



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาองค์ประกอบเคมีในใบรางสิต (Thunbergia laurifolia Linn.) ใต้น้ำเอาใบแห้งที่บดละเอียดแล้วไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ ether, methanol และน้ำตามลำดับ แยกได้ส่วนที่สกัดจาก ether 3.9% จาก methanol 9.9% และจากน้ำ 9.3% แต่เมื่อสกัดใบแห้งโดยตรงด้วยน้ำจะได้อะโรมาที่สกัดจากน้ำ 17.28% ดำเนินการแยกสารและทำหับริลลูทริ แล้วศึกษาว่าเป็นสารชนิดใดจากสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

2.1 สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วย ether

เมื่อแยกสารที่สกัดจาก ether ด้วย quick column chromatography แล้วนั้น จาก fraction ที่ elute ด้วย hexane : ether (93:7 ถึง 90:10) ได้สาร (1) ซึ่งยังเป็นของผลสม (แสดงร่องจุดซ้อนกันเหลืองบน TLC) จึงนำเอาไปทำ column chromatography ซ้ำ ๆ กันถึง 16 ครั้ง แยกได้เป็นสาร (2), (3) และยังคงมีสาร (1) ซึ่งเป็นส่วนผลสมของสาร (2) และ (3) ที่ยังไม่แยกออกจากกันเหลืออยู่อีก TLC ของสาร (2) และ (3) มีลักษณะเป็นจุดเดี่ยว แต่จุดหลอมเหลวมีช่วงกว้าง ให้สีน้ำเงินแล้วเปลี่ยนเป็นสีม่วง กับ Liebermann Burchard reagent ส่วน IR spectra ของสารทั้งสองมี broad band ที่ประมาณ 3450 cm^{-1} เป็นของ OH stretching และมี medium peak ที่ช่วง $1000-650\text{ cm}^{-1}$ เป็นชนิด out of plane bending vibration ของ $=C-H$ แต่ MS ของสารทั้งสองมี M^+ ที่ m/e 414 และ 412 ปนกันอยู่ แสดงในรูปที่ 1 หน้า 44 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร (2) และ (3) เป็นพวก sterol ประเภทที่มี C 29 อะตอม

2.1.1 การหาสูตรโครงสร้างของสาร (2)

สาร (2) มี mp. $149-158^\circ\text{C}$ ซึ่งมีช่วงจุดหลอมเหลวกว้างมาก แสดงว่าเป็นสารไม่บริสุทธิ์ หรือมีสารปนกันอย่างน้อยสองสารขึ้นไป เมื่อเปรียบเทียบกับค่า R_F ของสาร (2) กับ authentic sterol ที่มี C 29 อะตอม คือ stigmasterol และ β -sitosterol มีค่า R_F 0.36 (hexane:ether 1:1) เท่ากันทั้งสามสารโดยเห็นเป็นจุดกลมสีม่วงน้ำเงิน

