

ESTUDIO QUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Remijia peruviana* "Cascarilla"

Gabriel Vargas Arana,^{*,1} Lastenia Ruiz Mesía,² Wilfredo Ruiz Mesía² y Matías Reina³

¹Universidad Científica del Perú, Avda. Abelardo Quiñones Km 2.5, Iquitos, Perú.

²Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

³Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC, Avda. Astrofísico Francisco Sánchez 3, 38206, La Laguna, Tenerife, España.

e-mail: gvargas@ucp.edu.pe

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios y la cuantificación e identificación de los alcaloides presentes en la corteza de *Remijia peruviana*, la cual forma parte de la familia **Rubiaceae**, caracterizada por sintetizar mayoritariamente alcaloides. Se ha aislado y determinado la estructura química de cinco alcaloides quinolínicos: tres nuevos derivados, Quinina acetato (**1**), Quinina alcohol (**2**) y N-Etil Quinina (**3**); y dos reportados anteriormente en la literatura: Quinina (**4**) y Cinchonina (**5**). La estructura de los nuevos alcaloides fueron elucidados por análisis básicos de espectroscopía RMN, incluyendo correlaciones homonuclear y heteronuclear (COSY, NOESY, HMBC y HSQC).

Palabras claves: Rubiaceae, Remijia, Quinina, Alcaloides, Malaria.

CHEMICAL STUDY ON THE BARK OF *Remijia peruviana* "Cascarilla"

ABSTRACT

This study conducted the qualitative analysis of secondary metabolites and the quantification and identification of alkaloids in the bark of *Remijia peruviana*, whose species is part of the family **Rubiaceae** and is characterized by predominantly synthesizing alkaloids. We have isolated and determined the chemical structure of five quinoline alkaloids: three new derivatives, Quinine acetate (**1**), Quinine alcohol (**2**) and N-Ethyl Quinine (**3**) and two previously reported in the literature, Quinine (**4**) and Cinchonine (**5**). The structures of the new alkaloids were elucidated on the basis of spectroscopic analysis, including homonuclear and heteronuclear correlation NMR experiments (COSY, NOESY, HMBC and HSQC).

Keywords: Rubiaceae, Remijia, Quinine, Alkaloids, Malaria.

INTRODUCCIÓN

El estudio de plantas medicinales se ha incrementado últimamente en el Perú y en la región Loreto, debido a la gran biodiversidad existente y porque las plantas desde tiempos muy remotos han constituido para el hombre un recurso natural para el tratamiento de sus enfermedades.

Una de estas enfermedades es la malaria, la cual ha tenido un mayor impacto en la historia universal que cualquier otra enfermedad infecciosa.¹ Afecta cerca del 40% de la población mundial, causando entre 1 y 2 millones de muertes cada año.² En una campaña internacional a finales del siglo 20, para el control y la eliminación de la malaria, se señaló que el índice de infección continúa incrementándose en un ritmo significativo.³ Un factor principal que contribuye a este aumento es la extensión cada vez mayor de la resistencia a los drogas antimaláricas usadas como estándares.⁴

El tratamiento de la malaria ha cambiado en las últimas dos décadas en respuesta a la disminución de la sensibilidad a las drogas por el *Plasmodium falciparum* y al resurgimiento de esta enfermedad en áreas tropicales.

En la actualidad muchas de las drogas antimaláricas que se utilizan son compuestos derivados de la Quinina, como por ejemplo la Cloroquina y Mefloquina. Por lo general la Cloroquina es bien tolerada, aunque comúnmente produzca prurito en pacientes de piel morena y en el tratamiento de Malaria aguda puede causar náuseas, disforia y muy raramente un síndrome neuropsiquiátrico transitorio o una disfunción cerebelosa.⁵

Por lo tanto, con el problema de la resistencia por un lado y efectos secundarios múltiples por el otro, llega a ser inevitable la búsqueda de una droga alternativa que cure la enfermedad mortal.

