

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC TRONG MỘT SỐ DỊCH CHIẾT CỦA DẦU RÁI Ở ĐẠI LỘC - QUẢNG NAM

DETERMINATION OF THE COMPOUNDS EXTRACTED FROM DIPTEROCARPUS ALATUS IN DAILOC DISTRICT, QUANGNAM PROVINCE

Đào Hùng Cường¹, Nguyễn Thị Thu Phương¹, Lê Thị Đồng²

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng; Email: pyrene2016@gmail.com

²Học viên CH ngành Hóa hữu cơ, khóa 2011-2013, Đại học Đà Nẵng

Tóm tắt: Bài báo này công bố kết quả hàm lượng và thành phần hóa học của dầu rái. Với phương pháp chiết tách bằng dung môi hữu cơ và phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC/MS đã định danh được 19 cấu tử trong dịch chiết ethyl acetate, 17 cấu tử trong dịch chiết toluene, 20 cấu tử trong dịch chiết methanol. Trong 3 dịch chiết dung môi hữu cơ, có một số cấu tử giống nhau với thành phần định danh khá lớn như 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-tetramethyl từ 74,94 – 76,87%; 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa [1,2]benzene, 2,3,3a,3b,4,5,6,7octahydro-7-methyl-3- từ 2,63 – 4,08%; Isocaryophyllene từ 3,82 – 4,78%; (-)-Spathulenol từ 1,78 – 1,90%; Velleral từ 0,91 – 1,97%. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học phần kết tinh của cặn dầu rái trong dịch chiết methanol cho thấy hầu hết cấu tử thu được đều khác với các cấu tử trong 3 dịch chiết. Trong tinh thể kết tinh đã định danh được 49 cấu tử, trong đó cấu tử có hàm lượng cao nhất Lupeol chiếm đến 12,67%.

Từ khóa: Dầu rái; Dipterocarpus alatus; Dipterocarpaceae; hoạt tính sinh học; dung môi hữu cơ

1. Đặt vấn đề

Dầu rái là một trong số cây họ dầu (Dipterocarpaceae) có giá trị nhất về mặt kinh tế, y học, công nghiệp. Dầu rái là một loại nhựa rất bền về mặt hoá học, chịu nước, có khả năng chống thấm [1, 2]. Người dân vùng Đông Nam Châu Á đã dùng loại dầu này để làm sơn trám thuyền, sơn quét các vật dụng bằng mây, tre, gỗ, nứa... Dầu rái có hoạt tính sinh học khá cao, chữa một số bệnh về viêm da, lở loét, mụn nhọt, nước ăn chân, bệnh vẩy nến, eczema... Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu cây dầu rái trên thế giới. Tuy nhiên, việc nghiên cứu dầu rái trong nước còn ít và cũng giới hạn ở mức độ mô tả về một số đặc điểm của cây, phần lớn dựa trên kinh nghiệm dân gian. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu xác định thành phần hoá học trong một số dịch chiết dung môi hữu cơ của dầu rái ở Đại Lộc - Quảng Nam, nhằm góp phần cung cấp thêm các dữ liệu về thành phần hóa học, đồng thời tăng thêm ý nghĩa sử dụng trong nghiên cứu và trong đời sống ở Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu dầu rái

Dầu rái được khai thác từ cây dầu rái ở Đại Lộc - Quảng Nam. Cây dầu rái có khoảng từ 2 năm tuổi trở lên là có thể cho khai thác, cây càng lâu năm thì lượng dầu càng nhiều. Từ cây dầu rái lớn, có chu vi khoảng 40 cm, người ta dùng một dụng cụ là "cái dờn" vạt miệng cây rồi hơ lửa để dầu rái chảy ra. Nếu cây to thì người ta có thể vạt từ 2 đến 3 miệng ở hai bên, thường không đối xứng nhau để dầu rái không chảy trùng nhau. Theo kinh nghiệm, người dân thường chặt

Abstract: This article will reveal the content and chemical composition of Dipterocarpus alatus. Nineteen compounds of the ethyl acetate extract, seventeen constituents of the toluene extract and twenty constituents of the methanol extract of Dipterocarpus alatus were identified by using organic solvents for extraction and gas chromatography with mass spectrometry GC/MS. There were some similar constituents in the three extracts of organic solvents with high percentage such as 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-tetramethyl from 74,94% to 76,87%; 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa [1,2]benzene, 2,3,3a,3b,4,5,6,7octahydro-7-methyl-3- from 2,63% to 4,08%; Isocaryophyllene from 3,82% to 4,78%; (-)-Spathulenol from 1,78% to 1,90%; Velleral from 0,91% to 1,97%. Chemical components from crystallization of sediment methanol were found to differ from those of three solvent extracts above. There are 49 compounds in the crystal and the highest percentage compound found was Lupeol.

