วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ ๑๕ ฉบับที่ ๔ กรกฎาคม - สิงหาคม ๒๕๔๙

Journal of Health Science
Vol. 15 No. 4 July - August 2006

Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

ค่าปรกติของระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวมในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: กรณีศึกษาเทคนิค Microbiological assay

จันทร์ฉาย คำแสน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ โฟเลต หรือกรดโฟลิก มีบทบาทสำคัญต่อเมตาบอลิซึมในร่างกาย การขาดโฟเลตมีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการแบ่งตัวของเซลล์ อาจทำให้เกิดโรคโลหิตจางชนิดที่เม็ดเลือดแดงใหญ่ขึ้น (megaloblastic anemia) มีความผิดปรกติของประสาทบริเวณสมองและไขสันหลังในทารก (neural tube defect) นอกจากนี้โฟเลตยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคในระบบหลอดเลือดและหัวใจโดยจะลดระดับโฮโมซิสเตอีนในกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจวาย และโรคเส้นเลือดในสมองตีบตัน (stroke)

เก็บตัวอย่างเลือดผู้มีสุขภาพดีทั้งหมด ๖๐๐ ราย จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โรงพยาบาลอำนาจเจริญ และโรงพยาบาลขอนแก่น นำมาวิเคราะห์หาค่าปรกติของระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม ด้วยวิธี microbiological assay โดยจุลชีพ *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC ๒๗๗๗๓) ซึ่งปัจจุบันคือ *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus ที่ทำให้ดื้อต่อคลอแรมเฟนิคอล จะใช้โฟเลตที่มีอยู่ในตัวอย่างในการเจริญเติบโต วัดอัตราการเจริญเติบโตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม อยู่ในช่วงเท่ากับ ๕.๗-๔๒.๗, ๔๐๒.๓๖-๑,๑๖๐.๒๔ และ ๑๑๘-๕๐๒ nmol/L ตามลำดับ และมีการกระจายตัวแบบปรกติ การคำนวณค่าปรกติจึงใช้ค่าเฉลี่ย ± ๒ SD. ในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม มีค่าปรกติ เท่ากับ ๕.๑๒ - ๔๐.๔๘, ๔๔๕.๒๘ - ๑,๐๖๕.๘๔ และ ๑๘๖.๖๑ - ๔๕๔.๘๗ nmol/L ตามลำดับ เป็นค่าที่จะบ่งชี้ (cut-off) ว่าขาดโฟเลต ในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม น้อยกว่า ๕.๒๘ น้อยกว่า ๒๖๐.๑๔ และ น้อยกว่า ๑๒๓.๖๗ nmol/L ตามลำดับ การวิเคราะห์ระดับโฟเลต โดยวิธี microbiological assay มีค่าความแม่นยำ ความถูกต้อง และความไวดีมาก อีกทั้งในการวิเคราะห์ก็ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือ หรือน้ำยาสารเคมีที่มีราคาแพง

คำสำคัญ: **ระดับโฟเลต, เทคนิค microbiological assay**

บทนำ

โฟเลต หรือกรดโฟลิก หรือโฟลาซิน มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ pteroylglutamic acid (PGA) เป็นกลุ่มวิตามินบีที่ละลายในน้ำ มาจากรากศัพท์ folium ซึ่งแปลว่าใบไม้ ที่ได้ชื่อเช่นนี้เพราะพบมากในใบไม้ โดยเฉพาะในผักสีเขียวจัดทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบใน

แครอท ตับ ไข่แดง ฟักทอง แคนตาลูป ถั่วต่าง ๆ ข้าวซ้อมมือ และข้าวสาลีไม่ขัดขาว โฟเลตมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนหรือเจริญเติบโตของเซลล์ โดยจะทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการรับหรือให้คาร์บอนเดี่ยวในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โฟเลตที่พบในอาหารจะอยู่ในรูปของโพลีกลูตาเมตซึ่งจะเปลี่ยนเป็นโมโนกลูตาเมตโดยเอนไซม์ โฟลิลโพลีกลูตามิล ไฮโดรเลส ที่อยู่ในกระเพาะอาหารขณะที่มีการดูดซึม ขณะที่มีการขนส่งภายในเซลล์โฟเลตจะเปลี่ยนเป็นโพลีกลูตาเมตโดยเอนไซม์โฟลิลโพลีกลูตามิล ซินทีเตส การขาดโฟเลตจะทำให้เกิดโรคโลหิตจางชนิดที่เม็ดเลือดแดงใหญ่ขึ้น (megaloblastic anemia) โฟเลตยังมีส่วนสำคัญในการป้องกันความผิดปกติของแกน-ประสาท (neural tube) ในทารก ซึ่งจะมีความผิดปกติ ๒ ชนิด คือ ๑) กระดูกสันหลังโหว่ (spina bifida) เยื่อหุ้มไขสันหลังจะปิดไม่สนิท เด็กอาจจะเดินโตขึ้นมาพร้อมอาการอัมพาต ไม่สามารถควบคุมการขับถ่ายได้ ทั้งหนักและเบา ๒) สภาพไร้สมองใหญ่ (anencephaly) สมองบางส่วน ขาดหายไป หรืออาจเกิดมาโดยไม่มีสมอง. จากการศึกษาในยุโรป ๕ ประเทศ รวมทั้งอิสราเอล และแคนาดา พบว่าอาการพิการเหล่านี้จะลดลงได้ถึงร้อยละ ๗๐ หากมารดาได้รับโฟเลตอย่างน้อย ๐.๔ มิลลิกรัม/วันในขณะตั้งครรภ์ นอกจากนี้โฟเลตยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคในระบบหลอดเลือดและหัวใจ โดยจะลดระดับโฮโมซิสเตอีนในกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจวาย และโรคเส้นเลือดในสมองตีบตัน (stroke)[๑-๖]

