ACTA PHYSIOLOGICA POLONICA
1961, XII, 6, 869

HELENA KĄKOL, JADWIGA BOGUCKA, HANNA GAJCY

CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE KWASU FOLIOWEGO PRZY UŻYCIU SZCZEPU *STREPTOCOCCUS FAECALIS*

Z Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin Instytutu Leków w Warszawie
Kierownik: mgr *J. Iwanowska*

Wieland i wsp. w 1952 r. oddzielili za pomocą chromatografii bibułowej kwas foliowy od *citrovorum factor* w preparatach wątrobowych. W swojej pracy autorzy posługiwali się paskami bibuły Whatman'a Nr 2 o szerokości 3 cm. Badaną próbkę zawierającą od 0,005 do 0,02 mcg/ml kwasu foliowego umieszczano przy pomocy mikropipetki na paskach bibuły w odległości 5 cm od dolnej krawędzi. Pasek zanurzali w rozpuszczalniku na wysokości 4 cm.

Chromatogram rozwijano w naczyniach zamkniętych, w temperaturze pokojowej, w czasie od 8—14 godz., następnie po wysuszeniu, paski bibuły układano na płytach agarowych zaszczepionych *Streptococcus faecalis*, po czym inkubowano je w ciągu 16 godzin.

Stosowano przeważnie rozpuszczalniki dwufazowe składające się np. z alkoholu benzylowego, izoamylowego lub chloroformu i wody, w stosunku 1 : 0,5.

Zakrzewski i wsp. w 1953 r. rozdzielali również przy użyciu chromatografii bibułowej mieszaninę złożoną z kwasu foliowego i jego pochodnych. Używali oni bibułę Whatman'a Nr 1 w paskach szerokości około 1,3 cm, długości 45—50 cm. Próbka badana zawierała od 0,5 do 5,0 mcg/ml kwasu foliowego.

Przeprowadzono próby rozdziału z różnymi rozpuszczalnikami organicznymi i nieorganicznymi. Najlepsze wyniki dało zastosowanie buforu octanowego o pH = 6,3 i fosforanowego o pH = 7,7. Paski bibuły układano na płytach agarowych podobnie jak w pracy *Wielanda* i wsp. W obydwu wymienionych pracach udało się oddzielić kwas foliowy od pozostałych czynników, znajdujących się zarówno w ekstrakcie wątrobowym, jak i w mieszaninie pochodnych kwasu foliowego. Ilościowo oznaczono kwas foliowy metodą probówkową ze *Streptococcus faecalis*. Celem niniejszej

pracy było dobranie odpowiedniego rozpuszczalnika pozwalającego na całkowite i ilościowe oddzielenie się kwasu foliowego, ustalenie optymalnego stężenia badanej próby oraz opracowanie najlepszych warunków chromatografii, ze szczególnym uwzględnieniem głębokości zanurzenia paska i umieszczenia kropli, dających po wywołaniu chromatogramu koliste strefy wzrostu.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zasada oznaczania

Metoda polega na chromatograficznym oddzielaniu kwasu foliowego w preparatach złożonych — przy użyciu odpowiednio dobranych rozpuszczalników i zastosowaniu chromatografii wstępującej — od innych substancji wzrostowych dla *Streptococcus faecalis*.

W czasie rozwijania chromatogramu kwas foliowy zostaje przesunięty na pewną określoną wysokość, podczas gdy pozostałe substancje wzrostowe rozmieszczają się wzdłuż paska na innych wysokościach. Chromatogram wywołuje się na płycie agarowej zaszczepionej kulturą *Streptococcus faecalis*. Zawartość kwasu foliowego w preparacie wylicza się z krzywej standardowej wykreślonej dla różnych stężeń roztworu wzorcowego. Krzywą wykreśla się w układzie współrzędnych, odkładając na osi rzędnych wielkości średnic stref wzrostowych roztworu wzorcowego, a na osi odciętych logarytmy ich stężeń.

I. Szczep

a) *Przechowywanie*

W pracy niniejszej posługiwano się szczepem *Streptococcus faecalis* Nr 8043 otrzymanym z Muzeum Szczepów Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

Szczep przechowywano w temp. 4°C na agarze prostym, na który przeszczepiano go co 2 tygodnie.