Key words: Keruing Log; Dipterocarpus alatus; Dipterocarpaceae; bioactive; organic solvent

cây bông vang hoặc cây dẻ chẻ nhỏ làm thành bó đuốc, rồi hơ lên thân cây dầu rái sẽ có độ nóng lý tưởng làm dầu rái chảy nhiều. Theo khảo sát của chúng tôi, dầu rái có độ ẩm trung bình là 34,753% và hàm lượng tro là 3,792%, hàm lượng kim loại nặng Cu, Pb, As được xác định bằng phương pháp hấp thụ nguyên tử AAS cho kết quả tương ứng là 30 mg/kg Cu; 2 mg/kg Pb và 1mg/kg As. Điều này cho thấy hàm lượng các kim loại nặng trong dầu rái không ảnh hưởng đến ô nhiễm môi trường.

2.2. Chiết tách bằng dung môi hữu cơ

Dung môi hữu cơ được lựa chọn để chiết tách các cấu tử trong dầu rái là ethyl acetate, toluene và methanol.

Chiết soxhlet dầu rái với các điều kiện sau: Bộ chiết soxhlet có thể tích 500ml, 50 gam dầu rái, 160ml dung môi ethyl acetate, nhiệt độ đun 85°C, chiết đến khi dung môi trên phần ống chiết có màu vàng rất nhạt, thu được dịch chiết ethyl acetate. Phần dịch chiết này được đem cất đuổi dung môi và sấy khô, thu được phần cặn chiết ethyl acetate. Phần cặn chiết ethyl acetate tiếp tục được chiết soxhlet với 160 ml toluene ở nhiệt độ 110°C. Sau khi cất quay chân không đuổi dung môi và làm khô, phần cặn chiết này được đem chiết soxhlet lần thứ ba với 160 ml methanol ở 80°C. Ba mẫu dịch chiết thu được từ ba dung môi chiết được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ với điều kiện sau: Hệ thống GC-MS MS Waters với cột tách mao quản DB-5MS, kích thước: 30m × 0,25mm × 0,25µm, khí mang He, dung môi CH₂Cl₂; ghép máy MS EI⁺ kèm ngân hàng dữ liệu và theo chương trình nhiệt độ: từ 5°C đến 300°C (5 phút), injector 250°C và detector 500.

2.3. Kết tinh cần dầu rái được chiết từ dung môi methanol

Chiết soxhlet dầu rái với các điều kiện sau: Bộ chiết soxhlet có thể tích 500 ml, 60 gam dầu rái, 180 ml dung môi methanol, nhiệt độ đun 80°C trong 10h thu được dịch chiết (dịch chiết 1). Dịch chiết 1 thu được để nguội và loại dung môi bằng cất quay chân không đến còn 1/3 thể tích (dịch chiết 2). Phần dịch chiết 2 này được đem ly tâm tách phần dịch trong phía trên, được hỗn hợp chất rắn phía dưới ở dạng sánh. Sấy khô chất rắn trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C đến ngày thứ 15, thu được chất khô màu vàng nâu, nghiền chất khô này cân được 6,47gam. Dùng 3 gam rắn thử các dung môi kết tinh: n-hexane, diethyl ether, n-butyl alcohol, ethanol, chloroform, ethylacetate. Chất rắn tan nhanh ở điều kiện thường với các dung môi n-butyl alcohol, diethyl ether, ethanol, chloroform (DM1) nhưng không tan với dung môi ethyl acetate và n-hexane (DM2). Như vậy, việc làm sạch bằng kết tinh lại sẽ khó thực hiện đối với DM1, tiếp tục đun nóng các DM2. Dung môi ethyl

