บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

ในการศึกษากระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือก และเมล็ดของผลมังคุดทั้งแบบสดและแบบอบแห้งด้วยตัวทำละลายต่างชนิด อีกทั้งการศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Phenolic and Flavonoid Contents) และคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และABTS (DPPH and ABTS assays) ดังกล่าว จะมีการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ดังนี้ โดยสารเคมีที่ใช้ในการทดลองที่ใช้เป็นระดับคุณภาพห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ (Analytical Grade) แสดงดังในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
Analytical Balance	Sartorius / CPA224S	Germany
Autopipette (20 – 200 µL)	Thermo Scientific / FINNPIPETTE F2	Finland
Autopipette (100 – 1000 µL)	Thermo Scientific / FINNPIPETTE F2	Finland
Benchtop Centrifuge	SCANSPEED / 1580R	Denmark
Hot Air Oven	Binder / FD 240	Germany
Rotary Vacuum Evaporator	BÜCHI Rotaryvapor / R-200	Switzerland
Mesh Sieve	Tyler	U.S.A.
Orbital Shaker	Gerhardt / Laboshake	Netherland
Purify Water Generator Type I	TKA / GENPURE UF-UV	Germany
Refrigerator 4 °C	EVERMED / LCRF 625S PRO	Italy
UV/Visible spectrophotometer	UVIKON 900XLX5 / Schott	France
Vortex Mixer	Vision Scientific / KMC-1300V	South Korea
Water Bath	DIGITAL HEAT / DH-45-110	Thailand

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

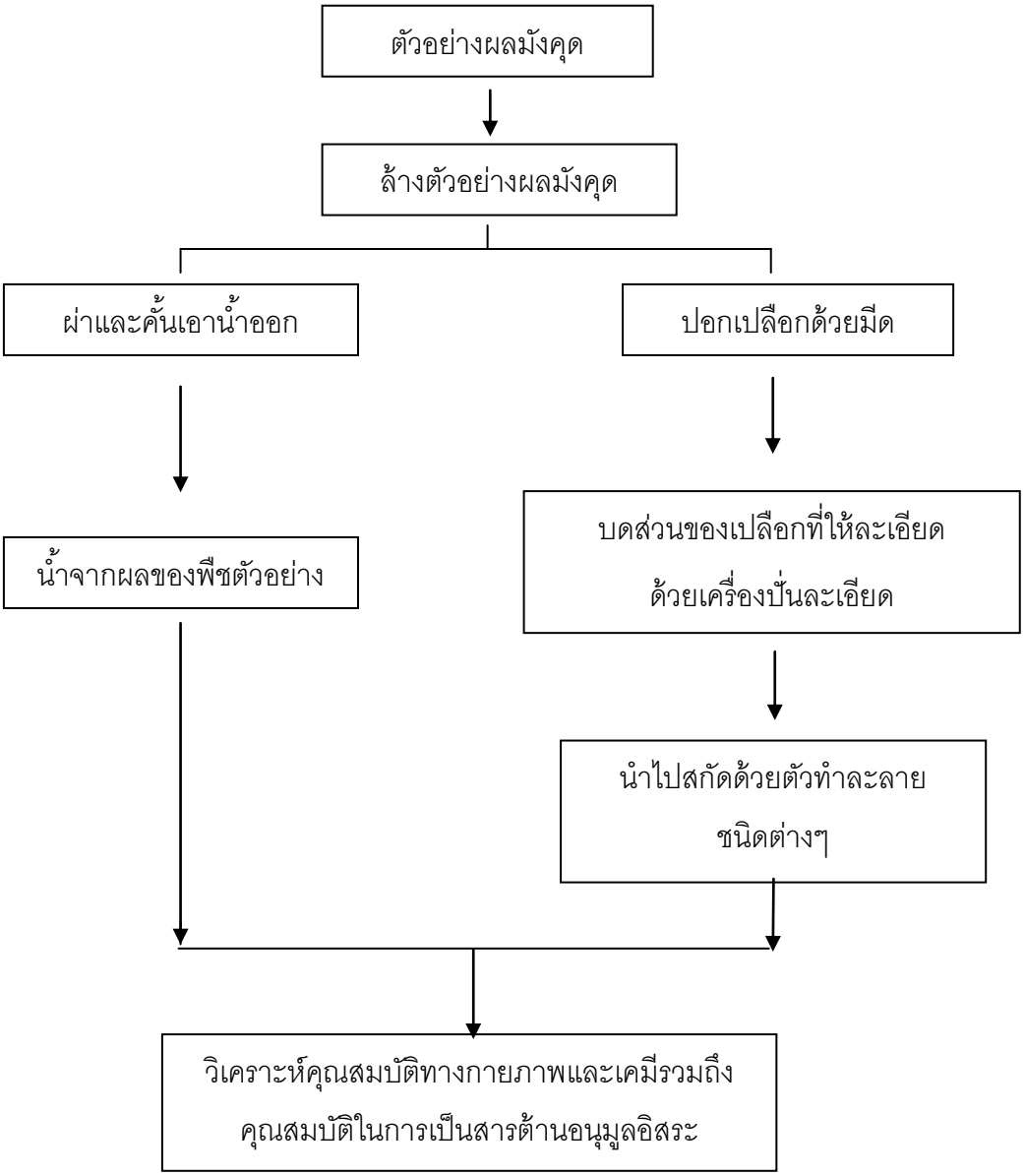
สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetone	Merck	Germany
Acetonitrile	Merck	Germany
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	Sigma	U.S.A.
Aluminium Chloride Hexahydrate	Merck	Germany
Dichloromethane	Merck	Germany
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	Aldrich	U.S.A.
Ethanol, absolute	Merck	Germany
Ethyl Acetate	Merck	Germany
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent	Merck	Germany
Gallic Acid Monohydrate	Sigma-Aldrich	U.S.A.
n-Hexane	Merck	Germany
Methanol, absolute	Merck	Germany
Rutin Trihydrate	Sigma	U.S.A.
Sodium Carbonate	Merck	Germany
Sodium Hydroxide	Merck	Germany
Sodium Nitrite	Merck	Germany

