

Identificación de los compuestos carbonílicos en el aceite esencial de limeta destilado producido en Cuba

R. TÁPANES Y J. R. PÉREZ ZAYAS

Lab. de Aceites Esenciales, CNIC, Habana, Cuba.

Recibido en: Julio 1973

ABSTRACT. In this paper we present the identification of the carbonyl compounds of the distilled lime oil (CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE) produced in Cuba, which represents a 1.79% of the total oil. The separation of these compounds was made by the conventional chemical methods (treatment of the oil with Sodium Sulfite, Sodium Bisulfite and Girard "P") and by the preparative gas chromatography. The identification was made by the analytical gas chromatography, paper chromatography, infrared and mass spectrometry.

RESUMEN. En el trabajo se presenta la identificación de los compuestos carbonílicos del aceite esencial de limeta destilado (CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE) producido en Cuba, los cuales representan un 1.79% del aceite total. Para la separación de estos compuestos se utilizaron los métodos químicos convencionales (tratamiento del aceite con Sulfito de Sodio, Bisulfito de Sodio y Reactivo Girard "P"), así como la cromatografía gaseosa preparativa. La identificación de los mismos se realizó con ayuda de la cromatografía de gases, cromatografía de papel, espectrometría infrarroja y de masa.

INTRODUCTION

Los aceites esenciales en general, y en especial los de cítricos, son mezclas complejas debido al gran número de sustancias que las componen y a la diversidad en el porcentaje de cada una de ellas.

Estos componentes, en su gran mayoría, son compuestos terpénicos, siendo entre sí muy diversos en su composición química (hidrocarburos monoterpénicos, hidrocarburos sesquiterpénicos, terpenos oxigenados tales como terpenos cetónicos, aldehídicos, alcohólicos, etc.), además presentan una gama numerosa de compuestos químicos no terpénicos por ejemplo aldehídos, cetonas, alcoholes, etc.¹

La identificación de los componentes de los aceites esenciales no sólo tienen interés científico, sino también interés técnico. Los métodos modernos de análisis y separación, tales como la espectrometría infrarroja, raman, ultravioleta, masa y resonancia magnética nuclear unida a la cromatografía, le brindan a los investigadores la posibilidad, tanto analítica como preparativa, de estudiar y analizar la gran variedad de compuestos presentes en los aceites esenciales, en especial isómeros, los cuales se diferencian solamente en la posición de sus dobles enlaces. Estos méto-

dos modernos de análisis brindan, en comparación con los métodos clásicos, muchas más posibilidades, por ejemplo se necesitan pequeñas cantidades de sustancias para analizar y clasificar nuevos componentes, los cuales se encuentran presentes en forma de trazas en los aceites esenciales.²

El análisis químico de la composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales nos facilita conocer las falsificaciones y adulteraciones, así como diferencias causadas por la vejez y almacenamiento de los mismos.³ También es de interés conocer su composición química, para poder sintetizar dichos componentes, y mediante composiciones sintéticas, asemejarse lo más posible al producto natural o utilizarse como fuentes de materia prima para la obtención de productos más valiosos.⁴

El presente trabajo abarca la identificación de los compuestos carbonílicos presentes en el aceite esencial de limeta destilado producido en Cuba, en la fábrica extractora "Jesús Menéndez", Río Seco, Banes, Oriente.

MATERIALES Y METODOS

La identificación de los compuestos carbonílicos en el aceite esencial de limeta destilado producido en Cuba se realizó fundamentalmente con ayuda de la cromatografía gaseosa, cromatografía de papel descendente, espectrometría infrarroja y de masa.

En la cromatografía gaseosa se utilizó un cromatógrafo gaseoso analítico tipo 18-3/4 de la firma Giede/Berlin con doble detector de ionización de llama, un cromatógrafo gaseoso analítico Hitachi tipo F-6 con doble detector de ionización de llama y un cromatógrafo gaseoso preparativo automático Pye tipo 105.

Para el análisis por cromatografía gaseosa se utilizaron columnas de acero inoxidable de 3 y 4mm de diámetro interno y de 2 y 3 metros de largo, rellenas con porolita (0.2-3 mm) impregnada al 7% con adipato de polietilenglicol, diatomite C (0.21-0.25) impregnada al 15% con adipato de polietilenglicol y diatomite C (0.21-0.25) impregnada al 15% con Carbowax 20M.

