หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psychotherm Incubator Shaker) เป็นเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลม (rotary shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 ของบริษัท INFORS ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

หลอดแสงอุลตราไวโอเลต(Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TUV 15W /G15 T8 ของบริษัท PHILIPS ประเทศ ฮอลแลนด์

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง(Spectrophotometer)รุ่น spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องปั่นเหวี่ยง(Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท KUBOTA Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) สำหรับถ่ายรูป รุ่น UFX-IIA ของบริษัท Nikon Corporation ประเทศญี่ปุ่น

ถังหมัก (Fermenter) ถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นของบริษัท L.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น รุ่น MD-300 ตัวถังหมักเป็นแก้ว มีใบพัด(impeller) แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมสภาวะเป็น bioprocess controler รุ่น MDIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compressor) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดมะนาว	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไฮโดรคลอริก	Mallinckrodt สหรัฐอเมริกา
กรดไอโซซิตริก	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดทาร์ทาริก	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดมาลิอิก	MERCK ประเทศเยอรมัน
กรดฟอสฟอริก	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
กรดซัลฟุริก	Mallinckrodt สหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมคลอไรด์	Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK ประเทศเยอรมัน
สารสกัดจากยีสต์	DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
สารสกัดจากมอลต์	DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมโบรไมด์	CARLO ERBA ประเทศอิตาลี
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	MERCK ประเทศเยอรมัน
ไทโอยูเรีย	MERCK ประเทศเยอรมัน
เฮปเทน	Mallinckrodt สหรัฐอเมริกา
แป้งมันสำปะหลัง	บริษัท ไทยวา ประเทศไทย
เอนไซม์ BAN และ Dextrozyme	Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก
NTG	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
พี.จี.โอ.เอนไซม์	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมเตตระบอเรต	MERCK ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคาร์บอเนต	Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK ประเทศเยอรมัน

2. **เชื้อจุลินทรีย์**

ยีสต์สายพันธุ์ตั้งต้น *Candida oleophila* C-73 ซึ่งคัดเลือกได้จากการวิจัยของ เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535)

3. **การเก็บรักษาและการเลี้ยงเชื้อ**

3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อ โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ(loop) แล้วลาก(streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก 1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว จึงนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อ โดยเติมน้ำที่ฆ่าเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอย ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (ภาคผนวก ก 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ควบคุมปริมาณเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวก ก 2) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ตรวจหาการเจริญและปริมาณกรดมะนาว

4. **วิธีการละลายเกลือแคลเซียมซิเตรท ในน้ำหมัก**

ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว และติดตามการเจริญของเชื้อ จะต้อง

ทำการละลายเกลือแคลเซียมซิเตรทที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCL) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 (Wojtatowicz et. al.,1993) จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร

5. การกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* C-73 ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

5.1 การกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

ปฏิบัติตามขั้นตอนต่างๆดังนี้ (Akiyama et al., 1973 ; Hamissa et al.,1982 ;Matsuoka,Ueda and Aiba,1980)

5.1.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ log phase ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8 (ภาคผนวก ข 3) ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งใน ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 8 ให้มีความหนาแน่น 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.1.2 นำสารละลาย NTG ใน ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 เติมลงใน 1 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอย ให้มีความเข้มข้นของ NTG เป็น 0.034-1.360 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที

5.1.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5.1.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตร ของเซลล์แขวนลอยที่ได้ ลงบนอาหารแข็ง YM (ภาคผนวก ก 1) ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

5.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ คำนวณเป็นเปอร์เซนต์รอดตาย นำโคโลนีที่ได้ไปทำการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีในข้อ 6

5.2 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

5.2.1 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.2 เมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงกลางของ log phase ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งใน สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความหนาแน่น 10^6–10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5.2.2 ปิเปต 5.0 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอย ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีคริปหนีบกระดาษที่ดัดเป็นรูปตัว Z เพื่อเป็นอุปกรณ์การกวนผสม

5.2.3 นำเซลล์ไปฉายด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆกัน ในตู้ที่มีแหล่งของแสงอุลตราไวโอเลต กำลังงาน 15 วัตต์ จำนวน 3 หลอด และอยู่ห่าง 30 เซนติเมตร โดยมีการกวนผสมตลอดเวลา

5.2.4 กระจาย 0.1 มิลลิลิตรของเซลล์ที่ผ่านการฉายด้วยแสงอุลตรา-ไวโอเลต ลงบนอาหารแข็ง YM ที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

5.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ คำนวณเป็นเปอร์เซนต์รอดตาย นำโคโลนีที่ได้ไปทำการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ ตามวิธีในข้อ 6

6. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ใหม่

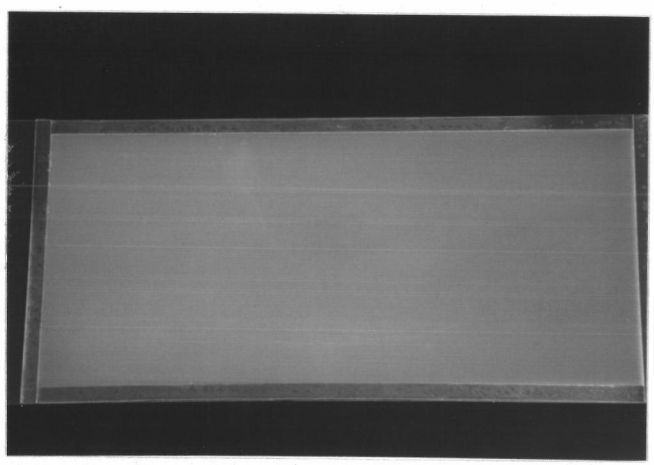
6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

เป็นวิธีที่ปรับปรุงจากรายงานของ Nout (1972) ที่ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตกรดมะนาว โดยใช้อาหารวุ้นที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ จะต้องละลายกรดมะนาวออกมาจากอาหารวุ้นด้วยสารละลายซัลฟุริก แล้วจึงนำมาวิเคราะห์กรดมะนาวด้วยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน ซึ่งมีหลายขั้นตอนไม่สะดวกสำหรับตัวอย่างมากๆ ดังนั้นจึงทำการปรับปรุงได้วิธีที่เหมาะสม ดังนี้

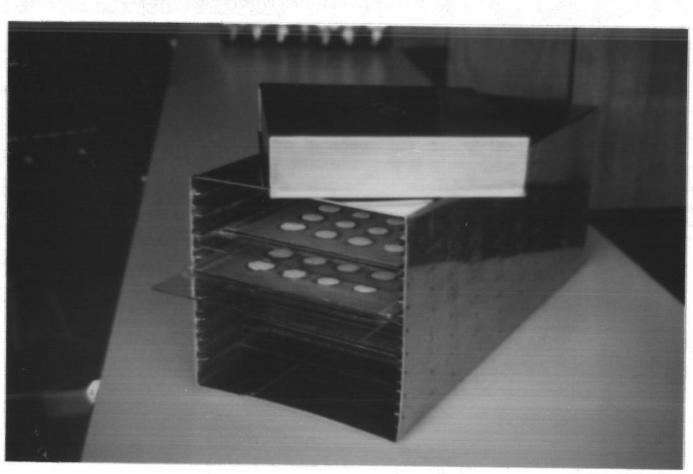
6.1.1 เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง(agar) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีแคลเซี่ยมคาร์บอเนตเป็นอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถาดกระจกขนาด 17.5 X 28.5 X 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3)

6.1.2 เขี่ยโคโลนีเชื้อยีสต์ ที่ได้จากข้อ 5 ด้วยเข็มเขี่ย ลงบนอาหารในข้อ 6.1.1 บรรจุลงในกล่องแสตนเลสปลอดสนิมที่มีฝาปิดขนาด 20 X 20 X 46 เซนติเมตร (รูปที่ 4) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตบริเวณใสรอบๆโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตกรดได้ (รูปที่ 5)

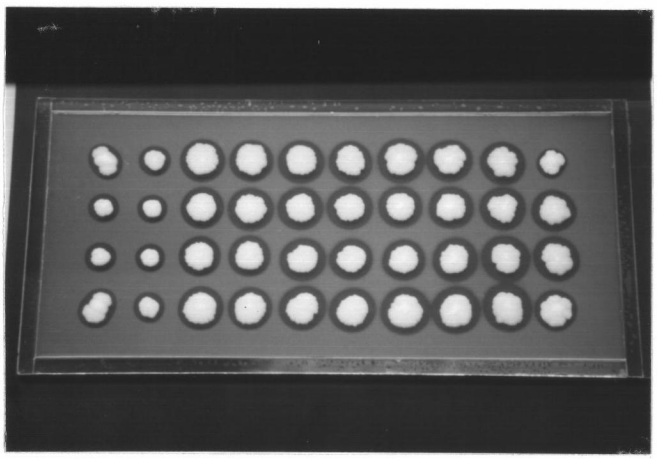
6.1.3 คัดเลือกเชื้อยีสต์ ที่ให้ค่าอัตราส่วนของความกว้างบริเวณใสรอบๆ โคโลนีต่อความกว้างโคโลนี หรือเรียกว่า potency index (ภาคผนวก จ 1) มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น นำมาทำการคัดเลือกต่อตามวิธีในข้อ 6.2



