

IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES EN LAS INFLORESCENCIAS DE *Erythrina americana* Miller

S. Sánchez-Herrera¹; R. M. Soto-Hernández¹; G. Kite²; M. R. García-Mateos³

¹Programa de Botánica. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. C.P. 56230.

²Royal Botanical Garden Kew. Surrey TW9 3AB. London, U.K.

³Área de Química. Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de Méx. México. C.P. 56230.

RESUMEN

Recientes investigaciones señalan que las semillas de *Erythrina americana* Miller tienen un alto contenido de proteína y un adecuado contenido de lípidos, lo cual representa una alternativa para ser usadas como alimento humano. Las flores y semillas de *E. americana* conocidas como "Colorín" son altamente apreciadas por su sabor y son empleadas como complemento proteínico en algunos países. En muchas regiones de México, tradicionalmente son cocinadas las flores, pero las semillas no son consumidas por su alta toxicidad debido a la cantidad de alcaloides que contienen. Los cuales tienen un efecto sobre el sistema nervioso periférico, como relajante muscular y en el sistema nervioso central como sedante. El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido y distribución de alcaloides en las flores (cáliz y corola) y localizar los alcaloides más tóxicos. Mediante las técnicas de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, se analizó el extracto observándose un alto contenido de alcaloides en el cáliz en comparación con el encontrado en la corola, sin embargo, los alcaloides tóxicos α - y β -eritroidina fueron detectados en ambos tejidos.

PALABRAS CLAVE: α - y β -eritroidina, Leguminosae, cáliz, corola, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas

IDENTIFICATION OF ALKALOIDS IN THE INFLORESCENCES OF *Erythrina americana* Miller

SUMMARY

Recent research has shown that the seeds of *Erythrina americana* Miller are high in proteins and an adequate content of lipids, giving it possibilities as a human food. The *E. americana* flowers and seeds are known in Mexico as "Colorín", and are highly appreciated for their flavor; in some countries they are used as a protein complement. In several regions of Mexico, traditionally the flowers are cooked, but the seeds are not consumed because the presence of alkaloids makes them highly toxic. The alkaloids affect the peripheral nervous system: muscular relaxation and a strong sedative effect on the central nervous system. The objective of the present study was to determine the alkaloid content in some parts of the flowers (calyx and corolla) and where the most toxic alkaloids are located. By liquid chromatography and mass spectrometry of the extract, it was observed that alkaloid content was higher in the calyx than in the petal, although the toxic alkaloids α - and β -erythroidine were detected in both tissues.

KEY WORDS: α - and β -erythroidine, Leguminosae, calyx, corolla, liquid chromatography and mass spectrometry

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos principios activos naturales basada en el uso popular de determinadas plantas, es un hecho bien documentado. En este sentido la Organización Mundial de la Salud, en 1976 creó un comité de Medicina Tradicional con el propósito de promover y desarrollar la enseñanza y la investigación sobre plantas medicinales y uno de los aspectos más importantes que enfatizaba este comité era el hallazgo de nuevos fármacos, aislando principios activos contenidos en las plantas.

En este contexto, entre las numerosas plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional se encuentran

las leguminosas entre ellas las del género *Erythrina* (Hastings, 1990; Lozoya y Lozoya, 1982). Existen diversas especies de *Erythrina*, distribuidas ampliamente en todo el mundo, pero en México se localiza un número importante de ellas (Neill, 1993), sin embargo, los estudios fitoquímicos, etnobotánicos, fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos sobre las especies de *Erythrina* son escasos y aislados.

Por el potencial y versatilidad de usos que representa el género *Erythrina* ha surgido el interés de estudiar diferentes especies (García-Mateos *et al.*, 2000a; b; García-Mateos, 1996). Estudios previos señalaron la presencia de varios metabolitos, pero los alcaloides identificados son los que presentan efectos farmacológicos importantes sobre

el sistema nervioso periférico como relajante muscular, empleados clínicamente como coadyuvantes en anestesia (Payne, 1991) y acción sobre el sistema nervioso central como tranquilizante (Craig, 1955; García-Mateos *et al.*, 2000b).