acetate cho thấy khi đun nóng thì chất rắn tan và để nguội thì có tinh thể kết tinh lại. Tuy nhiên, khi đun nóng hỗn hợp rắn trong dung môi n-hexane thì chất rắn vẫn không tan. Do đó, chúng tôi chọn ethyl acetate cho quá trình làm sạch kết tinh dầu rái. Lượng 3,47 gam chất rắn được cho vào cốc 100 ml, thêm 34,7 ml ethyl acetate, đun cách thủy, hòa tan và lọc nóng dung dịch được dịch kết tinh. Dịch kết tinh này được làm lạnh từ 2 – 7°C trong 1 ngày thu được hỗn hợp kết tinh, tiếp tục sấy trong 19 ngày được hỗn hợp tinh thể khô có màu vàng nâu. Phân tích GC/MS hỗn hợp tinh thể khô này với điều kiện sắc ký theo mục 2.2.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thành phần hóa học của dịch chiết dầu rái trong các dung môi hữu cơ

Sử dụng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ đã xác định được thành phần hóa học trong dịch chiết dầu rái (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần hóa học trong dịch chiết dung môi hữu cơ của dầu rái

TT	Tên cấu tử định danh	% Diện tích pic phát hiện các hợp chất trong các dung môi		
		Ethyl acetate	Toluene	Methanol
1	Germacrene B	0,20	0,10	0,19
2	Copaene	0,42	0,62	0,53
3	Cyclohexane,2,4-diisopropenyl-1-methyl-1-vinyl-, (1S,2R,4R)-	0,93	1,35	1,20
4	2H-2,4a-Methanonaphthalence,1,3,4,5,6,7-Hexahydro-1,1,5,5-tetramethyl-	1,38	1,99	1,78
5	Isocaryophyllene	3,82	4,39	4,78
6	3a,7-Methano-3aH-cyclopentacyclooctene,1,4,5,6,7,8,9,9a-Octahydro-1,1,7a-trimethyl	0,29	0,32	0,30
7	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-tetramethyl	74,94	76,87	75,08
8	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa [1,2]benzene,2,3,3a,3b,4,5,6,7octahydro-7-methyl-3-	4,08	2,63	3,06
9	(+)-Ledene	0,66	0,83	1,28
10	p-Menth-3-ene,2-isopropenyl-1-vinyl-(1S,2R)-(-)-	0,88	0,59	0,97
11	Cadina-3,9-diene	0,50	0,54	0,62
12	Patchulane	0,28	0,33	0,28
13	(-)-Spathulenol	1,90	1,89	1,78
14	12-oxabicyclo 9.1.0 docdeca-3,7-diene,1,5,5,8-tetramethyl-	1,46	1,53	1,24
15	1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl (Ledol)	1,26	0,90	0,75
16	Velleral	1,97	1,23	0,91
17	p-Menth-3-ene,2-isopropenyl-1-vinyl-(1S,2R)-(-)-	0,88	/	/
18	Caryophyllene oxide	1,83	/	1,82
19	Ledol	0,54	/	/
20	1,6,10-Dodecatrien-3-ol-3,7,11-trimethyl-S-(Z)-	/	/	/
21	Farnesol	/	0,38	0,38
22	Alpha.-Bisabolol	/	/	0,35

23	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene (Spathulenol)	/	/	0,24
	Tổng số cấu tử đã định danh được	19	17	20

Nhận xét: Kết quả từ Bảng 1 về thành phần hóa học trong dịch chiết bằng các dung môi hữu cơ của dầu rái cho thấy:

Trong dịch chiết methanol định danh được 20 cấu tử, trong dịch chiết toluene định danh được 17 cấu tử và trong dịch chiết ethyl acetate định danh được 19 cấu tử. Điều này chứng tỏ thành phần cấu tử định danh bằng GC/MS của dịch chiết methanol nhiều nhất nên chúng tôi chọn methanol cho các khảo sát tiếp theo.

Trong ba dịch chiết có chung những cấu tử giống nhau là: Germacrene B; Copaene; Cyclohexane,2,4-diisopropenyl-1-methyl-1-vinyl-, (1S,2R,4R)-; 2H-2,4a-Methanonaphthalence,1,3,4,5,6,7-Hexahydro-1,1,5,5-tetramethyl-; Isocaryophyllene, 3a,7-Methano-3aH-cyclopentacyclooctene,1,4,5,6,7,8,9,9a-Octahydro-1,1,7a-trimethyl-; 1H-Cycloprop[e]azulene,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-tetramethyl; 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene,2,3,3aa,3b,4,5,6,7octahydro-7-methyl-3-;

Ledene; p-Menth-3-ene,2-isopropenyl-1-vinyl-(1S,2R)-(-); Cadina-3,9-diene, Patchulane; Spathulenol. Trong đó, cấu tử đáng quan tâm là Isocaryophyllene. Theo nhiều nghiên cứu đã chỉ ra chất này có hoạt tính chống viêm, chống oxi hóa, kháng sinh, chống ung thư [4].