Agar prosty

glukoza	1%
ekstrakt drożdżowy	1%
octan sodu (uwodn.)	0,85%
agar	1,5%
sól A	0,5 ml
sól B	0,5 ml

Sól A:
K_2HPO_4 — 25 g
KH_2PO_4 — 25 g
Dopełnić wodą destyl. do 250 ml. Przechowywać pod toluenem.

Sól B:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Dopełnić wodą destyl. do 250 ml
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,5 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g	

b) *Pasażowanie*

Po kilku miesiącach hodowli szczepu *Streptococcus faecalis* na agarze prostym, otrzymywano strefy wzrostowe kwasu foliowego o coraz mniej wyraźnie zarysowanych konturach. Okazała się więc potrzeba pasażowania go, tym bardziej, że *Jones* i *Morris* stwierdzili, że przechowywanie szczepu *Streptococcus faecalis* na agarze prostym z dodatkiem ekstraktu drożdżowego Difco, lub ekstraktu z drożdży piekarskich, octanu sodu i glikozy daje dobre wyniki dla kwasu foliowego w metodzie probówkowej przez okres 4 do 6 tygodni. Przy dalszym przeszczepianiu autorzy ci otrzymywali wyniki gorsze, lub nie mieli ich wcale.

Opierając się na wynikach prac *Nymana* i *Gortnera*, *Jones* i *Morris* zmienili warunki hodowli *Streptococcus faecalis* pasażując szczep z agaru prostego, na którym go hodowano zwykle, na pożywkę płynną z ekstraktem wątrobowym i kazeiną hydrolizowaną trypsyną, a z tego podłoża na agar prosty w takim samym składzie jak pożywka płynna.

W naszej pracy szczep pasażowano co 4 miesiące, przeszczepiając go z agaru skośnego na pożywkę wzrostową, a po 24 godz. przenoszono go na pasaż I, tzw. płynny. Po następnych 24 godz. szczep przeszczepiano na pasaż II, tzw. stały, a stąd kolejno na 3 agary proste. Całe pasażowanie przeprowadzano w termostacie w temp. 37°C.

Skład pożywek używanych przy pasażowaniu:

Pożywka wzrostowa

Skład pożywki jak dla agaru prostego, tylko bez użycia agaru.

Pasaż I, tzw. płynny

Kazeina hydrolizowana trypsyną	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
glikoza	0,2 g
ekstrakt drożdżowy (Difco)	0,2 g
ekstrakt wątrobowy	10,0 g
woda redestyl. (ze szkła) do	100 ml

Pasaż II, tzw. stały

Kazeina hydrolizowana trypsyną	1,0 g
K_2HPO_4	0,2 g
glikoza	1,0 g

$CaCO_3$	0,3 g
agar	2,0 g
ekstrakt wątrobowy	10 ml
roztwór soli A	0,5 ml
roztwór soli B	0,5 ml
woda redestylowana (ze szkła) do	100 ml

Roztwór soli A

K_2HPO_4	25 g
KH_2PO_4	25 g
dopełnić wodą redestylowaną do	250 ml

Przechowywać pod toluenem.

Roztwór soli B

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10,0 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,03 g
HCl stężony	5 kropli
Dopełnić wodą redestylowaną do	250 ml

Kazeina hydrolizowana trypsyną [2]

10 g kazeiny zawiesza się w 100 ml H_2O, dodaje 0,2 g K_2HPO_4 oraz niewielkimi porcjami roztworu ok. 4 n NaOH stale wstrząsając, aż do całkowitego rozpuszczenia się kazeiny. Roztwór doprowadzi się do pH = 8,0—8,4, dodaje 0,5 g trypsyny i pokrywa toluenem. Kolbę z zawartością wstawia się do termostatu w temp. 37°C na okres 18 godz., po czym doprowadza ponownie do pH = 8,0—8,4 i pozostawia w termostacie jeszcze na 24 godz. Po upływie tego czasu doprowadza się roztwór do pH = 4,0 przy pomocy kwasu solnego, dodaje 4 g Norritu A, miesza dokładnie i pozostawia w temperaturze pokojowej, na przeciąg 1 godz. Zawartość kolby sączy się przez bibułę i przesącz zlewa do butelki, którą przechowuje się w chłodni pod toluenem.

Ekstrakt wątrobowy [3]

400 g suszonej zmielonej wątroby w kolbie zalewa się 2 litrami wody i ogrzewa na wrzącej łaźni wodnej przez 1 godz., po czym zawartość kolby sączy przez gazę i przesącz doprowadza do pH = 7,0.