รูปที่ 4 อาหารวุ้นที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอินดิเคเตอร์



รูปที่ 5 การเรียงแผ่นกระจกที่มีอาหารวุ้น ในกล่องแสตนเลสที่มีฝาปิด



รูปที่ 6 ความกว้างของบริเวณใสรอบๆ โคโลนี

6.2 <u>การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ</u> (Secondary screening)

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.1.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว ตามวิธีในข้อ 3.3 แล้วนำมาวิเคราะห์ มวลสารแห้ง, ปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในข้อ 7

7. <u>วิธีการวิเคราะห์</u>

7.1 <u>การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง</u>

หลังการละลายเกลือแคลเซียม ตามวิธีในข้อ 4 นำน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman แบบ GF/C ซึ่งชั่งน้ำหนักแล้ว โดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore filter) ล้างเซลด้วยน้ำ อบเซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองด้วยเครื่องไมโครเวฟ ด้วยความร้อนระดับดีฟรอส นาน 30 นาที จนน้ำหนักคงที่แล้วชั่งน้ำหนัก หักน้ำหนักกระดาษกรองออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง

7.2 <u>การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u>

โดยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld,1955) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

หลังการละลายเกลือแคลเซียมตามวิธีในข้อ 4 นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองในข้อ 7.1 เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตร-ซาลิไซลิก(ภาคผนวก ข 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำเย็น นาน 5 นาที เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ (ภาคผนวก ค 1)

7.3 <u>การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ พี.จี.โอ. เอนไซม์</u>

นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองในข้อ 7.1 เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตมา 0.25 มิลลิลิตรใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย พี.จี.โอ.เอ็นไซม์ (ภาคผนวก ข 4) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.04-0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ (ภาคผนวก ค 2)

7.4 <u>การวิเคราะห์กรดมะนาวโดยวิธีเพนตะโบรโมอะซีโตน (Pentabromo-acetone Method)</u> (Stern,1957)

หลังการละลายเกลือแคลเซียมตามวิธีในข้อ 4 นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองในข้อ 7.1 มาวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ขั้นตอนการเปลี่ยนกรดมะนาวเป็นเพนตะโบรโมอะซีโตน

นำสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโปตัสเซียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงไป 5 หยด และเติมสารละลายโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปอีก 10 หยดทันที เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2) ขั้นตอนการสกัดเพนตะโบรโมอะซีโตนด้วยเฮปเทน

นำหลอดทดลองจากข้อ 1 แช่ในอ่างน้ำแข็ง ในขณะเดียวกันค่อยๆ หยดสารละลายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนได้สารละลายใสไม่มีสี เติมเฮปเทนปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท สกัดโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

3) ขั้นตอนการสกัดด้วยไทโอยูเรีย

ดูดส่วนบนหรือชั้นของเฮปเทนจากหลอดทดลองในข้อ 2 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวก ข 1) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้แน่น สกัดโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

4) ดูดชั้นบนหรือชั้นของเฮปเทนทิ้งไป แล้วจึงนำชั้นล่างหรือชั้นของสารละลายไทโอยูเรียที่สกัดได้จากข้อ 3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 430 นาโนเมตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดมะนาวโมโนไฮเดรต ความเข้มข้นตั้งแต่ 10–40 ไมโครกรัมในกรดซัลฟุริกที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มัล ใช้สารละลายมาตรฐานของกรดมะนาวดังกล่าวปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง แล้วผ่านขั้นตอนของปฏิกิริยาต่างๆดังกล่าวข้างต้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดมะนาวกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณกรดมะนาวในสารละลายตัวอย่าง(ภาคผนวก ค 3)

7.5 <u>การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกในน้ำหมัก</u>

ทำได้โดย ฉีดตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC (Shimadzu HPLC,LC-8A) โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์ : SELECTOSIL 5 C18 ขนาด(I.D.) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$(NH_4)_2HPO_4$] ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.00 ด้วย H_3PO_4

อุณหภูมิที่ใช้ : 40 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : ความยาวคลื่นอุลตราไวโอเลต 214 นาโนเมตร

โดยใช้สภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์(retention time) ของกรดไอโซซิตริกประมาณ 4.6 นาที และกรดมะนาวประมาณ 6.6 นาที ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดไอโซซิตริก ความเข้มข้น 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร และกรดมะนาว ความเข้มข้น 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร สำหรับสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในใช้ กรดทาร์ทาริก ละลายตัวอย่างด้วยสารละลายตัวพาแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกรดมะนาวหรือกรดไอโซซิตริก กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค 4 และ ค 5)