En algunos países de América Central y en México se usan diferentes especies de *Erythrina* como forraje y alimento. Sotelo *et al.* (1993) señalaron que las semillas detoxificadas de *E. americana* al ser analizadas presentaron un alto contenido de proteínas y un adecuado contenido de grasas, lo cual representa una alternativa en su uso como forraje o alimento (Kass, 1994).

Tradicionalmente las flores de varias especies de *Erythrina* apreciadas por su sabor (Figura 1), son utilizadas para la elaboración de algunos platillos (Lozoya y Lozoya, 1982), pero su uso se ha limitado por la toxicidad de los alcaloides presentes en la mayoría de las especies (Payne y Foley, 1992).

Las flores comestibles son *E. edulis*, *E. berteroana*, *E. fusca*, *E. americana*, *E. poeppigiana* y *E. costaricensis*. En América Latina, un método popular de cocinar las flores consiste en la preparación de sopas y ensaladas, y las semillas molidas se utilizan para hacer tortillas. Tradicionalmente las flores de *Erythrina* son utilizadas para la elaboración de algunos platillos colombianos y en diversas regiones de nuestro país se emplean en la preparación de algunos platillos (Lozoya y Lozoya, 1982).

Las semillas de *E. edulis* contienen aproximadamente 20 % de proteína, para que puedan consumirse deben hervirse por lo menos 45 min, o freírse. Recientes investigaciones indicaron que las semillas de *E. edulis* no cocinadas pueden ser tóxicas si se consumen por largos periodos, debido a la presencia de alcaloides del tipo eritrinano. Las semillas de otras especies son más tóxicas. En algunos lugares, se prepara una pasta con la harina de las semillas combinada con harina de trigo y arroz, y se usa como complemento para hacer tortillas.

El valor nutritivo del follaje de *Erythrina* se afecta con la edad y la estación de cosecha, en las semillas dicho valor también varía entre las especies. Los análisis del follaje señalaron que el contenido de proteína cruda varía entre 20 y 32 %. Los niveles de digestibilidad están entre 45 y 60 %. Más del 40 % de la proteína cruda de la pastura de *Erythrina* es soluble. Las hojas contienen 24 % de proteína, 29 % de fibra cruda y 21 % de carbohidratos (con base en peso seco). Además son ricas en potasio y pobres en calcio. Las vainas contienen 21% de proteína, 23 % de fibra cruda (con base en peso seco), 24 % de carbohidratos y frescas contienen 91 % de humedad. Las semillas cocidas pueden sustituir hasta 60 % del alimento concentrado para pollos y peces (Barrera, 1994).

Sotelo *et al.* (1993) señalaron que las semillas detoxificadas de *E. breviflora* y *E. americana* son ricas en proteína (38.5 y 42.5 %, respectivamente) y contienen una concentración de grasa de 0.1 y 0.3 %, las proteínas encontradas presentan un buen balance de aminoácidos según lo establecido por la FAO en 1973, por lo que consideran que estas especies requieren de mayor investigación para usarse confiablemente como forraje.

En el presente estudio se evaluó el contenido de alcaloides en el cáliz y la corola de las flores de *E. americana* con la finalidad de determinar su potencial como alimento, así como la identificación de los mismos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL/EM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal

Las flores para el estudio se colectaron de varios ejemplares elegidos al azar, localizados en la población de Colorines, Estado de México. Las características climáticas de las zonas de colecta de las especies de *Erythrina* son: altitud 1680 m; latitud norte 19°11'; latitud oeste 100°11'; clima (A)Ca(w1)(w)(i)gw"; temperatura media anual 19.0 °C y una precipitación media anual de 1006.7 mm (García, 1973). La autenticidad del material vegetal fue realizada por el Ing. Joaquín Becerra Zavala del Herbario CHAPA del Colegio de Postgraduados. Un ejemplar fue depositado en el mismo Herbario.

