะ และไก่งวง ได้ (15)

4.3. Single strand conformational polymorphism analysis (SSCP)

เป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้สำหรับการตรวจการกลายพันธุ์ โดยดีเอ็นเอสายคู่ของ PCR products จะถูกแยกเป็นสายเดี่ยว และนำไปแยกด้วย polyacrymide gel electrophoresis ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้เห็นจะขึ้นอยู่กับลักษณะ ขนาดและโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ ซึ่งการเข้าคู่เบสระหว่างนิวคลีโอไทด์ภายในสายดีเอ็นเอจะเป็นตัวกำหนดโครงสร้างทุติยภูมิ และตติยภูมิของโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นๆ ซึ่งจะใช้วิธีนี้ในการแยกความแตกต่างของสปีชีส์เพียงแค่เบสเดียวได้ เช่น ในการจำแนกปลาในปลาทูน่ากระป๋อง โดยวิธี SSCP ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ mitochondrial *cytochrome b* gene พบว่า 5 ตัวอย่างเป็นเนื้อปลาที่ได้จาก species เดียวและอีก 2 ตัวอย่างเป็นเนื้อปลาทูน่าจาก 2 สปีชีส์ผสมรวมกัน

โดยเทียบกับ reference material และจากการทดสอบเพิ่มเติมกับปลาทูน่ากระป๋องทั้งหมด 72 ตัวอย่าง สามารถแยกได้ถูกต้อง 65 (90.3 %) ตัวอย่าง (16)

4.4. วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Polymerase Chain Reaction (PCR)

การจำแนกสปีชีส์โดยใช้วิธี PCR จะใช้ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primers) สายสั้นๆ ของลำดับเบสคู่สมกันกับสาย DNA แม่แบบ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็นจำนวนล้านเท่า Meyer R. และคณะได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจวัดดีเอ็นเอจากเนื้อสุกร โดยใช้ยีน 18S ribosomal และยีน Porcine growth hormone พบว่าสามารถตรวจวัดเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวทั้งที่เป็นเนื้อดิบ และเนื้อที่ผ่านความร้อนที่ความเข้มข้นต่ำถึง 2 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ชุดตรวจด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ไม่สามารถตรวจวัดเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20 เปอร์เซนต์ และเนื้อดิบที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซนต์ได้ (17) การตรวจวิเคราะห์ เนื้อสุกร เนื้อวัว เนื้อแพะ และเนื้อแกะ สำหรับเนื้อดิบและเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกในรูปเนื้อผสม โดยการทำ PCR ยีนบริเวณ mitochondrial 12S ribosomal rRNA สามารถตรวจวัดเนื้อผสมที่ขีดจำกัดต่ำสุดที่ 1 เปอร์เซนต์ (18) Calvo J.H.และคณะ ใช้วิธี PCR ตรวจวัดเนื้อสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.005 เปอร์เซนต์ และในเนื้อสุกรผสมเนื้อเป็ดที่ขีดจำกัดต่ำสุด 1 เปอร์เซนต์ สำหรับการตรวจวัดเนื้อสุกรที่ผ่านกระบวนการทางอาหาร และที่ไม่ผ่านกระบวนการทางอาหาร (19) Montiel-Sosa F.J. และคณะ ทำการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกร และไขมันในเนื้อผสมจาก เนื้อแกะ เนื้อวัว เนื้อไก่ และเนื้อมนุษย์ที่บริเวณยีน mitochondrial D-loop ได้ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ของเนื้อสุกรที่ความยาว 531 คู่เบส ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถยืนยันผลผลิตของเนื้อหมูป่าและเนื้อสุกร ได้โดยใช้เอนไซม์ *Ava*II สำหรับเนื้อสุกรจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ได้ผลผลิตที่ 286 และ 245 คู่เบส (20) สำหรับการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรในการขอรับรองตราฮาลาลในประเทศมาเลเซีย ที่บริเวณยีน mitochondrial 12S ribosomal rRNA พบว่าสามารถตรวจวัดเนื้อสุกรที่ความยาว 387 คู่เบส (21) สำหรับเทคนิค Multiplex PCR ในการแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์แต่ละชนิดที่บริเวณยีน Mitochondrial *cytochrome b* (cytb) โดยการรวมไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่เพื่อแยกสปีชีส์ ของเนื้อสัตว์ทั้งหมด 6 ชนิดออกจากกัน ได้แก่ เนื้อแพะ, เนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแกะ, เนื้อสุกร และเนื้อม้า ที่ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ความยาวต่างๆกัน ที่ 157, 227, 274, 331, 398 และ 439 คู่เบส ตามลำดับ และยังพบว่า เนื้อม้าไม่สามารถถูกเพิ่มปริมาณได้เมื่อให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่เนื้อแพะ, เนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแกะ และเนื้อสุกรสามารถเพิ่มปริมาณได้ (22) และวิธีเดียวกันสำหรับวิธี Multiplex PCR ของยีนบริเวณ 12S rRNA, tRNA, Val และ 16S sRNA ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก ปลา และสุกร ซึ่งจะได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่ความยาว

104-106, 183, 220-230 และ 290 คู่เบส ตามลำดับ พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ 0.004 เปอร์เซนต์ สำหรับปลา และ 0.002 เปอร์เซนต์ สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก และสุกร (23) ในการตรวจเนื้อสุกรปนเปื้อนในไส้กรอกเนื้อม้าจำนวน 30 ตัวอย่างจากร้านค้าในประเทศอิตาลีโดยวิธี Duplex PCR พบว่ามีเนื้อสุกรปนเปื้อนอยู่ 6 ตัวอย่าง และไม่ใช่เนื้อม้าเลย 1 ตัวอย่าง โดยถ้าเป็นเนื้อสุกรจะได้ผลผลิต PCR ที่ 398 คู่เบส และถ้าเป็นเนื้อม้าจะได้ผลผลิต PCR ที่ 439 คู่เบส และถ้าเป็นเนื้อสุกรผสมกับเนื้อม้าจะได้ทั้งสองผลผลิต คือ 398 คู่เบส และ 439 คู่เบส (24)

4.5. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP)

เทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่จำเพาะ จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกความแตกต่างของลำดับเบสที่ใกล้เคียงกัน เทคนิค PCR-RFLP ได้ถูกนำมาใช้ในการแยกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น การแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของ สุกร วัว สุกรป่า กระบือ แกะ แพะ ม้า ไก่ และไก่งวง โดยทำ PCR ยีนบริเวณ Mitochondrial *cytochrome b* (cytb) และตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Rsa*I, *Taq*I, และ *Hinf*I พบว่า วิธี PCR-RFLP สามารถตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ผ่านความร้อนได้ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (25) การวิเคราะห์ไขมันสุกร และเนื้อสุกร โดยใช้วิธี PCR-RFLP บริเวณยีน mitochondrial *cytochrome b* สำหรับการขอรับรองฮาลาลในประเทศมาเลเซีย จะได้ผลผลิต PCRที่ความยาวประมาณ 360 คู่เบส จากนั้นทำการแยกสปีชีส์ของสุกร โดยนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa*JI จะได้ความยาวที่ 121 และ 228 คู่เบส (26) อย่างไรก็ตามวิธี PCR-RFLP ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถแยกชนิดของเนื้อสัตว์ที่มีลำดับเบสของยีนเหมือนกัน หรือเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันได้ อีกทั้งต้องเสียเวลาในการตัดเอมไซม์และแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งยุ่งยาก และไม่สะดวก

4.6. Real-Time PCR

การทำ real time PCR เป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจผลผลิตของ PCR จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว การวิเคราะห์โดย Real-Time PCR ข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่อง และแสดงผลออกมา โดยทั่วไปจะมีการแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบ รวมถึงกราฟแสดงระดับสารเรืองแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบแบบ Real-Time สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณโดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณอยู่แล้วจากกราฟดีเอ็นเอมาตรฐานที่สร้างไว้ นอกจากนี้ความไวของ

Real-Time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้ ทำให้มีความสะดวก และประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์ได้

Dooley J. J. และคณะ ตรวจวัดในเชิงปริมาณด้วยวิธี TaqMan Real-Time PCR ยีนบริเวณ Mitochondrial 12S rRNA พบว่าสามารถจำแนกเนื้อสุกรจาก เนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อแพะ เนื้อไก่ เนื้อไก่งวง เนื้อเป็ด และเนื้อห่าน และสามารถบอกปริมาณของเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนในเนื้อผสมได้ โดยที่สามารถตรวจหาเนื้อสุกรปนปื้อนที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.1 เปอร์เซนต์ และมีความไวในการตรวจวัดเนื้อสุกรในเนื้อสุกรผสมกับเนื้อวัวที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.5 เปอร์เซนต์ (27) เช่นเดียวกันกับ Rodriguez M. A. และคณะในการตรวจวัดเนื้อสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวด้วยวิธี TaqMan Real-Time PCR พบว่ามีความไวอยู่ในช่วง 0.5-5 เปอร์เซนต์ (28) อีกงานวิจัยหนึ่งสำหรับวิธี TaqMan Real-Time PCR ที่บริเวณยีน 18S ribosomal RNA พบว่ามีความไวที่ขีดจำกัดต่ำสุด 1 เปอร์เซนต์ สำหรับเนื้อไก่ และไก่งวง และที่ 5 เปอร์เซนต์ สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องและแกะ (29)

วิธี PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวัดเนื้อสุกรปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งใช้จำแนก สปีชีส์ของเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ในอาหารสัตว์ สามารถวิเคราะห์เนื้อสัตว์ทั้งที่เป็นเนื้อดิบ และเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกมาแล้ว ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อย มีความรวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในเนื้อวัวได้ต่ำกว่า 1 เปอร์เซนต์ หรือสามารถตรวจวัดการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทไส้กรอก อาหารกระป๋อง และผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ ที่มีส่วนที่ทำจากเนื้อสัตว์

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า PCR และ Real-Time PCR จะมีความจำเพาะ และความไวในการตรวจวัดสูง แต่วิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีที่ต้องอาศัยความชำนาญ และมีเทคนิคที่ซับซ้อนมากมาย อีกทั้งราคาของน้ำยา และเครื่อง thermal cycle ที่ใช้ยังมีราคาค่อนข้างสูง จึงไม่เหมาะกับการนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการทั่วไปในต่างจังหวัด

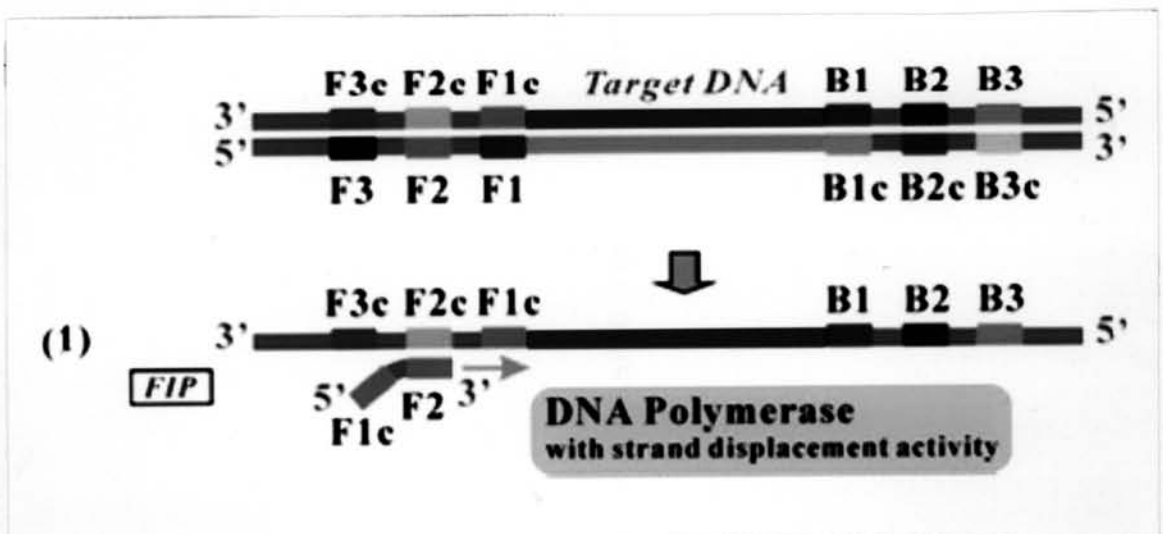
5. Loop-mediated isothermal amplification assay