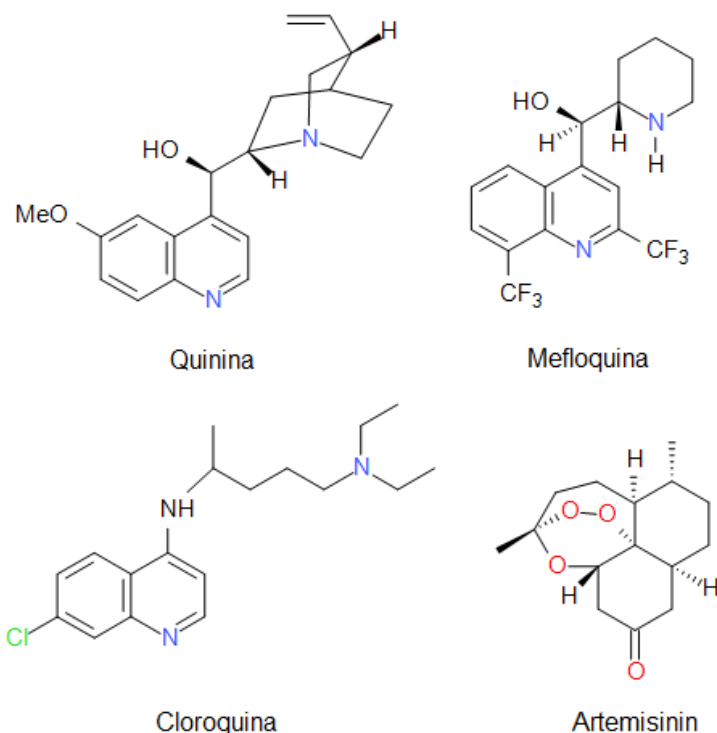


Figura 1. Estructura de algunos compuestos naturales antimaláricos.

La familia Rubiaceae es rica en constituyentes químicos de actividad potencial biodinámica, incluyen varios tipos de alcaloides, triterpenos, esteroides, antraquinonas, derivados naftalenos, polifenoles, taninos y es también conocida como una de las mayores fuentes del alcaloide tipo emetina. Algunas especies del género *Remijia* son fuentes del alcaloides tipo Quinina y Cinchona.⁶

La hoja y la corteza de las especies de *Remijia* es utilizada por el poblador amazónico, para el tratamiento de los síntomas relacionados con la malaria. Se espera entonces que la especie *Remijia peruviana* presente buenos resultados que pueden tener interés químico y farmacológico.

El presente artículo describe el aislamiento y determinación estructural de 5 alcaloides quinolínicos de la corteza de *Remijia peruviana*: Cinchonina, Quinina y 3 nuevos alcaloides: Quinina alcohol, Quinina acetato y el N-Etil Quinina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el presente trabajo *Remijia peruviana* (corteza) fue recolectada en el ARBORETUM CIEFOR (Puerto Almendras) en noviembre de 1998, de árboles adultos en época de floración. La muestra fue identificada por un botánico y una exicata está depositada en el Herbarium AMAZ de la UNAP codificada con el número 5402, J Ruiz.

Análisis cualitativo

A 55 g de la corteza seca y molida se le realizaron extracciones en caliente (soxhlet) de donde se obtuvo tres extractos: Hexánico, Clorofórmico y Etanólico, a los cuales se les realizó una marcha fitoquímica.⁷

Aislamiento e identificación de alcaloides

La corteza seca y molida (1.55 Kg.) fue macerada en una solución de ácido cítrico al 5% (pH = 2) durante 48 horas a temperatura ambiente; el extracto acuoso ácido fue extraído tres veces con CH₂Cl₂ (150 mL), para dar la fracción A (65 mg). La fase acuosa ácida fue ajustada a pH = 10, con una solución concentrada de NaOH y extraída con CH₂Cl₂ (150 mL x 3) para dar la fracción B (2.15 g).

Fraccionamiento cromatográfico

Se decidió estudiar sólo la fracción B, debido a que se obtuvo muy poca cantidad de la fracción A.

La fracción B (2.15 g) se cromatografió sobre alúmina 90, actividad II y III, se eluyó con mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol de polaridad creciente, donde se obtuvo 143 fracciones, el análisis cromatográfico de Capa Fina permitió hacer las agrupaciones que se indican: (37-40), (41-50), (49-50), (51-69), (70-76), (77-78), (89-101), (138-143).

