

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CHIẾT THU HỒI MANGOSTIN TỪ VỎ QUẢ MĂNG CỤT

Đến tòa soạn 05-03-2021

Ngô Văn Anh, Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Thị Hà

Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMMARY

ASSESSMENT OF EXTRACTION EFFICIENCY TO RECOVER MANGOSTEEN FROM MANGOSTEEN FRUIT PERICARP

Mangosteen pericarp makes up around 65% of the fruit weight, it contains many xanthone derivatives, of which α - mangostin, β - mangostin and γ - mangostin counted the highest content. Number of studies have proved that, mangostin extracted from mangosteen pericarp has some biological activities such as antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-cancer. This derivative is used in the prevention and treatment of many diseases such as infections, diarrhea, and jaundice especially in supporting cancer treatment. In this study, extraction conditions and factors affecting mangostin extract with ethanol 50 and 96% solvents were investigated. The results showed that the optimal extraction conditions: solvent was ethanol 96%, extraction time was 24 hours, the solid/liquid ratio was 1: 8 (w/v) and the temperature was 40°C. n-hexane, ethyl acetate and acetone were used to get purified extracts with silicagel packed column chromatography. The results showed that purified mangostin recover performance reached 70.11 and 12.06%, respectively, accountable by raw extract and the initial raw materials.

Key words: Mangosteen fruit pericarp, mangostin, ethanol solvent, extraction.

1. MỞ ĐẦU

Vỏ quả măng cụt được sử dụng rộng rãi trong y học dân gian chữa các bệnh như nhiễm trùng, tiêu chảy, lỵ, vàng da... Vỏ quả măng cụt chứa các xanthone, flavonoid, triterpenoid... đặc biệt là các dẫn xuất của xanthone (hợp chất thuộc nhóm chống oxy hóa, có nguồn gốc thực vật) có đặc tính giúp vết thương mau lành, chống oxy hóa, giảm đau, kháng khuẩn... Trong các xanthone được tìm thấy từ vỏ quả măng cụt, thì dẫn xuất mangostin là hợp chất rất được quan tâm nghiên cứu do có tác dụng chống oxy hóa, có tính kháng khuẩn, kháng viêm, kháng nấm, chống dị ứng và có tác dụng chống ung thư [6,7,8,12,14,16]. Vỏ quả măng cụt cũng được chế biến thành các loại thức uống thơm ngon như trà hay các sản phẩm làm đẹp. Lượng vỏ quả chiếm 65% khối lượng quả [8] và lượng

tiêu thụ quả măng cụt ngày càng tăng do vậy lượng vỏ thải cũng rất lớn đòi hỏi cần có biện pháp xử lý, tận dụng để giảm nguy cơ gây ô nhiễm, ảnh hưởng đến môi trường và tăng cường hiệu quả kinh tế.

Nghiên cứu chiết xuất mangostin đã được một số nhóm nghiên cứu tiến hành ở Việt Nam. Trần Thu Hương và nnk (2015) đã lựa chọn 3 dung môi để chiết mangostin. Kết quả cho thấy dung môi metanol và etanol cho hiệu quả chiết xuất cao, tương ứng đạt 7,5 và 6,7% [2]. Đào Hùng Cường và Đỗ Thị Thúy Vân (2010) tiến hành nghiên cứu chiết tách và xác định các xanthone từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L.). Trong nghiên cứu này đã so sánh điều kiện chiết và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết mangostin trong dung môi

etanol bằng 2 phương pháp đun hồi lưu cách thủy và chiết Soxhlet và chỉ ra đun hồi lưu cách thủy là tối ưu [1]. Đỗ Thanh Xuân và nnk (2011) đã sử dụng etanol để phân tách α -mangostin và γ -mangostin tinh khiết từ vỏ quả măng cụt là. Ngoài ra các tác giả cũng đã thử hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa của cao chiết và các chất tinh khiết [4]. Trong nghiên cứu của Đỗ Thị Tuyên và nnk (2012), đã tách được α -mangostin từ dịch chiết vỏ măng cụt bằng etanol và sử dụng sắc ký cột để tinh sạch mangostin. Hoạt chất α -mangostin tinh sạch có khả năng ức chế vi khuẩn B. Subtilis XL62. Tuy nhiên, hiệu suất chiết xuất mangostin từ vỏ quả măng cụt vẫn chưa đáp ứng với qui mô thực tế. Trong nghiên cứu này đã nghiên cứu lựa chọn điều kiện chiết tối ưu thành phần mangostin từ vỏ quả măng cụt bằng etanol và tinh sạch cao chiết để đánh giá được hiệu suất thu hồi mangostin.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị, máy:

Vỏ quả măng cụt (tươi) được loại tạp chất, sấy khô ở 70°C, nghiền nhỏ (d=1mm) và bảo quản kín, khô.