Trong 3 dịch chiết đều có cấu tử 1H-Cycloprop[e]azulene,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-tetramethyl (alloaromadendrene) với hàm lượng cao nhất. Kết quả xác định có chất Alloaromadendrene trong dịch chiết từ dầu rái hoàn toàn trùng hợp với nghiên cứu đã công bố trước đây của tác giả Hoàng Việt [3].

3.2. Thành phần hóa học phần kết tinh của cặn dầu rái trong methanol.

Sử dụng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ đã xác định được thành phần hóa học hỗn hợp kết tinh dầu rái (Bảng 2).

Bảng 2. Thành phần hóa học của hỗn hợp kết tinh

TT	Tên cấu tử định danh	%	TT	Tên cấu tử định danh	%
1	1á,1áH,10áH-Guaia-5,11-diene	8,61	17	Megastigmatrienone	0,9
2	Aromadendrane (2)	0,48	18	Methyl (z)-5,11,14,17-Eicosatetraenoate	0,42
3	Alpha-Santalol	1,59	19	Phthalic acid, diisooctyl ester	0,8
4	(-)-Spathulenol	0,81	20	Androst-1-en-3-one,4,4-dimethyl-, (5.Ápha)-	0,73
5	Isopatchoulane	0,64	21	Androst-3-ol, 9-methyl-, acetate	0,2
6	Caryophyllene oxide	1,65	22	FW 306	1,03
7	Eudesma-4(14),7(11)-diene	0,98	23	Squalene	0,29
8	1H-Cyclopropa[a]naphthalene,1a,2,3,4,5,6,7,7a,7b-octahydro-1-1,7,7,7a-tetrametyl	0,26	24	Lupeol	12,67
9	1,E-6,Z-10-Hexadecatriene	0,25	25	Taraxasterol	5,92
10	Ermophila-1(10),11-diene	0,48	26	1-Cyclohexene-1-butyraldehyde,a,2,6,6-tetramethyl	0,24
11	2-Pentadecyn-1-ol	1,05	27	1H-Cycloprop E azulen-4-ol,decahydro-1,1,4,7-tetramethyl (Globulol)	0,47
12	2,5-Heptadien-1-ol,6-methoxy-3-methyl-,acetate	0,28	28	(E,E,E)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-1,3,6,10,14-pentaene	0,33
13	Guaia-1(5),7(11)-diene	1,13	29	(-)-Globulol	0,46
14	Santalol	0,94	30	Velleral	0,37
15	Cedr-8(15)-en-9-ol	0,86	31	Cyclobuta 1,2,3,4 dicyclooctene, 1,2,5,6A,6B,7,8,11,12,12A,12B-dodecanydro	0,66
16	Isovellerdol	1,84	32	1H-Cycloprop E azulen-7-ol,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene	2,88

Nhận xét: Kết quả Bảng 2 về thành phần hóa học trong hỗn hợp kết tinh dầu rái cho thấy:

Trong hỗn hợp kết tinh đã định danh được 32 cấu tử, trong đó cấu tử có hàm lượng cao nhất Lupeol chiếm đến

12,67%, bình thường Lupeol chỉ chiếm hàm lượng nhỏ trong các thành phần khác. Lupeol được các nhà khoa học Việt Nam và thế giới nghiên cứu đánh giá cao vai trò của nó và được xem như nguồn dược liệu quý dùng để điều trị bệnh ung thư [5]. Ngoài ra còn có một số cấu tử khác như 1á,1áH,10áH-Guaia-5,11-diene chiếm 8,61%, Taraxasterol chiếm 5,92% và một số cấu tử khác có hàm lượng phần trăm thấp. Vì vậy việc nghiên cứu tách Lupeol là một hướng nghiên cứu khả quan về việc sử dụng nguồn nguyên liệu dầu rái.