เมื่อกรดโฟลิคเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมบริเวณลำไส้เล็ก แล้วส่งไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายและในที่สุดจะถูกขับออกจากร่างกายกับปัสสาวะในรูปของโฟเลต ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับที่พบในน้ำนมมารดา[๒] แต่จากการวิจัยกลับพบว่าร่างกายสามารถดูดซึมกรดโฟลิคในรูปผลึกได้ดีกว่าโฟเลตในรูปอาหาร

กรดโฟลิคจะทำงานได้ดีเมื่อร่วมกับวิตามินบี ๑๒ วิตามินบี ๖ และโคลีน[๗] สารอื่นที่มีผลต่อปริมาณกรดโฟลิคในร่างกายคือ ยาระงับอาการชัก ยารักษาวัณโรค แอลกอฮอล์ และสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่อต้านกรดโฟลิค สารเหล่านี้ล้วนมีผลทำให้เกิดอาการขาดโฟเลตได้[๒]

การวิเคราะห์ระดับโฟเลตในประเทศไทย มีหลายวิธี ได้แก่ microbiological method ที่โรงพยาบาลสมเด็จเจ้าพระยา[๗] คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล[๘] และภาควิชารังสีไอโซโทป คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล[๙] วิธี chemiluminescence ที่ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศิริราช[๑๐] radioimmunoassay คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร[๑๑] และวิธี HPLC ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี[๑๒] ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อจำกัดด้านเทคนิค เครื่องมือ และค่าใช้จ่ายแตกต่างกันไป การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ระดับโฟเลตในกลุ่มคนปรกติที่มีสุขภาพดีในการใช้เป็นค่าอ้างอิงของคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือและหาค่าที่กำหนด (cut-off level) ว่าขาดโฟเลตหรือไม่ (folate deficiency) ใช้วิธี microbiological method ซึ่งพัฒนาวิธีโดย Davis และคณะ[๑๓] และพัฒนาวิธีเพิ่มเติมโดย Sjollema[๑๔] โดยโฟเลตที่อยู่ในซีรัม พลาสมา เม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อ และสารสกัดจากอาหาร จะสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยจุลชีพ *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773) ซึ่งปัจจุบันคือ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ที่ทำให้ดื้อต่อคลอแรมเฟนิคอล ซึ่งจุลชีพตัวนี้สามารถตอบสนองต่อโฟเลตชนิดต่าง ๆ ได้รวมทั้ง ๕-เมทิล-เตตระไฮโดรโฟเลต คลอแรมเฟนิคอลที่เป็นยาต้านจุลชีพพวกแบคทีเรียและมัยโคพลาสมา และไซโคเฮกซิมายด์เป็นยาต้านเชื้อราและยีสต์ จะเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ขั้นตอนต่าง ๆ ปราศจากเชื้อ โฟเลตในซีรัมจะอยู่ในรูปของโมโนกลูตาเมต แต่ในเม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อและอาหารต่าง ๆ จะอยู่ในรูปของโพลีกลูตาเมต ถึงแม้ว่า *Lactobacillus rhamnosus* จะไม่สามารถตอบสนองต่อโฟเลตที่มีสายกลูตามิลยาวมากกว่าสาม แต่ตัวอย่างก็จะถูกเอนไซม์โฟลิลกลูตามิลไฮโดรเลส ตัดย่อยในขั้นตอนการสกัด จุลชีพนี้จะใช้

โฟเลตที่มีอยู่ในตัวอย่างในการเจริญเติบโต โดยจะวัดอัตราการเจริญเติบโตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในความยาวคลื่นที่เหมาะสม ปริมาณระดับความเข้มข้นของโฟเลตจะอ่านเทียบจากกราฟมาตรฐาน วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาค่าปรกติของระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม ในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยวิธี microbiological assay ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และค่าปรกติเหล่านี้จะได้ใช้เป็นค่าอ้างอิงที่จะบ่งชี้ภาวะโภชนาการหรือช่วยในการวินิจฉัยโรคที่ขาดโฟเลตต่อไป

วิธีการศึกษา

๑. ตัวอย่างเลือด ได้เก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด ๖๐๐ ราย อายุระหว่าง ๑๕-๖๕ ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม ๒๕๔๗ ถึงเดือนเมษายน ๒๕๔๘ โดยเป็นผู้บริจาคโลหิต ๕๐๐ ราย จากธนาคารเลือด โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งได้ตรวจสุขภาพร่างกายทั่วไป คือชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักเกิน ๔๗ กิโลกรัม) วัดส่วนสูง วัดความดันโลหิต ได้รับการพักผ่อนเพียงพอและไม่ได้รับยาหรือวัคซีนภายใน ๑ เดือนก่อนมาบริจาคโลหิต และตรวจทางห้องปฏิบัติการคือ ตรวจการติดเชื้อเอชไอวีทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซี ตรวจซิฟิลิส ให้ผลลบทั้งหมด อีก ๑๐๐ ราย เป็นผู้มีสุขภาพดีจากคลินิกแม่ลูกสุขภาพดี (well baby) จากโรงพยาบาลอำนาจเจริญ และโรงพยาบาลขอนแก่น ซึ่งได้ตรวจสุขภาพร่างกายทั่วไปเท่านั้นและมีกุมารแพทย์เป็นผู้คัดกรองตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเลือด ๖ มิลลิลิตร โดยเจาะจากเส้นเลือดดำ แบ่งใส่หลอดทดลอง ๓ มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดที่เหลือ ๓ มิลลิลิตรใช้สารกันเลือดแข็ง EDTA