Ponownie ogrzewa się przez 15 minut, sączy przez bibułę, zlewa do ciemnej butelki, pokrywa toluenem i przechowuje w chłodni.

c) *Przygotowanie szczepu do oznaczeń*

W dniu poprzedzającym wykonanie oznaczenia, szczep *Streptococcus faecalis* przeszczepiano z agaru prostego na pożywkę wzrostową (1 pro-

bówka pożywki wzrostowej na 1 płytę). Szczep inkubowano w termostacie w temp. 37°C przez okres 18 godz., a następnie odwirowywano go i przemywano dwukrotnie roztworem soli fizjologicznej.

II. Wylewanie podłoża na płytę

Kolbę z podłożem do wylewania na płytę rozgrzewano dokładnie, a następnie studzono do temp. 40°C i zaszczepiano szczepem uprzednio odwirowanym i przemytym.

Płytę szklaną zmywano alkoholem i nieco nagrzewano płomieniem palnika w celu ułatwienia równomiernego rozlewania się podłoża na szkle. Następnie jałową, ciepłą pipetą á 100 ml wylewano szybko podłoże, unikając powstawania pęcherzyków powietrza. Płytę przykrywano szklaną taflą i pozostawiano w temp. pokojowej na 20 minut.

Płyta, na którą wylewa się podłoże agarowe

Płyta składa się z 2 części: dolnej i górnej. Część dolną stanowi tafla szklana o wymiarach 28 × 28 cm, do krawędzi której przylepione są listwy również szklane. Listwy posiadają szerokość 15 mm i grubość 5 mm i razem z taflą stanowią rodzaj zbiornika. Część górną stanowi również kwadratowa płyta szklana o wymiarach 28 × 28 cm, lecz znacznie cieńsza od dolnej tworząca pokrywę.

a) Skład podłoża agarowego do wylewania na płytę [1]

Kazeina (hydrolizat kwaśny)	6 g
dl — tryptofan	50 ml
l — cystyna	50 ml
asparagarina	0,1 g
dl — alanina	0,2 g
adenina + guanina + uracil (roztwór)	10 ml
ksantyna (roztwór)	10 ml
biotyna (roztwór)	4 ml
witamina B_1 (roztwór)	2 ml
witamina B_2 (roztwór)	16 ml
kwas nikotynowy (roztwór)	6 ml
pirydoksyna (roztwór)	12 ml
pantotenian wapnia (roztwór)	4 ml
kwas para-aminobenzoesowy (roztwór)	0,1 ml
glikoza	20 g
pepton (roztwór)	2,0 ml
cytrynian sodu (uwodniony)	25,0 g
NaCl	5,0 g
K_2HPO_4	2,5 g

roztwór soli B	5,0 ml
woda destylowana do pH = 6,8	1000 ml
agar	1,5 g

dl — tryptofan: 4 g dl — tryptofanu rozpuszcza się na gorąco w 100 ml H_2O, dodaje kilka kropli stężonego kwasu solnego i dopełnia wodą do 1 litra.
l — cystyna: 4 g cystyny rozpuszcza się w 100 ml H_2O, roztwór podgrzewa, dodaje 5 ml stężonego kwasu solnego i dopełnia wodą do 1 litra.
Adenina, guanina i uracyl: 1 mg/1 ml — (rozpuścić w niewielkiej ilości stęż. NH_4OH, a następnie rozcieńczyć wodą).
Ksantyna: 1 mg/1 ml — (rozpuścić w niewielkiej ilości stęż. NH_4OH, a następnie rozcieńczyć wodą).
Biotyna: 0,1 mcg/1 ml (w 25% etanolu).
Witamina B_1: 0,1 g rozpuszcza się w małej ilości wody, a następnie uzupełnia do 100 ml 2% HCl. Tak otrzymany roztwór (1 mg/1 ml) rozcieńcza się tak, żeby otrzymać 100 mcg wit. B_1/ml.
Witamina B_2: 25 mcg/ml (w 0,02 n kwasie octowym).
Kwas nikotynowy: 100 mcg/ml (w 25% etanolu).
Pirydoksyna: 100 mcg/ml (w 25% etanolu).
Pantotenian wapnia: 100 mcg/ml (w 25% etanolu).
Kwas para-amino-benzoesowy: 100 mcg/ml (w 25% etanolu).
Roztwór soli B:

$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	10 g
$MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	0,5 g
$FeCl_3$	0,1 g

rozpuścić w 250 ml wody dodając 5 kropli stężonego HCl.
Pepton: 50 g peptonu Difco rozpuszcza się w 200 ml wody, doprowadza pH = 3 stężonym HCl, dodaje 5 g Norritu i miesza przez 1 godz., sączy roztwór przez bibułę i rozcieńcza do 500 ml wodą destyl.
Przechowuje się go pod toluenem w chłodni.