5.1. หลักการ

Loop- mediated isothermal amplification(LAMP) เป็นเทคนิคที่คิดค้นขึ้นโดย Notomi T.และคณะ (30) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) แต่การเกิดปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP จะเกิดภายใต้อุณหภูมิเดียว คือที่ 60-65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30-60 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Bacillus*

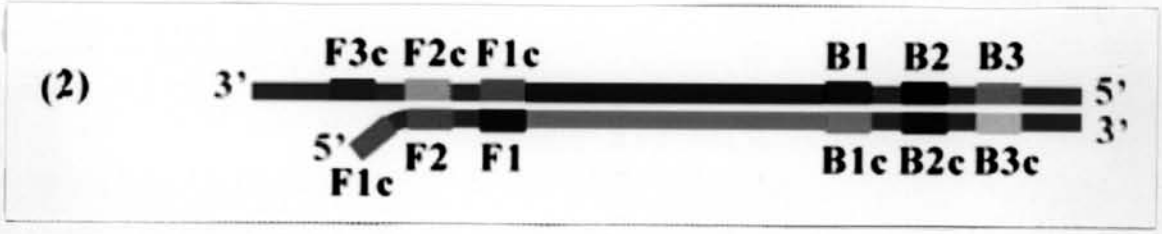
stearothermophilus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนและสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติ 5'-->3' polymerase และคุณสมบัติการแทนที่ (Strand Displacement) แต่ขาดคุณสมบัติ 3'-->5' exonuclease (31) ซึ่งแตกต่างจาก *Taq* DNA polymerase ที่ไม่มีคุณสมบัติการแทนที่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ถึง 10^9 เท่า โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง Thermal cycle และยังเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ประกอบด้วย Forward Inner Primer (FIP), Backward Inner Primer(BIP), F3(Outer Forward Primer) และ B3(Outer Backward Primer) ขั้นตอนของปฏิกิริยา LAMP อธิบายได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 เมื่อเข้าสู่สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส สายดีเอ็นเอเส้นคู่จะอยู่ในสภาพสมดุล (equilibrium) คือสภาวะที่สายดีเอ็นเอจะอยู่ในสภาพสายคู่ และสายเดี่ยวตลอดเวลาโดยสมดุลไม่ได้หยุดนิ่ง ไพร์เมอร์ของปฏิกิริยา LAMP จะเข้าจับกับดีเอ็นเอตั้งต้นที่เป็นคู่สมกันได้ และทำการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่โดยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และมีการแทนที่ (Stand displacement) สายดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้าง โดยสายดีเอ็นเอสายใหม่เส้นถัดไป ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันได้ ซึ่งเป็นข้อแตกต่างกับวิธี PCR ที่จะต้องมีการให้ความร้อนที่ 90- 95 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกัน ในขั้นที่ 1 ไพร์เมอร์ FIP ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ F1c และ F2 จะเข้าจับที่ตำแหน่ง F2c ดังรูปที่ 2.1



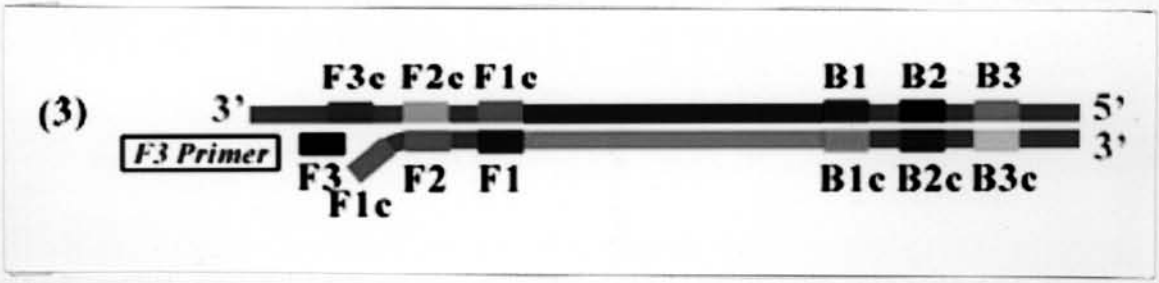
รูปที่ 2.1 แสดงขั้นที่ 1 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์

ขั้นที่ 2 จะมีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอแม่แบบโดยอาศัยคุณสมบัติของ *Bst* DNA polymerase จาก F2 ถึง B3c เข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ดังรูปที่ 2.2



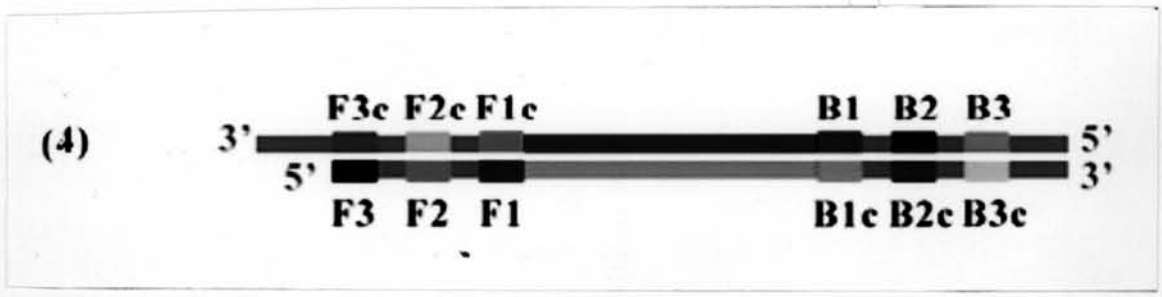
รูปที่ 2.2 แสดงขั้นที่ 2 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ FIP ที่บริเวณ F2 เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลาย 3'

ขั้นที่ 3 ไพรเมอร์ F3 จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่บริเวณ F3c ด้านนอกของไพรเมอร์ FIP แล้วเริ่มการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอแทนที่เส้นเดิม แล้วปล่อยเส้นที่เป็นคู่สมกับเส้นที่ไพรเมอร์ FIP สังเคราะห์เส้นแรกออกมา ดังรูปที่ 2.3