Dung môi chiết sử dụng C_2H_5OH 50 và 96% công nghiệp; etyl axetat, axeton, n-hexan, silicagel 60 (0,063 – 0,2mm, Merck).

Phương pháp tinh sạch mangostin và xác định nhóm đặc trưng: sử dụng sắc ký cột (thủy tinh, dài 25cm, d=2cm), pha tĩnh rắn silicagel 60 (cỡ hạt 0,063-0,200mm, Merck), dung môi rửa giải n-hexan.

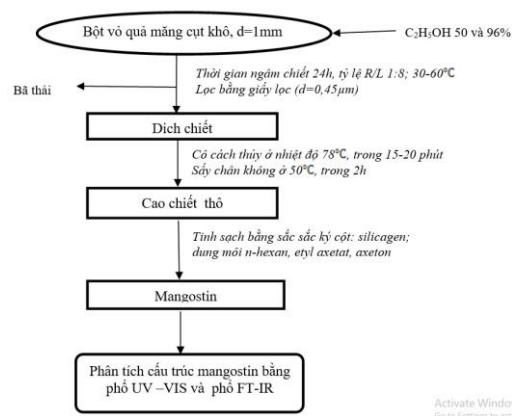
Phân tích hàm lượng mangostin tách chiết và các thành phần (nhóm đặc trưng) trong sản phẩm tinh sạch sử dụng quang phổ UV-VIS (UH5300 Hitachi); Phổ hồng ngoại FTIR (NICOLET iS500).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khảo sát tối ưu điều kiện tách chiết từ bột vỏ quả măng cụt

Tiến hành khảo sát điều kiện tách chiết

mangostin, quá trình khảo sát được tiến hành theo quy trình.



Hình 1. Sơ đồ chiết tách, tinh sạch và phân tích đặc tính cấu trúc của mangostin

Chiết cao măng cụt thô:

Lấy 20g bột vỏ quả măng cụt khô ngâm với 160ml C_2H_5OH 50 hoặc 96% trong thời gian khác nhau (1-24h) ở nhiệt độ 30; 40; 50 và 60°C. Dịch ngâm chiết đem lọc, cô cách thủy ở nhiệt độ 78°C trong 15-30 phút để bay hơi dung môi sau đó đi sấy khô chân không ở 50°C trong 2h thu đến khối lượng không đổi được cao chiết thô.

Lấy 1g cao măng cụt thô hoà tan vào 5ml nước cất sau đó chiết lần lượt với n-hexan (6ml x 3 lần) và etyl axetat (6ml x 3 lần) [2]. Dịch chiết etyl axetat được tách phân đoạn trên cột sắc ký sử dụng silicagel: (1) rửa giải loại nhóm chất kém phân cực bằng dung môi n-hexan; (2) rửa giải nhóm xanthone bằng các hệ dung môi n-hexan:axeton với tỷ lệ 30:1; 20:1 và 10:1. Dịch chiết thu ở từng phân đoạn được cô để thu cao chiết sạch. Đo phổ UV-VIS để xác định mangostin ở bước sóng cực đại và phổ hồng ngoại FTIR để xác định các nhóm chức (liên kết) đặc trưng có trong dẫn xuất mangostin.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

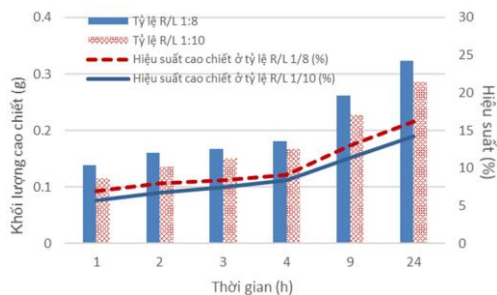
3.1. Nghiên cứu tối ưu điều kiện tách chiết bằng dung môi etanol

Lựa chọn dung môi

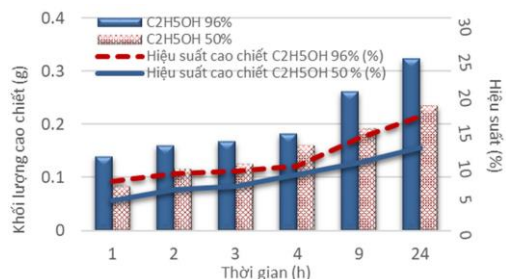
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi C_2H_5OH 96% khảo sát là 1:8, 1:10 (w/v) ở nhiệt độ chiết ở 50°C với thời gian ngâm chiết trong khoảng 1-24h. Các thí nghiệm được tiến hành 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được lượng

cao chiết cao hơn ở tỷ lệ 1:8 (Hình 2).