Extracción de alcaloides

Las flores se separaron en cáliz y corola, ambos tejidos se secaron en una estufa de laboratorio a una temperatura de 60 °C y se trituraron separadamente en un molino hasta obtener un tamaño de partícula muy fina, se guardaron en bolsas que se mantuvieron en refrigeración (5 °C), hasta el momento de iniciar la extracción de los alcaloides. La cantidad de cáliz que se procesó fue de 155 g y 189 g de pétalos.

La obtención de los extractos crudos de alcaloides se realizó conforme a la metodología de Games *et al.* (1974). La muestra en polvo fue desgrasada con hexano en un soxhlet por 48 h, el disolvente se evaporó a vacío y se lavó con una solución de H₂SO₄ al 2 %. La separación de la grasa de los alcaloides presentes en el extracto se realizó con tres lavados consecutivos de diclorometano de 100 ml cada uno (3 X 100). La fase acuosa se basificó con NaHCO₃ hasta alcanzar un pH de entre 8 ó 9, seguido de una extracción con diclorometano (3 X 100). El extracto de diclorometano se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó bajo presión reducida para obtener la fracción de alcaloides libres del extracto hexánico.

El residuo vegetal se secó a temperatura ambiente y se procesó con metanol en un soxhlet durante 48 a 72 h, El disolvente se evaporó a sequedad. El extracto se disolvió en una solución de H_2SO_4 al 2 %, después se realizaron lavados consecutivos con diclorometano (3 X 100). El disolvente se trató con Na_2SO_4 anhidro para eliminar la humedad y después se evaporó para obtener la fracción de alcaloides libres del extracto metanólico.

El remanente de la fase acuosa se acidificó a pH de 2 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se llevó a reflujo durante 3 h a una temperatura entre 60 y 70 °C. La mezcla fría, se alcalinizó con $NaHCO_3$ hasta obtener pH 8 y se extrajo con diclorometano (3 X 100), el disolvente se secó con Na_2SO_4 anhidro y posteriormente se evaporó, obteniéndose la fracción de alcaloides liberados (Games *et al.*, 1974).

Las fracciones de alcaloides libres del extracto hexánico, alcaloides libres del extracto metanólico y alcaloides liberados se analizaron preliminarmente por cromatografía en capa fina (CCF). Los análisis en CCF se realizaron utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF₂₅₄, Merck), el eluyente empleado fue diclorometano:metanol en una proporción de 8:2. En todos los casos, antes de revelar las placas con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas con luz ultravioleta (onda corta y larga). Las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff (reactivo específico para alcaloides).

Purificación de los alcaloides

Por cromatografía preparativa en columna se separaron y purificaron varios alcaloides. La separación se realizó mediante el fraccionamiento del extracto metanólico, utilizando como adsorbente sílica gel (400 g de gel de sílice G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con diclorometano:metanol iniciando con proporciones 99:1 hasta 80:20. Se recogieron fracciones de 5 ml y cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, visualizándose con luz ultravioleta de onda corta y larga y con el reactivo de Dragendorff, combinándose aquellas cromatográficamente similares, finalmente, se les eliminó el disolvente.

Identificación de los alcaloides por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas (CL/EM)

Los análisis se realizaron en fase reversa en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 600 acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan Mat LCQ. En el cromatógrafo se usó una columna Supelco Discovery C-18 (5 μ m) de 250 mm X 4.6 mm (i.d.) usando como fase móvil lineal de 1 ml·min⁻¹ y un gradiente programado de tres disolventes: A (0.1 % de acetato de amonio), B

(metanol) y C (acetonitrilo) de la siguiente manera: t = 0 min, 75 % A, 20 % B, 0.5 % C; t = 10 min, 50 % A, 45 % B, 5 % C; t = 15 min, 50 % A, 45 % B, 5 % C. La vaporización de la fuente APCI fue de 450 °C y la presión del gas nitrógeno de 80 y 20 psi, respectivamente, la temperatura capilar fue de 150 °C. El detector usado fue de UV a 230 nm. Por espectrometría de masas se confirmaron e identificaron los alcaloides, lo cual se realizó comparando los espectros con los de muestras auténticas (estándares) y con biblioteca de espectros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de análisis permitió detectar un número mayor de estructuras de naturaleza alcaloidal en el cáliz en comparación con los de la corola, hecho que justifica el uso de los pétalos en la preparación de alimentos tradicionales.