เมื่อพ่นด้วย 25% H_2SO_4 IR และ 1H NMR spectra ของสาร (2) เหมือนกันกับของ stigmasterol ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 12 หน้า 48,49 แต่ ^{13}C NMR ของสาร (2) ในรูปที่ 32 หน้า 56 แสดงค่า chemical shifts ของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 11.86-56.89 นับได้ 36 peaks ของ $C-OH$ ที่ δ 71.77 และคาร์บอนที่มีพันธะคู่ ที่ δ 121.64, 129.30, 138.25 และ 140.74 ซึ่งค่า chemical shifts ในช่วงนี้ identical กับของ stigmasterol เมื่อนำสาร (2) ไปทำ GLC แสดงในรูปที่ 21 หน้า 53 มีค่า retention time 25.39 และ 28.90 นาที ค่านี้ใกล้เคียงกันกับของ stigmasterol คือ 25.38 และ β -sitosterol คือ 28.88 นาที ตามรูปที่ 23,24 หน้า 53 ดังนั้นจึงคาดว่าสาร (2) เป็นของผสมของ stigmasterol และ β -sitosterol สารประกอบทั้งสองนี้มีโครงสร้างต่างกันที่ stigmasterol มี 2 พันธะคู่ ที่ C_5-C_6 และ $C_{22}-C_{23}$ แต่ β -sitosterol มี 1 พันธะคู่ที่ C_5-C_6 ค่า R_f 0.36 เท่ากัน IR spectra ในรูปที่ 9 และ 10 หน้า 43 ต่างกันที่ stigmasterol แสดง out of plane $=C-H$ bending ของคาร์บอนที่มีพันธะคู่เป็น doublet ที่ $969-980\text{ cm}^{-1}$ แต่ β -sitosterol แสดง singlet ที่ 969 cm^{-1} ในทำนองเดียวกัน 1H NMR spectra ของ stigmasterol ในรูปที่ 16 หน้า 51 แสดง chemical shifts ของ $-HC=CH-$ และ $>C=CH-$ เป็น multiplet ที่ δ 5.09 และ 5.35 ตามลำดับ β -sitosterol แสดงในรูปที่ 18 หน้า 52 มี chemical shifts ของ $>C=CH-$ เป็น multiplet เฉพาะที่ δ 5.35 ดังนั้นถ้ามีสารทั้งสองนี้ปนกันอยู่ 1H NMR spectra จึงเป็นเสมือนของ stigmasterol เพียงสารเดียว แต่ ^{13}C NMR ระหว่างสารทั้งสองนี้ในรูปที่ 29,30 หน้า 55 จะแสดง peaks ที่แตกต่างกันของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 11.86-56.85 โดย stigmasterol แสดง 24 peaks แต่ของ β -sitosterol แสดง 26 peaks และเมื่อสารทั้งสองนี้รวมกันนับได้ 36 peaks สำหรับ $C-OH$ จะแสดงที่ δ 71.77 เท่ากันทั้งสองสาร คาร์บอนที่มีพันธะคู่ของ stigmasterol แสดงที่ δ 121.64 (C_6), 129.25 (C_{23}), 138.25 (C_{22}), 140.72 (C_5)⁽¹⁴⁾ แต่คาร์บอนที่มีพันธะคู่ของ β -sitosterol แสดงค่าที่ δ 121.64 (C_6) และ 140.72 (C_5) ดังนั้นถ้ามีสารทั้งสองปนกันอยู่ ค่า chemical shifts จะแตกต่างกันที่ δ 11.96-56.85 เท่านั้น ส่วนที่อื่น ๆ นั้นค่า chemical shifts ของ stigmasterol กับ β -sitosterol ทับกันพอดี จากข้อมูลของ ^{13}C NMR spectra ของสาร (2) ในรูปที่ 32 หน้า 56 มี peaks identical กันกับ ^{13}C NMR spectra

ของของผลผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol ในรูปที่ 31 หน้า 56 ซึ่งชี้บ่งว่า สาร (2) น่าจะเป็นของผลผสมของ stigmasterol และ β -sitosterol

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้าง จึงนำสาร (2) ไปทำ hydrogenation ได้สาร (5) ถ้าสาร (2) เป็น sterols ที่คาดไว้จริง สาร (5) จะต้องเป็น stigmastanol ตาม scheme ที่ 1(a) จึงนำเอา spectra ของสาร (5) ไปเปรียบเทียบกับ stigmastanol ที่ได้จาก hydrogenation ของ stigmasterol หรือ β -sitosterol โดยตรง พบว่ามีค่า R_f 0.35 เท่ากัน 1H NMR ของสารทั้งสองคล้ายกัน แต่ ^{13}C NMR ของสาร (5) ในรูปที่ 4 หน้า 45 มี chemical shifts ของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 12.01-56.52 ระบุได้ 29 peaks ของ $C-OH$ ที่ δ 71.39 และ 71.81 (trace) ของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ (trace) ที่ δ 121.68 และ 124.79 ส่วน ^{13}C NMR ของ authentic stigmastanol ในรูปที่ 28 หน้า 54 มี chemical shifts ของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 12.01-56.54 ระบุได้ 28 peaks และ $C-OH$ ที่ δ 71.39 เท่านั้น ไม่มี peak ในช่วงของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ แสดงว่า สาร (5) ยังไม่บริสุทธิ์ จาก GLC ของสาร (5) รูปที่ 26 หน้า 54 มี retention time 29.22 และ 31.24 นาที (trace) ส่วน stigmastanol มี retention time 29.18 นาที ดังนั้น สาร (5) จึงเป็นของผลผสมของ stigmastanol กับ sterol อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อนทำ hydrogenation นั้น spectra ของ sterol (trace) อาจจะซ้อนทับกันกับของ stigmasterol และ β -sitosterol หมด และหลังจากที่ทำ hydrogenation แล้ว ข้อมูลทาง spectra ชี้บ่งว่า มี sterol อีกชนิดอยู่ด้วย แต่มีปริมาณน้อย จึงไม่สามารถหาโครงสร้างได้ แสดงว่า สาร (2) เป็นของผลผสมของ stigmasterol, β -sitosterol และ sterol อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีจำนวนน้อยมากปนอยู่ด้วย

