บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

นำแก่นมะหาดไปตากแห้ง 5 กิโลกรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) จะได้ผงละเอียดสีเหลือง หนัก 4.5 กิโลกรัม ซื้อจากห้างขายยา ไทย ฮั่ว จั่น เมื่อวันที่ 9 สิงหาคม 2555

วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์/เครื่องมือ

วัสดุและสารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ (ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น)
   - เฮกเซน (Commecial grage, Jakraval Application Co.,Ltd.)
   - ไดคลอโรมีเทน (Commecial grage, Jakraval Application Co.,Ltd.)
   - อะซิโตน (Commecial grage, Jakraval Application Co.,Ltd.)
   - เมทานอล (Commecial grage, Jakraval Application Co.,Ltd.)
   - อทิลอะซิเตต (Commecial grage, Jakraval Application Co.,Ltd.)
2. Silica gel สำหรับ column chromatography
   - Silica gel (less than 0.063 mm Merck 1.07729.1000)
   - Silica gel 60 (0.063-0.200 mm Merck 1.07734.1000)
   - Silica gel 60 (0.040-0.063 mm Merck 109385)
3. Thin-layer chromatography (aluminium sheet 20x20 cm. silica gel 60 GF_{254})
4. Developing reagent (*p*-anisaldehyde: conc.H_2SO_4: glacial acetic acid: methanol อัตราส่วน 0.5 : 8 : 10 : 85)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องให้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (CAMAG, Switzerland)
2. Rotary vacuum evaporator (N-series EYELA, Japan)
3. Melting point (SM11 Stuart®, USA)
4. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (IR-Tracer 100, SHIMADZU, Japan)
5. UV-visible Spectrophotometer (UV-2400PC, SHIMADZU, Japan)
6. Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer (Bruker Avance 300)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (TE2142 Sartorius, Thailand)

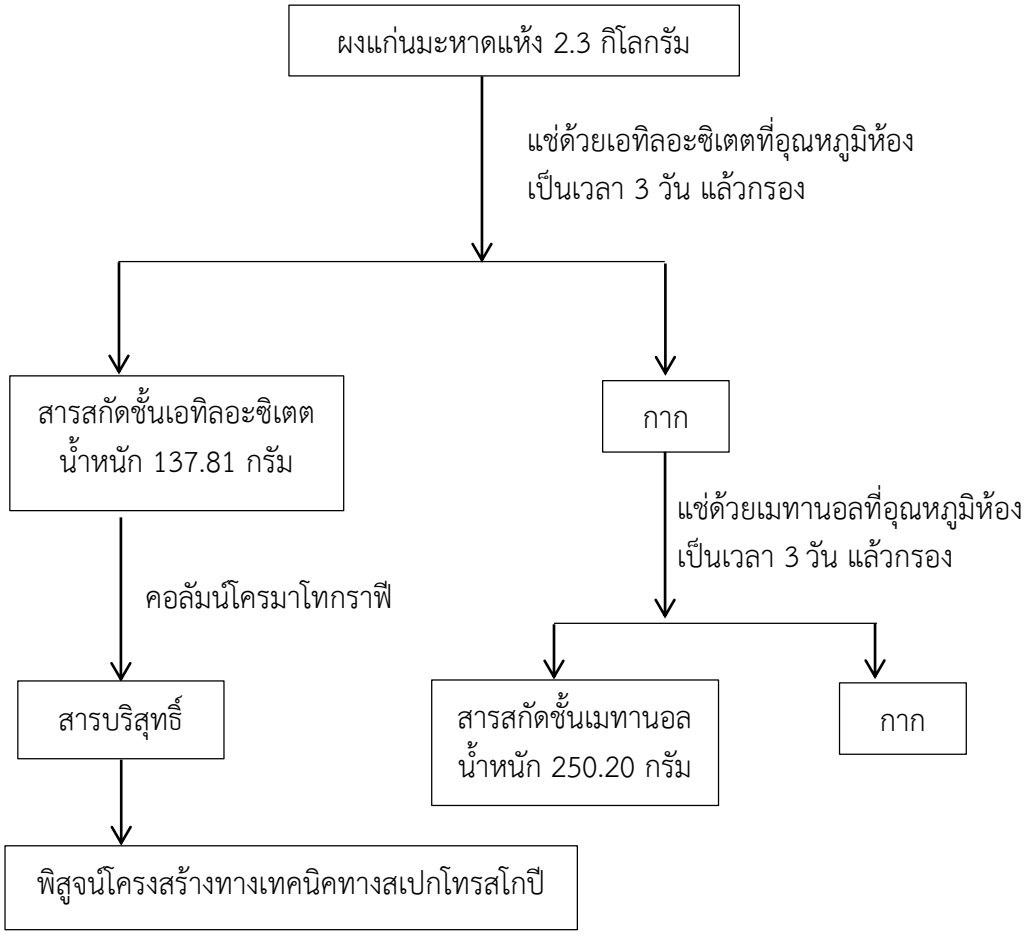
8. UHPLC-MS ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)