4. Kết luận

Bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ GC/MS, chúng tôi đã định danh trong dịch chiết ethylacetate có 19 cấu tử, dịch chiết toluene có 17 cấu tử, dịch chiết methanol có 20 cấu tử. Trong ba dịch chiết đó có một số cấu tử giống nhau và có % phát hiện lớn nhất là 1H-Cycloprop[e]azulene từ 74,94% -76,871H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa [1,2]benzene,2,3,3a,3b,4,5,6,7octahydro-7-methyl-3- từ 2,63 - 4,08%; Isocaryophyllene từ 3,82 - 4,78%; (-)-

Spathulenol từ 1,78 - 1,90%; Velleral từ 0,91 - 1,97%. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học hỗn hợp kết tinh của cặn dầu rái trong dịch chiết methanol cho thấy hầu hết cấu tử thu được đều khác với các cấu tử trong ba dịch chiết. Hỗn hợp kết tinh định danh được 32 cấu tử, trong đó Lupeol chiếm hàm lượng cao nhất đến 12,67%.

Tài liệu tham khảo

- [1] Đào Hùng Cường (1998), "Nghiên cứu thành phần hóa học của dầu rái", *Tạp san Khoa học Đại học Đà Nẵng*.
- [2] Đào Hùng Cường (2004), "Nghiên cứu đánh giá khả năng chống thấm của dầu rái", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 2004.
- [3] Hoàng Việt, Lê Ngọc Thạch, Lê Công Kiệt (2003), "Khảo sát tính dầu từ nhựa dầu của các loài thuộc nhóm Dipterocapus ở miền Đông Nam Bộ", *Hội nghị Hóa học toàn quốc lần thứ IV*.
- [4] Legault J, Pichette A, "Potentiating effect of beta-Caryophyllene on anticancer activity of alpha- Humulene, Isocaryophyllene and Paclitaxel", *J Pharm Pharmacol* 2007 Dec, 59 (12): 1643-7.
- [5] Margareth B.C. Gallo, Miranda J. Sarachine, "Biological Activities of Lupeol", *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2009 Global Science Books.

(BBT nhận bài: 19/09/2013, phản biện xong: 03/10/2013)