2.1.2 การหาสูตรโครงสร้างของสาร (3)

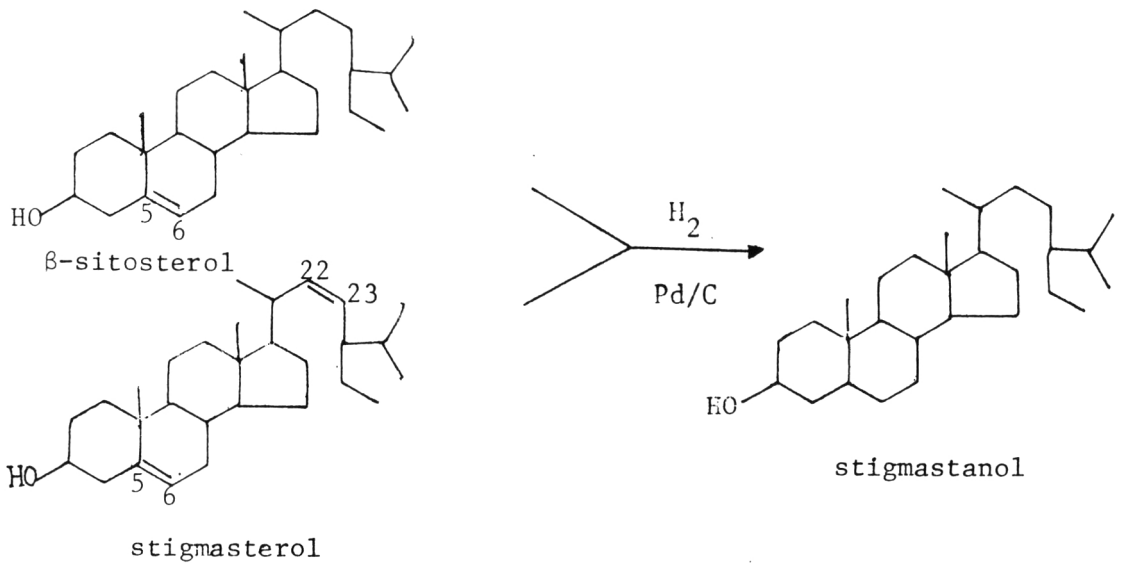
สาร (3) มี mp. 145-155°C แสดงว่ายังไม่บริสุทธิ์ในตัวเองเดียวกันกับสาร (2) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสาร (3) กับ authentic sterol ที่มี C 29 อะตอม โดยทำ TLC เห็นเป็นจุดกลมสีม่วงแดงเมื่อพ่นด้วย 25% H_2SO_4 มีค่า R_f 0.34 เท่ากันกับของ α -spinasterol ที่เป็น isomer ของ stigmasterol และในธรรมชาติมักพบว่ามี