III. *Bibuła*

Bibułę Whatman'a Nr 2 o wymiarach 18 × 40 cm, znaczono ostrzem wzdłuż każdego arkusza otrzymując ślady 6 torów o szerokości 3 cm. Na każdym z tych torów zaznaczono 2 miejsca: pierwsze w odległości 2 cm od jednej z krawędzi bibuły i drugie miejsce w odległości 3 cm od tej samej krawędzi. Znak pierwszy wskazuje poziom, do którego należy zanurzyć bibułę w rozpuszczalniku w czasie rozwijania chromatogramu, a znak drugi zaznacza miejsce, w którym ma być umieszczona kropla

standardu, czy badanego preparatu. Krople umieszczano zawsze na tej samej wysokości, dokładnie pośrodku danego toru.

Poszczególne tory numerowano lub znaczono w jakikolwiek inny sposób zwykłym ołówkiem.

IV. *Mikropipeta*

Używano mikropipetę wykalibrowaną á 0,004 g.

V. *Wzorzec kwasu foliowego*

10 mg. kwasu foliowego wysuszonego w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym w ciągu 24 godz., umieszczano w kolbie miarowej na 100 ml. Dodawano 2 ml. 0,1n NaOH wytrząsając do rozpuszczenia się kwasu, następnie dodawano 5 ml. 1 m buforu fosforanowego o pH=7,0, 25 ml. absolutnego etanolu i dopełniano do kreski wodą destylowaną. Z roztworu macierzystego sporządzano każdorazowo rozcięczenia: 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 mcg/ml.

VI. *Przygotowywanie preparatu do oznaczeń*

a) *Uwalnianie kwasu foliowego*

Uwalnianie kwasu foliowego stosowane jest w wypadku badania preparatów złożonych zawierających ekstrakt wątrobowy, tzw. *crude liver*.

Ze znanych sposobów uwalniania kwasu foliowego z prób pochodzenia biologicznego, dobre wyniki daje zmodyfikowana metoda Birda. Z badanej próby odważano zależnie od zawartości kwasu foliowego 0,1 g preparatu i przenoszono go do probówki miarowej. Następnie dodawano 0,05 g suszonej, b. dokładnie roztartej nerki i 8 ml 1% roztworu octanu sodu, o pH = 4,0—4,2. Zawartość mieszano dokładnie, powierzchnię pokrywano toluenem i wstawiano do termostatu w temp. 37°C na 48 godz. Dalsze przedłużanie czasu trawienia jak wykazały doświadczenia, nie wpływa na zwiększenie się ilości uwolnionego kwasu foliowego.

Następnie doprowadzano próbę badaną do pH = 7, ogrzewano przez 15 minut, studzono i odpowiednio rozcieńczano.

Wydajność wyżej opisanej metody uwalniania kwasu foliowego wynosi około 95%.

b) *Przygotowywanie rozcieńczeń*

W wypadku leków złożonych nie zawierających tzw. *crude liver* stosuje się rozpuszczanie kwasu foliowego 0,1 n NaOH.

Próbę badaną rozcieńczano wodą destylowaną tak, aby otrzymać stężenia podobne jak dla wzorca.

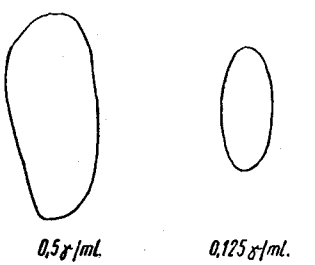
c) *Przygotowanie suszonej nerki* [3]

Jedną lub dwie świeże nerki wieprzowe należy dokładnie oczyścić z tłuszczu i błon, a następnie zemleć i przenieść do kolby stożkowej. Zalać pięciokrotną objętością acetonu, dokładnie wytrząsnąć i przesączyć przez bibułę. Nerkę wymyć raz jeszcze nową porcją acetonu, ponownie wytrząsnąć i przesączyć. Nerkę dokładnie wysuszyć, zsypać do słoja, szczelnie zamknąć i przechowywać w chłodni.

