



THE METHODS OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSES OF FOLATE IN NATURAL PRODUCTS. THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF FOLATE.

(กรรมวิธีในการตรวจหาปริมาณ และ คุณภาพของโฟเลตจากสารธรรมชาติ)

ขวัญชัย รัตนเสถียร, Ph.D.*

Folic acid นับว่าเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญ ต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสัตว์ประเภทเลี้ยงลูกด้วยนม สารประกอบที่เป็นอนุมูลของ Folic Acid โดยรวมๆ กันจะเรียกว่า Folate (IUPAC, 1966) แม้ว่าค้นพบ Folate มาประมาณ 30 ปีเศษแล้วก็ตาม ความรู้เกี่ยวกับ metabolism ของ folate ในคนไข้ด้วยโรคต่าง ๆ ก็ยังมีไม่มากนัก ความสำคัญ ของ Folate metabolism นั้นมีมากโดยเฉพาะในสัตว์ประเภทเลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งรวมถึงมนุษย์เรากด้วยทั้งนี้เนื่องจาก ยังไม่มีข้อบ่งชี้อะไรที่จะบอกว่า มนุษย์ และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ สามารถจะสังเคราะห์สารประกอบเหล่านี้ได้ ดังนั้นแหล่งใหญ่ที่จะได้ folate ที่ร่างกายต้องการก็โดยการดูดซึมจากอาหาร และ ยาที่ประกอบด้วย Folic acid โดยตรง

ปัญหาใหญ่สำหรับการศึกษเกี่ยวกับเรื่องของ folate นั้น ก็คือ การตรวจหาปริมาณ และคุณภาพ เนื่องมาจากเหตุที่ว่า สารประกอบเหล่านี้มีจำนวนน้อยมากในแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติ ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มความรู้ทางด้านการศึกษเกี่ยวกับ folate ผู้เขียนจึงได้จัดการเขียนเกี่ยวกับ วิธีการต่าง ๆ ที่สามารถใช้ประโยชน์ทางด้านนี้ขึ้น จากวิธีการที่มี ใช้กันอยู่ทั่วไป ไปจากประสบการณ์ และ จากวิธีการที่ก่อกำเนิดขึ้นมาเองบ้าง

การตรวจหาปริมาณของ Folate อาจจำแนกได้หลายวิธีดังนี้คือ

1. วิธีการทางเคมี (Chemical methods)
2. วิธีการทางฟิสิกส์ (Physical methods)
3. วิธีการทางชีววิทยา (Biological methods)

*ภาควิชาเคมีคลินิก, คณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. วิธีการทางเคมี ใช้ประโยชน์ได้เฉพาะการวัดปริมาณของ folate ที่เป็นสารที่ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นจึงใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณ ของ folate ในพวดยาเป็นส่วนใหญ่ และวิธีนี้ใช้เป็นวิธีการทางการของสหรัฐอเมริกาในการตรวจหา folate ในยา (U.S. Pharmacopoeia, 1965) ดังนั้นจึงไม่น่ารายละเอียดมาเขียนในที่นี้

2. วิธีการทางฟิสิกส์ มีอยู่ด้วยกันหลายวิธีด้วยกัน เช่น

2.1 Ultraviolet spectroscopy ใช้กันมากทั้งทางด้านการตรวจหาปริมาณ และ คุณภาพของสารที่บริสุทธิ์ วิธีการทางด้านการตรวจหาคุณภาพนั้น ก็ทำได้โดยการใช้เทียบ spectra กับ ของที่รู้จักกันอยู่แล้วที่ pH ต่างๆ (ตารางที่ 1) และสำหรับการตรวจหาปริมาณนั้น ก็ทำได้โดยการใช้ spectra ที่กล่าวมาแล้วโดยอาศัยสมการต่อไปนี้

$$A = C.E.d$$

A = Absorbance ; C = ความเข้มข้นเป็น Molar

E = Extinction coefficient และ

d = ความกว้างของทางเดินของแสง ที่ผ่านสารละลายที่ทำการตรวจหาปริมาณ
สำหรับ E นั้นแสดงไว้ในตารางที่ 1 เช่นกัน

2.2 Nuclear magnetic resonance spectroscopy ก็มีการนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณและ คุณภาพของ folate แต่ต้องการสาร

ตัวอย่างกรวละมากๆ และ บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงไม่ค่อยมีประโยชน์สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ folate ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะใช้กันเพื่อ การตรวจหาโครงสร้างของ folates และ ขณะนี้การค้นคว้ากำลังดำเนินอยู่ใน การที่จะหาวิธีการที่จะใช้ Nuclear magnetic resonance spectroscopy ในการศึกษาสารปริมาณน้อยในธรรมชาติ แต่ก็ยังไม่ค่อยมีความสำเร็จนัก

2.3 Chromatography ใช้กันมากในการศึกษาเกี่ยวกับ folate ในธรรมชาติ มีการใช้ทั้ง Column, Thin-layer และ paper chromatography วิธีการทาง chromatography ใช้ประโยชน์ในการแยกสารละลายที่เป็นสารผสมซึ่งมี folate อยู่ด้วย หรือ ในสารละลายที่มี folates ก่อนที่จะใช้วิธีการอย่างอื่นในการตรวจหาปริมาณ และ คุณภาพต่อไปโดยทั่ว ๆ ไป วิธีการที่ใช้ก็มีเช่น

2.3.1 Column-ultraviolet spectroscopy หลักการก็คือใช้ column chroma-

tography แล้วนำ fractionated eluates มาวัดหา absorbance ที่ 280 nm จากนั้นนำมาเขียนเป็นกราฟ และ เมื่อเทียบกับสาร

มาตรฐาน ก็จะใช้ตรวจหาปริมาณ และ คุณภาพ ได้

2.3.2 Colu - mn microbiological assays หลักการก็คือ หลังจากที่ใช้ column chromatography ในการแยกสารผสมของ folates ออกมาด้วยวิธีการแบบ 2.3.1 แล้วนำ eluates มาทำการ microbiological assays ดังที่จะอธิบายต่อไปในข้อ 3.