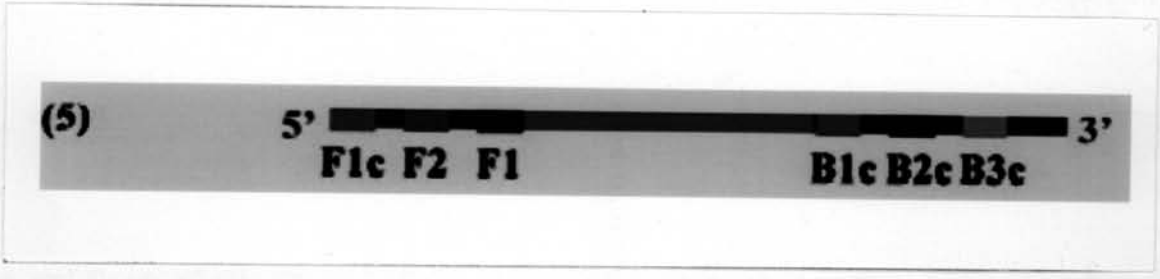
รูปที่ 2.3 แสดงขั้นที่ 3 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ F3

ขั้นที่ 4 จากการสังเคราะห์ของไพรเมอร์ F3 ในขั้นที่ 3 จะเกิดการเข้าคู่ของดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ดังรูปที่ 2.4



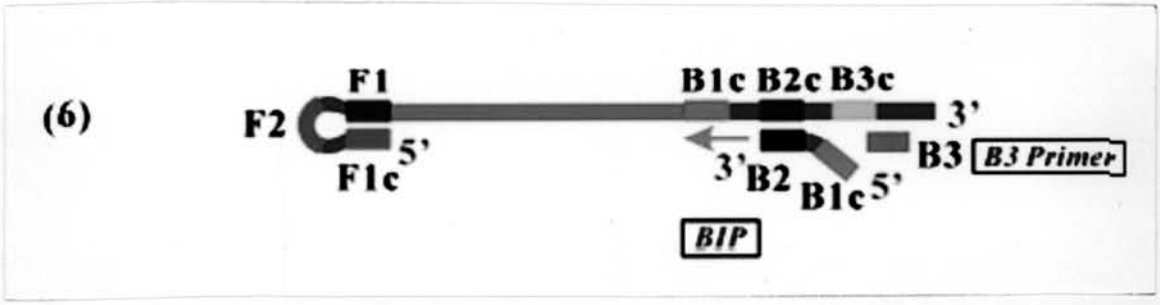
รูปที่ 2.4 แสดงขั้นที่ 4 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ

ขั้นที่ 5 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกปล่อยออกจากสายที่เป็นคู่สมกับเส้นที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ FIP ในขั้นที่ 3 รูปที่ 2.3 จะเข้าจับกันเป็นห่วงที่ปลาย 5' เพราะมีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง F1 และ F1c ดังรูปที่ 2.5 และ 2.6



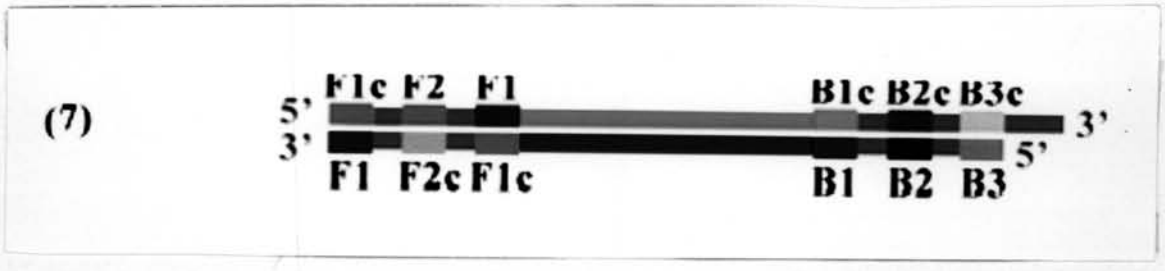
รูปที่ 2.5 แสดงบริเวณของผลผลิต LAMP ในขั้นตอนที่ 3 รูปที่ 2.3 ที่สามารถจับกันเป็นห่วงที่ปลาย 5'

ขั้นที่ 6 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากขั้นที่ 5 จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับไพรเมอร์ BIP ในการเข้าจับที่ปลาย 3' และสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันไปจนถึงบริเวณที่จับกันเป็นห่วงให้คืนกลับเป็นเส้นตรง จากนั้นไพรเมอร์ B3 จะเข้ามาจับบริเวณด้านนอกของไพรเมอร์ BIP แล้วสร้างสายดีเอ็นเอแทนที่เส้นที่สร้างจาก BIP ก่อนหน้า แล้วปล่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยวออกมา ดังรูปที่ 2.6



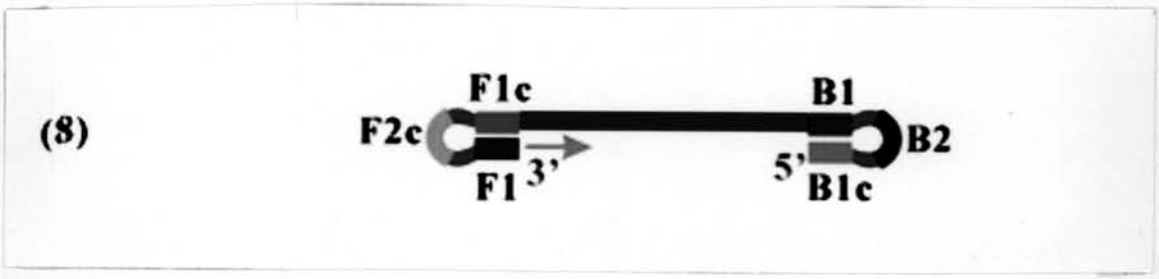
รูปที่ 2.6 แสดงขั้นที่ 6 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ BIP และ B3

ขั้นที่ 7 หลังจากเกิดการสังเคราะห์ในขั้นที่ 6 แล้วจะได้ดีเอ็นเอสายคู่ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงขั้นที่ 7 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ

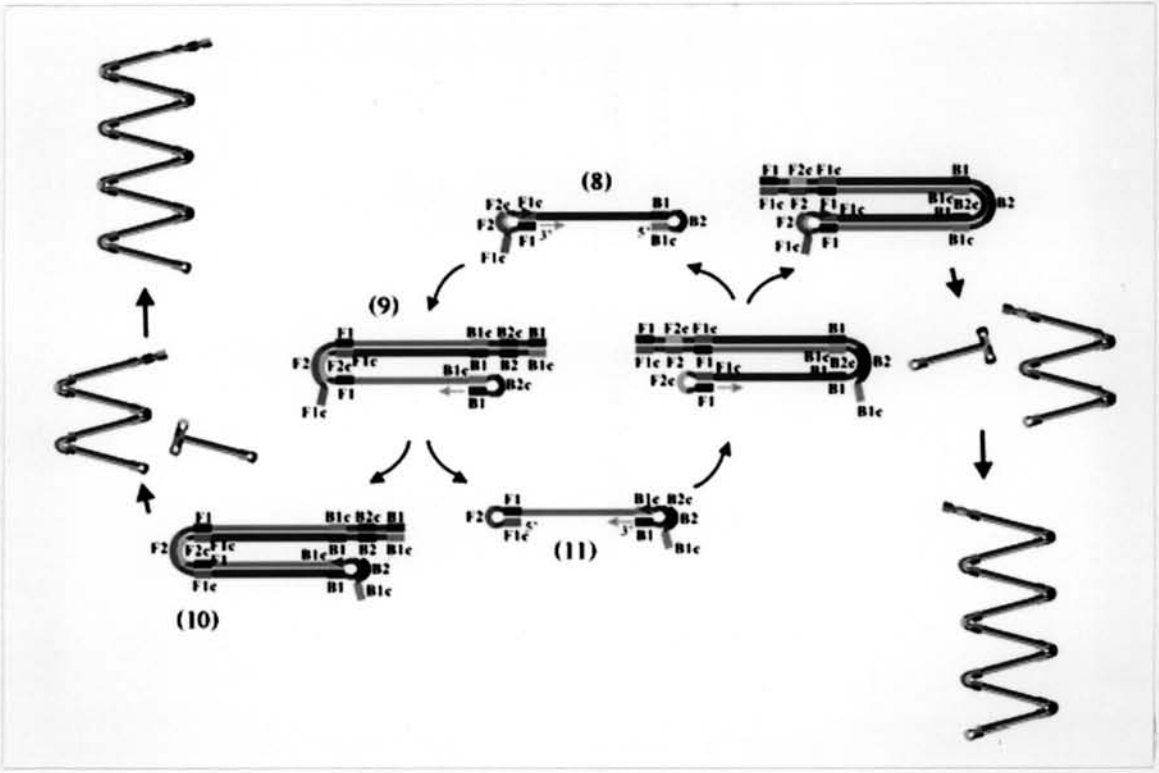
ขั้นที่ 8 สายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมโดยการสร้างของไพรเมอร์ FIP ที่ถูกปล่อยออกโดยการแทนที่ในขั้นที่ 6 นั้นจะจับกันเป็นห่วงที่ปลายทั้ง 2 ข้างของสายดีเอ็นเอ จึงมีลักษณะคล้ายดัมเบล(dumbbell)ดังรูปที่ 2.8 โครงสร้างนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณเป็นรอบๆ ของวิธี LAMP (LAMP cycling)



รูปที่ 2.8 แสดงขั้นที่ 8 ของปฏิกิริยา LAMP ของโครงสร้างหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบๆ

ขั้นที่ 8-11 จะแสดงดังรูปที่ 2.9 จากโครงสร้างรูปดัมเบล จะถูกเปลี่ยนเป็น stem-loop โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ด้วยไพรเมอร์ของตัวมันเอง ไพร์เมอร์ F1 และทำให้ห่วงทางด้าน BIP คลายออก ไพรเมอร์ FIP จะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวตรงบริเวณ stem-loop และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากนั้นจะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ด้วยไพร์เมอร์ของตัวมันเอง คือ จากไพร์เมอร์ B1 ดังในขั้นที่ 9 ทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างจาก BIP หลุดออก ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกปล่อยออกมาจับกันเป็นรูปดัมเบลที่ปลายทั้งสองข้างโดยมีลำดับเบสคู่สมที่ไพร์เมอร์ F1-F1c และ B1-B1c ตามลำดับดังรูปที่ 2.9 ในขั้นที่ 11 ซึ่งโครงสร้างนี้จะกลับไปเป็นโครงสร้างเดียวกับขั้นที่ 8 และจะเกิดปฏิกิริยาเหมือนกันต่อไปในขั้นที่ 8-11 จากโครงสร้างในขั้นที่ 11 จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของตัวมันเองที่บริเวณ B1 ที่ปลาย 3' และ BIP จะเข้ามาจับที่บริเวณ B2c และเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ ขณะเดียวกันจะมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ด้วยไพร์เมอร์ของตัวมันเองจากปลาย F1 ทำให้ดีเอ็นเอเส้นที่จับอยู่ก่อนหน้าที่ถูกสร้างด้วยไพรเมอร์ BIP หลุดออก ต่อมาจะได้ผลผลิตเหมือนกับโครงสร้างในขั้นที่ 8 จากโครงสร้างในขั้น

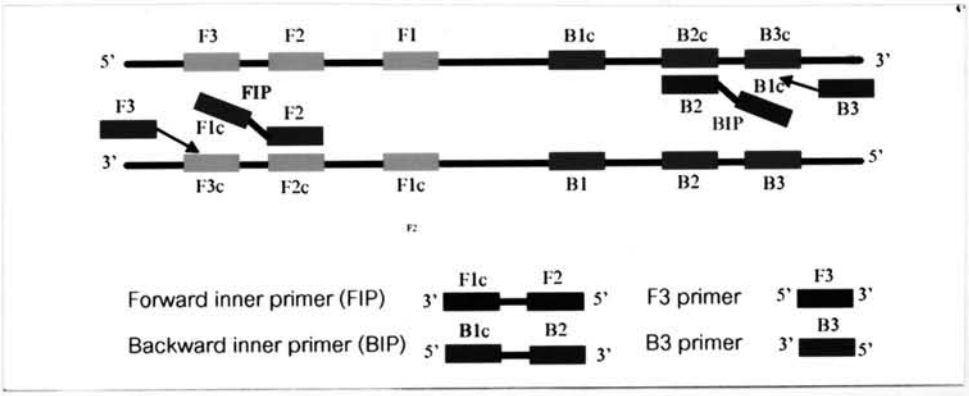
ที่ 10 ไพรเมอร์ BIP เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวบริเวณ B2c และดีเอ็นเอจะถูกสังเคราะห์อย่างต่อเนื่องโดยการแทนที่ดีเอ็นเอสายคู่ ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอหลายขนาดเนื่องจากมีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อเนื่องกันไปมา จากดีเอ็นเอขนาดเล็กเท่ากับขนาด F3 ถึง B3 จนถึงขนาดใหญ่มาก (32)