Δ^7 -stigmastenol ปนอยู่ด้วย (15) IR spectra ของสาร (3) ต่างกันกับของ stigmasterol ในช่วงที่แสดง out of plane bending ของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ โดยสาร (3) มี medium singlet peak ที่ 1107 และ 980 cm^{-1} แต่ stigmasterol ไม่มี medium peak ที่ 1107 cm^{-1} และที่ 969-980 cm^{-1} เป็น doublet ดังแสดงในรูปที่ 34 หน้า 57 แสดงว่าสารทั้งคู่มีตำแหน่งของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ต่างกัน ^1H NMR ของสาร (3) ในรูปที่ 35 หน้า 58 แสดง broad peak ของ OH ที่ δ 3.62 และ multiplet ของ =CH- ที่ δ 5.16 ^{13}C NMR ของสาร (3) ในรูปที่ 38 หน้า 60 แสดง chemical shifts ของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 11.89-56.19 พบได้ 40 peaks ซึ่งบ่งให้เห็นว่าจะต้องเป็นของผลผลิตของ sterol อย่างน้อยสองสารขึ้นไป ค่า chemical shifts ของ $\text{C}-\text{OH}$ มี 1 peak ที่ δ 71.09 และ chemical shifts ในช่วงของคาร์บอนที่มีพันธะคู่บ่งว่ามี 2 พันธะคู่ ซึ่งจากการทำ off resonance แสดง doublet ของ =CH- ที่ δ 117.49, 129.52 และ 138.16 แสดง 1 singlet ของ =C< ที่ δ 139.57 และจาก GLC ของสาร (3) ในรูปที่ 22 หน้า 53 มี retention time 28.30 และ 32.12 นาที ใกล้เคียงกับค่า 28.22 นาที ซึ่งเป็นค่า retention time ของ α -spinasterol ในรูปที่ 25 หน้า 53 ส่วนอีกค่าหนึ่งคาดว่า เป็นของ Δ^7 -stigmastenol ที่มักจะปนกันอยู่ในธรรมชาติ Δ^7 -stigmastenol แตกต่างกับ α -spinasterol ที่ไม่มีคาร์บอนที่มีพันธะคู่ ที่ $\text{C}_{22}-\text{C}_{23}$ โครงสร้างส่วนอื่น ๆ จะเหมือนกัน ดังนั้นถ้ามีสารทั้งสองปนกันอยู่ IR, ^1H NMR และ ^{13}C NMR (เฉพาะช่วงที่แสดง chemical shifts ของ $\text{C}-\text{OH}$ และของคาร์บอนที่มีพันธะคู่) จะเป็นเสมือนของ α -spinasterol เพียงสารเดียว เว้นแต่จะปนกันกับกรณีที่มี stigmasterol และ β -sitosterol ที่กล่าวมาแล้ว