2.3.3 Thin layer - ultraviolet light (wavelengths 254 or 365 nm) หลักการนี้ใช้ Thin layer plates ที่เคลือบด้วยสารที่เป็น fluorescent indicator ซึ่งหลังจากที่เรา developed thin layer plates ที่มี folates แล้วในหัวทำละลายหลายๆ แบบแล้วนำมาอ่านค่า Rf ภายใต้แสง ultraviolet ที่ความถี่คลื่น 254 และ 365 nm เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ก็จะใช้ในการตรวจหาคุณภาพของสาร folate ได้ ตัวอย่างของการใช้วิธีการนี้แสดงไว้ในตารางที่ 2

2.3.4 Thin layer or paper chromatography-microbiological assays หลักการก็คือ หลังจากที่เรา developed chromatography แล้วก็นำเอา plate หรือ paper นั้นมาตัดเป็นส่วนเท่าๆ กัน 10 ส่วน หรือ มากกว่าแล้วแต่ความต้องการโดย ติดตามแนวขวาง กับระยะทางที่สารตัวอย่างวิ่งไป ทั้งนี้การใส่สารตัวอย่างลงไปบน plate หรือ paper นั้น แทนที่จะใส่เป็นจุดๆ ที่จุดเริ่มต้นเหมือนกันทั่วๆ ไปเราจะใช้ขีดเป็น ทางยาวตลอดแนวของจุดเริ่มต้น ซึ่งอาจทำได้โดยจุดดี ๆ คัดกัน หรือ ใช้เครื่องมือสำหรับการนี้โดยเฉพาะหลังจากตัด chromatograms เป็นส่วน ๆ ตาม

ที่ต้องการแล้วเราก็นำเอาส่วนต่าง ๆ ไป eluted แล้วนำเอา eluates ไปทำการ microbiological assays ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

2.3.5 Bioautography เป็นการใช้หลักการคล้าย ๆ กับข้อ 2.3.4 แต่ที่ไม่มีหลักการ chromatograms เป็นส่วน ๆ และ การใส่สารตัวอย่างก็ใส่เป็นจุด ๆ อย่างปรกติ และการทำ microbiological assay ก็ทำในรูปของแข็ง และการอ่านผล ก็อ่านได้ด้วยการโดยอาศัย สารช่วยให้เกิดขึ้นบนแผ่น chromatogram สำหรับวิธีการนี้ทำคล้าย ๆ กับการตรวจหาสารที่เป็น antifolate ดังที่ได้อธิบายแล้ว (K.Ratanasthien, 1976) มีข้อแตกต่างกันที่ microorganisms ที่ใช้นั้นใช้ได้ทั้งสามแบบคือ *L.casei*, *S.faecalis* และ *P.cerevisiae* โดยที่การทำ bioautography นี้เราจะเห็นส่วนที่มีการเจริญเติบโตของ microorganisms เป็นสีแสดเนื่องจากการเปลี่ยนรูปของ tetrazolium จากไม่มีสีเป็นสีแสดของอนุผล formazan ด้วยขบวนการ reduction และ เพื่อขจัดปัญหาที่จะมี background ที่มีสีมากเกินไปเนื่องจากการเจริญเติบโตของ micororganisms ดังนั้นจึงต้องใช้ microorganisms ที่มี folate อยู่ใน culture เพียงเล็กน้อย หรือ ไม่มีเลย โดยทำการล้าง culture ที่เตรียมไว้ประมาณ 18-24 ชม. ก่อนหน้าการทดลอง 1 ครั้งด้วย assay media จากนั้นเลี้ยง microorganism ไว้ใน media ที่ไม่มี folate (assay media) อีกประมาณ 6 ชม. หลังจากนั้นล้างอีก 1-3 ครั้งด้วย assay media แล้วทำการเจือจาง microorganisms ประมาณ 1:20 จากนั้นนำไปใช้เหมือนการทำ Bioautography ของ antifolate.

ตารางที่ 1 Absorption spectra of folates and folate analogues.*

Compound	pH		max (nm)			E max (mol.) x 10 ⁻³	
Folic acid	1	246	296			20.4	
	1	247	296	12.8		19.7	
	7		282	346		27.6	7.2
	11	255	282	365	26.5	26.3	9.4
	13	256	283	365	24.5	23.4	8.5
	13	256	283	365	26.9	25.9	9.4
	13	256	284	366	24.6	24.5	8.6
10-formylfolic acid	1	252		321	21.8		7.6
	7	245	269	348	20.0	20.9	5.7
	13	257		366	31.6		6.8
	13	256		366	31.8		6.8
Dihydrofolic acid (DHF)	1	256	282			19.9	
	1		283			15.4	
	7	224	282	304	32.7	28.4	
	7	225	282	304	24.1	22.4	
	7.5		283	306		19.0	
	11		284			22.6	
	13		284	306		27.0	
	13		288	306		18.2	
	13	241	285	309		20.4	
5-methyl-5,6-DHF	7		290			31.2	
10-methyl DHF	7		284	305		30.0	30.3
Tetrahydrofolic acid (THF)	0		267	292		15.4	20.6
	1		271	292		21.4	19.1
	3	215	270	290	40.8	25.4	22.8
	7	220	297		31.4	29.1	
	7		297			22.0	
	7		298			28.0	
	7		298			25.0	

