2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

เลือดคนปกติ

เลือดคนปกติ (หมู่เลือด O) ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้บริจาคโลหิต ณ หน่วยงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลหาดใหญ่ จ. สงขลา

สมองหนูขาว

สมองหนูขาว (Wistar rat) เพศเมีย อายุ 3 เดือน ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิจจา สว่างเจริญ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารสกัดพืชสมุนไพร

สารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้งหมดที่นำมาศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดังนี้

- สารสกัดชะพลู ผักเบี้ยใหญ่ ว่านกีบแรด และปีบฝรั่ง ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. กานดา ปานทอง
- สารสกัดมะกรูด และหญ้าพันงูเขียว ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล
- สารสกัดบัวหลวงได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

สารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
Acetyl phenylhydrazine (APH)	150.18	Sigma
α, α'-Azodiisobutyramidine dihydrochloride	271.19	Fluka

(AAPH)		
สารเคมี	**M.W.**	**บริษัทที่ผลิต**
L-Ascorbic acid	176.13	May& Baker
Butylated hydroxytoluene (BHT)	220.30	Sigma
Bleomycin sulfate	-	Sigma
Catechin	290.30	Sigma
Citric acid	210.14	Sigma
Crystal violet	408.02	Sigma
1,1- Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)	394.30	Merck
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	174.18	Fluka
Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	358.14	Merck
Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)	372.24	Fluka
2-Deoxy-D-ribose	134.13	Fluka
DNA (type XIV from Herring testis)	-	Sigma
Ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)	278.02	J.T. Baker
Ferric chloride ($FeCl_3$)	162.21	Sigma
D-Glucose	180.16	Carlo Erba
Hexamine ($C_6H_6Na.2H_2O$)	140.20	Sigma
Hydrochloric acid	36.46	Sigma
Hydrogen peroxide	34.01	Merck
Magnesium chloride ($MgCl_2$)	95.20	Sigma
Methanol	32.04	BDH
L-Methionine	149.20	Sigma
Nitro blue tetrazolium dihydrochloride (NBT)	817.60	Sigma
Potassium chloride (KCl)	74.55	Carlo Erba

Potassium hydroxide	56.11	J.T. Baker
สารเคมี	**M.W.**	**บริษัทที่ผลิต**
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	136.09	Fluka
Phosphomolybdic acid ($H_3[P(Mo_3O_{10})].H_2O$)	1,825.25	Sigma
Riboflavin	376.40	Sigma
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	105.99	Carlo Erba
Sodium chloride (NaCl)	58.44	Merck
Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	358.14	Merck
Sodium hydroxide	40.00	Merck
Sodium tungstate ($Na_2WO_4.2H_2O$)	329.86	Sigma
Tetramethyl murexide (TMM)	340.30	Sigma
Thiobarbituric acid (TBA)	144.10	Carlo Erba
Trichloroacetic acid (TCA)	163.39	Carlo Erba
Tris (hydroxymethylaminomethane)	121.11	Sigma
Triton X-100	646.35	Sigma
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid)	250.29	Aldrich

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น 8453 บริษัท Hewlett-Packard, USA
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (refrigerated bench-top centrifuge) รุ่น 5804R ของ Eppendorf, Germany
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland

4. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
5. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น PC-410 ของ Corning, USA
6. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, USA
7. เครื่องบดสาร (polytron) รุ่น CH-6010 ของ Kinematica, Switzerland
8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) รุ่น SS40-D ของ Grant, England
9. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (rotatory evaporator) รุ่น R114 ของ BÜCHI, Switzerland
10. กล้องจุลทรรศน์รุ่น PMS60.PMS30 ของ Leica, Switzerland

วิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร

นำแต่ละส่วนของพืชสมุนไพร ตามตารางที่ 1 มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแยกบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาแช่ให้ท่วมในเมธานอล (methanol) ทิ้งไว้ 5-7 วัน โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้แต่ละครั้งมารวมกัน แล้วระเหยเมธานอลออกไปด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (rotatory evaporator) ที่อุณหภูมิ 45-55°ซ จนแห้งสนิท ได้เป็นส่วนสกัดหยาบเมธานอลของพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