El análisis cualitativo por cromatografía de gases se realizó utilizando las mismas técnicas descritas en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio.⁵

El área de los picos cromatográficos se calculó por el método general de la altura por la anchura a semialtura, así como por planimetría. El planímetro empleado fue un "Ott Planimeter", Horr & Choperena.

En la cromatografía gaseosa preparativa se utilizó una columna de vidrio Pyrex de 6 mts. de largo y 9mm de diámetro externo utilizando como relleno diatomite C impregnado con Carbowax 20M al 15%.

La espectrometría infraroja se realizó en un equipo UNICAM SP-200.

Para la espectrometría de masa se utilizó un equipo RMU-6D (Hitachi), con enfoque simple y fuente iónica por impacto electrónico.

Para la cromatografía de papel descendente se tomaron tiras de papel de la firma Schleicher Schüll tipo 2043 b de 60 cms. de largo y 16.5 cms. de ancho.

También se determinó la rotación óptica (Polarímetro M-412, Milger & Watts), el índice de refracción (Refractómetro ABBE, Carl-Zeiss, Jena), solubilidad, densidad (Picnómetro de 5 ml.), etc.⁶, así como el contenido de aldehídos por oximación en valoraciones potenciométricas⁷ y el % de alcoholes por ftalización.⁸

Para la separación de los aldehídos α , β -no saturados se tomaron 1500.0 grs. de aceite esencial de limeta destilado libre de ácidos y bases, agitándose durante ocho horas con 50 grs. de bisulfito de sodio, 40 grs. de bicarbonato de sodio y 330 mls. de agua destilada. El aceite no reaccionante se separó de la solución acuosa, extrayéndose ésta con éter en un extractor líquido-líquido durante 16 horas. La solución acuosa se alcalinizó con una solución al 5% de hidróxido de sodio y se extrajo de nuevo con éter en el extractor durante dos días. El extracto etéreo se neutralizó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló, obteniéndose 1.1 gr. (0.07%) de aldehídos α , β -no saturados.

Para la obtención de los n-aldehídos se agitaron a temperatura ambiente 1420 grs. de aceite esencial de limeta destilado libre de aldehídos α , β no saturados durante tres horas con 600 grs. de bisulfito de sodio y 150 grs. de etanol, calentándose entonces durante cinco horas.

Después de enfriada la solución se le agregó agua destilada, para disolver el precipitado presente. Se separó el aceite no reaccionante de la solución acuosa, extrayéndose ésta con éter en el extractor. Para regenerar los aldehídos se alcalinizó la solución acuosa con una solución al 10% de hidróxido de sodio y se extrajo rápidamente con éter. El extracto etéreo se neutralizó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló.

Rendimiento: 22.70 grs. (1.60%) de n-aldehídos.

Para evitar que se perdieran los aldehídos volátiles en la destilación del éter, después de regenerados los n-aldehídos, se introdujo este, al destilar, en una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina, dejándose evaporar el éter a temperatura ambiente. Se obtuvo 0.1 gr. de 2,4-dinitrofenilhidrazonas.

La solución de la 2,4-dinitrofenilhidrazina se preparó por el siguiente método:

50 grs. de 2,4-dinitrofenilhidrazina se disolvieron con 600 mls. de ácido fosfórico (80%), se le añadieron 395 mls. de etanol y se filtró sobre lana de vidrio.

En la cromatografía de papel de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas se utilizó la cromatografía de papel descendente. La cubeta cromatográfica se saturó por varios días con ciclohexano. Se aplicó 60 γ de una solución alcohólica al 0.1% de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas, impregnándose el papel cromatográfico en una mezcla de dimetilformamida/acetona (1:1), se secó durante 15 minutos, se introdujo en la cubeta cromatográfica y se saturó durante 24 horas. Las 2,4-dinitrofenilhidrazonas se corrieron con ciclohexano saturado con dimetilformamida.