Compound	pH		max (nm)		E _{max} (mol.) x 10 ⁻³		
	7.2		298		28.4		
	7.5		298		22.0		
	13		298		25.7		
	13		290		21.6		
5,10-methylene THF	7.2		294		32.0		
	7.5		295		25.0		
5-formyl THF	7		285		37.2		
	13		282		28.2		
10-formyl THF	7	258					
	13	253			15.3		
5-10-diformylTHF	13	266			17.1		
5-formyl-10-methylTHF	1		281	314			
	13		294	314			
5,10-methenylTHF	0		290	348		26.5	
	0		288	345	13.5	26.0	
	2		283	352	11.8	25.0	
	3	263	281	360		25.1	
5-formiminoTHF	7		285		35.4		
5-methylTHF	7		290		31.7		
8-dehydro-4a-hydroxy 5-methylTHF	7		290		17.8		
2-Dimethylamino-2-deaminofolic acid	1	245	293				
	13		278	387			
10-methylfolic acid	1	250	307		13.9	25.0	
	7	282	301		25.0	26.4	
	13	255	302	368	26.2	26.9	9.6
Homofolic acid	13	255	281	365	24.6	19.5	7.9
3'-methylfolic acid	13	255	285	365			
3'-bromofolic acid	1		296			21.6	
	13	256	282	366	26.2	25.0	8.9
3'-chlorofolic acid	13	255	278	365			
3'-iodofolic acid	13	255	280	365			

Compound	pH	max (nm)		E max (mol.) x 10 ⁻³			
3',5'-dinitrofollic A	13	258	367				
3',-dichlorofolic A	1		280				
	13	256	365				
3,-chloro-10-methylfolic acid	1		303			13.7	
	13	257	280	362	27.6	18.6	8.4
3',5'-dichloro-10-methylfolic acid	1		318			12.7	
	13	252	363	28.2		9.2	
2-hydroxy-2-deaminofolic acid	1		298			17.8	
	13		280	370		26.2	7.1
4-amino-4-deoxyfolic acid	1	244	290	355	18.6	21.3	12.0
(aminopterin)	13	260	284	370	28.5	26.4	8.6
4-amino-10-methyl-4-deoxyfolic acid	1	244	307		17.3	19.7	
(amethopterin)	13	257	302	370	23.0	22.0	7.1
4-amino-2'-dimethylamino-2-deamino-4-deoxyfolic acid	1	253	293	350			
	13		275	397			
4-amino-3'-chlorodeoxyfolic acid	13	260	280	369			
4-amino-3',5'-dichloro-4-deoxyfolic acid	1		280	335			
	13	259		370			
4-amino-3',5'-dichloro-10-methyl-4-deoxyfolic acid	1	240		330	23.1		12.1
	13	258		370	25.6		7.6
4-amino-3'-chloro-10-methyl-4-deoxyfolic acid	1	242	282	336	20.5	14.4	11.0
	13	259	280	370	28.3	18.0	7.5
4-amino-3'-bromo-10-methyl-4-deoxyfolic acid	1	241	283	336	21.4	14.1	10.8
	13	260	280	370	28.2	17.8	7.5
4-amino-3'-bromo-5',-chloro-10-methyl-4-deoxyfolic acid	1	240		332	25.0		11.9
	13	257		372	26.7		7.9

* modified from Blakley, 1969, and Gapski et al, 1971.

ตารางที่ 2 Rf values of pterates and folates. MN 300 UV plates. (Beavon, 1973)

Compound	Appearance under 254* or 365 nm UV light.	Rf values in solvent			
		1	3	2	4
Pteric acid	Absorbing*	0.15	0.00	0.28	0.00
10-formylpterioic acid	Blue	0.78	0.68	0.24	-
Pteroylglutamic acid	Absorbing*	0.50	0.00	0.12	0.05
10-formylpteroylglutamic acid	Blue	0.92	0.65	0.30	0.78
7,8-dihydropteroylglutamic acid	Light blue	0.39	0.55	0.30	0.15
Tetrahydropteroylglutamic acid	Absorbing*	0.78	0.43	0.35	0.64
5-formyl-H ₁ PteGlu	Absorbing*	0.87	0.69	0.32	0.71
5,10-CH = H ₄ PteGlu.	Bluish-White	0.65	0.38	decomposed	0.42
5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu	Absorbing*	0.92	0.85	0.28	0.61
5-CH ₃ H ₄ PteGlu	Absorbing*	0.85	0.68	0.55	0.78
10-formyl-H ₄ PteGlu	Absorbing*	0.82	0.43	0.52	-
Teropterin (PteGlu ₃)	Absorbing*	0.94	0.30	0.08	-

These solvents are shown in Table 3

ตารางที่ 3 Chromatography solvents used in the work of Table 2

Solvent system	Composition
1.	0.1M phosphate buffer, pH 7.0.
2.	n-Propanol/ammonium hydroxide (s.g. 0.88)/water, 200/1/99 (v-v). Made immediately before use.
3.	n-Butanol/acetic acid/water, 4/1/5, upper phase. Equilibrated for 18 to 24 hour at room temperature before use.
4.	3% (w/v) aqueous ammonium chloride.