Tiến hành xác định dung môi chiết phù hợp sử dụng C_2H_5OH 50 và 96%; tỷ lệ R/L 1:8 (w/v); ở nhiệt độ $50^\circ C$; trong 1-24h thu được kết quả ở Hình 3.



Hình 2. Kết quả xác định tỷ lệ R/L ngâm chiết tối ưu



Hình 3. Kết quả xác định lựa chọn dung môi chiết tối ưu

Hình 3 cho thấy khi sử dụng C_2H_5OH 96% cho lượng cao măng cụt thô lớn hơn đáng kể so với dung môi C_2H_5OH 50% với cùng thời gian ngâm chiết thay đổi trong khoảng 1-24h. Kết quả đo hấp thụ quang của dịch chiết cũng khẳng định kết quả này. Trong các nghiên cứu tiếp theo sẽ sử dụng C_2H_5OH 96%.

Trong các nghiên cứu trước, dung môi thường được lựa chọn để chiết mangostin từ vỏ quả măng cụt là etyl axetat, metanol; hexan [3; 11; 19; 23; 25; 28], trong đó etyl axetat cho hiệu quả chiết tốt hơn so với etanol. Theo Trần Thu Hương và nnk (2015), khi ngâm chiết vỏ quả măng cụt sử dụng metanol cho hàm lượng cao chiết là 7,5% so với 6,7% khi chiết với dung môi etanol [2]. Theo Ghasemzadeh và nnk (2018), hiệu suất chiết mangostin từ vỏ quả măng cụt sử dụng dung môi etyl axetat là 46,25% trong khi chiết với dung môi etanol cho hiệu suất chiết là 26% [6]. Liza Pratiwi và nnk (2017) đã sử dụng một số dung môi để chiết và định lượng α - mangostin trong vỏ quả

măng cụt. Kết quả cho thấy etyl axetat cho hiệu quả cao nhất với hàm lượng α -mangostin 33,61%, trong khi etanol đạt 8,73% [26].

Lựa chọn thời gian và nhiệt độ ngâm chiết

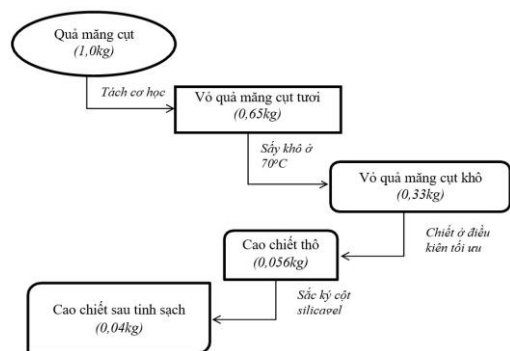
Nghiên cứu xác định thời gian ngâm chiết phù hợp với khoảng 1-24h cho thấy thời gian càng tăng lượng mangostin chiết được càng lớn. Sau thời gian chiết 24h, lượng cao chiết thô thu được lớn nhất 0,4022g đạt hiệu suất 20,11%. Tiến hành chiết ở các nhiệt độ 30; 40; 50 và $60^\circ C$ sử dụng C_2H_5OH 96%; tỷ lệ R/L 1:8 (w/v); thời gian 24h. Kết quả cho thấy lượng cao chiết ở $60^\circ C$ cho lượng cao chiết thô cao nhất đạt 0,3218g, hiệu suất 16,09%. Tuy nhiên, khi đánh giá chi tiết chi phí hiệu quả có thể lựa chọn nhiệt độ chiết ở $40^\circ C$ cho qui mô thực tế do mức chênh lệch giữa các nhiệt độ không đáng kể.