Para la separación de las cetonas se refluaron 1300.0 grs. de aceite esencial de limeta destilado libre de aldehídos durante una hora con 30 grs. de reactivo Girard "P", 1519.0 grs. de alcohol, 295 mls. de ácido acético glacial y 7 mls. de anhídrido acético. Después de enfriada la solución se le añadieron primeramente dos litros de agua fría y 113 grs. de hidróxido de sodio. Se extrae rápidamente con éter. A la solución acuosa se le añadieron 200 mls. de ácido sulfúrico concentrado y se dejó reposar una hora a temperatura ambiente. Las cetonas regeneradas se extrajeron varias veces con éter. El éter se lavó neutral, se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló. Rendimiento: 1.6 grs. de cetonas (0.12%).

RESULTADOS Y DISCUSION

Constantes físico-químicas:

El aceite de limeta destilado cubano utilizado para la separación e identificación de los compuestos carbonílicos presentaba las siguientes constantes químicas y físicas:

Densidad relativa (d_{20}^{20}) = 0.854; Poder rotatorio (α_D^{20}) = + 40.25°; Índice de Refracción (n_D^{20}) = 1.4774; contenido de aldehídos y cetonas calculado como Citral (método de la Hidroxilamina) = 1.70%; alcoholes primarios y secundarios = 5.65%.

Separación y análisis de los compuestos carbonílicos:

El aceite esencial de limeta destilado, después de separados los ácidos y las bases se trató con sulfito de sodio/bicarbonato de sodio, para separar los compuestos α , β no saturados, separándose así 0.07% del aceite total. Con ayuda de la cromatografía gaseosa analítica se pudo identificar el citral A y el citral B.

El aceite esencial de limeta destilado sin compuestos α , β -no saturados, se trató con bisulfito de sodio en alcohol, obteniendo 1.60% de n-aldehídos de cadena corta. Mediante la cromatografía gaseosa analítica se identificaron los siguientes aldehídos: n-heptanal, n-octanal, n-nonanal, n-decanal, n-undecanal y n-dodecanal. (Fig. 1).