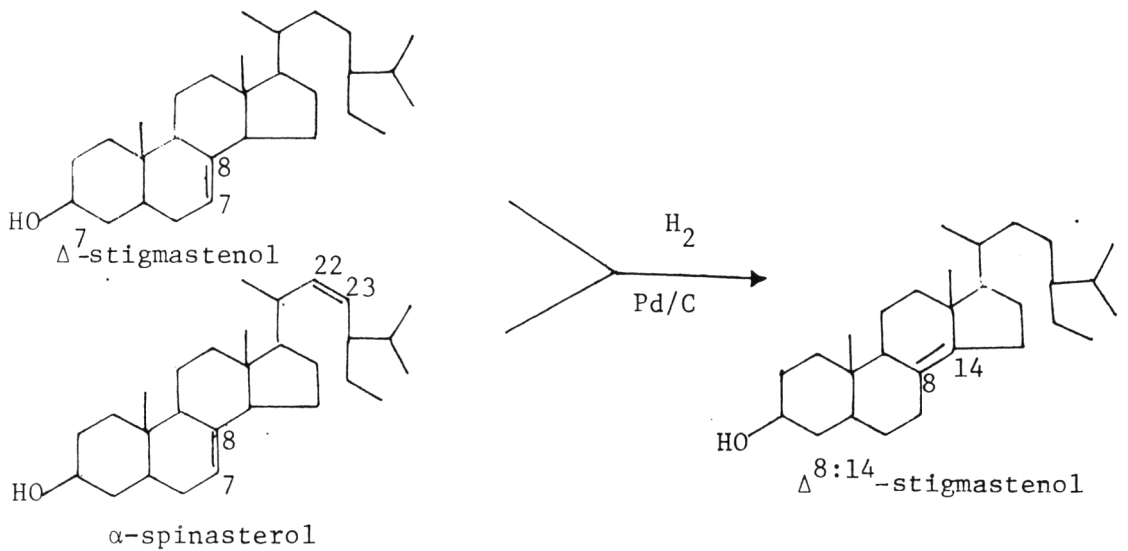
เพื่อยืนยันโครงสร้างของสาร (3) จึงนำไปทำ hydrogenation ได้เป็นสาร (6) ถ้าสาร (3) เป็น α -spinasterol ปนกับ Δ^7 -stigmastenol แล้ว สาร (6) จะต้องเป็น $\Delta^{8:14}$ -stigmastenol ดังแสดงใน scheme ที่ 1(b)⁽¹⁶⁾ จากการตรวจสอบด้วย TLC ปรากฏเห็นเป็น 2 จุด ที่ R_f 0.61 และ 0.35 จึงทำ PTLC แยกสารทั้งสองออกจากกัน ได้เป็นสาร (6A) R_f 0.61 และสาร (6B) R_f 0.35 เนื่องจากสาร (6A) มีปริมาณน้อย จึงได้เฉพาะข้อมูลของ ^1H NMR และ GLC เท่านั้น แสดงในรูปที่ 15 และ 43 หน้า 50 กับ 62 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ไม่พอที่จะวิเคราะห์ว่าเป็น sterol ชนิดใด ส่วนอีกสารหนึ่งแยกได้เป็นสาร (6B)

scheme 1 แสดง hydrogenation ของ sterols

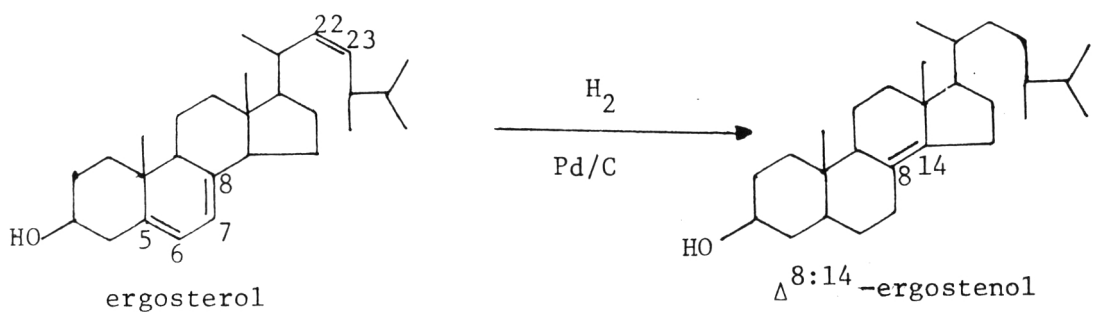
(a) hydrogenation ของ β -sitosterol และ stigmasterol