1	1,10,11,11-trimethyl-2,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,21,21,22,22,23,23,24,24,25,25,26,26,27,27,28,28,29,29,30,30,31,31,32,32,33,33,34,34,35,35,36,36,37,37,38,38,39,39,40,40,41,41,42,42,43,43,44,44,45,45,46,46,47,47,48,48,49,49,50,50,51,51,52,52,53,53,54,54,55,55,56,56,57,57,58,58,59,59,60,60,61,61,62,62,63,63,64,64,65,65,66,66,67,67,68,68,69,69,70,70,71,71,72,72,73,73,74,74,75,75,76,76,77,77,78,78,79,79,80,80,81,81,82,82,83,83,84,84,85,85,86,86,87,87,88,88,89,89,90,90,91,91,92,92,93,93,94,94,95,95,96,96,97,97,98,98,99,99,100,100,101,101,102,102,103,103,104,104,105,105,106,106,107,107,108,108,109,109,110,110,111,111,112,112,113,113,114,114,115,115,116,116,117,117,118,118,119,119,120,120,121,121,122,122,123,123,124,124,125,125,126,126,127,127,128,128,129,129,130,130,131,131,132,132,133,133,134,134,135,135,136,136,137,137,138,138,139,139,140,140,141,141,142,142,143,143,144,144,145,145,146,146,147,147,148,148,149,149,150,150,151,151,152,152,153,153,154,154,155,155,156,156,157,157,158,158,159,159,160,160,161,161,162,162,163,163,164,164,165,165,166,166,167,167,168,168,169,169,170,170,171,171,172,172,173,173,174,174,175,175,176,176,177,177,178,178,179,179,180,180,181,181,182,182,183,183,184,184,185,185,186,186,187,187,188,188,189,189,190,190,191,191,192,192,193,193,194,194,195,195,196,196,197,197,198,198,199,199,200,200,201,201,202,202,203,203,204,204,205,205,206,206,207,207,208,208,209,209,210,210,211,211,212,212,213,213,214,214,215,215,216,216,217,217,218,218,219,219,220,220,221,221,222,222,223,223,224,224,225,225,226,226,227,227,228,228,229,229,230,230,231,231,232,232,233,233,234,234,235,235,236,236,237,237,238,238,239,239,240,240,241,241,242,242,243,243,244,244,245,245,246,246,247,247,248,248,249,249,250,250,251,251,252,252,253,253,254,254,255,255,256,256,257,257,258,258,259,259,260,260,261,261,262,262,263,263,264,264,265,265,266,266,267,267,268,268,269,269,270,270,271,271,272,272,273,273,274,274,275,275,276,276,277,277,278,278,279,279,280,280,281,281,282,282,283,283,284,284,285,285,286,286,287,287,288,288,289,289,290,290,291,291,292,292,293,293,294,294,295,295,296,296,297,297,298,298,299,299,300,300,301,301,302,302,303,303,304,304,305,305,306,306,307,307,308,308,309,309,310,310,311,311,312,312,313,313,314,314,315,315,316,316,317,317,318,318,319,319,320,320,321,321,322,322,323,323,324,324,325,325,326,326,327,327,328,328,329,329,330,330,331,331,332,332,333,333,334,334,335,335,336,336,337,337,338,338,339,339,340,340,341,341,342,342,343,343,344,344,345,345,346,346,347,347,348,348,349,349,350,350,351,351,352,352,353,353,354,354,355,355,356,356,357,357,358,358,359,359,360,360,361,361,362,362,363,363,364,364,365,365,366,366,367,367,368,368,369,369,370,370,371,371,372,372,373,373,374,374,375,375,376,376,377,377,378,378,379,379,380,380,381,381,382,382,383,383,384,384,385,385,386,386,387,387,388,388,389,389,390,390,391,391,392,392,393,393,394,394,395,395,396,396,397,397,398,398,399,399,400,400,401,401,402,402,403,403,404,404,405,405,406,406,407,407,408,408,409,409,410,410,411,411,412,412,413,413,414,414,415,415,416,416,417,417,418,418,419,419,420,420,421,421,422,422,423,423,424,424,425,425,426,426,427,427,428,428,429,429,430,430,431,431,432,432,433,433,434,434,435,435,436,436,437,437,438,438,439,439,440,440,441,441,442,442,443,443,444,444,445,445,446,446,447,447,448,448,449,449,450,450,451,451,452,452,453,453,454,454,455,455,456,456,457,457,458,458,459,459,460,460,461,461,462,462,463,463,464,464,465,465,466,466,467,467,468,468,469,469,470,470,471,471,472,472,473,473,474,474,475,475,476,476,477,477,478,478,479,479,480,480,481,481,482,482,483,483,484,484,485,485,486,486,487,487,488,488,489,489,490,490,491,491,492,492,493,493,494,494,495,495,496,496,497,497