All chromatography solvent systems contained 1% (v/v) 2-mercaptoethanol as anti-oxidant unless otherwise specified.

2.4 Radioassay หลักการของวิธีนี้
โดยอาศัยการค้นพบว่า ในนมมีโปรตีนซึ่ง
สามารถจับ folate ไว้ได้ และความสามารถ
ในการจับ folate นี้ (Ghitis, 1967) ก็มี
ค่าคงที่หนึ่ง ดังนั้นถ้าหากเราสามารถแยก
เอาสารที่เป็นตัวจับ folate นี้มาได้ และ
โดยใช้ radioactive folate ช่วยด้วย
เราก็สามารถใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณของ
folate ได้ โดยการใช้ตัวจับ folate ใน
ปริมาณเท่า ๆ กันและมีค่าคงที่ สำหรับการจับ

folate สูงกว่าในสารละลายที่เราจะตรวจหา
ปริมาณและหลังจากที่ folate จากสารที่เรา
จะตรวจหาถูกจับหมดแล้วโดยตัวจับ เราก็ใส่
radioactive folate ลงไปจำนวนเท่า ๆ กัน
ซึ่งเมื่อรวมกับ folate ที่เราจะตรวจหาแล้วมาก
กว่าความสามารถของตัวจับจะรับไว้ได้ แล้ว
เราก็คูดซึมเอา radioactive folate ออกมา
โดยใช้ activated charcoal หรืออย่างอื่น
และ radioactivity ของ folate ในสารละลาย
นั้นย่อมจะเปลี่ยนแปลงตรงข้ามกับปริมาณของ

folate ที่เราจะตรวจหา ซึ่งจะทำให้เราสามารถสร้าง standard curve และ ตรวจหาปริมาณของ folate ได้ซึ่งวิธีที่ใช้โดยทั่วไปก็มีกันอยู่มากมายแต่ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากยังอยู่ในระหว่างการปรับปรุงกรรมวิธี (Waxman, Schreiber and Herbert, 1971; Rothenberg, daCosta and Rosenberg, 1972; Archibald, Mincey and Morrison, 1972 Tajudin and Gardyna, 1973)

ทั้งนี้ทางคำแนะนำละเอียดของวิธีต่าง ๆ จึงไม่นำมาเขียนไว้ในที่นี้ แต่ก็สามารถอ่านได้จากหนังสืออ้างอิง ดังกล่าวนั้น

3. วิธีการทางชีววิทยา (Biological methods) ใช้ประโยชน์ได้สำหรับการตรวจหาปริมาณของ folate ในสารจากธรรมชาติโดยเฉพาะจากสารประเภทอาหาร วิธีการทางชีววิทยานี้มีทั้ง แบบ ที่ค่อนข้างมีความจำเพาะเจาะจงและที่ไม่จำเพาะเจาะจงร่วมกัน

3.1 Chick assay เป็นกรรมวิธีที่ค่อนข้างใช้เวลามากและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงไม่เป็นที่นิยมใช้กันหลักการสำหรับวิธีการแบบนี้คือ ใช้ลูกไก่จัดเป็นกลุ่ม ๆ และเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีสารที่เรา จะตรวจหาจากนั้นใช้ลูกไก่กลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร และมีจำนวน folate ปริมาณต่าง ๆ กัน ในขณะที่เดียวกันก็ใช้ลูกไก่กลุ่มอื่นๆ เลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วน ประกอบ

ของสารที่ต้องการจะหา folate หลังจากเลี้ยงลูกไก่เหล่านี้ประมาณ 2-3 อาทิตย์ก็นำเอาลูกไก่กลุ่มต่างๆ มาชั่งน้ำหนักและเขียน Standard curve เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารที่ต้องการ หาได้

3.2 Microbiological assay เป็นกรรมวิธีทางชีววิทยาโดยการเลี้ยง จุลชีพที่มีความต้องการ folate ในการเจริญเติบโตใน culture media ที่ปราศจาก folate จากนั้นเติมสาร folate ในปริมาณต่าง ๆ เพื่อใช้เป็น Standard curve และเติมตัวอย่างสารที่ต้องการหาลงไป ใน culture tube อื่น ๆ เมื่อทำการอ่านค่า O.D. ของ culture แล้วก็จะสามารถสร้าง Standard curve และหาปริมาณของ folate ในสารที่ต้องการตรวจหาได้ สำหรับจุลชีพที่ใช้โดยทั่วไป จะมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ และความต้องการ folate ของจุลชีพแบบต่าง ๆ ก็ไม่เหมือนกันดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 4 (Ratanasthien, K., 1975)

วิธีการตรวจหา ปริมาณ และ คุณภาพ ของ folate โดยวิธี microbiological assays

โดยทั่ว ๆ ไปลักษณะของวิธีการที่ใช้ในการตรวจหา folate มีใช้กันอยู่สองแบบคือ วิธี aseptic addition method และ extraction method

ตารางที่ 4 Response of folates on various microbiological assays.