Se observa que en la corola el número de alcaloides liberados identificados en este estudio es menor al observado en el cáliz, sin embargo, la cantidad de alcaloides libres de la fracción del extracto metanólico es mucho mayor en el cáliz que en la corola (Figura 1)

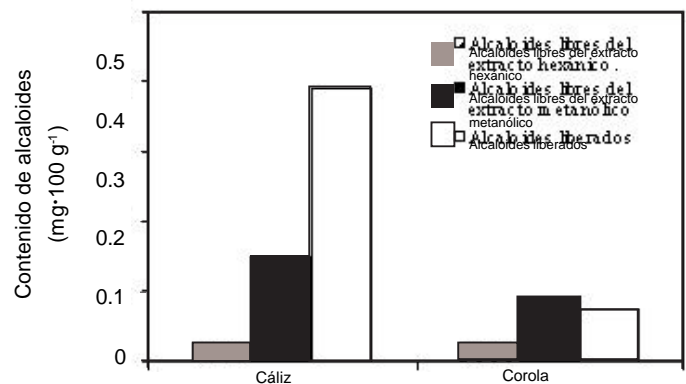
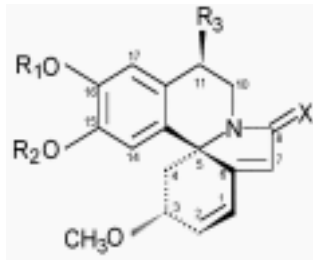


Figura 1. Contenido de alcaloide en cáliz y corola de *Erythrina americana*.

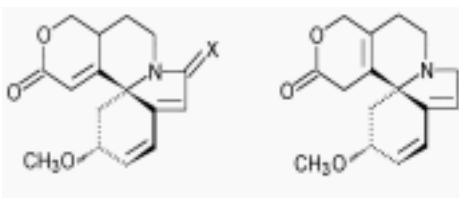
La identificación por CL/EM permitió detectar estructuras no descritas en ambas estructuras florales de *E. americana* (Cuadro 1), debido posiblemente a que el método de análisis empleado (CL/EM), el cual permite mayor resolución que los empleados en trabajos previos (García-Mateos *et al.*, 1998; 1996). Las estructuras moleculares identificadas se muestran en la Figura 2. Los alcaloides que fueron purificados por cromatografía preparativa en columna, fueron identificados empleando el mismo método de análisis, lo que permitió corroborar su identidad, para usarse como muestras auténticas (referencias) en investigaciones posteriores.



Alcaloides Diénicos	R ₁	R ₂	R ₃	X
Erisodina	H	Me	H	H
Eritralina		-CH ₂ -	H	H
Eritrinina		-CH ₂ -	OH	H
Cristamidina		-CH ₂ -	z	O

^z10-11 Doble enlace

ALCALOIDES LACTÓNICOS



α -eritroidina X=2H
8-oxo- α -eritroidina X=O

β -eritroidina

Figura 2. Estructuras de los alcaloides identificados en cáliz y corola de *Erythrina americana*.

Por otro lado, los espectros de masas de los alcaloides presentes en los extractos analizados mostraron el patrón de fragmentación característico de los alcaloides del tipo eritranano (Boar y Widdowson, 1970). Los espectros muestran los iones moleculares (M⁺) de los alcaloides identificados: erisodina de m/e 299, eritralina m/e 297, eritrinina m/e 313, cristamidina m/e 309, α -eritroidina m/e 273, β -eritroidina m/e 273 y 8-oxo- α -eritroidina m/e 287 (Amer *et al.*, 1991).

CUADRO 1. Alcaloides identificados en *Erythrina americana*

Alcaloide	Cáliz	Corola
α -eritroidina	+	+
β -eritroidina	+	+
8-oxo- α -eritroidina	+	+
Eritrinina	+	+
Eritralina	+	-
Cristamidina	+	-
Erisodina	-	+
Alcaloide no identificado (PM=326.25)	+	-

+: alcaloide presente, -: alcaloide no presente; PM: peso molecular.