(b) hydrogenation ของ Δ^7 -stigmasterenol และ α -spinasterol



(c) hydrogenation ของ ergosterol



R_f 0.35 GLC มี retention time 29.80 นาที แสดงในรูปที่ 44 หน้า 62 ^1H NMR spectra ในรูปที่ 36 หน้า 58 ไม่แสดงค่า chemical shifts ของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ แต่แสดง chemical shifts ของ CH , CH_2 และ CH_3 ที่ δ 0.69-2.31 และ broad peak ของ OH ที่ δ 3.6, ^{13}C NMR ของสาร (6B) ในรูปที่ 39 หน้า 60 มี chemical shifts ของ C, CH, CH_2 และ CH_3 ที่ δ 12.01-56.90 นับได้ 26 peaks ของ C-OH ที่ δ 71.31 และในช่วงของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ แสดงว่ามีเพียง 1 พันธะคู่ จากการทำ off resonance พบว่าค่า chemical shifts ที่ δ 126.31 และ 142.66 เป็น singlet ทั้งคู่ ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็น tetrasubstituted ของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ ($=\text{C}<$) ถ้าสาร (6B) เป็น $\Delta^{8:14}$ -stigmastenol แล้ว คาร์บอนที่มีพันธะคู่จะต้องอยู่ที่ตำแหน่ง C_8 กับ C_{14} ข้อมูลที่ละสนับสนุนว่าค่า chemical shifts ที่ δ 126.31 และ 142.66 เป็นของ C_{14} กับ C_8 ตามลำดับนั้น ได้จากการทำ hydrogenation ของ ergosterol แสดงใน scheme ที่ 1 (c) ได้เป็น $\Delta^{8:14}$ -ergosterol ที่มี 1 พันธะคู่ ที่ตำแหน่ง C_{14} กับ C_8 ตรงกัน ซึ่งมี ^{13}C NMR spectra แสดงในรูปที่ 41 หน้า 61 มีค่า chemical shifts ที่ δ 126.31 (C_{14}) และ 142.66 (C_8) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าสาร (6B) เป็น $\Delta^{8:14}$ -stigmastenol จริง ดังนั้นสาร (3) เป็นของผลผสมของ α -spinasterol, Δ^7 -stigmasterol และ sterol ชนิดอื่นอีกอย่างน้อยหนึ่งชนิดที่มีปริมาณน้อยมากปนอยู่ด้วย

2.2 สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วย methanol

เมื่อนำเอาใบรางสีดที่สกัดด้วย ether แล้ว ไปสกัดต่อด้วย methanol ได้สารที่ละลายใน methanol (I) แล้วระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง นำสารแห้งนี้ไปละลายกับ n-butanol, methanol ที่อุณหภูมิห้อง, methanol ร้อน และน้ำ ระเหยไล่ตัวทำละลายออก ได้สารที่ละลายใน n-butanol 4.9%, methanol (II) 1.1%, methanol (III) 0.6% และน้ำ 0.4% ตามลำดับ ผลการศึกษาส่วนสกัดต่าง ๆ พอสรุปได้ดังนี้

2.2.1 สารที่ละลายใน n-butanol

ทดลองตกผลึกสารที่ละลายใน n-butanol ด้วย methanol โดยนำมาละลายกับ methanol กรองได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก จะได้ผลึกใสรูปเข็ม และ

รูปสี่เหลี่ยมแบนสำหรับเหี่ยวสีน้ำตาล ผลึกนี้มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 340°C ละลายน้ำได้ดี เมาแล้วยังมีสารเหลืออยู่ซึ่งละลายน้ำได้ และแสดงความแตกต่างกับกระดาษลิตมัท น้ำสารละลายน้ำของผลึกนี้ไปทดสอบหา cation และ anion พบ K^{+} และ Cl^{-} จึงคาดว่าเป็นผลึกของ KCl และอาจมีเกลืออนินทรีย์อื่นปนอยู่ด้วย

เพื่อหาทางตกผลึกสารโดยหลีกเลี่ยงการตกผลึกปนของเกลืออนินทรีย์ จึงนำเอาสารที่ละลายใน n-butanol ไปละลายกับ methanol* เมื่อระเหยเอา methanol* ออก และปล่อยให้แห้งไว้ให้ตกผลึก ก็ยังมีผลึกของเกลืออนินทรีย์ปนอยู่อีก อาจเนื่องจากความชื้นในอากาศ ทำให้ methanol* มีน้ำปนอยู่บ้าง จึงละลายเกลืออนินทรีย์ออกมาได้ เมื่อเปลี่ยนเป็นละลายสารที่ละลายใน n-butanol ด้วย chloroform*, methanol* และน้ำตามลำดับ เพื่อแยกสารที่มี polarity ต่าง ๆ ออกจากกัน ดังแสดงใน scheme ที่ 4 หน้า 32 แล้วปล่อยให้แห้งไว้ ไม่มีผลึกสารอินทรีย์ใด ๆ นอกจากสารเหี่ยวสีน้ำตาล และ/หรือ ผลึกของเกลืออนินทรีย์ที่กล่าวมาแล้ว เมื่อแบ่งส่วนที่ละลายใน chloroform* ไป hydrolyse และทำการแยกเอาส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ออกจากชั้นน้ำ ปล่อยให้แห้งไว้ให้ตกผลึก ได้สารเหี่ยวสีน้ำตาลเข้มไม่เป็นรูปผลึก