,498,498,499,499,500,500,501,501,502,502,503,503,504,504,505,505,506,506,507,507,508,508,509,509,510,510,511,511,512,512,513,513,514,514,515,515,516,516,517,517,518,518,519,519,520,520,521,521,522,522,523,523,524,524,525,525,526,526,527,527,528,528,529,529,530,530,531,531,532,532,533,533,534,534,535,535,536,536,537,537,538,538,539,539,540,540,541,541,542,542,543,543,544,544,545,545,546,546,547,547,548,548,549,549,550,550,551,551,552,552,553,553,554,554,555,555,556,556,557,557,558,558,559,559,560,560,561,561,562,562,563,563,564,564,565,565,566,566,567,567,568,568,569,569,570,570,571,571,572,572,573,573,574,574,575,575,576,576,577,577,578,578,579,579,580,580,581,581,582,582,583,583,584,584,585,585,586,586,587,587,588,588,589,589,590,590,591,591,592,592,593,593,594,594,595,595,596,596,597,597,598,598,599,599,600,600,601,601,602,602,603,603,604,604,605,605,606,606,607,607,608,608,609,609,610,610,611,611,612,612,613,613,614,614,615,615,616,616,617,617,618,618,619,619,620,620,621,621,622,622,623,623,624,624,625,625,626,626,627,627,628,628,629,629,630,630,631,631,632,632,633,633,634,634,635,635,636,636,637,637,638,638,639,639,640,640,641,641,642,642,643,643,644,644,645,645,646,646,647,647,648,648,649,649,650,650,651,651,652,652,653,653,654,654,655,655,656,656,657,657,658,658,659,659,660,660,661,661,662,662,663,663,664,664,665,665,666,666,667,667,668,668,669,669,670,670,671,671,672,672,673,673,674,674,675,675,676,676,677,677,678,678,679,679,680,680,681,681,682,682,683,683,684,684,685,685,686,686,687,687,688,688,689,689,690,690,691,691,692,692,693,693,694,694,695,695,696,696,697,697,698,698,699,699,700,700,701,701,702,702,703,703,704,704,705,705,706,706,707,707,708,708,709,709,710,710,711,711,712,712,713,713,714,714,715,715,716,716,717,717,718,718,719,719,720,720,721,721,722,722,723,723,724,724,725,725,726,726,727,727,728,728,729,729,730,730,731,731,732,732,733,733,734,734,735,735,736,736,737,737,738,738,739,739,740,740,741,741,742,742,743,743,744,744,745,745,746,746,747,747,748,748,749,749,750,750,751,751,752,752,753,753,754,754,755,755,756,756,757,757,758,758,759,759,760,760,761,761,762,762,763,763,764,764,765,765,766,766,767,767,768,768,769,769,770,770,771,771,772,772,773,773,774,774,775,775,776,776,777,777,778,778,779,779,780,780,781,781,782,782,783,783,784,784,785,785,786,786,787,787,788,788,789,789,790,790,791,791,792,792,793,793,794,794,795,795,796,796,797,797,798,798,799,799,800,800,801,801,802,802,803,803,804,804,805,805,806,806,807,807,808,808,809,809,810,810,811,811,812,812,813,813,814,814,815,815,816,816,817,817,818,818,819,819,820,820,821,821,822,822,823,823,824,824,825,825,826,826,827,827,828,828,829,829,830,830,831,831,832,832,833,833,834,834,835,835,836,836,837,837,838,838,839,839,840,840,841,841,842,842,843,843,844,844,845,845,846,846,847,847,848,848,849,849,850,850,851,851,852,852,853,853,854,854,855,855,856,856,857,857,858,858,859,859,860,860,861,861,862,862,863,863,864,864,865,865,866,866,867,867,868,868,869,869,870,870,871,871,872,872,873,873,874,874,875,875,876,876,877,877,878,878,879,879,880,880,881,881,882,882,883,883,884,884,885,885,886,886,887,887,888,888,889,889,890,890,891,891,892,892,893,893,894,894,895,895,896,896,897,897,898,898,899,899,900,900,901,901,902,902,903,903,904,904,905,905,906,906,907,907,908,908,909,909,910,910,911,911,912,912,913,913,914,914,915,915,916,916,917,917,918,918,919,919,920,920,921,921,922,922,923,923,924,924,925,925,926,926,927,927,928,928,929,929,930,930,931,931,932,932,933,933,934,934,935,935,936,936,937,937,938,938,939,939,940,940,941,941,942,942,943,943,944,944,945,945,946,946,947,947,948,948,949,949,950,950,951,951,952,952,953,953,954,954,955,955,956,956,957,957,958,958,959,959,960,960,961,961,962,962,963,963,964