Se encontraron siete estructuras de alcaloides en el cáliz y cinco en la corola (Cuadro 1), la mayoría de naturaleza diénica, característica de las especies localizadas en nuestro continente (Hargreaves *et al.*, 1974), se desconocen los efectos tóxicos y farmacológicos de algunos de estos metabolitos.

Se detectó la presencia de un alcaloide de peso molecular de 326.35, no descrito en la literatura, la elucidación de su estructura fue imposible realizarla por la pequeña cantidad de muestra que se obtuvo para poder llevar a cabo los estudios espectroscópicos y espectrométricos.

Se observó en ambos tejidos la presencia de los alcaloides α -y β -eritroidina, identificados en investigaciones previas (Cuadro 2; García-Mateos *et al.*, 1998; 1996; Aguilar *et al.*, 1981), característicos de la especie analizada, en la literatura se encuentran descritos sus efectos farmacológicos (García-Mateos *et al.*, 2000b; García-Mateos, 1996; Lozoya y Lozoya 1982) y la elevada toxicidad en animales de laboratorio (García-Mateos *et al.*, 2000a; Garín *et al.*, 1997).

CUADRO 2. Alcaloides identificados en flores de *Erythrina americana* en investigaciones previas.

Referencias	Alcaloides
Aguilar <i>et al.</i> , 1981	α -eritroidina, β -eritroidina,
García-Mateos <i>et al.</i> , 1996	α -eritroidina, β -eritroidina, eritristemina-n-óxido, alcaloide no identificado
García-Mateos <i>et al.</i> , 1998	α -eritroidina, β -eritroidina, eritristemina-n-óxido

El Cuadro 3 muestra los tiempos de retención para cada uno de los alcaloides encontrados en la CL/EM. Por otro lado, los esperados alcaloides n-óxidos descritos previamente en las flores de *E. americana* (García-Mateos *et al.*, 1998; 1996), no se detectaron. En las Figuras 3 y 4 se presentan los cromatogramas en donde se puede observar la presencia de los alcaloides: 8-oxo- α -eritroidina (m/e 287), α -eritroidina (m/e 273) y β -eritroidina (m/e 273), identificados en la fracción de alcaloides libres del cáliz y de pétalos de *E. americana*.

CUADRO 3. Tiempos de retención relativos de los alcaloides de *Erythrina americana* mediante el análisis de cromatografía de líquidos.

Alcaloide	Tiempo de Retención Relativo ^z (Detector UV a 230 nm)
α -eritroidina	1.00
β -eritroidina	1.16
8-oxo- α -eritroidina	0.95
Eritrinina	1.69
Erisodina	1.23
Eritralina	1.39
Cristamidina	1.50
Alcaloide no identificado	1.40