La fracción 77-78 (182 mg) se cromatografió repetidas veces utilizando como fase estacionaria óxido de aluminio, actividad II y III y como fase móvil mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol en polaridad creciente, lográndose aislar el alcaloide Quinina Acetato (**1**) (14.5 mg).

La fracción 41-48 (32.6 mg) se cromatografió repetidas veces sobre óxido de silicio y óxido de aluminio, no lográndose aislar los alcaloides de la mezcla por lo que se decidió sembrar en placa de óxido de silicio a escala preparativa y se eluyó con ciclo-hexano y dietil amina (70:30), observándose en el U.V. cuatro compuestos, dos de ellos mayoritarios 41-48 PTLC-1 (4.8 mg) y el 41-48 PTLC-4 (6 mg); después de separar los compuestos se purificaron sobre sílica gel utilizando como eluyente la mezcla acetato de etilo-metanol (70:30) de donde se obtuvo la Cinchonina (**5**) (10 mg) y la N-Etil Quinina (**3**) (5.2 mg).

La fracción 70-76 (185.6 mg) se cromatografió sobre óxido de aluminio actividad II y III y se eluyó con mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol de polaridad creciente, obteniéndose las fracciones C₁ y C₂.

La fracción C₁ (98.35 mg) se sembró en 3 placas de sílica gel a nivel preparativo y se eluyó 2 veces con mezclas de ciclo-hexano-dietil amina (70:30), observándose en U.V. dos compuestos, después de separarlos, se purificó sobre sílica gel utilizando como eluyente acetato de etilo – metanol (70:30) y se obtuvo el alcaloide Quinina Alcohol (**2**) (22,6 mg).

La fracción 49-50 (35 mg), mezcla de 3 compuestos, se cromatografió en columna de fase reversa Lobar de la casa MERCK, utilizando como fase estacionaria Lichroprep R—18 y como fase móvil aceto nitrilo-metanol (1:1)-. El análisis en cromatografía en capa fina de óxido de silicio nos permitió agrupar varias fracciones en una sola (D₁) que luego fue sembrada en cromatografía preparativa de óxido de silicio y se eluyó en mezclas de ciclo-hexano y dietil amina (70:30), lográndose purificar el alcaloide Quinina (**4**) (5.2 mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cualitativo

Los resultados de la marcha fitoquímica realizada a los tres extractos obtenidos de la corteza se muestran en la Tabla 1, donde se puede apreciar la alta presencia de alcaloides en la corteza.

Tabla 1.
Marcha fitoquímica de la corteza de *Remijia peruviana*

Test	Extractos		
	Hx	CHCl ₃	EtOH
Taninos	--	+	+
Fenoles	--	--	--
Flavonoides	--	+-	++
Esteroides	+	--	--
Triterpenos	--	--	--
Saponina	--	+	+
Quinonas	+-	--	--
Alcaloides	--	+	++

Leyenda: (++) alta presencia, (+) presencia, (+-) dudosa presencia (--) no presencia.

Aislamiento e identificación de alcaloides

Los datos de RMN ¹H para los alcaloides **1 – 3** y RMN ¹³C para **1-5** se muestran en la tabla 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2.Datos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de los alcaloides **1** – **3**, δ^a (multiplicidad, J en Hz).