3.1 การสกัดสารจากแก่นมะหาด

ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 2.3 กิโลกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 10 ลิตร แล้วทำการแช่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 8 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

นำกากที่เหลือมาทำการแช่สกัดต่อด้วยเมทานอล ปริมาตร 8 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ ดังแสดงขั้นตอนวิธีการสกัดและการแยกสารจากแก่นมะหาดในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 วิธีการสกัดและการแยกสารจากแก่นมะหาด

3.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร

3.2.1 หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด

- แก่นมะหาดแห้งบดละเอียด นำมาทำการร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาดที่เท่ากัน
- ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอลในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 5:0, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1 และ 0:5 ปริมาตร 50 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัด นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสาร oxyresveratrol

3.2.2 หาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด

- ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 โดยใช้อัตราส่วนของพืชต่อสารสกัดในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัด นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสาร oxyresveratrol

3.2.3 ศึกษาผลการเขย่าและการใช้การสั่นสะเทือนต่อการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด

- ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 และอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัดในข้อ 3.2.2 นำมาทำการสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัด นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสาร oxyresveratrol

3.2.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด

- ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 และอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัดในข้อ 3.2.2 นำมาทำการสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัด นำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสาร oxyresveratrol

3.3 การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography)

3.3.1 แบ่งสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต (45 กรัม) แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว (Quick Column Chromatography) ขนาด 500 มิลลิลิตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร โดยบรรจุ silica gel ขนาดกลาง (Silica gel 60; 0.040-0.063 mm, Merck 109385) ใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ CH_2Cl_2 - acetone และ acetone - methanol (100:0) ทำการเพิ่มขั้วทีละ 10% ปริมาตรที่ใช้ระบบละ 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ครั้งละ 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-1) เก็บรวมสารเป็นกลุ่ม ๆ โดยนำมาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค (Thin-layer chromatography; TLC) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV; 254 และ 365 nm) developing reagent บนแผ่น TLC ด้วย *p*-anisaldehyde reagent นำไปให้ความร้อนที่ 80-120 ℃ นาน 5 นาทีจะปรากฏเป็นสีแตกต่างกัน และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน ได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม โดยแสดงแผนผังการแยกสารทั้งหมดดังภาพที่ 3.2

3.3.1.1 แบ่งสารกลุ่มที่ 4 มา 11.05 กรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวปนกับของแข็งสีน้ำตาล ที่ได้จากการชะด้วยระบบ acetone-CH_2Cl_2 (30:60) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าจะให้ดวงสารสีชมพูกับ *p*-anisaldehyde reagent เป็นดวงที่ใหญ่ที่สุด นำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 100 กรัม ได้ความสูง 15.5 เซนติเมตร เลือกใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ 100% CH_2Cl_2 ถึง 100% methanol การเพิ่มขั้วทีละ 0.5% เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-2) เก็บรวมสารเป็นกลุ่มๆ โดยนำมาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน ได้ทั้งหมด 12 กลุ่มสารย่อย

3.3.1.1.1 สารกลุ่มย่อยที่ 4.3 และ 4.4 มีน้ำหนักรวม 373.7 มิลลิกรัม เป็นของหนืดปนของแข็งสีน้ำตาล ได้จากการชะด้วยระบบ 1.5-4% methanol/CH_2Cl_2 นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วย silica gel จำนวน 17 กรัม ได้ความสูง 8.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane - 25% acetone/hexane ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 0.5% เติมระบบครั้งละ 100 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร พบของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (75.8 มิลลิกรัม) จึงนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร บรรจุด้วย silica gel จำนวน 5 กรัม ได้ความสูง 9.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane - 30% acetone ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 0.5% เติมระบบครั้งละ 100 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-3) ได้ **สารประกอบ B (sss6621) น้ำหนัก 4.9 มิลลิกรัม ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล**

3.3.1.1.2 กลุ่มย่อยที่ 4.5 และ 4.6 มีน้ำหนักรวม 3.1525 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลปนเหลือง ได้จากการชะที่ระบบ 4-6% methanol/CH_2Cl_2 แยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 35 กรัม ได้ความสูง 7 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane – 30% acetone/hexane ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 1% เติมระบบครั้งละ 250 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-4) ได้ **สารประกอบ A (sss6610) น้ำหนัก 516.9 มิลลิกรัม ของแข็งสีเหลือง**