^zExpresado con respecto al tiempo de retención de α -eritroidina

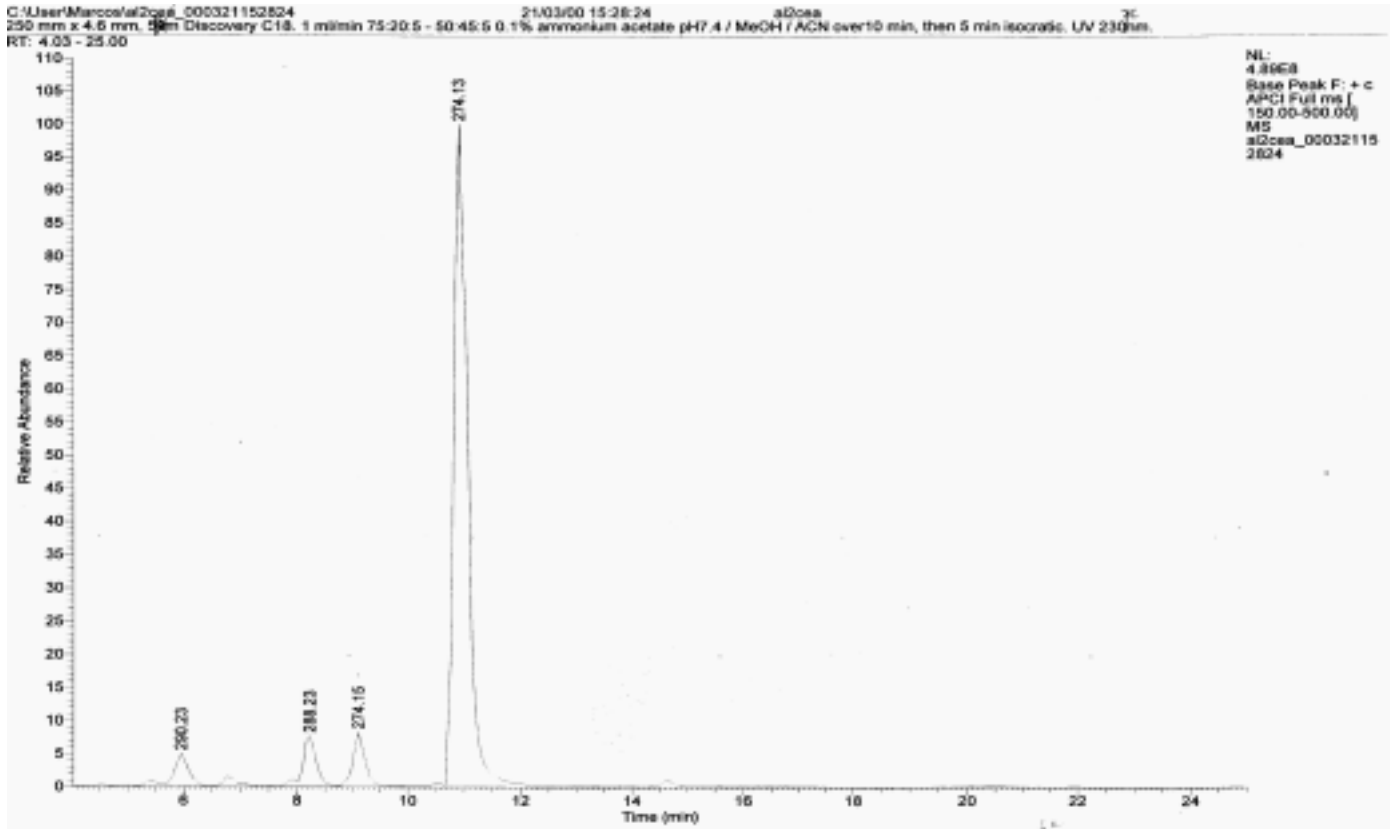


Figura 3. Cromatograma del análisis de CL/EM de la fracción de alcaloides libres del extracto metanólico del cáliz de *Erythrina americana*.