Posición	1	2	3
H-2'	8.85 (d, 4.54)	8.52 (d, 3.64)	8.72 (d, 4.41)
H-3'	7.57 (d, 4.57)	7.51 (d, 3.93)	7.67 (d, 4.4)
H-5'	7.13 (d, 2.55)	7.37 (s)	7.04 (brs)
H-7'	7.27 (d, 9.1, 2.5)	7.16 (d, 8.97)	7.21 (d, 9.1)
H-8'	7.88 (d, 9.1)	7.80 (d, 8.96)	7.99 (d, 8.9)
H-8	3.36 (t, 8.6)	3.20 (t, 8.48)	3.28 (m) ^b
H-9	5.83 (s)	6.00 (s)	6.33 (brs, 8.9)
H-10	5.53 (m)	5.46 (m)	6.03 (m)
H-11A	4.98 (d, 17.2)	4.85 (d, 16.9)	5.22 (d, 15.75)
H-11B	4.94 (d, 10.4)	4.84 (d, 10.4)	5.21 (d, 11.57)
H-2 trans	3.27 (dd, 10.52, 13.32)	2.99 (t, 10.48)	4.26 (t, 10.1)
H-2 cis	3.11 (dt, 13.41, 2.76, 3.11)	2.73 (d, 11.5)	3.28 (m) ^b
H-3	2.57 (brs, 10.8)	2.34 (Sa)	2.52 (m)
H-4	1.19 (m)	1.86 (s)	1.94 (brs)
H-5 endo	2.02 (m)	1.98 (m)	1.84 (t, 12.5)
H-5 exo	1.74 (m)	1.57 (Sa)	1.67 (m)
H-6 endo	4.16 (m)	4.10 (m)	3.28 (m) ^b
H-6 exo	3.00 (m)	2.80 (m)	3.08 (m)
H-7 endo	1.19 (m)	1.98 (m)	2.32 (t, 2
H-7 exo	1.22 (m)	1.27 (m)	0.95 (m)
OAC	1.96 (s)		
OMe			3.81 (s)
N-C ₂ H ₅			1.28 (t, 5.76)
			2.00 (s)

^a Desplazamiento químico en ppm.^b Señal obliterada.

El nuevo alcaloide Quinina Acetato (**1**) fue obtenido como un prisma cristalino de punto de fusión 198-200 °C, cristaliza en hexano-acetato de etilo, $[\alpha]^{25}_D -116.6^\circ$ (c 0.32, EtOH). Su espectro de U.V. mostró absorciones a 206, 232 y 286 nm, valores característicos para anillos aromáticos y heteroátomos conjugados con insaturaciones.

El espectro de ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) muestra señales características comprendidas entre 7.12 y 8.55 ppm para anillos aromáticos quinolínicos, así tenemos un doblete a 8.55 ppm que dio una correlación a tres enlaces con el C-9 y el C-4' en el experimento de HMBC, por lo que esta señal se asignó al C-2'.

Tabla 3.
 Datos de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) para los alcaloides **1-5**.

Posición	1	2	3	4	5
C-2'	146.2 d	146.3 d	147.4 d	147.2 d	149.9 d
C-3'	118.4 d	118.9 d	118.8 d	118.5 d	118.6 d
C-4'	144.7 s	144.3 s	144.5 s	145.9 s	145.8 s
C-5'	102.8 d	103.6 d	100.2 d	100.5 d	122.3 d
C-6'	156.4 s	156.6 s	158.1 s	158.2 s	127.0 d
C-7'	122.5 d	121.7 d	121.7 d	122.0 d	128.9 d
C-8'	131.0 d	130.4 d	131.6 d	131.3 d	129.9 d
C-9'	142.7 s	142.8 s	143.9 s	143.9 s	147.7 s
C-10'	125.9 s	125.8 s	125.5 s	125.9 s	124.2 s
C-8	59.3 d	60.1 d	59.8 d	59.8 d	60.4 d
C-9	66.8 d	67.3 d	66.8 d	68.2 d	66.8 d
C-10	137.8 d	137.7 d	136.8 d	139.2 d	136.6 d
C-11	116.6 t	115.8 t	117.1 t	115.1 t	117.4 t
C-2	54.2 t	54.2 t	49.0 t	55.5 t	48.6 t
C-3	37.4 d	37.1 d	37.8 d	38.3 d	37.7 d
C-4	26.3 d	26.8 d	27.7 d	27.3 d	27.6 d
C-5	24.5 t	23.8 t	23.8 t	25.7 t	23.6 t
C-6	43.6 t	44.0 t	48.9 t	43.4 t	49.2 t
C-7	18.6 t	18.2 t	18.4 t	19.3 t	18.2 t
OAc	179.6 s				
	23.4 c				

Los carbonos singletes a 142.7 y 125.9 ppm se asignaron a los carbonos C-9' y C-10' respectivamente por sus conectividades a tres enlaces en el experimento HMBC con el C-2' y el C-8'.