๒. สถานที่ตรวจวิเคราะห์และเครื่องมือ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี ได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวีวิส แบบลำแสงคู่ (UV-VIS double beam spectrophotometer) ยี่ห้อ Varian รุ่น Cary IE ของประเทศออสเตรเลีย

๓. สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ

ประกอบด้วย ๓ ส่วนหลัก ๆ คือ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมสารมาตรฐาน การเตรียมจุลชีพที่จะใช้ทดสอบและวัสดุควบคุมคุณภาพ ซึ่งอ้างอิงตาม Sjollema[๑๔] (ตารางที่ ๑)

๔. การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ประกอบด้วย การเตรียมตัวอย่าง[๑๔] การตรวจวิเคราะห์โฟเลต[๑๔] การหาค่าความไวของวิธี (sensitivity) การหาค่าร้อยละการวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) การหาค่าความเที่ยงตรงของวิธี (% reproducibility) การรายงานผล (ตารางที่ ๒)

๕. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน กราฟที่ใช้วิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูล

ผลการศึกษา

วิเคราะห์ซีรัม ๖๐๐ ราย วิเคราะห์เม็ดเลือดแดงและเลือดรวม ๕๙๕ ราย จากตัวอย่างทั้งหมด ๖๐๐ ราย อายุระหว่าง ๑๕-๖๕ ปี แยกเป็นชาย ๓๕๗ ราย (๕๙.๕ %) และหญิง ๒๔๓ ราย (๔๐.๕ %) การศึกษาระดับโฟเลต โดยวิธี microbiological assay จุลชีพคือ *L. rhamnosus* (ATCC 27773) ซึ่งปัจจุบันคือ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ที่ดื้อต่อคลอแรมเฟนิคอล เป็นตัววิเคราะห์ โดยจุลชีพนี้จะเก็บในรูปแบบแห้ง และจับในเม็ดพลาสติก ต้องใช้วัสดุควบคุมคุณภาพ คือ พลาสมารวมที่ทำซ้ำอย่างน้อย ๓๐ ครั้ง (การศึกษาในครั้งนี้ใช้จุลชีพและวัสดุควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลรอยัลเพิร์ท ประเทศออสเตรเลีย) จุพชีพจะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดจากระดับความขุ่น และอ่านค่าความเข้มข้นเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน โดยพบว่าระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม มีค่าอยู่ในช่วง ๕.๗-๔๒.๗

๔๐๒.๓๖-๑,๑๖๐.๒๔ และ ๑๑๘-๕๐๒ nmol/L ตามลำดับ และมีการกระจายตัวแบบปรกติ (normal distribution) (รูปที่ ๑) การคำนวณค่าปรกติจึงใช้ค่าเฉลี่ย + 2SD. ระดับโฟเลตในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม มีค่าปรกติ เท่ากับ ๕.๑๒ - ๔๐.๔๘, ๔๔๕.๒๘ - ๑,๐๖๕.๘๔ และ ๑๘๙.๙๑ - ๔๕๔.๘๗ nmol/L ตามลำดับ เป็นค่าที่จะบ่งชี้ (cut-off) ว่าขาดโฟเลต ในซีรัม (ค่าที่น้อยกว่าค่าเฉลี่ย ± 2SD.) เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม (ค่าที่

ตารางที่ ๑ สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การเตรียม	วิธีการ
๑. อาหารเลี้ยงเชื้อ	
๑.๑ Assay medium ความเข้มข้น ๔ เท่า	เตรียมจากสารอาหารทั้งน้ำตาล กรดอะมิโน วิตามิน และสารเคมีที่จำเป็น ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus*
๑.๒ Maintenance medium	เตรียมจาก assay medium, assay standard, Chloramphenicol และ Cycloheximide stock solution
๑.๓ Substrate	เจือจาง Assay medium ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น ๑ เท่า เติม L-ascorbic acid, Chloramphenicol และ Cycloheximide stock solution เติมจุลชีพที่วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว ตามสูตร $\frac{0.7 \times 0.8 \times \text{ปริมาตร Single strength medium ที่จะใช้ (ลิตร)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของจุลชีพ}}$
๑.๔ คลอแรมเฟนิคอล และ Cycloheximide stock solution	ละลายในเอทานอลปริมาณเล็กน้อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
๒. สารมาตรฐาน	
๒.๑ Stock standard Folic acid (F 7876) ของบริษัท Sigma	เตรียมสารมาตรฐาน Folic acid ความเข้นข้น ๐.๓๓๙๘ mmol/L ละลายในเอทานอลปริมาณเล็กน้อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
๒.๒ Working standard	เจือจาง Stock standard ให้ได้ ความเข้นข้น ๕ μmol/L
๒.๓ Assay standard	เจือจาง Working standard อัตราส่วน ๑:๕๐ ในการเตรียมกราฟมาตรฐานให้เจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้น ๕, ๑๐, ๒๐, ๓๐, ๔๐, ๖๐, ๘๐ และ ๑๐๐ (nmol/L)
๓. จุลชีพและวัสดุควบคุมฯ	
๓.๑ จุลชีพ	จุลชีพ *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773) สายพันธุ์ที่ดื้อต่อคลอแรมเฟนิคอล ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพแห้งบน Ceramic bead กระตุ้นการเจริญเติบโตโดยนำ ceramic bead 1 bead เพาะเลี้ยงใน maintenance medium เพาะเลี้ยงใหม่ (refresh) ใน maintenance medium ปั่นล้าง resuspended อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๖๔๐ นาโนเมตร
๓.๒ วัสดุควบคุมคุณภาพ	เตรียมโดยรวมตัวอย่างพลาสมา (pooled plasma) จากผู้บริจาคโลหิต ให้ได้ปริมาตรอย่างน้อย ๒๐๐ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วิเคราะห์หาค่าระดับโฟเลต จำนวน ๓๐ ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงของวัสดุควบคุมคุณภาพต่อไป