ได้ทำการแยกเอาเกลืออนินทรีย์ออกจากส่วนที่ละลายใน n-butanol โดยตรงก่อน โดยนำสารส่วนนี้ไปละลายในน้ำก่อน ทำส่วนที่ไม่ละลายน้ำให้แห้ง แล้วละลายด้วย chloroform* เมื่อระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารเหี่ยวสีน้ำตาลเข้มไม่เป็นรูปผลึก

เมื่อนำสารที่ละลายใน n-butanol ไป hydrolyse โดยตรง แล้วแยกเอาส่วนที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ออก แต่ก็ไม่สามารถแยกสารอินทรีย์ออกได้ เหมือนกับการ hydrolyse ส่วนที่ละลายใน chloroform* ดังได้กล่าวมาแล้ว

เมื่อใช้วิธีการตกผลึกและการ hydrolyse ไม่สามารถแยกสารอินทรีย์ออกมาได้ จึงนำสารที่ละลายใน n-butanol ไปแยกโดยวิธี quick column chromatography ใน fraction ที่ elute ด้วย chloroform:ethyl acetate (90:10) แยกได้สาร (1) จำนวนเล็กน้อย และใน fraction ที่ elute ด้วย ethyl acetate:methanol (40:60) และในตัวทำละลายที่มี polarity สูงกว่านี้ จะมีผลึกของเกลืออนินทรีย์ปนกับสารเหี่ยวสีน้ำตาล ส่วนใน fraction อื่น ๆ ได้สารเหี่ยวที่ไม่เป็นรูปผลึก

* หมายถึงการทำให้ปราศจากน้ำโดยแห้งไว้กับ sodium sulfate ที่ไร้น้ำ

2.2.2 สารที่ละลายใน methanol (II) และ (III)

นำเอาสารที่ละลายใน methanol (II) และ (III) มาทำการทดลองแบบเดียวกัน โดยนำสารสกัดทั้งสองนี้ไปละลายด้วย methanol* เมื่อระเหยตัวทำละลายออกให้ตกผลึก จะได้ผลึกของเกลืออนินทรีย์ เช่นเดียวกับในสารที่ละลายใน n-butanol และเมื่อนำเอาสารที่ละลายใน methanol (II) และ (III) ไป hydrolyse (เหมือนกับที่ได้กล่าวมาแล้ว) ได้ผลเช่นเดียวกันคือ ได้ผลึกของเกลืออนินทรีย์ และไม่สามรถตกผลึกสารอินทรีย์ออกมาได้

2.2.3 สารที่ละลายในน้ำ

ส่วนใหญ่เป็นพวกเกลืออนินทรีย์ และสารอินทรีย์บางชนิดที่ละลายได้ดีในน้ำ เมื่อนำสารสกัดในน้ำไปฟอกสีด้วย activated charcoal ได้สารละลายสีอ่อนลง และจากการทำให้ตกผลึก ได้แต่ผลึกเกลืออนินทรีย์

2.3 สารที่ได้จากการสกัดใบรางจืดด้วยน้ำ

จากการสกัดใบรางจืดแห้งด้วยน้ำโดยตรง จะได้สารที่สกัดด้วยน้ำ (I) และสกัดจากใบรางจืดแห้ง (ที่สกัดด้วย ether และ methanol แล้ว) ด้วยน้ำ จะได้สารที่สกัดจากน้ำ (II) แล้วจึงนำสารที่สกัดทั้งสองนี้ไปทำการแยกสารโดยวิธีต่าง ๆ พอสรุปได้ดังนี้