Compound	L. casei	S. faecalis	P. cerevisiae
Pte	-	+	-
5-CHO H ₄ Pte	-	+	-
10-CHO H ₄ Pte	-	+	-
PteGlu	+	+	-
PteGlu ₂	+	+	-
PteGlu ₃	+	-	-
PteGlu ₇	-	-	-
10-CHO pteGlu	+	+	-
10-CHO PteGlu ₃	+	-	-
H ₄ PteGlu	+	+	-
10-CHO H ₂ PteGlu	+	+	-
5-CH ₃ -5,6-H ₂ PteGlu	(±) +	-	-
5-CH ₃ -5,8-H ₂ PteGlu	-	-	-
H ₄ PteGlu	+	+	+
5-CHO H ₄ PteGlu	+	+	+
5-CHO H ₄ PteGlu ₂	+	+	+
5-CHO H ₄ PteGlu ₃	+	-	+
5-NCHO H ₄ PteGlu	+	+	+
10-CHO H ₄ PteGlu	+	+	+
5,10-CH ₂ -H ₄ PteGlu	+	+	+
5-10-CH=H ₄ PteGlu	+	+	+
5-CH ₃ -H ₄ PteGlu	+	-	-
4a-OH-5-CH-3 4a, 5,6,7-H ₄ PteGlu	-	-	-

(±) indicates results are negative when ascorbic acid was omitted

ในวิธีการแบบแรกนั้น การหา folate ในสารต่างๆ จะต้องผ่านขั้นตอนในการสกัดเอาสาร folate ออกมาจากสารที่ต้องการหาเสียก่อน โดยการต้มใน autoclave, 15°C 10 min. และใช้ ascorbic acid เป็นตัวช่วยลดการสูญเสีย เนื่องจากการสลายตัวของ folate ในขณะที่มีการต้ม (autoclave) เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกไป ส่วนในกรรมวิธีแบบที่สองนั้นจะต้องอาศัยการต้มหรือสามารถทำให้มีสารตัวที่อยู่ใน aseptic condition และวิธีการนี้ใช้ได้สำหรับตัวอย่างเล็กน้อย เนื่องจากสามารถเก็บตัวอย่างได้ไม่ลำบากนักและไม่มีการสูญเสียของสาร folate อันเนื่องมาจากการต้มในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาอย่างวิธีแรก

วัสดุและวิธีการ นอกจากเครื่องมือที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการทั่วไปแล้วสิ่งต่อไปนี้จะต้องจัดหา

- Folic acid (pteroyl glutamic acid) สำหรับใช้เป็น Standard (i.e. ซื้อได้จาก BDH, Sigma, Fischer).
- 0.1N phosphate buffer pH 6.1
- Universal containers หรือ test tubes ขนาด 16 x 125 หรือ 16 x 100 มม. กับฝาปิดแบบครอบ (โลหะหรือพลาสติกทนความร้อน)

น้ำกลั่นส่วนใหญ่จะใช้ double glass-distilled water

- Microorganisms; *L. casei*, *S. faecalis* or *P. cerevisiae* i.e. หาได้จาก

National Collection of Industrial Bacteria (NCIB)

Torry Research Station, P.O. Box 31
Aberdeen AB 9 8 DS, SCOTLAND.

- Water bath หรือตู้แช่ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

- Culture media และ assay media สำหรับแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้

- Spectrophotometer

- Autoclave

การเตรียมสำหรับการเริ่มในห้องปฏิบัติการที่ยังไม่เคยทำมาก่อน

นอกจากวัสดุต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วปัญหาสำคัญจะอยู่ที่การได้ microorganisms ในแบบที่ไม่มี contamination ดังนั้นจะต้องการผู้มีความรู้ทางด้าน microbiology พอสมควรเพื่อที่จะสามารถตรวจดูได้ว่า culture ที่ซื้อมานั้นเมื่อนำมาทำการ sub-culture แล้วยังอยู่ในแบบที่ต้องการหรือไม่ ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการจัดทำ การทดลองนี้ ก็โดยการหา culture ที่ต้องการใช้จากห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่ใช้อยู่เป็นประจำแล้ว สำหรับในประเทศไทยก็มีเช่นศูนย์วิจัยโลหิตและทุโภชนาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หลังจากที่ได้ microorganisms ที่ต้องการแล้วก็จะต้องมี การ sub-culture ของ culture (S) ที่ได้มาทุก ๆ 2-3 สัปดาห์ และการเก็บ culture (s) เหล่านี้ตามประสิทธิภาพนั้นพบว่าการเก็บไว้ในรูปของสารละลายใน culture media นั้นใช้ได้ดีและสะดวก

ก่อนการทำการทดลองหนึ่งวันจะต้องมีการทำ subculture ของ microorganisms ที่ต้องการใช้เพื่อที่จะได้ culture ที่มีอายุประมาณ 16-18 ชม. และในวันรุ่งขึ้นที่จะทำการทดลอง จะต้องทำการ subculture อีกครั้งใน assay media เพื่อให้ได้ Culture (s) ที่มีอายุประมาณ 6 ชม. ในเวลาที่เต็มลงไป ใน assay tests นั้นจะต้องทำการล้าง Culture (a) นี้ด้วย single strength assay media ประมาณ 1-3 ครั้ง เสร็จแล้วเจือจาง 1 ต่อ 20 เพื่อที่จะใช้งานได้

การเตรียมสารมาตรฐาน (Standard solutions) Stock solution สำหรับ *L. casei* and *S. faecalis* ชั่ง 10 มก. ของ folic acid (pteroylglutamic acid) แล้วละลายใน 1,000 ml volumetric flask ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ NaOH เล็กน้อย เพื่อช่วยให้การละลายได้ดีขึ้นจากนั้นปรับให้ได้ pH 7.0 ด้วยกรดเกลือแล้วเติม ethanol เข้าไป 200 มล. และปรับให้ได้

ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C. (10 µg/ml)

สำหรับ *P. cerevisiae* ชั่ง 20 มก. ของ $\pm$ folinic acid ($\pm$ 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid) ซึ่งจะต้องมี biological activity 10 มก. แล้วละลายใน 2% ascorbate water 1 ลิตร (10 µg/ml) จากนั้นแบ่งเก็บในขวดเล็กๆ ที่มีฝาปิดขวดละประมาณ 2 ถึง 3 มล. การเก็บนั้นให้เก็บที่ในตู้แช่แข็ง (-20°C) และเวลาใช้ก็นำออกมาละลายใช้คราวละ 1 ขวด Working standard

เจือจาง Stock standard 1/100 ด้วย phosphate buffer pH 6.1 (สำหรับ extraction method) และด้วย 2% ascorbate water (w/v) สำหรับ aseptic addition method (100 ng/ml)

สำหรับ *P. cerevisiae* ให้ทำการเจือจาง stock standard 1: 100 จะทำให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/ml

Standard Curves

ทำการเจือจาง working standard ด้วย 0.1 N phosphate buffer pH 6.1 สำหรับ extraction method และ 2% ascorbate water สำหรับ aseptic addition method มีความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 Standard solutions สำหรับ Standard curves ของ microbiological assay ด้วย *L. casei*, *S. Faecalis* และ *P. cerevisiae*.

Test organism	Standard (ng/ml)											
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0	10.0	15.0	20.0	30.0
<i>L. casei</i>	x		x		x			x	x	x	x	x
<i>S. faecalis</i>	x	x	x		x	x	x	x	x			
<i>P. cerevisiae</i>	x	x	x	x	x	x	x	x				

ตารางที่ 6 การเตรียม Test สำหรับ microbiological assay ด้วย *L. casei*, *S. faecalis* & *P. cerevisiae* (aseptic addition)

Test	Double strength assay media	2% Ascorbate water (ml)	Standard (ml)	Unknown (ml)
Standard	2.0	1.9	0.1	—
Unknown	2.0	1.9	—	0.1

ตารางที่ 7 การเตรียม Test สำหรับ microbiological assays ด้วย *T. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae* สำหรับวิธี extraction.

ตารางที่ 7 การเตรียม extract ของสารตัวอย่างและ standard

Test	Standard (ml)	Sample (ml)
Standard	0.5	—
0.1 M phosphate buffer pH 6.1	4.5	4.5
Serum	—	0.5

หลังจากเตรียมตามตาราง 7 ก. แล้วนำไปต้มด้วย autoclave ที่ 120° ซ. หรือ 15 ปอนด์ ต่อ 1 ตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกเอาตะกอนโปรตีนออกไปหลังจาก centrifuge ประมาณ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 7 ข. การเตรียม Test สำหรับวิธี extraction

Test	Double strength assay media (ml)	0.1 N phosphate buffer pH 6.1 (ml)	extract (ml)	standard (ml)
Samples	1.0	1.0	1.0	—
Standards	1.0	—	—	1.0

การทำการทดลอง

การเก็บ sample ทำการเก็บ venous blood จากคนไข้ หรือ จากคนที่เราต้องการจะตรวจหาปริมาณ 10 มล. จากนั้นปล่อยให้เลือดแข็งตัวในหลอดแก้ว (ฝาเกลียว) โดยใช้เวลาประมาณ 1/2 ถึง 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 1000xg ประมาณ 10 ถึง 15 นาที แล้วแยกเอา serum ออกมาใส่ไว้ในขวดฝาเกลียว และเติม ascorbic acid (2-5 มก/มล.) ก่อนที่จะนำไปเก็บแช่แข็ง (-20°ซ) จนกว่าจะถึงเวลาที่จะใช้

หลังจากการเตรียมสิ่งต่าง ๆ ที่ต้องการใช้เรียบร้อยแล้ว ก็ทำการทดลองโดยการเตรียมแต่ละตัวอย่างเป็น triplicate สำหรับวิธีทั้งสอง แก่สำหรับวิธี aseptic addition ควรจะทำ blank สำหรับแต่ละตัวอย่างที่ทำการทดลอง และ หลังจากที่ได้เลี้ยง microorganisms ตามที่ต้องการจนครบเวลา (16-20 ชม.) แล้วก็ทำการอ่านเพื่อหาผลโดยการวัด optical density ที่ความถี่คลื่น 590 nm หรือ ด้วยการใช้ titrate หากกรณีที่เกิดขึ้นจาก

การเลี้ยงเชื้อ *L.casei* ด้วย 0.1 N NaOH เมื่ออ่านผลระยะแรกตั้งนั้นแล้ว ก็ทำการเขียน standard curve และอ่านผลออกมาเป็นหน่วย ng/ml ตัวอย่าง standard curve สำหรับ *L. casei*, *S. faecalis* และ *P.cerevisiae* นั้นแสดงไว้ในรูปที่ 1.