ตารางที่ ๒ วิธีการตรวจวิเคราะห์

การเตรียม/การวิเคราะห์	วิธีการ
๑. ตัวอย่าง	
๑.๑ ซีรัม	เก็บตัวอย่างเลือด ๓ มิลลิลิตร จากเส้นเลือดดำ ตั้งทิ้งไว้ แยกเก็บซีรัม
๑.๒ เลือดรวม	เก็บตัวอย่างเลือด ๓ มิลลิลิตร โดยใช้สารกันเลือดแข็ง EDTA เจือจางเลือดรวม อัตราส่วน ๑:๒๐ ในสารละลาย ๑% Ascorbic acid ที่เติม ๐.๒% triton X-10 และปรับ pH ๕.๐ ผสมเข้ากันให้ดีเก็บที่ -๒๐°ซ วันที่วิเคราะห์นำออกมาต้มให้เดือดเป็นเวลา ๕ นาที ปั่น นำส่วนใสข้างบนมาใช้วิเคราะห์
๒. การตรวจวิเคราะห์โฟเลต	สารมาตรฐาน (working standard folic acid) ตัวอย่าง และวัสดุควบคุมคุณภาพ เติม substrate บ่มที่ ๓๗°ซ เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๖๔๐ นาโนเมตร
๓. การหาค่าความไวของวิธี (sensitivity)	เจือจางสารมาตรฐานโฟเลต ให้ได้ความเข้มข้น ๑-๑๐ nmol/L วิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัม โดยวิเคราะห์แต่ละความเข้มข้นซ้ำสองครั้ง
๔. การหาค่าร้อยละการวิเคราะห์กลับคืน (% recovery)	วิเคราะห์ค่าโฟเลตเริ่มต้นของตัวอย่างซีรัม และเลือดรวม แบ่งตัวอย่างซีรัม และเลือดรวมที่วิเคราะห์แล้ว ออกเป็น ๓ ตัวอย่าง ๆ ละ ๒ มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานโฟเลต ที่ความเข้มข้น ๑๐, ๓๐ และ ๕๐ nmol/L* วิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยวิเคราะห์แต่ละความเข้มข้นซ้ำสามครั้ง
๕. การหาค่าความเที่ยงตรงของวิธี (% reproducibility)	วิเคราะห์ค่าโฟเลตของตัวอย่างซีรัม และเลือดรวม โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำสิบครั้งพร้อมกันครั้งเดียว
๖. การรายงานผล	อ่านผลซีรัมโฟเลตโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น nmol/L ในเลือดรวม หลังอ่านค่าจากกราฟต้องคูณด้วยค่าการเจือจาง (๑๐ หรือ ๒๐) โฟเลตในเม็ดเลือดแดง คำนวณได้จากสูตร (หน่วยเป็น nmol/L)