Kết quả về thời gian chiết cũng phù hợp với nghiên cứu của Kusmayadi và nnk (2018), khi tăng thời gian chiết kéo dài đến 48h, hiệu quả tách xanthone cao nhất với dung môi axeton. Trong khi đó thành phần chất chống oxy hóa lại thu được cao hơn với thời gian chiết ngắn hơn (24h bằng etanol) [8].

Ngâm chiết bột vỏ quả măng cụt ở điều kiện tối ưu trong nghiên cứu (C_2H_5OH 96%, tỷ lệ R/L 1:8 (w/v), $60^\circ C$, 24h) thu được lượng cao chiết thô trong khoảng 3,4-3,5g; tương ứng hiệu suất thu cao đạt 17,0-17,25%, cao hơn đáng kể so với nghiên cứu của Đỗ Thị Tuyên và nnk (2012). Trong đó đã tiến hành chiết mangostin sử dụng C_2H_5OH 95%, nhiệt độ $60^\circ C$, thời gian 4h với tỷ lệ R/L 1:3, hiệu quả thu cao măng cụt thô là 12,8%. Tuy nhiên, nghiên cứu này sử dụng tỷ lệ R/L cao hơn và thời gian ngâm chiết dài hơn. Do vậy cần có đánh giá đầy đủ hơn để lựa chọn điều kiện phù hợp đảm bảo đồng thời hiệu quả thu mangostin và chi phí kinh tế R/L cao hơn và thời gian ngâm chiết dài hơn kiện phù hợp đảm bảo đồng thời hiệu quả thu mangostin và chi phí kinh tế R/L cao hơn và thời gian ngâm chiết dài hơn. Do vậy cần có đánh giá đầy đủ hơn để lựa chọn điều kiện phù hợp đảm bảo đồng thời hiệu quả thu mangostin và chi phí kinh tế.

3.2. Tinh sạch mangostin

Cao thô chiết thường chứa nhiều chất, thành phần dầu béo và các tạp chất khác ngoài các xanthone. Để làm sạch và tăng hàm lượng nhóm xanthone trong cao chiết, hòa tan cao chiết thô với nước để loại bỏ các chất tan được trong nước, sau đó chiết bằng n-hexan để loại bỏ các chất béo, cuối cùng chiết với dung môi etyl axetat để thu phần lớn xanthone. Để làm sạch xanthone, dịch chiết bằng etyl axetat được đưa qua cột sắc ký nhồi silicagel, rửa giải với hệ dung môi n-hexan:axeton 10:1 (v/v) [2] thu được khoảng 0,7g các xanthone/g cao chiết thô. Hiệu suất thu hồi xanthone đạt tương ứng 70,11 và 12,06% tính theo cao măng cụt thô và theo khối lượng bột vỏ quả măng cụt (Hình 4). Trong nghiên cứu của Narasimhan và nnk (2017) đã lựa chọn dung môi chiết xuất α -mangostin là etyl axetat và thu được 26% chiết xuất thô etyl axetat. Dịch chiết thô được phân tích bằng sắc ký cột với etyl axetat và hexan thu được α - mangostin tinh khiết và độ tinh khiết được xác nhận là 95% khi sử dụng HPLC [13]. Nhìn chung, dung môi etanol cho hiệu quả chiết thấp hơn tuy nhiên về mặt môi trường etanol an toàn hơn theo hướng hóa học xanh.



Hình 4. Phân tích dòng khối lượng theo qui trình chiết và tinh sạch mangostin

3.3. Kết quả đánh giá đặc tính cấu trúc mangostin

Phổ UV-VIS của cao chiết thô và dịch chiết tinh sạch

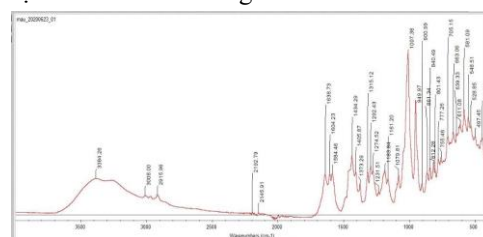
Lấy 1ml dịch chiết bằng C_2H_5OH 96% sau khi lọc qua giấy lọc (0,45 μ m), pha loãng 100 lần bằng nước cất, đo phổ UV-VIS ở 200 – 800nm để xác định bước sóng hấp thụ cực đại. Phổ đồ