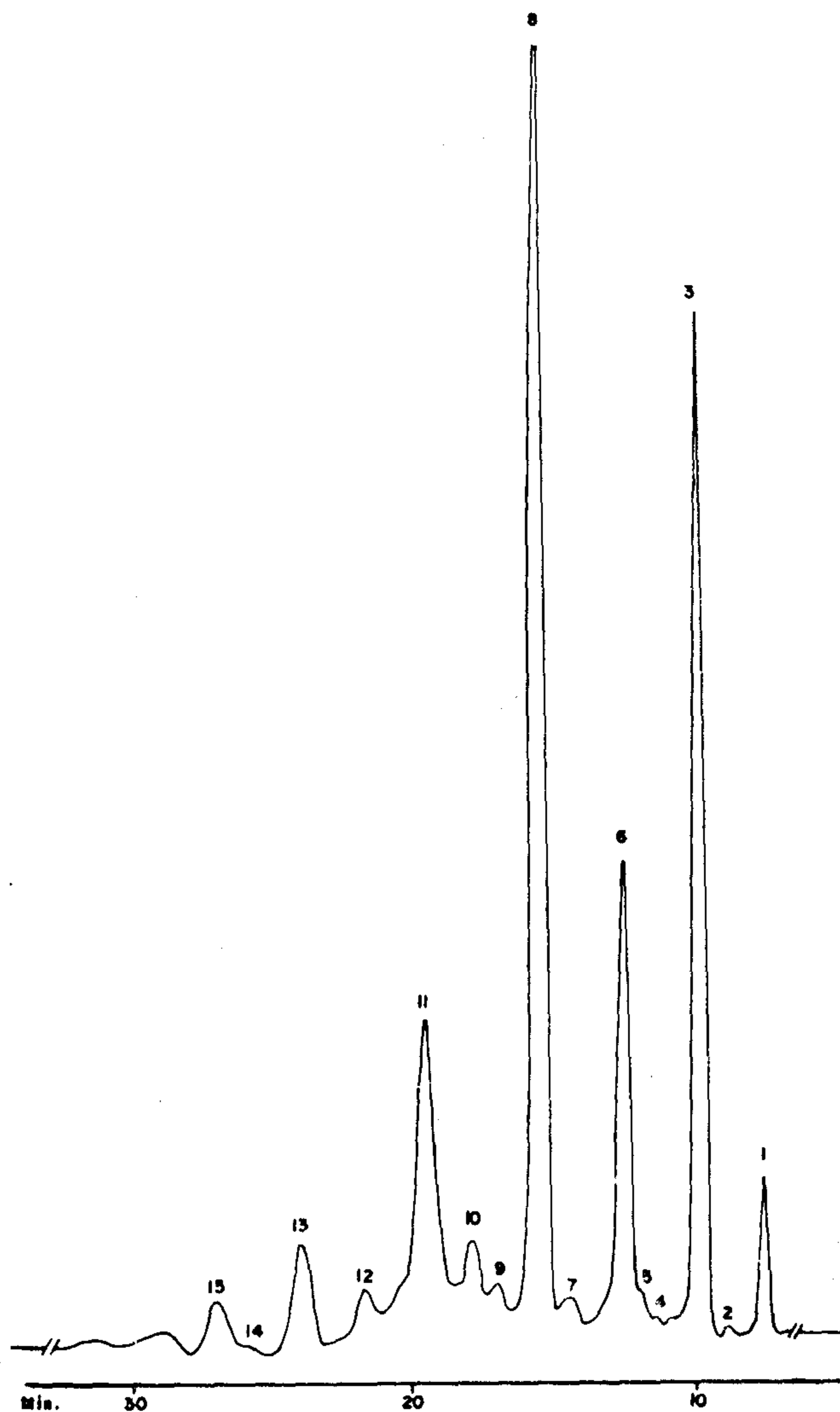


FIG. 1. Componentes identificados en la fracción de los n-aldehidos del aceite esencial de limeta destilado. (1) heptanal; (3) octanal; (6) nonanal; (8) decanal; (11) undecanal y (13) dodecanal.

Condiciones de análisis:

Cromatógrafo gaseoso: Pye 105.

Columna: 15% adipato de polietilenglicol sobre diatomite C.

Temperatura: 120-160°C 4°/min.

Flujo N₂: 30ml/min.

El análisis cuantitativo de la fracción de los n-aldehídos se resume en la (Tabla I.)

TABLA I

ANALISIS CUANTITATIVO DE LA FRACCION DE LOS n-ALDEHIDOS
DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMETA DESTILADO

Pico No.	% encontrados	Sustancia identificada
1	3.20	n-heptanal
2	1.05	—
3	19.07	n-octanal
4	1.18	—
5	2.78	—
6	8.97	n-nonanal
7	2.84	—
8	29.08	n-decanal
9	3.68	—
10	4.33	—
11	12.37	n-undecanal
12	2.78	—
13	4.12	n-dodecanal
14	0.16	—
15	2.07	—
16	1.39	—
17	0.93	—

Para identificar los aldehídos volátiles separados con bisulfito de sodio se introdujo el éter destilado de la regeneración de los n-aldehídos en una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Después de la evaporación del éter a la temperatura ambiente se obtuvo 0.1 gr. de 2,4 dinitrofenilhidrazonas las que se pudieron identificar con ayuda de la cromatografía de papel descendente. Los aldehídos volátiles: Formaldehído, Acetaldehído, Propionaldehído, Butiraldehído, Valeraldehído y Capronaldehído, fueron identificados por primera vez en el aceite esencial de limeta de destilado. (Fig. 2).

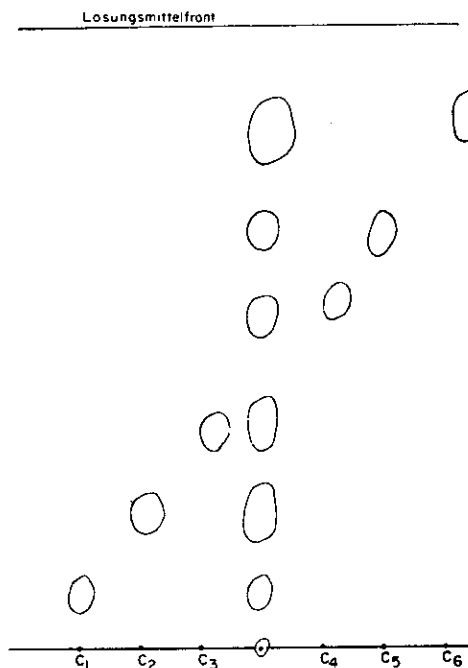


Fig. 2. Cromatografía de papel descendente de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de los aldehídos volátiles del aceite esencial de limeta destilado. (C₁) Formaldehído; (C₂) Acetaldehído; (C₃) Propionaldehído; (C₄) Butiraldehído; (C₅) Valeraldehído y (C₆) Capronaldehído. Sistema: Ciclohexano saturado con dimetilformamida.