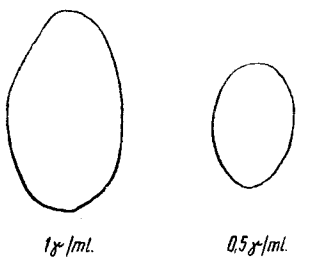
VII. *Rozwijanie chromatogramu*

Uprzednio przygotowane bibuły kładziono na czystych, dokładnie odtłuszczonych taflach szklanych i przy pomocy mikropipety nakładano na nie krople wzorca i preparatu. Wygodnie jest umieszczać odpowiednie stężenia obok siebie. Następnie suszone bibuły bardzo dokładnie i ostrożnie zawieszano w komorze chromatograficznej z danym solwentem.

a) *Solwenty*



Ryc. 1



Ryc. 2

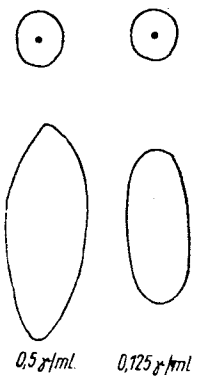
Ryc. 1. CH_3COONa 0,1 m. pH = 6,8. Bibuła Whatman'a Nr 2. Czas ciągnienia 6,5 godziny. Chromatografia wstępująca.

Fig. 1. CH_3COONa 0.1 m. pH = 6.8. Whatman filter paper No. 2. Time of drawing 6.5 hours. Ascending chromatography.

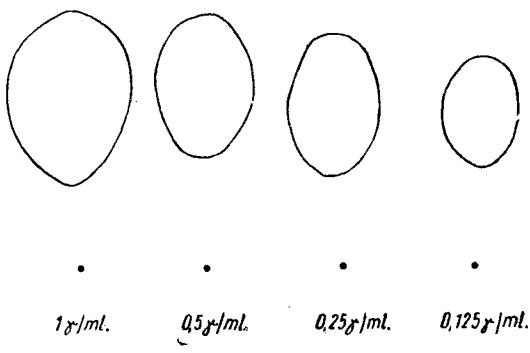
Ryc. 2. Na_2HPO_4 0,1 m. pH = 7,0. Bibuła Whatman'a Nr 2. Czas ciągnienia 6,5 godziny. Chromatografia wstępująca. Kwas foliowy czysty, stężenie: 1; 0,5 mcg/ml.

Fig. 2. Na_2HPO_4 0.1 m. pH = 7.0. Whatman filter paper No. 2. Time of drawing 6.5 hours. Ascending chromatography. Pure folic acid: 1; 0.5 mcg/ml.

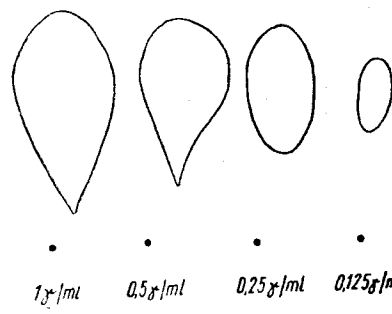
Głębokość zanurzenia bibuł do solwentu wynosi 2 cm. Komorę zakrywa się szczelnie doszlifowaną płytą i pozostawia w temperaturze pokojowej na 24 godziny.



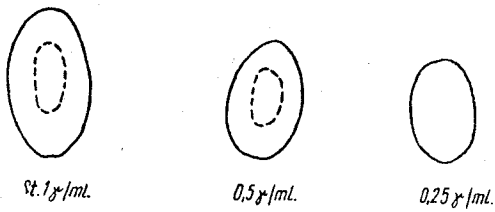
Ryc. 3. CH_3COOH – alkohol n-butylowy + H_2O 1 : 4 : 1. Bibuła Whatman'a Nr 2. Chromatografia zstępująca. Czas ciągnienia 17 godzin. Kwas foliowy czysty, stężenie 0,5; 0,125 mcg/ml.
Fig. 3. CH_3COOH – n-butyno alcohol + H_2O L : 4 : 1. Whatman filter paper No. 2. Descending chromatography. Time of drawing 17 hours. Pure folic acid, concentrations: 0.5; 0.125 mcg ml.