,964,965,965,966,966,967,967,968,968,969,969,970,970,971,971,972,972,973,973,974,974,975,975,976,976,977,977,978,978,979,979,980,980,981,981,982,982,983,983,984,984,985,985,986,986,987,987,988,988,989,989,990,990,991,991,992,992,993,993,994,994,995,995,996,996,997,997,998,998,999,999,1000,1000,1001,1001,1002,1002,1003,1003,1004,1004,1005,1005,1006,1006,1007,1007,1008,1008,1009,1009,1010,1010,1011,1011,1012,1012,1013,1013,1014,1014,1015,1015,1016,1016,1017,1017,1018,1018,1019,1019,1020,1020,1021,1021,1022,1022,1023,1023,1024,1024,1025,1025,1026,1026,1027,1027,1028,1028,1029,1029,1030,1030,1031,1031,1032,1032,1033,1033,1034,1034,1035,1035,1036,1036,1037,1037,1038,1038,1039,1039,1040,1040,1041,1041,1042,1042,1043,1043,1044,1044,1045,1045,1046,1046,1047,1047,1048,1048,1049,1049,1050,1050,1051,1051,1052,1052,1053,1053,1054,1054,1055,1055,1056,1056,1057,1057,1058,1058,1059,1059,1060,1060,1061,1061,1062,1062,1063,1063,1064,1064,1065,1065,1066,1066,1067,1067,1068,1068,1069,1069,1070,1070,1071,1071,1072,1072,1073,1073,1074,1074,1075,1075,1076,1076,1077,1077,1078,1078,1079,1079,1080,1080,1081,1081,1082,1082,1083,1083,1084,1084,1085,1085,1086,1086,1087,1087,1088,1088,1089,1089,1090,1090,1091,1091,1092,1092,1093,1093,1094,1094,1095,1095,1096,1096,1097,1097,1098,1098,1099,1099,1100,1100,1101,1101,1102,1102,1103,1103,1104,1104,1105,1105,1106,1106,1107,1107,1108,1108,1109,1109,1110,1110,1111,1111,1112,1112,1113,1113,1114,1114,1115,1115,1116,1116,1117,1117,1118,1118,1119,1119,1120,1120,1121,1121,1122,1122,1123,1123,1124,1124,1125,1125,1126,1126,1127,1127,1128,1128,1129,1129,1130,1130,1131,1131,1132,1132,1133,1133,1134,1134,1135,1135,1136,1136,1137,1137,1138,1138,1139,1139,1140,1140,1141,1141,1142,1142,1143,1143,1144,1144,1145,1145,1146,1146,1147,1147,1148,1148,1149,1149,1150,1150,1151,1151,1152,1152,1153,1153,1154,1154,1155,1155,1156,1156,1157,1157,1158,1158,1159,1159,1160,1160,1161,1161,1162,1162,1163,1163,1164,1164,1165,1165,1166,1166,1167,1167,1168,1168,1169,1169,1170,1170,1171,1171,1172,1172,1173,1173,1174,1174,1175,1175,1176,1176,1177,1177,1178,1178,1179,1179,1180,1180,1181,1181,1182,1182,1183,1183,1184,1184,1185,1185,1186,1186,1187,1187,1188,1188,1189,1189,1190,1190,1191,1191,1192,1192,1193,1193,1194,1194,1195,1195,1196,1196,1197,1197,1198,1198,1199,1199,1200,1200,1201,1201,1202,1202,1203,1203,1204,1204,1205,1205,1206,1206,1207,1207,1208,1208,1209,1209,1210,1210,1211,1211,1212,1212,1213,1213,1214,1214,1215,1215,1216,1216,1217,1217,1218,1218,1219,1219,1220,1220,1221,1221,1222,1222,1223,1223,1224,1224,1225,1225,1226,1226,1227,1227,1228,1228,1229,1229,1230,1230,1231,1231,1232,1232,1233,1233,1234,1234,1235,1235,1236,1236,1237,1237,1238,1238,1239,1239,1240,1240,1241,1241,1242,1242,1243,1243,1244,1244,1245,1245,1246,1246,1247,1247,1248,1248,1249,1249,1250,1250,1251,1251,1252,1252,1253,1253,1254,1254,1255,1255,1256,1256,1257,1257,1258,1258,1259,1259,1260,1260,1261,1261,1262,1262,1263,1263,1264,1264,1265,1265,1266,1266,1267,1267,1268,1268,1269,1269,1270,1270,1271,1271,1272,1272,1273,1273,1274,1274,1275,1275,1276,1276,1277,1277,1278,1278,1279,1279,1280,1280,1281,1281,1282,1282,1283,1283,1284,1284,1285,1285,1286,1286,1287,1287,1288,1288,1289,1289,1290,1290,1291,1291,1292,1292,1293,1293,1294,1294,1295,1295,1296,1296,1297,1297,1298,1298,1299,1299,1300,1300,1301,1301,1302,1302,1303,1303,1304,1304,1305,1305,1306,1306,1307,1307,1308,1308,1309,1309,1310,1310,1311,1311,1312,1312,1313,1313,1314,1314,1315,1315,1316,1316,1317,1317,1318,1318,1319,1319,1320,1320,1321,1321,1322,1322,1323,1323,1324,1324,1325,1325,1326,1326,1327,1327,1328,1328,1329,1329,1330,1330,1331,1331,1332,1332,1333,1333,1334,1334,1335,1335,1336,1336,1337,1337,1338,1338,1339,1339,1340,1340,1341,1341,1342,1342,1343,1343,
---	---