Los valores R_f de las hidrozonas de los aldehídos volátiles anteriormente mencionados, los cuales fueron comparados con patrones aplicados, son lo siguiente: (Tabla II).

TABLA II
VALORES R_f DE LOS ALDEHIDOS VOLATILES
DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMETA DESTILADO

Mancha No.	Valor R _f	Sustancia identificada
1	0.16	Formaldehído
2	0.25	Acetaldehído
3	0.40	Propionaldehído
4	0.59	Butiraldehído
5	0.68	Valeraldehído
6	0.70	Capronaldehído

Para separar los compuestos carbonílicos que no reaccionaron con sulfito y bisulfito de sodio, se trató el aceite esencial de limeta destilado restante con el reactivo Girard "P", obteniéndose 0.12% de cetonas. El cromatograma gaseoso analítico presentaba 14 picos pudiéndose identificar los siguientes compuestos: metilheptenona, metilnonilcetona, piperitona, isopiperitenona, p-metilacetofenona y carvona. (Fig. 3).

Condiciones de análisis:

Cromatógrafo gaseoso: Hitachi-Perkin-Elmer F-6.

Columna 15% adipato de polietilenglicol sobre diatomite C (2 mts. y 3 mm).

Temperatura: 80-180°C 2.5°/min.

Flujo N₂: 25 ml/Min.

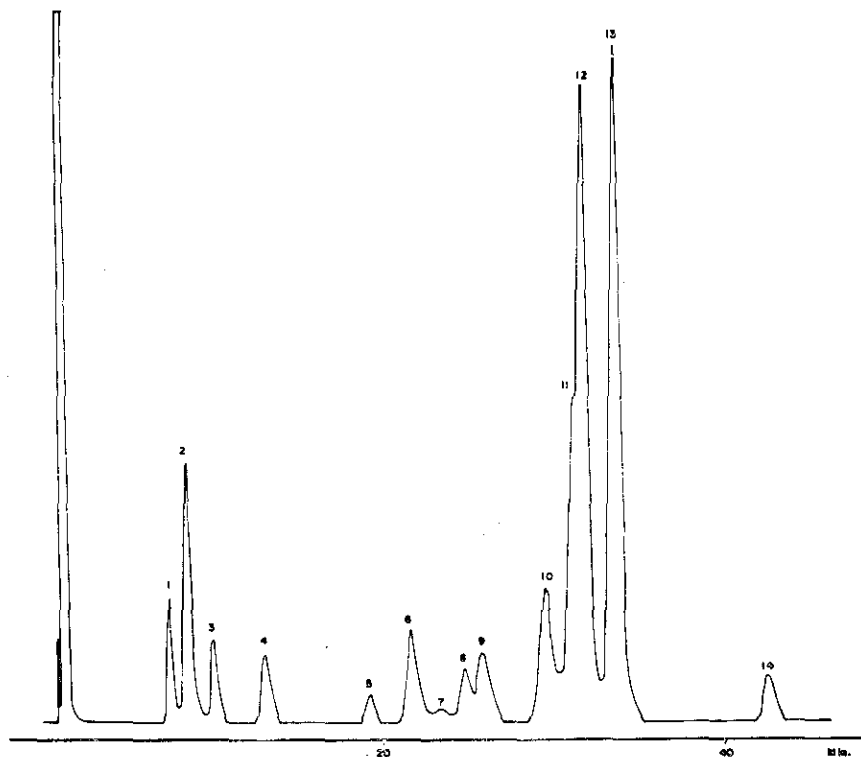


FIG. 3. Compuestos identificados en la fracción de las cetonas del aceite esencial de limeta destilado. (4) metilheptenona; (8) metilnonilcetona; (11) carvona; (12) p-metilacetofenona; (13) piperitona e isopiperitenona.

Los resultados del análisis cuantitativo se presentan en la (Tabla III.)