รูปที่ 2.9 แสดงขั้นที่ 8-11 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบ

5.2. การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา LAMP จะจำเพาะกับ 6 ตำแหน่ง คือ F3, F2, F1, B1, B2 และ B3 โดยในการออกแบบไพรเมอร์นั้น จะมีไพรเมอร์ทั้งหมด 4 เส้น คือ FIP, BIP, F3 และ B3 ดังรูปที่ 2.10 Forward inner primer (FIP) ประกอบด้วยลำดับเบสของ F2 ที่ปลาย 3' เชื่อมกับลำดับเบสคู่สมของ F1 ที่ปลาย 5' และ Backward inner primer (BIP) ประกอบด้วยลำดับเบส B2 ที่ปลาย 3' ที่เชื่อมกับลำดับเบสคู่สมของ B1 ที่ปลาย 5'



รูปที่ 2.10 แสดงไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP คือ อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting Temperature) Tm, ความเสถียร(stability) ที่บริเวณปลายของแต่ละไพรเมอร์, GC รวม(GC content), และโครงสร้างทุติยภูมิ(secondary structure)

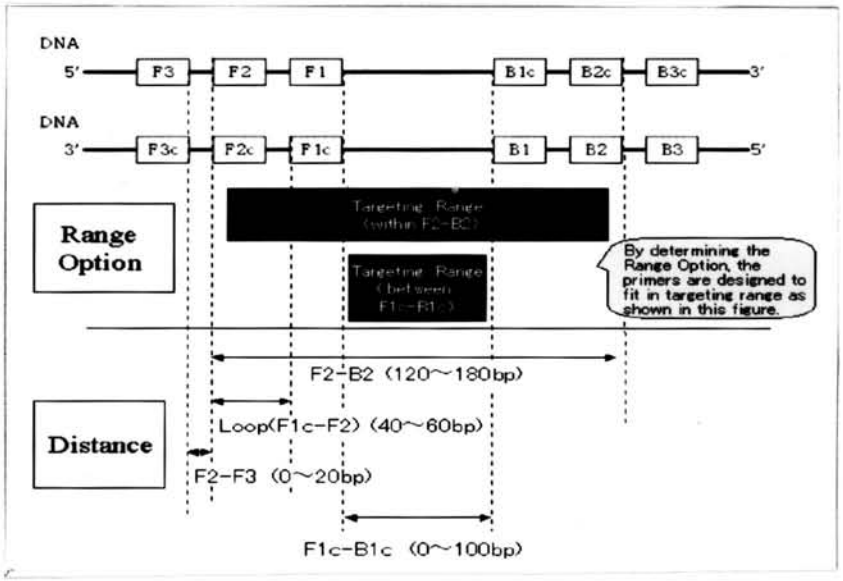
การคำนวณค่า Tm จะมีผลต่อสภาวะของปฏิกิริยา ดังนั้นค่า Tm ในแต่ละบริเวณของไพรเมอร์ได้แก่ บริเวณ F1c และ B1c มีค่าประมาณ 65 องศาเซลเซียส (64-66 องศาเซลเซียส), บริเวณ F2, B2, F3 และ B3 มีค่าประมาณ 60 องศาเซลเซียส(59-61 องศาเซลเซียส)

ความเสถียรที่บริเวณปลายของแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยที่ปลาย 3' ของบริเวณ F2/B2, F3/B3, และที่ปลาย 5' ของบริเวณ F1c/B1c จะต้องมีค่าพลังงานอิสระ (Δ G) เท่ากับหรือน้อยกว่า -4 กิโลเคลอรี่/โมล

ค่า GC รวมจะอยู่ที่ประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ถึง 65 เปอร์เซนต์ สำหรับค่า GC รวมที่อยู่ระหว่าง 50เปอร์เซนต์ ถึง 60เปอร์เซนต์ ถือว่าเป็นลักษณะของไพรเมอร์ที่ดี

โครงสร้างทุติยภูมิมีความสำคัญสำหรับ Inner primer คือ จะต้องไม่สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เพื่อป้องกันการเกิดไดเมอร์ของไพรเมอร์ โดยต้องแน่ใจว่าไม่มีลำดับเบสคู่สมกันกับไพรเมอร์อื่นที่ปลาย 3' (33)

ความยาวและระยะห่างที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละเส้น เป็นดังนี้ ระยะระหว่างปลาย F2 และปลาย B2 จะอยู่ระหว่าง 120-180 คู่เบส ระยะระหว่างปลาย 5' ของ F2 ถึงปลาย 5' ของ F1 จะอยู่ระหว่าง 40 -60 คู่เบส และระยะระหว่าง F2-F3 จะอยู่ระหว่าง 0-20 คู่เบส F1c-B1c จะอยู่ระหว่าง 0-100 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 2.11 (34)



รูปที่ 2.11 แสดงระยะห่างของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

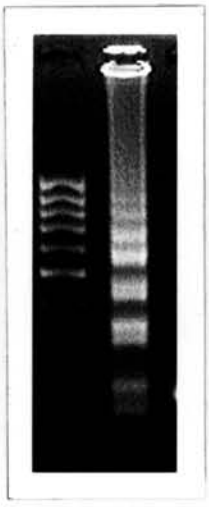
5.3. การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP

การตรวจสอบว่ามีผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP หรือไม่ มีหลายวิธีด้วยกัน