ตารางที่ 1 ส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่ใช้เตรียมสารสกัด

ชื่อพืชสมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้*
ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)	ต้นแห้ง
บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)	ใบแห้ง รากแห้ง และกกแห้ง
ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* L.)	ต้นสด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อพืชสมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้ *
มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.)	ใบสด และเปลือกผลสด
ว่านกีบแรด (*Angiopteris evecta* Hoffm.)	เหง้าแห้ง
ปีบฝรั่ง [*Laurentia longiflora* (L.) Peterm.]	ต้นแห้ง
หญ้าพันงูเขียว [*Stachytarpheta indica* (L.) Vahl]	ต้นแห้ง

*หมายเหตุ เป็นส่วนของพืชสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ที่นิยมใช้ในตำรับยาแผนโบราณ

2.2 การหาปริมาณ polyphenols ในสารสกัด

อาศัยวิธีการของ AOAC (1990) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) ของเมธานอล จากนั้นเติมสารละลายที่ได้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลาย Folin Danis reagent [ประกอบด้วย 10% (w/v) sodium tungstate และ 0.002% (w/v) phosphomolybdic acid] ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที เติม 35% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นลงไปจนครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับ blank ซึ่งใช้เมธานอลแทนสารสกัด หาปริมาณ polyphenols ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย catechin ที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH$^{\bullet}$

ทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ ของสารสกัดตามวิธีการที่ระบุโดย Yen และ Hsieh (1997) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้ม

ข้นต่าง ๆ กันในเมธานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเมธานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่เมธานอลแทนสารสกัด โดยใช้เมธานอลเท่านั้นเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$)

ดัดแปลงจากวิธีการที่ระบุโดย Murcia และคณะ (2001) โดยนำหลอดทดลองมาบรรจุสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในเมธานอล ปริมาตร 67 ไมโครลิตร แล้ววางทิ้งไว้ให้ระเหยจนแห้ง เติมสารละลาย 30 mM KH_2PO_4/KOH, pH 7.4 ปริมาตร 134 ไมโครลิตร, 17 mM deoxyribose ปริมาตร 67 ไมโครลิตร, 34 mM H_2O_2 ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 1.2 mM EDTA ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 300 µM $FeCl_3$ ปริมาตร 67 ไมโครลิตร และ 600 µM ascorbic acid ปริมาตร 67 ไมโครลิตร ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาบ่ม (incubate) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 1% (w/v) TBA ใน 50 mM NaOH ปริมาตร 333 ไมโครลิตร ตามด้วย 2.8% (w/v) TCA ในน้ำกลั่น ปริมาตร 333 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 20 นาที หลังจากทิ้งให้เย็น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีแต่ reagent เท่านั้น และชุด sample blank ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดกับ reagent ต่าง ๆ เกือบครบ (ยกเว้น deoxyribose) โดยใช้ชุดควบคุมที่ไม่มี deoxyribose อยู่ด้วยเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $OH^{\bullet}$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [A_{control} - (A_{sample} - A_{sample\ blank})/ A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{sample\ blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $OH^{\bullet}$ ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

อาศัยวิธีการของ Bayer และ Fridovich (1987) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ กันในเมธานอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมกับสารละลายผสมของ 9.9 mM L-methionine, 1.72 mM NBT, 1% (w/v) Triton X-100 และ 117 µM riboflavin ใน 50 mM K_2HPO_4, pH 7.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากส่องด้วยแสง (illuminate) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) ความเข้ม 40 วัตต์ (Watt) นาน 7 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่เมธานอลแทนสารสกัด และชุด sample blank ที่มีสารสกัดกับ reagent ต่าง ๆ <u>ยกเว้น</u> riboflavin โดยใช้ชุดควบคุมที่ไม่เติม riboflavin ลงไปเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [A_{control} - (A_{sample} - A_{sample\ blank}) / A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{sample\ blank}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