3.3.1.1.3 กลุ่มย่อยที่ 4.7 น้ำหนัก 2.0251 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลอมเขียว ได้จากการชะที่ระบบ 6% methanol/CH_2Cl_2 นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 35 กรัม ได้ความสูง 9.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane – 50% acetone/hexane ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 1% เติมระบบครั้งละ 200 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-5) ได้**สารประกอบ A (sss6606, 6607) น้ำหนัก 1.0131 มิลลิกรัม ของแข็งสีเหลืองปนสีน้ำตาล**

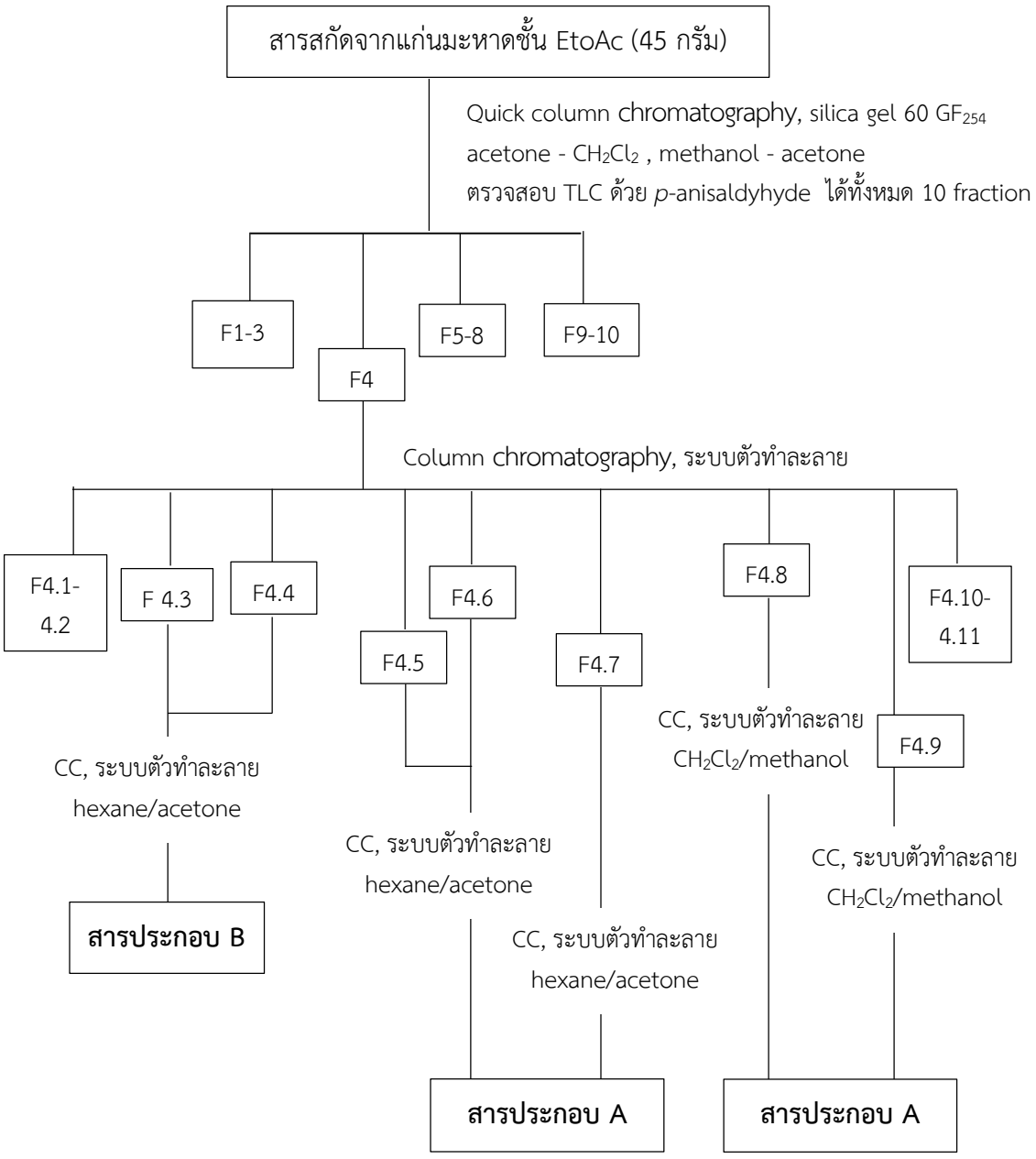
3.3.1.1.4 กลุ่มย่อยที่ 4.8 น้ำหนัก 3.1428 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลปนเทา ได้จากการชะที่ระบบ 7% methanol/CH_2Cl_2 นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร โดยบรรจุ silica gel (7729) จำนวน 50 กรัม ได้ความสูง 8.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH_2Cl_2 ถึง 10% methanol/CH_2Cl_2 ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 1% เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50-100 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-6) ได้**สารประกอบ A (sss6609,6608 และBY6038) น้ำหนัก 1.2199 มิลลิกรัม ของแข็งสีเหลืองและสีน้ำตาลอ่อน**