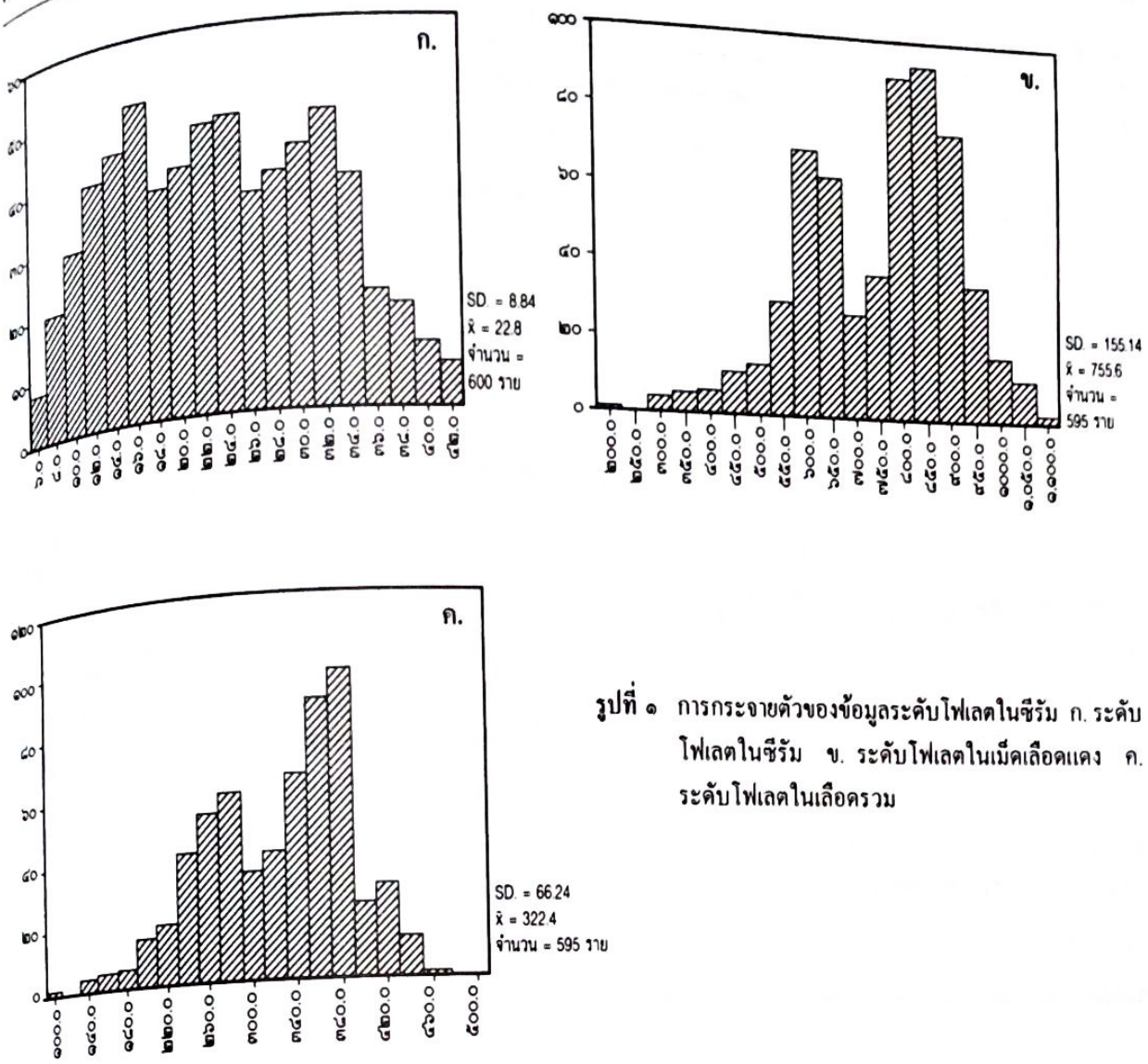
$$\frac{\text{โฟเลตในเลือดรวม - ซีรัมโฟเลต x (๑ – ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น)}}{\text{ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น}}$$

*nmol/L = nanomol per liter คือหน่วยความเข้มข้น คือ เจือจางลงหนึ่งส่วนพันล้านเท่าของโมเลกุลของสารนั้น ๆ ต่อลิตร

น้อยกว่า ค่าเฉลี่ย ± 3SD.) มีค่าน้อยกว่า ๕.๑๒ น้อยกว่า ๒๙๐.๑๔ และน้อยกว่า ๑๒๓.๖๗ nmol/L ตามลำดับ โดยพบว่าระดับโฟเลต ทั้งในซีรัมและเม็ดเลือดแดง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเพศชายและหญิง ($p<0.01$) ค่าความไวของวิธีนี้เท่ากับ ๔.๐ nmol/L (ตารางที่ ๓) ค่าร้อยละการวิเคราะห์กลับคืนในซีรัมและเลือดรวมอยู่ในช่วงร้อยละ ๙๐.๔๓-๑๑๖.๒๖ และ ๙๐.๘๗-๑๐๔.๐๓ ตามลำดับ (ตารางที่ ๔) และความแม่นยำของวิธีการตรวจวัดแบบ within - run ในซีรัมและเลือดรวม ได้ค่า %CV เท่ากับร้อยละ ๒.๕๓ และ ๒.๓๑ ตามลำดับ (ตารางที่ ๕)

วิจารณ์

ระดับโฟเลต ที่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยจะใช้หลากหลายวิธี ศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มและโรคต่าง ๆ กัน[๗-๑๒] ซึ่งมีข้อจำกัดทั้งค่าใช้จ่ายด้านเครื่องมือ วัสดุ สารเคมี ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ และทักษะความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่ง Clifford



รูปที่ ๑ การกระจายตัวของข้อมูลระดับโฟเลตในซีรัม ก. ระดับโฟเลตในซีรัม ข. ระดับโฟเลตในเม็ดเลือดแดง ค. ระดับโฟเลตในเลือดรวม

ตารางที่ ๓ ผลความไวของวิธี

โฟเลต (nmol/L)	โฟเลต (nmol/L) ๑	โฟเลต (nmol/L) ๒	ร้อยละ การวิเคราะห์กลับคืน ๑	ร้อยละ การวิเคราะห์กลับคืน ๒	ค่าเฉลี่ย
๑	๐.๕๐	-๑.๑๕	๕๐.๐	๐	๒๕.๐
๒	๑.๖๐	๑.๘๕	๘๐.๐	๕๔.๕๐	๘๗.๓
๓	๒.๘๕	๒.๗๕	๕๕.๐	๕๑.๖๗	๕๓.๔
๔	๔.๐๕	๓.๕๐	๑๐๑.๒	๕๗.๕๐	๕๕.๔
๕	๕.๒๕	๕.๕๖	๑๐๕.๐	๑๑๑.๒๐	๑๐๘.๑
๖	๖.๗๕	๖.๒๒	๑๑๒.๕	๑๐๓.๗	๑๐๘.๑
๗	๗.๔๑	๘.๐๔	๑๐๕.๕	๑๑๔.๕	๑๑๐.๔
๘	๘.๖๓	๕.๓๗	๑๐๗.๕	๑๑๗.๑	๑๑๒.๕
๕	๕.๔๘	๑๐.๔๐	๑๐๕.๓	๑๑๕.๖	๑๑๐.๔
๑๐	๑๑.๐๕	๑๑.๒๘	๑๑๐.๕	๑๑๒.๘	๑๑๑.๖