TABLA III

ANALISIS CUANTITATIVO DE LA FRACCION DE LAS CETONAS
DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMETA DESTILADO

Pico No.	% encontrados	Sustancia identificada
1	2.81	—
2	7.21	—
3	2.03	—
4	3.03	metilheptenona
5	1.18	—
6	3.49	—
7	0.59	—
8	2.44	metilnonilcetona
9	3.88	—
10	6.06	—
11	12.53	carvona
12	25.75	p-metilacetofenona
13	26.89	piperitona, isopiperitenona
14	2.07	—

Los dos compuestos principales de esta fracción (picos Nos. 12 y 13) se aislaron por cromatografía gaseosa preparativa, y se identificaron con la ayuda de la espectrometría infrarroja y de masa.

Analizando el espectro IR de la sustancia correspondiente al pico cromatográfico No. 13, se pudo observar una banda α, β - carbonílica a 1695 cm^{-1} , así como una banda metilénica a los 900 cm^{-1} . El espectro de masa presentaba dos picos moleculares $m/e = 150$ y 152 , denotando así una mezcla que podía pensarse fuese de isopiperitenona, piperitona o carvotanacetona. (Fig. 4).

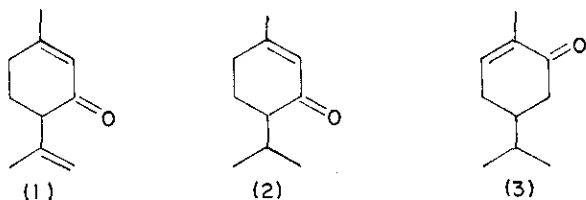


FIG. 4. (1) Isopiperitenona; (2) piperitona; (3) Carvotanacetona.

Las intensidades relativas del espectro de masa se encuentran resumidas en la Tabla IV.

Analizando los valores obtenidos para los fragmentos iónicos $m/e = 82$ y 110 , confirmamos la presencia de piperitona (PM = 152) como componente principal de dicha mezcla. Esta confirmación se basa en las siguientes deducciones:

El pico $m/e = 110$ se origina de acuerdo a un reordenamiento Mc Lafferty, como es ya conocido en la fragmentación de la mentona.⁹ Para que este reordenamiento tenga lugar es necesario que el grupo carbonílico se encuentre en posición a la cadena alquílica, lo que nos permite desechar la posibilidad de la presencia de la carvotanacetona. El propileno fragmentado en este reordenamiento es la causa de la formación del ión $m/e = 41$ de alta intensidad. Este ión se forma por pérdida de un radical $H\cdot$, adquiriendo así la estructura alílica



El ión $m/e = 110$ formado también en el reordenamiento citado anteriormente representa la estructura del 1-metil-3-hidroxi-ciclo-hexadieno-1,3. En analogía con la fragmentación que experimentan los compuestos fenólicos¹⁰ observamos aquí la eliminación posterior del CO, originándose así el ión $m/e = 82$, que es el pico base del espectro. La estructura de este ión sería la 1-metilciclopenteno-1. Este mecanismo de fragmentación, el cual resulta ser el predominante en la fragmentación de la piperitona, se representa en la (Fig. 5).

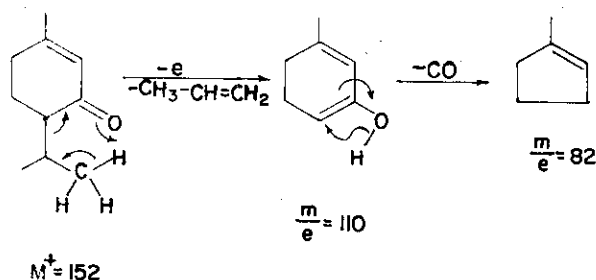


Fig. 5. Mecanismo principal de fragmentación para la piperitona.

En el espectro de masa se aprecia además un pico intenso $m/e = 67$, para el cual proponemos el siguiente mecanismo, análogo a las cetonas cíclicas¹¹. (Fig. 6).

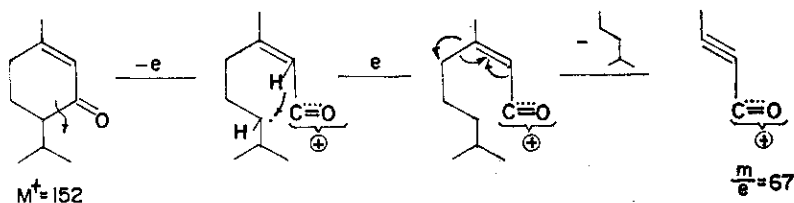


FIG. 6. Mecanismo secundario de fragmentación para la piperitona.