จากการทดสอบสารละลายที่สกัดจากน้ำ (I) ด้วยสารละลาย 5% $FeCl_3$ จะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวอ่อนๆ แสดงว่าอาจมีสารพวก phenol ปนอยู่ด้วย จึงนำเอาสารที่สกัดจากน้ำ (I) ไปทำ acetylation แยกได้ตะกอนสีน้ำตาล เมื่อนำตะกอนนี้ไปละลายกับตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น ether, ethyl acetate, chloroform และ methanol ปรากฏว่าละลายใน ethyl acetate ได้มากกว่าในตัวทำละลายอื่น จึงนำเอาส่วนที่ละลายใน ethyl acetate ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกพองวด เติม ether จะได้ตะกอนขุ่น กรองได้ตะกอนละเอียดสีน้ำตาล นำตะกอนนี้ไปตกผลึกใหม่ใน ethyl acetate ปน ether จะได้สารเหนียวสีน้ำตาล ติดกระดาษกรอง ไม่เป็นผลึก

เนื่องจากสารที่สกัดจากน้ำจะมีเกลืออนินทรีย์ปนอยู่ จึงนำเอาสารที่สกัดจากน้ำ (I) ไปละลายน้ำ แล้ววิเคราะห์หา cation และ anion โดยใช้ chemical reagent

ดังแสดงในตารางที่ 6 หน้า 37 ผลการทดลองที่ชัดเจนที่สุดคือ K^+ และ Cl^- นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หากรดอะมิโน พบว่า R_f และสีใกล้เคียงกับกรดอะมิโนทั้งสี่คือ histidine, glycine, serine และ methionine

เมื่อนำสารสกัดจากน้ำ (I) ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลโดยตรง พบว่า R_f และสีใกล้เคียงกับ glucose ส่วนน้ำตาลอื่นมีปริมาณน้อยเห็นไม่ชัด ได้แยกเอา เกสออินทรีย์และกรดอะมิโนออกจากสารสกัดจากน้ำ (I) โดยนำไปผ่าน cation และ anion resins เมื่อระเหยไล่ น้ำออกจากสารละลายที่ได้จากการผ่าน resins ทั้งสองจนแห้ง จะได้เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลไม่เป็นรูปผลึก นำไปทดสอบน้ำตาลอีกครั้งหนึ่ง จะเห็นจุดของน้ำตาลบน PC 5 จุดชัดเจน พบว่า R_f และสีใกล้เคียงกับ glucose, arabinose, galactose, xylose และ rhamnose

เมื่อนำเอาสารละลายที่สกัดใบรางจืดแห้งโดยตรงด้วยน้ำไปแยก tannin ออกแล้วแบ่งสารละลายไปวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ โดยใช้ AAS พบว่ามี K^+ 17.04%, Mg^{++} 0.26%, Na^+ $5.2 \times 10^{-3}\%$, Ca^{++} $4.1 \times 10^{-3}\%$, Mn^{++} $6.3 \times 10^{-4}\%$ และ Zn^{++} $6.8 \times 10^{-5}\%$

เมื่อนำสารละลายที่แยก tannin ส่วนที่เหลือไประเหยไล่ น้ำออกจนแห้ง นำไปตกผลึกในตัวทำละลายต่าง ๆ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ได้สารเหนียวสีเหลืองไม่เป็นรูปผลึก

ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำเอาสารที่สกัดจากน้ำ (II) ที่ได้จากการสกัดกากใบรางจืดด้วยน้ำไปแยกออกเป็นส่วน ๆ โดยละลายกับตัวทำละลายต่าง ๆ ดังแสดงใน scheme ที่ 5 หน้า 42 ในส่วนที่ละลายใน ether และ acetone จะได้สารสีขุ่นแข็งเปราะสีน้ำตาล ไม่เป็นรูปผลึก และในส่วนสารละลายที่มีน้ำปน ก็จะมีผลึกของเกสออินทรีย์ปนอยู่ด้วย

แม้ว่าจะสกัดใบรางจืดด้วยน้ำโดยตรง หรือสกัดจากกากใบก็ตาม ผลการทดลองก็คล้ายกันคือ ได้สารที่ไม่เป็นรูปผลึกกับผลึกของ เกสออินทรีย์