3.3.1.1.5 กลุ่มย่อยที่ 4.9 น้ำหนัก 539 มิลลิกรัม ของแข็งสีน้ำตาล ได้จากการชะที่ระบบ 7-9% methanol/CH_2Cl_2 นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH_2Cl_2 ถึง 5% methanol/CH_2Cl_2 ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 0.1 % เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-7) ได้**สารประกอบ A (sss6611) น้ำหนัก 8.7 มิลลิกรัม ของแข็งสีเหลืองอ่อน**

3.3.1.1.6 กลุ่มย่อยที่ 4.10 และ 4.11 มีน้ำหนักรวม 1.0291 กรัม เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม ที่ได้จากการชะที่ระบบ 10-30% methanol/CH_2Cl_2 นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 35 กรัม ได้ความสูง 9 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH_2Cl_2 - 50% methanol/CH_2Cl_2 ทำการเพิ่มความมีขั้วทีละ 1% เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50-100 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ก-8) และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน ได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม

3.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้น รายงานค่าจุดหลอมเหลว (mp) ในหน่วย องศาเซลเซียส (°C) แถบของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (IR) รายงานเป็น ν_{max} ในหน่วย reciprocal centimeter (cm^{-1}) แถบการดูดกลืนรังสียูวี-วิสซิเบิล (UV-visible) รายงานเป็น λ_{max} ในหน่วย nanometer (nm) และ log ε ในตัวทำละลาย methanol (นอกจากจะบ่งเป็นตัวทำละลายอื่น) ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR บันทึกโดยใช้เครื่อง NMR spectrometer ที่ 300 MHz และ 75 MHz ตามลำดับ ตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (CD_3SOCD_3), Deuterated chloroform ($CDCl_3$), Deuterated methanol (CD_3OD) (นอกจากจะบ่งเป็นตัวทำละลายชนิดอื่น) และรายงานในหน่วย δ ที่ downfield จาก TMS (Tetramethylsilene) ซึ่งใช้เป็น internal standard (δ 0.00)



ภาพที่ 3.2 แสดงแผนผังรวมการแยกสารจากสารสกัดแก่นมะหาดชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.5 วิเคราะห์หาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) freeradical scavenging assay

- การเตรียม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl หรือ DPPH ชั่ง DPPH 0.0237 กรัม นำมาละลายด้วย 80% ethanol แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

- นำตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer และนำมาคำนวณหาค่า % Radical scavenging activity เมื่อเทียบกับ trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_O - A_s)/A_O]\times 100$$

เมื่อ A_O คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตั้งต้น

A_s คือค่าการดูดกลืนแสงหลังจากการเติมสารตัวอย่าง

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2,2′-azinobis-[3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid]) assay

สารละลายของ ABTS (7 มิลลิโมลาร์) เป็นสารที่คงตัวแต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย potassium peroxide จะทำให้ ABTS เปลี่ยนไปเป็นอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ที่มีสีฟ้าเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระบบจะทำให้อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ เปลี่ยนกลับมาเป็น ABTS (6 นาที) ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง ศึกษาเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ โทลอกซ์ (trolox; 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในเมทานอล) สารสกัดเพื่อใช้ของสมุนไพร (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจากแก่นมะหาด

3.6.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาด

- ชั่งสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ปริมาณ 1 มิลลิกรัมละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทียบกับสารมาตรฐาน

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol

- ชั่งสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.2.1 – 3.2.4 และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นมะหาด 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ด้วยเทคนิค HPLC เทียบกับสารมาตรฐาน

- สภาวะที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol เทียบกับสารมาตรฐานด้วยเครื่อง UHPLC-MS รุ่น ultimate 3000 คือ

Column : HyPURITY C18 (150 x 3 mm, 3 μm)
Column oven : 30 °C
Flow rate : 0.6 mL / min
Detector : DAD 190 – 800 nm. (@ 280 nm.)
: MS (Positive polarity Full scan)
Injection Vol. : 2 μL
ระบบตัวชะที่ใช้ : แบบ gradient
mobile phase A = 0.1% formic acid ในน้ำ
mobile phase A = 0.1% formic acid ในเมทานอล
โดยใช้ระบบการแยกดังต่อไปนี้

Time (min)	Mobile phase B (%)
0	20
2	20
5	50
7	80
9	80
10	20

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

- ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง และแสดงค่าข้อมูลทางสถิติใหม่ในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ± SD