3.2 การออกแบบกระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือก และเมล็ดของผลมังคุดทั้งแบบสดและแบบอบแห้ง

หลักในการออกแบบกระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผลมังคุดในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างผลมังคุด ที่นำมาใช้ในการศึกษา และหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานตั้งแต่การคัดเลือกตัวอย่าง การเก็บรักษาตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผลมังคุด

เพื่อให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ตลอดจนทำการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากส่วนของน้ำจากเนื้อ เมล็ดและเปลือกนอกของผลมังคุดแบบสด และแบบอบแห้ง ที่คัดเลือกมาเพื่อให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมีคุณภาพ เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ในงานวิจัยได้ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยจะนำส่วนของเมล็ดและเปลือกนอกของผลมังคุดแต่ละชนิดไปทำการเตรียมตัวอย่าง และทำการสกัดในขั้นตอนต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 กระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผลมังคุดที่ออกแบบไว้

3.3 การหาปริมาณความชื้นจากเปลือก และเมล็ดของผลมังคุด

นำเปลือกของตัวอย่างผลมังคุดที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างมาหาปริมาณความชื้นด้วยวิธี Oven Drying Method (AOAC, 2000) โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 1.00 ± 0.05 กรัม ที่เหมาะสมให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในภาชนะอลูมิเนียม (ซึ่งผ่านการอบ 30 นาที และทราบน้ำหนักที่แน่นอน) โดยเปิดฝาเล็กน้อย นำไปอบแห้งด้วยเครื่องเป่าลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 105 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำภาชนะออกจากตู้อบลมร้อนพร้อมปิดฝาอลูมิเนียม ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้น โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของความชื้น ดังนี้

วิธีคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความชื้น $= \dfrac{100\left(w_1 - w_2\right)}{w_1 - w}$

เมื่อ w = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (กรัม)

w_1 = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

w_2 = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

3.4 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของผลมังคุดทั้งแบบสด และแบบอบแห้งด้วยตัวทำละลายต่างชนิด

3.4.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างผลของมังคุดจากตลาดสดท้องถิ่นในเขตพื้นที่บางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างผลมังคุด

ตัวอย่างผลมังคุดนำมาล้างทำความสะอาดและผึ่งจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง นำมาแยกส่วนเปลือก เมล็ด และเนื้อออกจากกัน โดยใช้มีดปลอกผลไม้ ปลอกส่วนเปลือกโดยไม่ให้สีม่วงติดอยู่ที่ส่วนเนื้อ ซึ่งปลายที่ได้จะหนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตร แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องปั่นละเอียดและนำไปร่อนผ่านตระแกรง (Mesh Sieve) ขนาด 16 mesh ส่วนของเนื้อและเมล็ดแยกออกจากกันโดยการผ่าครึ่งแล้วแยกส่วนเมล็ดออก นำส่วนของเนื้อไปคั้นน้ำออกด้วยเครื่องคั้นน้ำ

ผลไม้ จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC เพื่อรอการนำไปสกัดและวิเคราะห์ต่อไป

3.4.3 การสกัดสารตัวอย่างจากเปลือกนอกและเมล็ดของผลมังคุดแบบสด และแบบอบแห้งโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิด

นำเปลือกนอกและเมล็ดของตัวอย่างผลมังคุดแบบสดและแบบอบแห้งที่ผ่านการบดละเอียดมาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1.0 กรัม เติมสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้สกัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman (No.1) แล้วระเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่มีความหนืด ซึ่งสารละลายที่ใช้สกัดสารต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ คือ Purified Water (H_2O), Methanol (CH_4O), 80 % (v/v) Methanol, Ethanol (C_2H_6O), 80 % (v/v) Ethanol, Acetonitrile (C_2H_3N), Acetone (C_3H_6O), 80 % (v/v) Acetone, Dichloromethane (CH_2Cl_2), Ethyl Acetate ($C_4H_8O_2$) และ *n*-Hexane (C_6H_{14}) จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักคำนวณหา ร้อยละของผลผลิต (% yield) จากสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักเปลือกนอกของผลมังคุดที่ใช้ในการสกัด}}$$

ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยตัวทำละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Contents)

วิธี Folin-ciocalteu (Waterhouse *et al.*, 2001) เป็นวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสาระลายมาตรฐาน Gallic Acid ต่อน้ำหนักของสารสกัดของตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

3.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

3.5.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic Acid เข้มข้น 1,000 ppm

ชั่ง Gallic Acid Monohydrate 40 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.5.1.2 การเตรียมสารละลาย 20 % (w/v) Sodium Carbonate

ชั่ง Sodium Carbonate 40 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.5.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารสกัดตัวอย่างสกัดตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้นาน 8 นาที แล้วเติม 20 % (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV/Visible spectrophotometer

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Contents)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric Assays (Bushra *et al.*, 2009) วิธีนี้เป็นวิธีวัดโดยการเกิดปฏิกิริยา $AlCl_3$ ที่เติมในปฏิกิริยา เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟลาโวนอยด์ (Aluminium / Flavonoid) ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

3.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.6.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Rutin เข้มข้น 5,000 ppm

ชั่ง Rutin Trihydrate 40 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.6.1.2 การเตรียมสารละลาย 30 % (v/v) Ethanol

ตวง Ethanol (absolute) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.6.1.3 การเตรียมสารละลาย 5 % (w/v) Sodium Nitrite

ชั่ง Sodium Nitrite 40 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.6.1.4 การเตรียมสารละลาย 10 % (w/v) Aluminium Chloride

ชั่ง Aluminium Chloride Hexahydrate 40 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.6.1.5 การเตรียมสารละลาย 1 M Sodium Hydroxide

ชั่ง Sodium Hydroxide 40 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.6.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารสกัดตัวอย่างสกัดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร เติม 30 % (v/v) Ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 5 % (w/v) $NaNO_2$ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที เติม 10 % (w/v) $AlCl_3$ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที จึงเติม 1 M NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย 30 % (v/v) Ethanol จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV/Visible spectrophotometer

3.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH assays)

วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี DPPH assays (Brand-Williams *et al*., 1995) วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH radical ($DPPH^{\cdot}$) มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{12}N_5O_6$ เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

3.7.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

3.7.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 1,000 ppm

ชั่ง Gallic acid monohydrate 40 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.7.1.2 การเตรียมสารละลาย DPPH· เข้มข้น 6.5×10^{-2} mM

ชั่ง 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.0150 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.7.2 วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

นำสารละลาย DPPH· ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลางหลอดละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด เติมสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารสกัดตัวอย่าง หลอดละ 0.30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้ Methanol เป็นสารละลายแบงค์ (Blank) และใช้สารละลาย DPPH· ที่ยังไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเป็นชุดควบคุม (Control)

สารละลายมาตรฐานอื่นๆที่ความเข้มข้นต่างๆและสารตัวอย่าง ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารละลายตัวอย่าง คำนวณหาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%DPPH radical scavenging activity) จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารละลายตัวอย่าง , A_{sample}) โดยคิดเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม ($A_{control}$) ดังสมการนี้

$$\%\,\text{DPPH radical scavenging activity} = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\right) \times 100$$

นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นแล้วหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด (IC_{50})

3.8 การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ABTS assays)

วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างจากผลมังคุดด้วยวิธี ABTS assays (Rice-Evans *et al.*, 1996) วิธีนี้เป็นวิธีวัดโดยใช้สาร 2,2'-Azino-bis

(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ $ABTS^{\bullet+}$ มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ เป็น stable radical ในตัวทำละลาย Methanol ซึ่งสารละลายนี้มีฟ้า และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

3.8.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

3.8.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 1,000 ppm

ชั่ง Gallic Acid Monohydrate 40 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.8.1.2 การเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เข้มข้น 6.5×10^{-2} mM

ชั่ง 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 0.0150 กรัม ละลายด้วย Methanol แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

3.8.2 วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

นำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลางหลอดละ 3.00 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด เติมสารละลายมาตรฐานหลอดละ 0.30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลายแบงค์ (Blank) และใช้สารละลาย ABTS ที่ยังไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานเป็นชุดควบคุม (Control)

สารละลายมาตรฐานอื่นๆที่ความเข้มข้นต่างๆและสารตัวอย่าง ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารละลายของตัวอย่าง คำนวณหาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (%ABTS radical scavenging activity) จาก

ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และ/หรือ สารละลายตัวอย่าง , A_{sample}) โดยคิดเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม ($A_{control}$) ดังสมการนี้

$$\%\,\text{ABTS}\ \ \text{radical scavenging activity} = \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right) \times 100$$

นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นแล้วหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด (IC_{50})