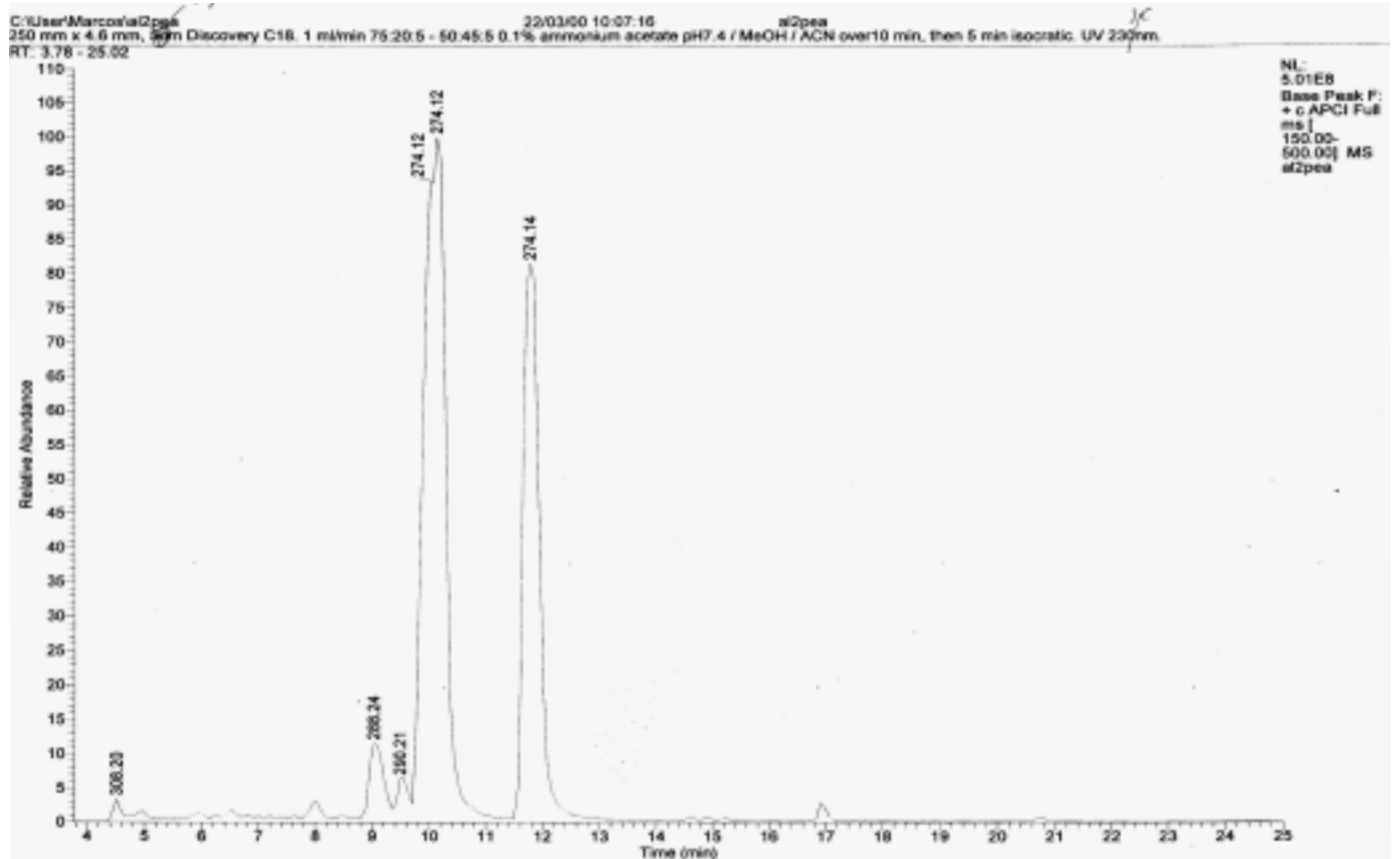


Figura 4. Cromatograma del análisis de CL/EM de la fracción de alcaloides libres del extracto etanólico de pétalos de *Erythrina americana*.

CONCLUSIONES

En el cáliz se identificó un mayor número de alcaloides del tipo eritranano en comparación con los pétalos, en ambas estructuras florales el perfil fue diferente. Los alcaloides identificados en el cáliz fueron: tres alcaloides del tipo lactónico, tres del tipo diénico y uno no identificado. En la corola se observó la presencia de tres alcaloides del tipo lactónico y dos del tipo diénico. No se observó la presencia de los alcaloides-n-óxido de esqueleto eritranano. Tampoco se observó la presencia de alcaloides del tipo alquénico.

El uso de las flores en la preparación de diversos platillos tradicionales, puede ocasionar un efecto tranquilizante y sedante en los consumidores, por la presencia de los alcaloides lactónicos α - y β -eritroidina identificados en el presente estudio.

El método de análisis por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas permitió detectar las estructuras de alcaloides que en trabajos previos no se habían identificado en flores de esta especie.