Por último la presencia de los picos $m/e = 43$ y 109 indican que la ruptura simple del grupo isopropílico se lleva a cabo de una forma competitiva a las anteriormente planteadas. Sin embargo las pequeñas intensidades encontradas para estos productos de fragmentación (13 y 10% respectivamente), demuestran que el mecanismo dominante es el reordenamiento McLafferty.

Por encontrarse en el espectro de masa un pico molecular $m/e = 150$, se reafirma la presencia de una cetona con un grado de insaturación mayor que la piperitona. Se propone la estructura de la isopiperitenona para dicha sustancia por los siguientes datos:

Es conocido en la literatura, que los compuestos terpénicos, que presentan la estructura terpinolénica fragmentan bajo impacto electrónico por el mecanismo retro-diels-alder, dando lugar a un pico intenso $m/e = 68$ ¹². Analizando los valores planteados en la (Tabla IV), se puede observar que en el espectro de masa se encuentra presente un pico de poca intensidad $m/e = 68$. Proponemos para la formación de este ión el siguiente mecanismo: (Fig. 7).

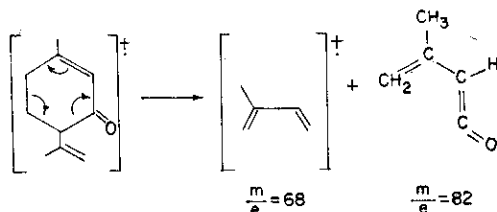


FIG. 7. Mecanismo de fragmentación para la isopiperitenona.

El otro fragmento producido por este mecanismo posee la masa 82, y dado que la carga pudiera localizarse en ambos productos de fragmentación, explicaría la alta intensidad del ión $m/e = 82$, encontrado en el espectro, derivado también por el reordenamiento McLafferty. Esta interferencia nos impide afirmar con certeza la presencia de la isopiperitenona en el aceite esencial de limeta destilado aunque los datos analizados anteriormente concuerdan con la estructura de dicho compuesto.

El espectro IR de la sustancia correspondiente al pico cromatográfico No. 12 presenta a 1695 cm^{-1} una banda carbonílica, bandas aromáticas a 820, 1270 y 1620 cm^{-1} , una banda de intensidad pequeña, de las vibraciones C-H a 2960 cm^{-1} y una banda correspondiente a un grupo metilénico a 900 cm^{-1} , la cual podía ser una impureza presente en la muestra. Los resultados hallados en el espectro IR se confirman con el espectro de masa obtenido, representado en la (Tabla V).

Al igual que en el espectro de masa anterior, encontramos dos picos moleculares $m/e = 134$ y 150, indicándonos la presencia de una mezcla. Se pudo observar la presencia de varios picos característicos de compuestos aromáticos, así como un pico $m/e = 91$, correspondiente al ión tropilio, característico para la estructura bencílica. Los dos fragmentos más importantes del espectro fueron encontrados a $m/e = 91$ y 119. La aparición de un pico meta estable ($m^* 69.5$) confirma, que el ión tropilio ha sido formado a partir del fragmento a $m/e = 119$, posiblemente por pérdida de CO. La presencia de un pico bastante intenso $m/e = 43$, nos indica el fraccionamiento del grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{-CO}$). De acuerdo a los datos obtenidos llegamos a formular la estructura del p-metilacetofenona, la cual confirmamos comparando nuestro espectro con el de dicho compuesto. La siguiente figura muestra el mecanismo propuesto para el fraccionamiento de la p-metilacetofenona. (Fig. 8).

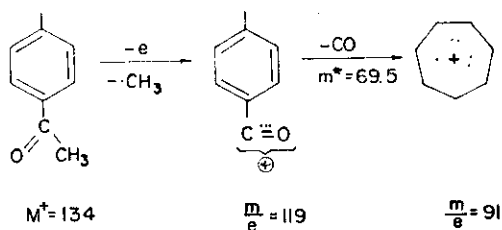


FIG. 8. Mecanismo de fragmentación para la p-metilcetofenona.