La señal a δ 7.57d que correlacionó a un enlace con el carbono doblete a 118.4 ppm, en el experimento HSQC y a tres enlaces con el C-10' en el experimento HMBC se asignó al C-3'.

Las señales a δ 7.27dd y 7.88d por su posición multiplicidad y su conectividad a tres enlaces en el experimento HMBC con los C-5', C-9', C-6' y C-10', se asignó a los C-7' y C-8' respectivamente.

En el anillo quinuclidínico las asignaciones se hicieron teniendo en cuenta la multiplicidad y la posición de las señales.

En el espectro de ^1H y ^{13}C RMN se observó la presencia de un doble enlace metilénico terminal a δ 3.27dd y 3.11dt que en el experimento HSQC conectaron con la señal a 54.2t y en el experimento HMBC conectaron a tres enlaces con las señales a δ 137.8d, 59.3d y con la señal 43.6t, por lo tanto se les asignó al H-2 y C-2 respectivamente, la estereoquímica de la señal δ 3.27dd quedó definida como H-2trans por la fuerte conectividad espacial en el experimento NOESY con el H-6exo, por lo tanto, la señal a δ 3.11dt se asignó la configuración H-2cis, asimismo estas dos señales mostraron una correlación escalar en el experimento COSY con el H-3.

La señal a δ 3.36t que en el experimento HSQC conecta con la señal a 59.3d y en el experimento HMBC mostró conectividades con los carbonos C-2, C-4' y con el C-6', se asignó al H-8 y C-8 respectivamente. La estereoquímica de esta señal como H-8exo quedó definida por su correlación espacial en el experimento NOESY con los protones H-7exo, H-2cis, H-9 y H-5'.

Las demás señales fueron asignados por comparación con los datos espectroscópicos del alcaloide Quinina⁸ y teniendo en cuenta la multiplicidad de las señales y desplazamientos químicos, las correlaciones escalares y espaciales que mostraron las señales en los experimentos HSQC, COSY, MHBC y NOESY.

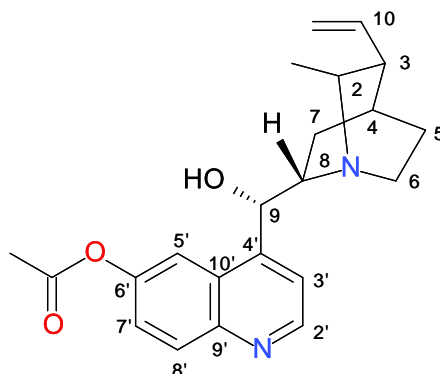


Figura 2. Estructura del Quinina Acetato (**1**) aislado.

Quinina Alcohol (**2**), alcaloide cristalino, con punto de fusión 195-197°C, cristaliza en MeOH, $[\alpha]_D^{25} -168^\circ$ (*c* 0.62, EtOH). Su espectro de U.V. mostró absorciones a 208.4, 283.6, 233 nm correspondiente para anillos aromáticos sustituidos y heteroátomos conjugados con insaturaciones.

El espectro de masa presenta un ion molecular a m/z 310 (13%) y los fraccionamientos que se indican en la Figura 3.⁹

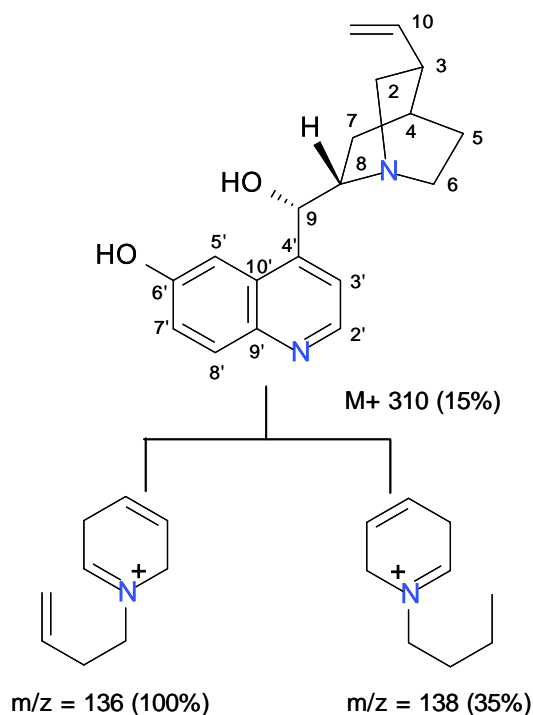


Figura 3. Fraccionamiento del espectro de masa del Alcaloide Quinina Alcohol (**2**).