LITERATURA CITADA

- AGUILAR, M. I.; GIRAL, F.; ESPEJO, O. 1981. Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. *Phytochemistry* 20: 2061-2062.
- AMER, M. E. 1991. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. *Journal of Natural Products* 54: 329-363.
- BARRERA, N. 1994. *Erythrina edulis*: multipurpose tree for the tropical highlands. Nitrogen Fixing Tree Association (NFTA). Ed. NFT Highlights, NFTA 94-01, Hawaii, USA. pp. 1-2.
- BOAR, R. B.; WIDDOWSON, D. A. 1970. Mass spectra of the *Erythrina* alkaloids: a novel fragmentation of the spiran system. *Journal Chemical Society B*: 1591-1595.
- CRAIG, L. E. 1955. *Erythrina* alkaloids, pp. 265-293. In: *The Alkaloids* Vol. V. R. H. F. Manske; H. L. Holmes (eds.). Academic Press. London, UK.
- GAMES, D. E.; JACKSON, A.H.; KHAN, N. A.; MILLINGTON, D.C. 1974. Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia* 37: 581-588.
- GARCÍA, E. 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México.
- GARCÍA-MATEOS, M. R. 1996. Estudio químico-biológico de los alcaloides de *Erythrina*. Tesis Doctoral, Programa de Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México, México. 165 p.
- GARCÍA-MATEOS, M. R.; LUCAS, B.; ZENDEJAS M.; SOTO-HERNÁNDEZ M.; MARTÍNEZ, M.; SOTELO, A. 1996. Variation of total nitrogen, non-protein nitrogen content, types of alkaloids at different stages of development in *Erythrina americana* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4: 2987-2991.
- GARCÍA-MATEOS, M. R.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; KELLY, D. 1998. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 545-551.
- GARCÍA-MATEOS, M. R.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. 2000a. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum* 7: 166-170.
- GARCÍA-MATEOS, M. R.; GARÍN-AGUILAR, M. E.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ VAZQUEZ, M. 2000b. Effect of β -erythroidine and dihidro- β -erythroidine from *Erythrina americana* on rats aggressive behaviour. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 10: 34-37.
- GARÍN, A. M. E.; RAMÍREZ, L.; VALENCIA D.T.G. 1997. Evaluación farmacológica de dos fracciones alcaloideas de semillas de *Erythrina americana*, pp. 6-15. In: *Productos Naturales*. Vol 3. Perspectivas Biotecnológicas. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. D.F., México.
- HARGREAVES, R. T.; JOHNSON, R.D.; MILLINGTON, D.S.; MOSSAL, D. S.; BREAVERS, M.H.; BECKER, W.; YOUNG, L.; RINEHART, K.L. JR. 1974. Alkaloids of american species of *Erythrina*. *Lloydia* 37: 569-580.
- HASTINGS, R. B. 1990. Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae Papilionoideae. Part One. *Economic Botany* 44: 336-348.
- KASS, D. L. 1994. *Erythrina* species- Pantropical multipurpose tree legumes, pp. 84-96. In: *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture*. R. C. Gutteridge; H. M. Shelton (eds.). Wallingford, UK.
- LOZOYA, X.; LOZOYA, M. 1982. Flora Medicinal de México. 1. Plantas Indígenas. Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS. D.F., México. 309 p.
- NEILL, D. A. 1993. Botany and ecology, pp. 2-6. In: *Erythrina Production and Use: A Field Manual*. S. B. Westley; B. Sidney (eds.) Nitrogen Fixing Tree Association (NFTA). Hawaii, USA.
- PAYNE, L. G. 1991. The alkaloids of *Erythrina*: Clonal evaluation and metabolic fate. Ph. D. Thesis. Department of Chemistry. Louisiana State University. USA. 160 p.
- PAYNE, L. G.; FOLEY, J. P. 1992. Gas chromatography and mass spectrometry of *Erythrina* alkaloids from the foliage of genetic clones of three *Erythrina* species, pp. 85-99. In: *Chromatography and Pharmaceutical Analysis*. Ed. American Chemical Society Symposium Series No. 512. American Chemical Society, Washington, USA.
- SOTELO, A.; SOTO, M.; LUCAS, B.; GIRAL, F. 1993. Comparative studies of the alkaloidal composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of detoxified seeds. *Journal Agricultural Food Chemistry* 41: 2340-2343.