บทวิจารณ์

ในการตรวจหาปริมาณของ folate ในสารจากธรรมชาตินั้นปรากฏว่าวิธีการที่ยังนิยมใช้กันนั้นก็คือ microbiological assays และที่ใช้กันอย่างแพร่หลายก็โดยใช้ *L.casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae* การใช้จุลชีพทั้งสามแบบนี้มีประโยชน์ต่างกันถึงที่เห็นได้จากตารางที่ 4 ซึ่งจุลชีพแต่ละแบบก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ใน culture ที่มี folate แบบต่างๆ ซึ่งถ้าหากจะเขียนแบบย่อ ๆ ก็จะได้ความว่า สำหรับ *L. casei* นั้นใช้ตรวจหา folate ได้เกือบทั้งหมดและ *S. faecalis* ใช้ตรวจหาได้คล้าย ๆ กันกับ *L. casei* แต่ยกเว้น 5-methyltetrahydropteroylglutamic acid ดังนั้น

ผลของความแตกต่างระหว่างการวัดด้วย *L. casei* กับ *S. faecalis* จะเป็นการตรวจหา 5-methyltetrahydropteroylglutamic acid (Johns and Bertino, 1965) ส่วน *P. cerevisiae* นั้น มีความแตกต่างกับ *S. faecalis* ตรงที่ จุลชีพแบบนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตใน culture ของ folic acid (pteroylglutamic acid) และ 10-formylpteroylglutamic acid ดังนั้น ความแตกต่างระหว่าง *S. faecalis* กับ *P. cerevisiae* จะเป็นการตรวจหา 10-formylpteroylglutamic acid หรือ pteroylglutamic acid

สำหรับ folate ที่มี *P. cerevisiae* activity นั้นพบว่าโดยทั่ว ๆ ไปใน serum และ urine จะเป็น 10-formyltetrahydropteroylglutamic acid (Blair et al 1974; Ratanasthien et al 1974; Nixon and Bertino, 1972) การใช้วิธีแบบง่าย ๆ นี้ย่อมบอกได้เพียงคร่าว ๆ เท่านั้น ดังนั้นหากจะมีความมั่นใจมากขึ้นก็จะต้องมีการ ตรวจดู ให้แน่ชัด ซึ่งก็อาจทำได้โดยวิธี bioautography ด้วย *L. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae* ซึ่งก็ทำได้โดยวิธีคล้าย ๆ กับการตรวจหาสารที่เป็น antifolates (Ratanasthien, K. 1976).

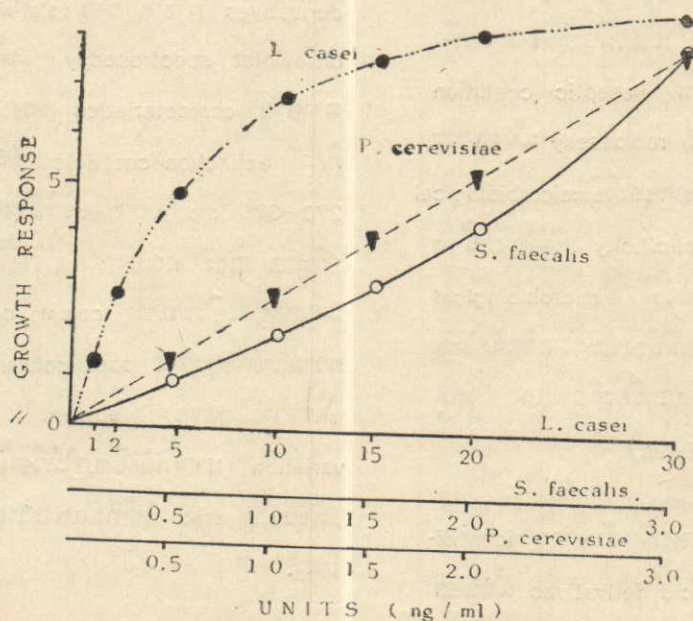


Figure 1 Standard curves สำหรับ *L. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae* (ตัวอย่างของ standard curves ของ culture อายุประมาณ 16-20 ชม.)

การใช้วิธี microbiological assays ทั้งสองแบบนี้มีข้อเสียด้วยกันทั้งคู่ คือ สำหรับวิธี extraction method นั้นค่าของ folate ที่ตรวจหาได้นั้นมักจะต่ำกว่าความเป็นจริง ทั้งนี้เนื่องมาจากการสลายตัวของสาร folate จากการถูกความร้อน ในขณะที่ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยการ autoclave สำหรับวิธี aseptic addition method นั้นมีข้อเสีย คือ หากว่า sample ที่เก็บได้ หรือ การทำการทดลองนั้นไม่อยู่ใน aseptic condition จะทำให้ผลการทดลองผิดไป คือ อาจจะได้ค่าที่สูงกว่าปกติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำ sample blank สำหรับแต่ละ sample เพื่อที่จะได้ตัดปัญหาเกี่ยวกับการที่ค่าที่ได้สูงขึ้นเนื่องมาจากการทำการทดลองนั้นไม่อยู่ใน aseptic condition สำหรับวิธีการทางกัมมันตภาพรังสี radioassay นั้นผลการทดลองไม่แตกต่างไปจากของวิธี microbiological assays และไม่มี specificity ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่มีประโยชน์มากไปกว่า microbiological assays และยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลายเนื่องจากความยุ่งยากทางด้านเครื่องมือ และ วัสดุ (i.e. radioactive folates)

สำหรับการตรวจหาในด้านการ identification ของ folic acid derivatives นั้นนอกจากการใช้ bioautographic technique ซึ่งมี specificity ต่ำมากเพราะเป็นการใช้ทั้งค่า Rf values และ biological activity (การวางที่

2 และ 4) การใช้วิธีทาง Thin-layer chromatography (TLC) โดยวิธีใส่ sample เป็นเส้นตามแนวขวางกับทางเดินของ solvent ที่ใช้ในการ develop TLC และทำการ microbiological assays ของ eluted samples จากการตัด TLC Plate เป็น 10 หรือ 20 ส่วนก็สามารถใช้แทน bioautographic technique ได้ก็.