En el espectro de RMN ^1H y ^{13}C se observa señales características para grupos aromáticos quinolínicos, así tenemos que la señal a δ 8.52d (1H, $J=3.6\text{Hz}$) y 146.2d que en el experimento HMBC conectó a tres enlaces con el C-4' se asignaron al H-2' y C-2' respectivamente; las señales a δ 7.51d (1H, $J=3.93\text{Hz}$) que en el experimento HSQC conectó con la señal a 117.8d y que correlaciona a tres enlaces con el C-10' en el experimento HMBC se asignó al H-3' y C-3'; las demás señales en el anillo quinolínicó se asignaron teniendo en cuenta las correlaciones de los ^1H y ^{13}C existentes en los experimentos HSQC y HMBC.

El protón H-9 fue asignado teniendo en cuenta la correlación en el experimento COSY con el H-8 y las correlaciones espaciales en el experimento NOESY con los protones H-8 y H-5'.

Las señales a δ 1.98 y 1.27 nm que conectaron en el HSQC con la señal a 18.7t y que correlacionaron en el experimento NOESY con los protones H-8 y H-10 se asignaron al H-7endo y H-7exo, respectivamente.

El H-3 fue asignado teniendo en cuenta la correlación espacial con el H-10 y con el H-5exo en el experimento NOESY y por su conectividad en el experimento HMBC con el C-4 y el C-10.

Las demás señales en el anillo quinuclidínico se asignaron por las correlaciones existentes de ^1H y ^{13}C en los experimentos HSQC y HMBC y por comparación con los datos espectroscópicos de alcaloides relacionados como la Quinina Acetato y la Quinina.¹⁰

La N-Etil Quinina (**3**), alcaloide amorfo, que no se pudo cristalizar, $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +128^\circ$ (c 0.13, EtOH). Su espectro de U.V. mostró absorciones de anillo aromático sustituido a 206 nm y 279 nm y heteroátomos conjugados con insaturaciones a 230 nm.

En el espectro de I.R. se observan bandas características a 3224.9 cm^{-1} de grupos hidroxilos, 1620.8 cm^{-1} y 863 cm^{-1} para doble enlace metilénico, 1472.3 cm^{-1} , 1135.1 cm^{-1} , 832.4 cm^{-1} para grupos aromáticos, 1241.7 cm^{-1} y 1028.2 cm^{-1} para metoxilo aromático y 1104.2 cm^{-1} para enlace C-O.

La similitud de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C con los publicados para Quinina, Quinidina, Dihidroquinina y epiquinina¹⁰ nos permitió identificar a nuestra muestra como un alcaloide quinolírico.

En los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se observaron señales a δ 2.92 (2H, q) 42.17t, H-12 y C-12 respectivamente, 1.29 ppm (3H, t, $J=7.1\text{Hz}$) H-13 y C-13 y 3.81 (3H, S) 55.89q para un grupo metoxilo.

Las señales a δ 8.72 (1H, d), 7.99 (1H, d), 7.67 (1H, d), 7.21 (1H, d) y 7.04 (1H, brs) se pueden asignar por su posición, constantes de acoplamiento y multiplicidad de las señales a los protones H-2', H-8', H-3', H-7' y H-5' respectivamente para este tipo de alcaloides.

En la RMN ^{13}C , el triplete a 117.2 ppm se puede asignar al C-11 señal que corresponde a un doble enlace terminal, el doblete a 66.8 ppm se asignó al C-9' por su desplazamiento químico corresponde a un carbono sustituido por un grupo hidroxilo secundario.