ตารางที่ ๔ ผลการวิเคราะห์กลับคืนของวิธี

ลำดับ	ตัวอย่างเริ่มต้น (nmol/L)	เติมโฟเลต (nmol/L)	ค่าจริง (nmol/L)	ค่าที่วิเคราะห์ (nmol/L)	ร้อยละ การวิเคราะห์กลับคืน
๑.	เลือดรวม ๑๑๐.๕๔	๑๐	๑๒๐.๕๔	๑๒๕.๔๐	๑๐๔.๐๓
				๑๑๖.๑๑	๕๖.๓๒
				๑๐๕.๕๔	๕๐.๘๗
๒.	เลือดรวม ๑๑๐.๕๔	๓๐	๑๔๐.๕๔	๑๔๑.๗๒	๑๐๐.๘๔
				๑๓๕.๕๕	๕๖.๔๕
				๑๓๓.๑๓	๕๔.๗๒
๓.	เลือดรวม ๑๑๐.๕๔	๕๐	๑๖๐.๕๔	๑๕๔.๔๘	๕๖.๒๒
				๑๕๘.๖๓	๕๘.๘๑
				๑๕๕.๒๒	๕๕.๑๘
๔.	ชีรัม ๒๐.๓๑	๑๐	๓๐.๓๑	๓๕.๒๔	๑๑๖.๒๖
				๓๒.๗๕	๑๐๘.๐๕
				๒๗.๔๑	๕๐.๔๓
๕.	ชีรัม ๒๐.๓๑	๓๐	๕๐.๓๑	๕๓.๓๐	๑๐๕.๕๔
				๔๕.๘๗	๕๕.๑๒
				๕๗.๑๔	๑๑๓.๕๗
๖.	ชีรัม ๒๐.๓๑	๕๐	๗๐.๓๑	๗๒.๘๘	๑๐๓.๖๕
				๖๖.๖๑	๕๔.๗๔
				๗๖.๕๔	๑๐๘.๘๖

ตารางที่ ๕ ผลการทำซ้ำค่าความเที่ยงตรงของวิธี

ลำดับ	ชีรัมรวม (nmol/L)	เลือดรวม (nmol/L)
๑.	๓๒.๕๒	๑๑๕.๕๘
๒.	๓๐.๗๕	๑๑๕.๕๐
๓.	๓๓.๕๘	๑๑๖.๔๕
๔.	๓๓.๐๕	๑๑๕.๗๕
๕.	๓๒.๔๔	๑๑๕.๔๖
๖.	๓๒.๘๕	๑๒๑.๒๒
๗.	๓๒.๗๕	๑๑๔.๘๕
๘.	๓๓.๑๕	๑๑๔.๗๑
๙.	๓๓.๖๖	๑๑๔.๕๖
๑๐.	๓๓.๔๗	๑๒๒.๐๓

	ชีรัมรวม
ช่วงค่า	๓๐.๗๕-๓๓.๕๘
ค่าเฉลี่ย	๓๒.๘๓
% CV	๒.๕๓
SD	๐.๘๓
	เลือดรวม
ช่วงค่า	๑๑๔.๕๖-๑๒๒.๐๓
ค่าเฉลี่ย	๑๑๖.๖๒
% CV	๒.๓๑
SD	๒.๗๐

ตารางที่ ๖ การเปรียบเทียบระดับโฟเลตที่รายงานกับผลการศึกษาต่าง ๆ

การศึกษาค่าปรกติใน	การศึกษาครั้งนี้	Wagner	Sjollema	Carney
ซีรัม (nmol/L)	๕.๑๒-๔๐.๔๘	๑๓.๕๕-๔๕.๓	๖.๐-๔๒.๐	-
เม็ดเลือดแดง (nmol/L)	๔๔๕.๒๘-๑,๐๖๕.๘๔	๓๖๒.๔-๑,๔๔๕.๖	๓๑๐-๑,๓๖๐	๕๐๐.๕๖-๒,๕๒๐.๖๔

และคณะ[๑๓] ได้รายงานผลการเปรียบเทียบ ๔ วิธีการวิเคราะห์ ได้แก่ microbiological, cheminumines-cence, GC-MS และ radioassay พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.001$)

การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองในตัวอย่าง ๓ ชนิด คือ ซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม เนื่องจากระดับโฟเลตในซีรัมแสดงให้เห็นถึงสภาวะโฟเลตในปัจจุบัน ส่วนระดับโฟเลตในเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นถึงสภาวะโฟเลตเมื่อ ๓ เดือนก่อนหน้านี้ ดังนั้นถ้าระดับโฟเลตในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าค่าบ่งชี้ (cut off) จึงแสดงว่าผู้นั้นขาดโฟเลตมาตั้งแต่ ๕-๖ เดือนที่แล้ว เพราะโฟเลตสะสมในร่างกายได้นานเพียง ๕-๖ เดือนเท่านั้นเนื่องจากเป็นกลุ่มวิตามินที่ละลายในน้ำ[๗] สำหรับเลือดรวมใช้ในกรณีที่ตัวอย่างเลือดไม่เพียงพอ (เจาะเลือดจากทารก) แสดงให้เห็นถึงสภาวะโฟเลตในปัจจุบันถึง ๓ เดือนก่อนหน้านี้ ระดับโฟเลตในซีรัมเหมาะจะใช้ในการติดตามผลการรักษาหลังจากให้โฟเลตเสริมระดับโฟเลตในเม็ดเลือดแดงเหมาะที่จะใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรค การคงสภาพของตัวอย่างซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ ๒-๘°ซ ได้นานอย่างน้อย ๒ สัปดาห์ แต่สามารถคงสภาพได้นานเป็นปีถ้าเก็บ ที่ –๒๐°ซ โดยเม็ดเลือดแดง และเลือดรวมต้องสกัดก่อนเก็บ[๑๔] การศึกษาครั้งนี้ต่างจากวิธีที่อ้างอิงของ Sjollema ตรงที่ใช้เครื่อง spectophotometer ธรรมดา ที่อ่านค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ ๒ ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย แต่วิธีอ้างอิงใช้เครื่อง automated spectophotometer ของรายงาน[๑๔] จะอ่านค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ ๕ ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย การศึกษาค่าปรกติของระดับโฟเลตในประเทศไทยเคยมีรายงานไว้เมื่อ ๓๐ ปีที่แล้ว โดย สุวัฒน์ อารีกุล และคณะ[๑๑] เปรียบเทียบค่าปรกติที่ศึกษาโดยวิธี microbiological assay ในซีรัมและเม็ดเลือดแดง แสดงในตารางที่ ๖

จะเห็นว่าค่าโฟเลต ทั้งในซีรัม และเม็ดเลือดแดงในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่ำกว่าที่มีการศึกษาในต่างประเทศ ปัจจัยด้านโภชนาการเป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่ง ถึงแม้ว่าจะมีการให้โฟเลตเสริมในหญิงตั้งครรภ์ แต่ในเด็กที่กำลังเจริญเติบโตทั้งร่างกายและสมองถ้าไม่ได้รับโฟเลตเสริมโดยเฉพาะในนมจะมีรูปร่างเล็ก เตี้ย โลหิตจางและสมองไม่พัฒนาเท่าที่ควร จากผลการศึกษาพบว่าค่าของระดับโฟเลตทั้งในซีรัม เม็ดเลือดแดง และเลือดรวม มีช่วงที่กว้างมาก อาจเนื่องจากไม่ได้แยกปัจจัยด้านอายุ ระดับการศึกษา ในเด็กที่ยังดื่มนมและหญิงตั้งครรภ์จะมีระดับโฟเลตสูงกว่าในผู้สูงอายุ นอกจากนี้ถิ่นที่อยู่อาศัยในเมืองและชนบทอาจทำให้ภาวะโภชนาการต่างกัน จากรูปที่ ๑ ดูเหมือนมีค่าสูงสุดสองค่า อาจจะเป็นเพราะประชากรกลุ่มคลินิกแม่ลูกสุขภาพดียังคงมีโฟเลตสะสมในช่วงที่ให้เสริมระหว่างตั้งครรภ์

มีข้อสังเกตและข้อเสนอแนะว่าวิธี microbiological assay มีข้อดีคือ ตรวจวิเคราะห์ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือวัสดุและสารเคมีราคาแพงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ข้อเสียคือใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย ๓ วัน ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะที่จะใช้ในการสำรวจภาวะโภชนาการในหญิงตั้งครรภ์ การป้องกันความผิดปรกติของท่อประสาทในทารก และกลุ่มผู้ป่วยโลหิตจางชนิดเม็ดเลือดแดงใหญ่ขึ้น ซึ่งไม่ต้องการ

ความรวดเร็วในการวินิจฉัยโรค

สรุป

คนไทยปรกติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีระดับโฟเลต ที่วิเคราะห์โดยวิธี microbiological assay ในซีรัม ๕.๑๒ - ๔๐ nmol/L เม็ดเลือดแดง ๔๔๕.๒๘ - ๑,๐๖๕.๘๔ nmol/L และเลือดรวม ๑๘๙.๙๑ - ๔๕๔.๘๗ nmol/L ค่าที่จะบ่งชี้ (cut-off) ว่าขาดโฟเลตในซีรัมน้อยกว่า ๕.๒๘ nmol/L เม็ดเลือดแดงน้อยกว่า ๒๙๐.๑๔ nmol/L และเลือดรวม น้อยกว่า ๑๒๓.๖๗ nmol/L ซึ่งการหาค่าปรกติของระดับโฟเลต โดยวิธี microbiological assay นี้ วิเคราะห์ได้ง่าย ไม่ต้องใช้ผู้ชำนาญการสูง รวมทั้งไม่ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีราคาแพง นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีนี้ในการหาระดับโฟเลต ในน้ำนม และตัวอย่างอาหารได้[๑๔]

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Mr. Graham Icke A/P Scientist และ Mrs. Sandra Sjollema ผู้เชี่ยวชาญการวิเคราะห์วิตามิน ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของโรงพยาบาลรอยัลเพิร์ท ประเทศออสเตรเลีย ที่ให้คำแนะนำและอนุเคราะห์เชื้อมาตรฐาน สารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์บางชนิด ในการวิเคราะห์ระดับโฟเลต

เอกสารอ้างอิง

๑. Davis RE, Nicol DJ. Folic acid. Int J Biochem 1988, 20: 133-9.

๒. William M, editor. Folic acid. Singapore: Info Access & Distribution; 1994.

๓. Molloy AM. Folic acid. Micronutrient worth attention. Nutrireview (serial online) 1996 [cited 2005 Oct 1]; Available from: URL: http:// www.alternateinfo.com/Alternateh/Hsth/Folic_acid_th.htm

๔. Murray MT. Folic acid. In: Lebenthal E, editor. Encyclopedia of nutritional supplements. USA: Prima; 1996. p. 19-26.

๕. Stites TE. Kinetic modeling of folate metabolism through use of chronic administration of deuterium-labelled folic acid in men. Am J Clin Nutr 1997; 65: 53-60.