Ryc. 4. CH_3COOH + alkohol n-butylowy + H_2O 1 : 4 : 1. pH = 6,8 (stężony NH_4OH). Bibuła Whatman'a Nr 2. Chromatografia wstępująca. Czas ciągnienia 19 godzin. Kwas foliowy czysty, stężenie: 1; 0,5; 0,25; 0,125 mcg/ml.
Fig. 4. CH_3COOH + n-butyl alcohol + H_2O 1 : 4 : 1. pH = 6.8 (conc. NH_4OH). Whatman filter paper No. 2. Ascending chromatography. Time of drawing 19 hours. Pure folic acid, concentrations: 1; 0.5; 0.125 mcg/ml.

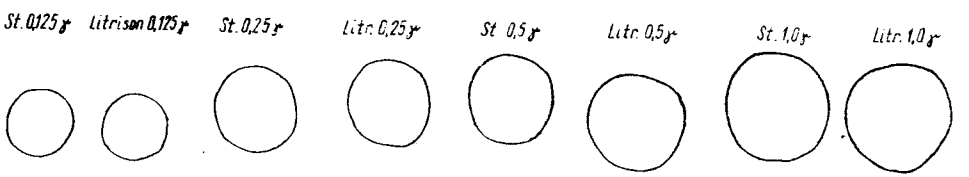


Ryc. 5. Alkohol n-butylowy + CH_3COOH + H_2O 1 : 4 : 1. pH = 6,8 (stęż. NH_4OH). Bibuła Whatman'a Nr 2. Chromatografia wstępująca. Czas ciągnienia 6,5 godz.
Fig. 5. n-Butylic alcohol + CH_3COOH + + H_2O 1 : 4 : 1. pH=6.8 (conc. NH_4OH). Whatman filter paper No. 2. Ascending chromatography. Time of drawing. 6.5 hours.



Ryc. 6. 5% kwas cytrynowy + chloroform 1 : 2. pH = 9 (stęż. NH_4OH). Bibuła Whatman'a Nr 2. Chromatografia zstępująca. Czas ciągnienia 17 godzin. Kwas foliowy czysty, stężenie: 1; 0,5; 0,25 mcg ml.

Fig. 6. 5% Citric acid + chloroform 1 : 2. pH = 9. (conc. NH_4OH). Whatman filter paper No. 2. Descending chromatography. Time of drawing 17 hours. Pure folic acid. conc. 1: 05: 0.25 mcg ml.



Ryc. 7. CH_3COOH 0,1 n + alkohol n-butylowy + alkohol etylowy 96%. 9 : 2 : 1. Bibuła Whatman'a Nr 2. Chromatografia zstępująca. Czas ciągnienia 24 godziny. Kwas foliowy czysty (standard) oraz preparat „Litrison", stężenie: 1; 0,5; 0,25; 0,125 mcg/ml.

Fig. 7. CH_3COOH 0.1 n + n-butyl alcohol + etyl alcohol 96%. 9 : 2 : 1. Whatman filter paper No. 2. Descending chromatography. Time of drawing 24 hours. Pure folic acid (standard) and preparation „Litrison", concentration: 1; 0.5; 0.25; 0.125 mcg/ml.

b) *Komora chromatograficzna*

Komorę stanowi wanna szklana o wymiarach 50 × 24 × 21 cm z doszlifowaną płytą szklaną, stanowiącą pokrywę.

Sprawą dużej wagi jest to, ażeby dno komory było dokładnie płaskie, gdyż tylko wtedy wysokość słupa rozpuszczalnika w stosunku do części bibuły zanurzonej jest stała. Dwie boczne, przeciwległe ściany komory, powinny posiadać uchwyty do podtrzymywania prętów szklanych. Przez pręty te przewiesza się bibuły w czasie rozwijania chromatogramu.