Las asignaciones en el anillo quinuclidínico se hizo teniendo en cuenta los desplazamientos químicos y las correlaciones escalares y espaciales existentes entre los protones, así tenemos que la estereoquímica del H-8 quedó definida como exo, por el fuerte acoplamiento espacial existente con los protones H-2cis, H-5' en el experimento Noesy.

El protón designado como H-3 se designó por su posición y multiplicidad en la RMN ^1H y ^{13}C y su correlación escalar con el H-10 en el experimento COSY y el protón H-6exo en el experimento NOESY.

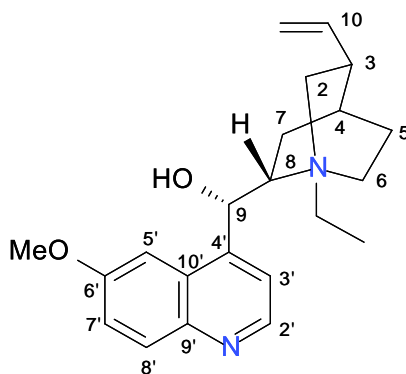


Figura 4. Estructura del N-Etil Quinina aislado.

El nombre y la estructura de los alcaloides conocidos se determinaron por comparación de los datos físicos y espectroscópicos, como punto de fusión, actividad óptica, I.R., E.M., RMN ^1H y ^{13}C , con los publicados.

El alcaloide Quinina (**4**) descrito en la bibliografía, ¹⁰ cristalizado en mezcla de metanol-acetato de etilo, punto de fusión 177-179 °C, con un $[\alpha]^{25}_D$ -158.7° (*c* 0.85, EtOH).

Alcaloide Cinchonina (**5**), descrito en la bibliografía, ⁹ cristaliza en metanol-acetato de etilo, punto de fusión 256-257 °C y $[\alpha]^{25}_D$ +230° (*c* 0.64, EtOH).

Quimiotaxonomicamente *Remijia peruviana* está relacionada con las Cinchonas, por la similitud de los compuestos presentes en las especies de donde también se aislaron alcaloides Indólicos y Quinolínicos (Cinchonina, quinina, quinidina, quinamina, conquinamina, etc.)

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Biodiversidad (PBIO), del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), por el financiamiento para la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS

- (1) Lynne, S. Garcia (2010). Malaria. Clinics in Laboratory Medicine, 30 (1), 93 – 129.
- (2) Trigg, P. I.; Kondrachine, A. V. (1999). In Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection; Sherman, I. W., Ed.; American Society for Microbiology (pp. 11-22). Washington, D. C. Press.
- (3) Lissouba, P.; del Cid, E.; Adhyatma, M.; Moosa, A. B. M. B.; Lini, H. (1993). A Global Strategy for Malaria Control. World Health Organization: Geneva.
- (4) Milhous, W.; Kyle, D. E. (1999). In Malaria: Parasite biology, Pathogenesis, and Protection; Sherman, I. W., Ed.; American Society for Microbiology (pp. 303-316). Washington, D. C. Press.
- (5) White, N. J. (1996). The Treatment of Malaria. The New England Journal of Medicine, (335), 800-806.
- (6) Geoffrey A. Cordell. (1981). Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach. University of Illinois.
- (7) Eduardo G. Cordell. (1981). Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Primera Edición, Copyright, Washington, 146 p.
- (8) Jeffrey I. Seeman (2007). The Woodward–Doering/Rabe–Kindler Total Synthesis of Quinine: Setting the Record Straight. Angew. Chem. Int. Ed. 46, 1378–1413.
- (9) Tibor Bartok; György Szöllösi; Károly Felföldi; Mihály Bartók and Jacek Thiel (2000). New results on the mass spectra of cinchona alkaloids. Journal of Mass Spectrometry. 35, 711–717.
- (10) Prakash, O. M.; Raja Roy; Singh, I. P.; Ram Pratap; Popli S.P.; D. S. Bhakuni (1988). Steric Influence on High Resolution ¹H RMN Spectra of Cinchona Alkaloids. Indian Journal of Chemistry, 27B, 950-952.