5.3.1. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส จากนั้นนำวุ้นมาย้อมด้วย เอทิเดียมโบรไมด์ หรือสารเรืองแสงอื่นๆ เช่น ไซเบอร์กรีน

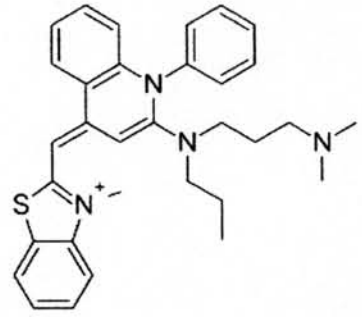
วัน และดูผลบนเครื่อง UV transilluminator จะเห็นลักษณะของผลผลิต LAMP เป็นแถบ เสมียร์คล้ายขั้นบันได ซึ่งเป็นดีเอ็นเอหลายๆขนาดจากเล็กไปถึงใหญ่ ขนาดเล็กความยาวตั้งแต่ F3 ถึง B3 จนถึงชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากเป็น 100 กิโลเบส ดังรูปที่ 2.12 (35)



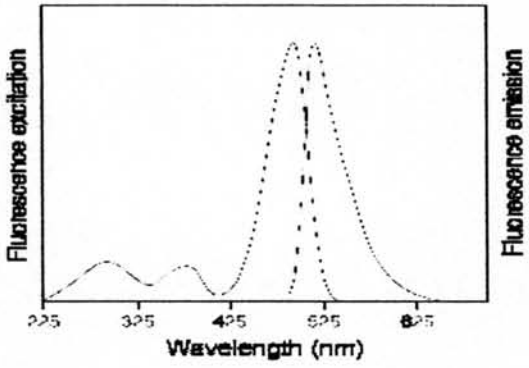
รูปที่ 2.12 แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา LAMP ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

5.3.2. การตรวจสอบโดยใช้ไซเบอร์กรีนวัน (SYBR Green I)

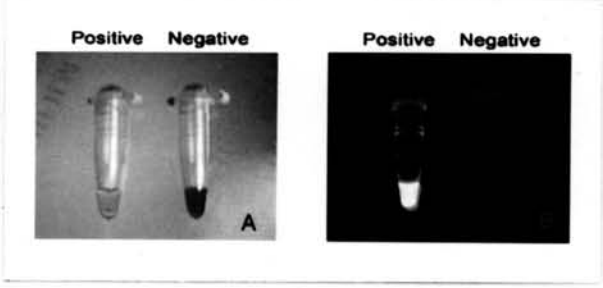
เนื่องจากเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปริมาณมาก โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นน้อยมาก ทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายในปริมาณที่มาก จึงได้มีการนำสีไซเบอร์กรีนวัน (SYBR Green I) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงประเภท ฟลูออโรโครม (Fluorochrome) ชนิดหนึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.13 ใช้ในการดูผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP แทนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา หรือแสงอัลต้าไวโอเลต โดยเติมสีไซเบอร์กรีนวันลงไปในปฏิกิริยา LAMP หรือเสร็จสิ้นปฏิกิริยา LAMP ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลังจากทำปฏิกิริยา LAMP ไซเบอร์กรีนวันจะเข้าจับกับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้โครงสร้างของไซเบอร์กรีนวันเปลี่ยนแปลง ไซเบอร์กรีนวันเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี (UV) ความยาวคลื่น 240-370 นาโนเมตร จะมีการคายพลังงานและเปล่งแสงสีเขียวของฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ในขณะที่ถ้าไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ไซเบอร์กรีนจะอยู่ในรูปอิสระ และจะคายพลังงานในช่วงความยาวคลื่นเดิมที่ประมาณ 590 นาโนเมตร จึงเห็นเป็นสีเดิมของสีไซเบอร์กรีนวันคือสีส้ม ดังรูปภาพที่ 2.14 และ 2.15 (36, 37)



รูปที่ 2.13 แสดงโครงสร้างของไซเบอร์กรีนวัน $C_{32}H_{37}N_4S$



รูปที่ 2.14 แสดงกราฟของไซเบอร์กรีนวันที่เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 240-370 นาโนเมตร และคายพลังงานที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร



รูปที่ 2.15 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ด้วยสีไซเบอร์กรีนวัน
(A) ผลบวก และผลลบ ภายใต้แสงไฟธรรมดา (B) ผลบวก และผลลบ ภายใต้แสงอุลต้าไวโอเลต

5.3.3. **การดูความขุ่นจากการเกิดแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต**(Turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation)

เนื่องจากในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในปฏิกิริยา LAMP จะได้ผลผลิตไพโรฟอสเฟต ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Mg^{2+} ที่มีอยู่ในน้ำยา จะเกิดเป็น $Mg_2P_2O_7$ ขึ้นได้ดังสมการซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนขุ่นขาว และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $Mg_2P_2O_7$ ได้ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

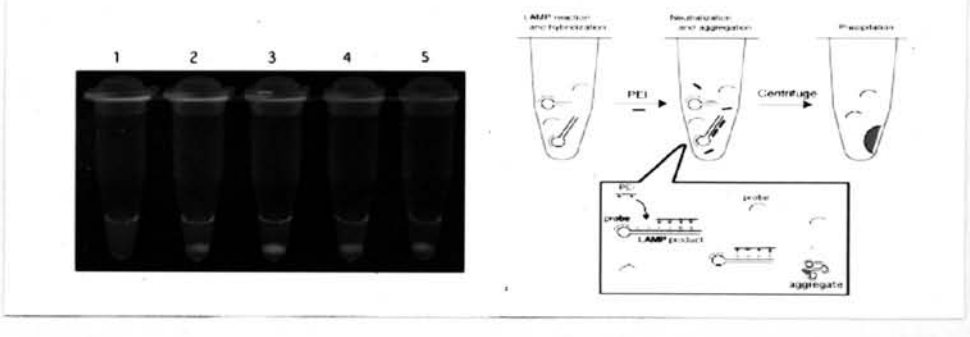
$$(DNA)_{n-1} + dNTP \quad ==> \quad (DNA)_n + P_2O_7^{4-} \qquad [1]$$

$$P_2O_7^{4-} + 2Mg^{2+} \quad ==> \quad Mg_2P_2O_7 \qquad [2]$$

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วสามารถนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $Mg_2P_2O_7$ ถูกพัฒนาไปใช้สำหรับการวัดในเชิงปริมาณได้โดยใช้เครื่อง Real-Time LAMP ซึ่งเป็นเครื่องสเปกโตรโฟโตเมตรีชนิดหนึ่ง (38) ในปัจจุบันได้มีการนำเครื่อง Real-Time LAMP นำไปใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการมากขึ้น โดยมีการประยุกต์ใช้กับเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และปรสิต เป็นต้น