๖. Kim Y. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. Am J Clin Nutr 1997; 65: 46-52.

๗. พัชรินทร์ วนิชานนท์, ทัศนีย์ กุลจนพงศ์พันธ์, สมศรี รัตนวิจิตราศิลป์, ดาราณศ เกษไสว, สุรีย์ กิจวิทยศักดิ์. ระดับของกรดโฟลิคในเม็ดเลือดแดง ในผู้ป่วยจิตเวชผู้สูงอายุ. วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย ๒๕๔๕; ๔๗:๑๓๖-๔๓.

๘. Assantachai P. Analysis of vitamin levels in the eldery in northrn part of Thailand. Proceedings of the Eighth Asian Congress of Agricaltural Medicine and Rural Health; 1999 November 11-14; Guangzhou, China. Beijing: Chinese Rural Health Association; 1999.

๙. อรอนงค์ กังสดาลอำไพ, ลินนา ทองยงศ์, ชิดาพร จิระวัฒนะไพศาล, พนัส พฤกษ์สุนันท์, จีระรัตน์ จีระมกร, ธิติรัตน์ ปานม่วง. ภาวะโภชนาการของโฟเลตในสตรีปรกติ สตรีตั้งครรภ์และสตรีกินยาเม็ดคุมกำเนิดที่มารับบริการตรวจรักษาสุขภาพที่ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต ๔ ราชบุรี. วารสารโภชนาการ ๒๕๔๖; ๓๘:๑๕-๒๗.

๑๐. Leowattana W, Mahanonda N, Bhuuripunyo K, Pokum S. Association between serum homocysteine, vitamin B12 folate and Thai coronary artery disease patient. J Med Assoc Thai 2000; 83: 536-42.

๑๑. Ponchidecha M, Srikusalanukul M, Chattananon A, Tanjariyaporn S. Effect of metfornin on plasma homocyateine, vitamin B12 and folic acid: a cross-sectional study in-patient Type2 diabetes mellitus. J Med Assoc Thai 2004; 87: 780-7.

๑๒. Worachart M, Thunyachai S, Sritara P. Association between serum homocysteine, folate and B12 concentration with coronary artery disease in Thai Patients. J Med Assoc Thai 2004; 87: 674-78.

๑๓. Davis RE, Nicol D, J Kelly A. An automated method for the measurement of the folate activity. J Clin Path 1970; 23: 47-53.

๑๔. Sjollema S. Folate bioassay using a chloramphenicol resistant strain of *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773) as the test organism. In: Icke G, editor. Vitamin assay method. 5th ed. Perth; Royal Perth Hospital Press; 2005. p. 9-13.

๑๕. Andrew CJ, Noceti M Elizabeth, Joy B Amy, Block T, Block G. Erythrocyte folate and its response to folic acid supplementation is assay dependent in women. J Nutr January 2005; 135: 137-43.

๑๖. Areekul S, Kitkornphan S. Folate activity in red cells of Thai blood donors. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1975; 6: 440-2.

๑๗. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular me-

tabolism. In: Bailey LB, editor. Folate in health and disease. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 23-42.
๑๘. Carney MWP, Chary TKN, Laundy Ml. Red cell folate concentrations in psychiatric patients. J Affect Disord 1990; 19: 207-13.

Abstract **Normal Levels of Folate in Serum, Red Blood Cell and Whole Blood in the Northeast of Thailand: Microbiological Technique**

Junchay Khamsaen

Pathology section, Regional Medical Science Center Ubon Ratchathani, Thailand

Journal of Health Science **2006; 15:552-61.**

The function of folate or folic acid was mainly in human metabolism. Folate deficiency leads to impaired cell division manifested as megaloblastic anemia and foetal development neural tube defect. Moreover, it has also been linked to elevated levels of serum homocysteine, a condition implicated as an independent risk factor for coronary artery disease and stroke.

Six hundred of blood samples were collected from healthy subjects attending Subpasitthiprasong Hospital Ubon Ratchathani province, Amnatchareon Hospital and Khon Kaen Hospital. Levels of folate present in serum, red blood cell and whole blood were assayed microbiologically using chloramphenicol resistant, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773) that was previously known as *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus, as the test organism. Folate was used in their growth and the growth rate was detected from turbidity of medium by a spectrophotometer; the readings of folate concentrations were derived from a standard curve. The results revealed that the ranges of serum, red blood cell and whole blood folate were 5.7-42.7, 402.36-1,160.24 and 118-502 nmol/L, respectively. Their distributions appeared normal. As such, ± 2 SD had been used to calculate the normal levels of folate in serum of 5.12 - 40.48 nmol/L, red blood cell of 445.28 - 1,065.84 nmol/L and whole blood of 189.91 - 454.87 nmol/L. The cut-off points are less than 5.28 nmol/L in serum, 290.14 nmol/L in red cell and 123.67 nmol/L in whole blood. It could be concluded that the detection of folate level by this method has good precision, accuracy and sensitivity. Moreover, the method is relatively, less expensive and simple.

Key words: **folate level, microbiological assay**