TABLA IV

INTENSIDADES RELATIVAS DEL ESPECTRO DE MASA DEL PICO PRINCIPAL No. 13 DEL
CROMATOGRAMA GASEOSO DE LA FRACCION DE LAS CETONAS

m/e	39	41	43	53	54	55	58	65	67	68	77	79	82	91	93	95	107	108	109	110	150	152
I %	52	41	13	26	44	12	9	9	44	7	13	17	100	14	27	37	17	21	10	46	8	12

TABLA V

INTENSIDADES RELATIVAS DEL ESPECTRO DE MASA DEL PICO PRINCIPAL No. 12 DEL
CROMATOGRAMA GASEOSO DE LA FRACCION DE LAS CETONAS

m/e	39	41	43	51	53	63	65	68	77	79	82	91	93	95	105	107	110	119	134	148	152
I %	46	39	60	29	39	17	36	76	50	76	32	100	43	28	36	52	14	89	36	11	39

Como se señala en el cromatograma gaseoso de la fracción de las cetonas (ver pág. 20), el pico principal No. 12, presenta una forma de hombro (pico No. 11) perteneciente a la carvona. La aparición de una banda a 900 cm^{-1} en el espectro IR, así como el otro pico molecular $m/e = 150$ en el espectro de masa, confirman la presencia de este compuesto en forma de impureza en la mezcla anteriormente analizada; además la formación de iones $m/e = 68$ y 82 (ver Tabla V) nos indican la posible fragmentación por un mecanismo retro-diels-alder, semejante al planteado para la isopiperitenona.

CONCLUSIONES

- 1) En el análisis de los componentes carbonílicos del aceite esencial de limeta cubano se identificaron los siguientes compuestos: citral A, citral B, n-heptanal, n-octanal, n-nonanal, n-decanal, n-undecanal, n-dodecanal, así como metilheptenona y metilnonilcetona, todos ellos reportados en la literatura como componentes en el aceite esencial de limeta destilado de otras procedencias.
- 2) Además se identificaron otros componentes que aún no habían sido reportados en el aceite esencial de limeta destilado, tales como: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, capronaldehído, piperitona, p-metilacetofenona y carvona, esta última posiblemente como producto de la autoxidación del limoneno.
- 3) También proponemos la presencia de la isopiperitenona en el aceite de limeta destilado lo cual se confirmará en estudios posteriores.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos las orientaciones y las discusiones valiosas realizadas con el M. Sc. Aristides Rosado, del laboratorio de espectrometría de masa del CNIC, las cuales nos fueron de gran utilidad para la presentación de este trabajo.

Además queremos agradecer la ayuda prestada por los técnicos medios del laboratorio de aceites esenciales del CNIC.

REFERENCIAS

- 1) GILDEMEISTER E. Y HOFFMANN FR. Die Ätherischen Öle, Vol. I, 281-303, Akademie Verlag, Berlin, 1956.
- 2) GILDEMEISTER E. Y HOFFMANN FR. Die Ätherischen Öle, Vol. I, 255, Akademie Verlag, Berlin, 1956.
- 3) ZIEGLER, E. Zur Beurteilung von Citrusöle, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 66. Jahrg. Heft 9. 1970.
- 4) GILDEMEISTER E. Y HOFFMANN FR. Die Ätherischen Öle, Vol. I, 481-483, Akademie Verlag, Berlin, 1956.
- 5) TÁPANES R., PÉREZ ZAYAS J. Y FANGHÄNEL E. *Revista Cenic*, 3, 99, 1971.
- 6) Normas Cubanas de Calidad de los Aceites Esenciales, Empresa de Conservas, Frutas y Vegetales, 1967.
- 7) GUENTHER E. The Essential Oils Vol. II, 322-323, Van Nostrand Co. Inc., Pricenton, New Jersey, 1963.
- 8) GILDEMEISTER E. Y HOFFMANN FR. Die Ätherischen Öle, Vol. II, 201, Akademie Verlag, Berlin, 1959.
- 9) SPITELLER G. Massenspektrometrische Strukturanalyse Organischer Verbindungen. Verlag Chemie, GmbH, 128, 1956.
- 10) IBID., 151, 1956.
- 11) IBID., 158, 1956.
- 12) BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI K. AND WILLIAMS D. H. Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Vol. II 144. Holden-Day., San Francisco, 1964.