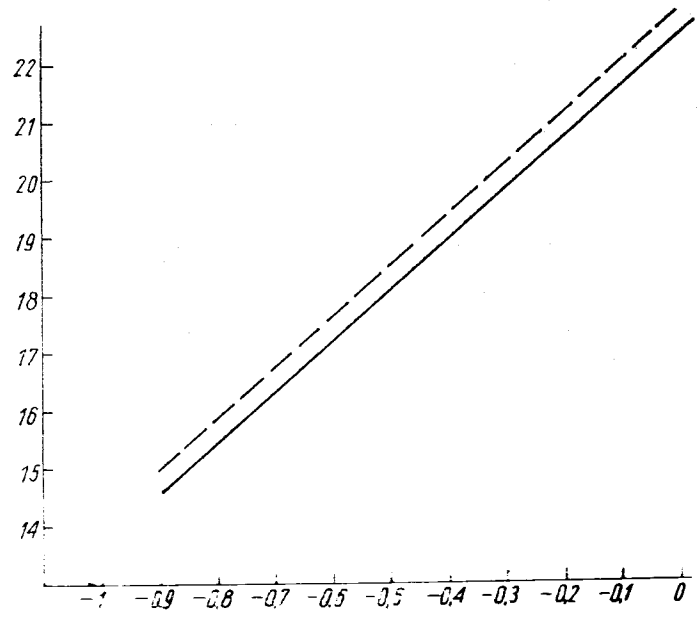
VIII. *Wywoływanie chromatogramu*

Po 24 godz. bibuły wyjmowano ostrożnie z rozpuszczalnika i dokładnie suszono, a następnie rozcinano każdy arkusz, wzdłuż zaznaczonych torów, otrzymując poszczególne paski. Paski te (uprzednio poznaczone) układano na płycie z agarowym podłożem. Płytę przykrywano szklaną taflą i inkubowano w termostacie w temp. 37°C w ciągu 18 godz.

IX. *Odczytywanie chromatogramu i obliczanie wyników*

Po skończonej inkubacji płyty wyjmowano z termostatu i zdejmowano paski bibuły, a następnie przy pomocy cyrkla mierzono średnice powstałych stref wzrostowych.

Wykreślano dwie krzywe dla standardu i preparatu odkładając na osi odciętych logarytmy stężeń kwasu foliowego użyte w badaniu, a na osi rzędnych wielkości otrzymanych średnic. Różnica odczytana w odpowiedniej skali, pomiędzy krzywą standardową i preparatu stanowi logarytm M', który po zantylogarytmowaniu i przemnożeniu przez 100, wyraża zawartość kwasu foliowego w badanym preparacie w procentach.



Ryc. 8. Krzywa standardowa oraz krzywa preparatu.
Fig. 8. Standard curve of the preparation.

WNIOSKI

1. Dobrano rozpuszczalnik pozwalający na rozdzielenie kwasu foliowego w preparatach złożonych.

2. Opracowano warunki dla chromatografii wstępującej, ustalając wielkość stężenia prób, miejsce umieszczenia kropli i głębokość zanurzenia bibuły, dzięki czemu otrzymano koliste strefy wzrostu.

3. W powyższej pracy posługiwano się szczepem *Streptococcus faecalis*, a nie *Lactobacillus casei* ze względu na krótszy okres inkubacji tego szczepu.

Г. Конколь, Я. Богуцка, Г. Гайцы

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ШТАММА STREPTOCOCCUS FAECALIS

Содержание

Разработан простой метод количественного определения фолиевой кислоты с применением бумажной хроматографии в сложных препаратах.

Установлены оптимальные условия к проведению хроматографии, подбирая соответствующие растворитель и бумагу, определяя концентрацию фолиевой кислоты в исследуемых пробах, место помещения капли и глубину погружения бумаги.

Установлены точные условия выращивания и адаптации штамма streptococcus faecalis к проведению обозначения.

H. Kąkol, J. Bogucka, H. Gajcy

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FOLIC ACID WITH THE AID OF *STREPTOCOCCUS FAECALIS*

Summary

A simple quantitative method for assaying folic acid in composite preparation by means of chromatography was elaborated. Optimum conditions for chromatography were determined, such as choice of solvent, filter paper, amount of folic acid in the sample, site of application, and depth of immersion of the filter paper. The conditions of cultivation of *Streptococcus faecalis* were also defined, and a strain of *Streptococcus faecalis* was adapted to making assays of folic acid.

PIŚMIENNICTWO

1. *Barton C. C., Wright:* The Microbiological Assay of the Vitamin B — complex and Amino Acids.
2. *Johnson B. C.:* Methods of Vitamins Determination.
3. *Jones A., Morris S.:* The Analyst, 1949, 74, 29.
4. *Nyman M. C., Gortner W. A.:* J. Biol. Chem., 1945, 157, 303.
5. *Wieland O. P., Hutchings B. L., Williams J. H.:* Arch. Biochem. Biophys., 1952, 40, 205.
6. *Zakrzewski S. F., Nichol Ch. A.:* J. Biol. Chem., 1953, 205, 361.

Otrzymano: 20. IV. 1961.

Adres autorów: Instytut Leków, Warszawa, ul. Długa 16.