xuất hiện 3 đỉnh hấp thụ cực đại ở 242; 312 và 318nm, phù hợp với phổ chuẩn của dẫn xuất mangostin và phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu trước [5,11]. Theo Muchtaridi và nnk (2018), các dẫn xuất mangostin có thể xuất hiện ở bước sóng: 248 và 318nm. Trong nghiên cứu của Ahmad và nnk (2013), phổ UV-VIS của mangostin xuất hiện các pic cực đại (đặc trưng) ở bước sóng 242 và 317nm. Phổ UV-VIS của dịch chiết sau khi tinh sạch bằng sắc ký cột sử dụng silicagel cũng xuất hiện đỉnh hấp thụ cực đại của dịch chiết etanol sau tinh sạch ở 244 và 316nm. Kết quả phổ UV-VIS của dịch chiết sau tinh sạch cho phổ đồ không còn xuất hiện các pic nhiễu và có độ phân giải tốt hơn so với phổ đồ của cao chiết thô do đã loại bỏ được tạp chất trong cao chiết thô.

Phân tích phổ FTIR của dịch chiết tinh sạch

Tiến hành phân tích phổ hồng ngoại (FTIR) để xác định nhóm chức đặc trưng có trong hợp chất xanthone và dẫn xuất thu được phổ đồ Hình 5.

Từ phổ đồ FT-IR cho thấy xuất hiện các đỉnh đặc trưng (Bảng 1) so với một số pic điển hình của xanthone được đưa ra trong nghiên cứu của Machmudah và nnk (2015), thấy được các pic đặc trưng tương tự khá rõ rệt. Từ phổ FT-IR (Hình 6) so với kết quả nghiên cứu phổ hồng ngoại của mangostin. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Ahmad và nnk (2013) (Bảng 1) thấy rằng ở nghiên cứu này xuất hiện hầu hết các nhóm chức đặc trưng của dẫn xuất mangostin: OH, C-C liên hợp C=O, dao động biến dạng của OH⁻, C-O-C, C-H_n. Phổ đồ FT-IR và so với các nghiên cứu trước, có thể kết luận các hợp chất xanthone đã được chiết tách và tinh sạch với hiệu suất 12,06% so với bột vỏ quả măng cụt khô và định tính được sự xuất hiện dẫn xuất của mangostin.



Hình 5. Phổ FTIR của các xanthone trong cao chiết sau tinh sạch

Bảng 1. Một số nhóm chức điển hình của xanthone trong mangostin

Nhóm chức	Số sóng của nghiên cứu này (cm ⁻¹)	Số sóng (cm ⁻¹) của các xanthone trong nghiên cứu [9]	Số sóng (cm ⁻¹) của mangostin trong nghiên cứu [5]
OH ⁻	3384	3550-3200	3256
C-H _n	2915	2860-2970	2856- 2952
Dao động biến dạng của OH ⁻	1373	1378	1378
C=O	1584	1510-1584	1460
C=C liên hợp C=O	1638	1632-1642	1639
O-CH ₃	1434	1470-1430	-
O-H	1434, 1405	1440-1400	-
C-H	1405	1402	-
C-O-C	1231	1232	-
C-O-C	1079	1170-1082	1077
O-H	1107	1108	-
C-O	-	1215, 1060	-
C-H	700-900	700-900	-
C-C	700-650	700-650	-

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được điều kiện chiết tối ưu bằng C₂H₅OH 96%, tỷ lệ R/L 1:8 (w/v); 60°C và thời gian chiết là 24h. Lượng cao măng cụt thô chiếm 17,21% so với bột vỏ quả khô.

Đã tinh sạch được các xanthone bằng sắc ký cột Sử dụng silicagel với hiệu suất thu hồi xanthone tinh sạch đạt tương ứng 70,11 và 12,06% so với khối lượng cao măng cụt thô và khối lượng bột vỏ quả măng cụt khô.

Phân tích xác định đặc trưng cấu trúc của dẫn xuất mangostin bằng phổ tử ngoại UV-VIS cho pic hấp thụ cực đại đặc trưng của mangostin là 242 và 318nm, phù hợp với phổ chuẩn. Kết quả chụp phổ hồng ngoại FT-IR cho nhóm chức OH⁻ của phenol, CH_n của vòng thơm, C=O của vòng benzen, C-C liên hợp C=O, dao động biến dạng của OH⁻ đặc trưng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đào Hùng Cường, Đỗ Thị Thúy Vân (2010) Nghiên cứu chiết tách và xác định xanthones từ vỏ quả măng cụt (*Garcinia mangostana* L), *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 5 (40), 167.
- Trần Thu Hương, Nguyễn Thành Trung, Lê Huyền Trâm, Đinh Thị Thu Hiền, Hồ Đức

Cường, Nguyễn Tiến Đạt, Phạm Thanh Bình (2015), Nghiên cứu phương pháp chiết tách, nâng cao hàm lượng nhóm xanthone từ dịch chiết vỏ măng cụt, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 53(4D), 254.