2.4 การทดสอบความสามารถจับ Fe^{2+} ของสารสกัด

อาศัยวิธีการของ Shimada และคณะ (1992) โดยนำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน 10 mM hexamine, pH 5.0 (เตรียมจาก hexamine 1.4 กรัม ผสมกับ KCl 0.74 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 3 mM $FeSO_4$ ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 1 mM TMM ในน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร เปรียบเทียบ

กับชุดควบคุมที่ใส่บัฟเฟอร์แทนสารสกัด โดยใช้บัฟเฟอร์เท่านั้นเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับ Fe^{2+} จากสูตร

$$\% \text{ chelation} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

2.5 การทดสอบความสามารถปกป้องชีวโมเลกุลจากอนุมูลอิสระ

2.5.1 การทดสอบความสามารถยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis)

จากวิธีการที่ระบุโดย Liu และ Ng (2000) นำเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ผ่านการล้างด้วยน้ำเกลือ [0.9% (w/v) NaCl] จำนวน 3 ครั้ง มาเตรียมเป็นสารละลายเม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 10% (v/v) ใน 10 mM phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 (ประกอบด้วย 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 และ 150 mM NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดเจือจางใน PBS ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมลงไป แล้วผสมกับสารละลาย 200 mM AAPH ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจือจางด้วย PBS ปริมาตร 8 เท่าก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 665 x g ณ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ PBS เป็น blank เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่เติมน้ำกลั่นแทน PBS ในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตกอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเม็ดเลือดแดงแตก จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

2.5.2 การทดสอบความสามารถยับยั้งการทำลายดีเอ็นเอ (bleomycin-dependent DNA damage)

จากวิธีการที่ระบุโดย Liu และ Ng (2000) นำสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ กันในเมธานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมลงในสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 0.5 mg/ml DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 0.05 mg/ml bleomycin sulfate ปริมาตร 50

ไมโครลิตร, 5 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ 50 µM $FeCl_3$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.1 M EDTA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 1% (w/v) TBA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 25% (v/v) HCl ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่เมธานอลแทนสารสกัดโดยใช้ชุดควบคุมที่ไม่มีทั้ง DNA และ bleomycin เป็น blank

2.5.3 การทดสอบความสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)

จากวิธีการที่ระบุโดย Liu และ Ng (2000) นำสมองหนูขาวที่ผ่านการล้างด้วยน้ำเกลือจนสะอาด มาผสมกับสารละลาย 20 mM Tris–HCl, pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) แล้วทำการตัดออกเป็นชิ้นด้วยเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสาร (polytron) จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกที่ 20,800 x g, 4 °ซ นาน 15 นาที นำสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในเมธานอล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตามด้วย 10 µM $FeSO_4$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 0.1 mM ascorbic acid ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 28% (w/v) TCA ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และ 1% (w/v) TBA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที หลังจากทิ้งให้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่สภาวะเดิมเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เมธานอลแทนสารสกัด โดยใช้ 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 เป็น blank จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

2.5.4 การทดสอบความสามารถป้องกันออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

อาศัยวิธีการที่ระบุโดยวาริน แสงกิติโกมล และคณะ (2543) ซึ่งมีขั้นตอนคือ นำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายใน 1/15 M KH_2PO_4/Na_2HPO_4 ที่มี 2 mg/ml glucose และ1 mg/ml APH อยู่ด้วย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed red cells) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารละลายสี crystal violet ความเข้มข้น 10 mg/ml ใน 0.75% (w/v) NaCl ปริมาตรเท่าตัวลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงนำมาทำ blood smear บนแผ่นสไลด์ (glass slide) เพื่อใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 100 ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ปรากฏตะกอนของ Heinz bodies (ฮีโมโกลบินที่ถูกออกซิไดส์) อยู่ภายในต่อเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1,000 เซลล์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากสารสกัด และชุดควบคุมที่ไม่ใส่ APH ต่อไป