5.3.4. **การตรวจวัดลำดับเบสที่จำเพาะของปฏิกิริยา LAMP โดยการเติม cationic polymers**

การติดฉลาก Oligo DNA probe ด้วยสารเรืองแสงสำหรับ multiplex nucleic acid template เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด และเติมสาร polyethylenimine (PEI) ลงไปหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา LAMP จะทำให้เกิดการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex และเกิดการเรืองแสงขึ้นภายใต้ UV Transilluminator ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (39) ดังรูปภาพที่ 2.16



รูปที่ 2.16 แสดงปฏิกิริยาการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex

5.4. การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

เนื่องจากความรวดเร็ว ความไว และความจำเพาะของเทคนิค LAMP ทำให้มีการนำมาใช้สำหรับการตรวจตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย และปรสิตมากมาย เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว

5.4.1. การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส

สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสด้วยเทคนิคLAMP นั้นพบว่ามีความไวและความจำเพาะมากกว่า หรือเท่ากับวิธี PCR ด้วยเทคนิค Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส West Nile พบว่า RT-LAMP มีความไวมากกว่า RT-PCR 10 เท่า ที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.1 PFU สำหรับการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ Real-Time LAMP สามารถตรวจวัดได้ภายใน 17 นาทีที่ความเข้มข้น 10^4 PFU และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อไวรัส *Flavivirus* อื่นๆ (35) การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ Herpesvirus 7 (HHV-7) ด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีความไวในการตรวจวัดที่ 250 copies/หลอดทดลอง ที่เวลา 60 นาที และ 500 copies/หลอดทดลอง ที่เวลา 30 นาที (41) สำหรับ Human Herpesvirus 6 พบว่าสามารถตรวจวัด ได้ทั้งระยะเฉียบพลัน และระยะฟื้นตัวในเลือด และหากเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ จะทำให้มีความไวเพิ่มขึ้นด้วย โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อในพลาสมาได้ด้วย (42) การตรวจวิเคราะห์ Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) , เชื้อ H5 Avian Influenza Virus และ Human parvovirus B19 ด้วยวิธี LAMP พบว่ามีความไวกว่า conventional RT-PCR ถึง100 เท่า (43-45) โดยสามารถตรวจหาเชื้อ SARS-CoV ที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.01 PFU ความไวและความจำเพาะ 100 เปอร์เซนต์ และ 87 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนการตรวจเชื้อ Herpes Simplex Virus type 1(HSV 1) และ Herpes Simplex Virus type 2(HSV 2) พบว่ามีความไว 500-1,000 copies/หลอดทดลอง เมื่อตรวจวัดด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส และมีความไว 1,000-10,000 copies/หลอดทดลอง เมื่อตรวจวัดด้วยความขุ่น (46) อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสคางทูม(Mumps Virus) เชื้อ Koi Herpesvirus (KHV) hemorrhagic septicaemia virus (VHS) และเชื้อ Japanese Encephalitis Virus ด้วยวิธี LAMP พบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับวิธี PCR (47-49) ในทางตรงกันข้าม จากงานวิจัยในการตรวจหาเชื้อ Herpes Simplex Virus type 1 และ 2 ในน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง ด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีความไวต่ำกว่าเทคนิค Real-Time PCR (50) ในขณะที่ การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส *Plum pox* สายพันธุ์ D, M, EA, C และ W พบว่าเทคนิค LAMP และ Real-Time PCR มีความไวเท่ากัน (51)

5.4.2. การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

เทคนิค LAMP ได้ถูกพัฒนามาประยุกต์ใช้กับเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เพาะเลี้ยงได้ยาก หรือใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. avian* และ *M. intracellulare* ในเสมหะโดยใช้ไพรเมอร์บริเวณยีน *gyrB* พบว่าสามารถตรวจเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งได้ 5-50 copies ในเวลาเพียง 35 นาทีและตรวจเชื้อที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหรือจากเสมหะโดยตรงในเวลา 60 นาที (52) การตรวจวิเคราะห์เชื้อที่ทำให้เกิดโรคเหงือกและฟัน *Porphyromonas gingivalis* ที่บริเวณยีน 16S ribosomal RNA สามารถตรวจได้ในเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส ที่ขีดจำกัดต่ำสุด 20 เซลล์ (53) และสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Yersinia pseudotuberculosis* ในเวลา 30 นาทีโดยใช้ไพรเมอร์บริเวณยีน *inv* (54) การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* ในปลาสามารถตรวจวัดได้ที่เวลา 45 นาที (55) สำหรับการเปรียบเทียบกับวิธี PCR ในการจำแนกเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* จาก *Streptococcus* อื่นๆ โดยเทคนิค LAMP พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี PCR ถึง 1000 เท่า (56) การตรวจวิเคราะห์ *Bordetella pertussis* พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี PCR 100 เท่า (57) การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลา บริเวณ 16S-23S ribosomal RNA และการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Haemophilus influenza พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 เท่า (40, 58)

5.4.3. การตรวจวิเคราะห์เชื้อปรสิต

สำหรับการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อปรสิต ยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจาก เชื้อปรสิตสามารถตรวจวินิจฉัยได้ง่าย และรวดเร็วทั้งจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการใช้เทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น Agglutination test งานวิจัยที่ผ่านมา ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP พบว่ามีความไวและความจำเพาะที่ 95เปอร์เซนต์ และ 99เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (59) และการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Babesia gibsoni* ในสุนัขพบว่ามีความไวในการตรวจวัดเท่ากันที่ขีดจำกัดต่ำสุด 0.0005เปอร์เซนต์ (60)