สำหรับการใช้ column chromatography ร่วมกันกับ ultraviolet spectroscopy นั้นนับว่ามีประโยชน์ในการตรวจหา folic acid derivatives ได้ดีพอควร เนื่องจากการใช้ column chromatography นั้นเป็นการแยก derivatives ต่าง ๆ ของ folate ออกมา และ ultraviolet spectroscopy นั้นเป็นการหาทางด้าน characteristics ของ folate ซึ่งมีค่า extinction coefficient (ϵ) ในช่วง 270-370 nm การใช้วิธีนี้จึงสามารถได้ทั้งปริมาณ และ คุณภาพ แต่วิธีนี้มี variation มากพอควรซึ่งรวมทั้ง column condition เช่น ความแน่นของการ pack column, อุณหภูมิ อัตราการไหลของ solvent เนื่องจากมี variation มากนั่นเองจึงทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย และ ใช้กันเฉพาะงานวิจัยเป็นส่วนใหญ่.

สรุป

1. การตรวจหาระดับของ serum และ urine folate อาจทำได้โดยวิธี microbiolo-

gical assay ด้วย *L. casei* หรือ ใช้วิธี radioassay

2. การตรวจหาอนุผลของ folic acid นั้นอาจตรวจได้กว้างๆ โดยการหา differential microbiological assay ด้วย *L. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae*

3. การตรวจหาอนุผลของ folic acid อย่างแน่นอนนั้นการใช้ bioautographic technique โดยอาศัย *L. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae* นับว่าได้ผลดีมาก และไม่ยุ่งยากซับซ้อน

4. การใช้ thin-layer chromatography แบบ horizontal line application ร่วมกับ microbiological assay (ด้วย *L. casei*, *S. faecalis* และ *P. cerevisiae*) นั้นสามารถใช้ทดแทน bioautographic technique ได้

5. ในการศึกษาเกี่ยวกับค่าน folate metabolism นั้น ความรู้เกี่ยวกับ chromatography แบบต่าง ๆ นับว่ามีประโยชน์มาก

Abstract

Principle of various methods for the detection and identification of folate in natural products had been discussed. The discussion lay stressed on both detection and identification of folic acid derivatives. Chemical, Physical and Biological methods had

been dealt with in due cause. Only physical and microbiological methods are useful for both criteria. The combination of both physical and microbiological techniques provided rather specific techniques for folate detection and identification. These techniques included bioautography, horizontal line application thin-layer chromatography plus microbiological assays with *L. casei*, *S. faecalis* and *P. cerevisiae*. The use of column chromatography and the fractionated eluates ultraviolet spectroscopy is also one of the best technique for folate detection and identification in clinical research. This paper is written as both introduction and applications of various techniques used in the folate field.

เอกสารอ้างอิง

1. Archibald, E.L., Mincey, E.K., and Morrison, R.T. (1972) Estimation of folate levels by competitive protien binding assay. Clin. Biochem. 5 232-241.
2. Beavon, J.R.G. (1973) Aspects of folate and tetrahydrofolate chemistry and metabolism in the rat. Ph. D. Thesis. University of Aston in Birmingham, U.K.
3. Blair, J.A., Ratanasthien, K., Leeming, R.J., Cooke, W.T., and Melikian, V. (1974) Human serum

- folate in health and disease. *Am. J. clin. Nutr.* **27** 441.
4. Blakley, R.L. (1969) The biochemistry of folic acid and related pteridines. North Holland Publishing Company, 569 pages.
 5. Gapski, G.R., Whiteley, J.M., and Huennekens, F.M. (1971) Hydroxylated derivatives of 5-methyl-5, 6,7,8-tetrahydrofolate. *Biochemistry* **10** 2930-2934.
 6. Ghitis, J. (1967) The folate binding in milk. *Am. J. clin. Nutr.* **20** 1-4.
 7. IUPAC IUB Commission on biochemical nomenclature (1966) Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds-tentative rules. *J. Biol. Chem.* **241** 2991-2992.
 8. Johns, G., and Bertino, J.R. (1965) Folates and megaloblastic anemia: a review. *Clin. Pharm. Ther.* **6** 372-379.
 9. Nixon, P. F. and Bertino, J.R. (1972) Effective absorption and utilization of oral formyltetrahydrofolate in man. *New Engl. J. Med.* **286** 175-179.
 10. Ratanasthien, K., Blair, J.A., Leeming, R.J., Cooke, W.T., and Melikian, V. (1974) Folates in human serum. *J. clin. Path.* **27** 875-879
 11. Ratanasthien, K. (1975) Metabolism and handling of folates in the mammal especially man. Ph. D. Thesis. University of Aston in Birmingham, U.K.
 12. Ratanasthien, K. (1976) Folic acid antagonists (The dihydrofolate reductase inhibitors): Application of tetrazolium bioautography on determination of serum and urine methotrexate. *Bull. Chiang Mai Assoc. Med. Sci.* **9** 107-118.
 13. Rothenberg, S.P., daCosta, M. and Rosenberg, Z. (1972) A radioassay for serum folate: Use of a two-phase sequential-incubation, ligand binding system. *N. Engl. J. Med.* **286** 1335-1339.
 14. U.S. Pharmacopoeia (1965) 17 edition pp 874.
 15. Waxman, S., Schreiber, C., and Herbert, V. (1971) Radioisotopic assay for measurement of serum folate levels. *Blood* **38** 219-228.