3. Đỗ Thị Tuyên, Mai Thị Hiền, Phí Thị Mơ, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Quyền Đình Thi (2012) Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của hoạt chất α -mangostin tách ra từ vỏ măng cụt *Garcinia Mangostana* L. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(1), 21.

4. Đỗ Thanh Xuân, Phùng Văn Trung, Trần Văn Quốc, Nguyễn Ngọc Hạnh (2011). Phân lập hai hợp chất tinh khiết từ vỏ trái măng cụt (*Garcinia Mangostana* L) và thử hoạt tính của chúng, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, số 18a, 153.

5. M. Ahmad, B. M. Yamin, A. M. Lazim, 2013. A study on dispersion and characterisation of α -mangostin loaded pH sensitive microgel systems, *Chemistry Central Journal*, 7(85), 150.

6. Ghasemzadeh, H. Z. E. Jaafar, A. Baghdadi, A. Tayebi-Meigooni (2018). Alpha-Mangostin-Rich Extracts from Mangosteen Pericarp: Optimization of Green Extraction Protocol and

Evaluation of Biological Activity. *Molecules*, 23(8), 1852.

7. H. A. Jung, B. N. Su, W. J. Keller, R. G. Mehta, A. D. Kinghorn (2006). Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem*, 54(6), 2077.

8. Kusmayadi, L. Adriani, A. Abun, M. Muchtaridi, U. H. Tanuwiria (2018). The effect of solvents and extraction time on total xanthone and antioxidant yields of mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.) extract. *Drug Invention Today*, 10(12), 2572.

9. S. Machmudah, Q. Y. A. Shiddiqi, A. D. Kharisma, Widiyastuti, Wahyudiono, H. Kanda, S. Winardi and M. Goto (2015). Subcritical water extraction of xanthone from mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn) Pericarp, *Advanced Chemical Engineering*, 5(1), 117.

10. M. Muchtaridi, M. Prasetyo, N. M. Saptarini, F. A. Saputri (2018) High performance liquid chromatography for α -mangostin analysis in mangosteen pericarp extract for routine analysis with photodiode array detector. *Rasayan. J. Chem*, 11(3), 973.

11. M. Muchtaridi, N. A. Puteri, T. Milanda, I. Musfiroh (2017). Validation Analysis Methods of α -Mangostin, γ -Mangostin and Gartanin Mixture in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Fruit Rind Extract from West Java with HPLC. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7 (10), 125.

12. K. Nakatani, M. Atsumi, T. Arakawa, K.

Oosawa, S. Shimura, N. Nakahata, Y. Ohizumi (2002). Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant, *Biol Pharm Bull*, 25(9), 1137.

13. S. Narasimhan, S. Maheshwaran, I. A. Abu-Yousef, A. F. Majdalawieh, J. Rethavathi, P. E. Das, P. Poltronieri (2017). Anti-Bacterial and Anti-Fungal Activity of Xanthenes Obtained via Semi-Synthetic Modification of α -Mangostin from *Garcinia mangostana*, *Molecules*, 22(2), 275.

14. Y. Sakagami, M. Iinuma, K. G. N. P. Piyasena, H. R. W. Dharmaratne (2005), Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics, *Phytomedicine*, 12(3), 203.

15. N. Wathoni, A. Rusdin, K. Motoyama, I. M. Joni, R. Lesmana, M. Muchtaridi (2020). Nanoparticle Drug Delivery Systems for α -Mangostin, *Nanotechnology Science and Applications*, 13, 23.

16. B. Zhang, G. Yu, Y. Shen (2018). The naturally occurring xanthone α -mangostin induces ROS-mediated cytotoxicity in non-small scale lung cancer cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1090.

17. H. Zhang, Y. Tan, L. Zhao, L. Wang, N. Fu, S. Zheng, X. Shen (2020). Anticancer activity of dietary xanthone α -mangostin against hepatocellular carcinoma by inhibition of STAT3 signaling via stabilization of SHP1, *Cell Death & Disease*, 11(63), 2.