



การทดสอบทางพฤกษเคมี ลักษณะโครมาโตแกรมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ของอุตพิต บุกคางคกและบอน

Phytochemistry Thin layer Chromatography and Antioxidant activity of
Typhonium trilobatum (L.) Schott, *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.)

Nicolson, *Colocasia esculenta* (L.) Schott

ณิชนันท์ บุญสุข¹

Nitchanan Bunsuk

บทคัดย่อ

อุตพิต บุกคางคก และบอน เป็นพืชล้มลุก พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค ในตำรายาแพทย์พื้นบ้าน เช่น อาการโรคผิวหนัง ฝีหนอง ใช้กััดเถาดานในท้อง แก้ท้องผูก แก้อักเสบ แก้ปวด ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ทางพฤกษเคมีของพืชทั้งสามชนิด โดยการสกัดต่อเนื่องด้วยวิธี soxhlet extraction พบว่าอุตพิตและบุกคางคกพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ในพืชทั้ง 3 ชนิด จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าอุตพิตและบอนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ มีค่า IC_{50} ที่ 140.58 , 193.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดบุกคางคกอาจพบที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบสูงกว่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การทดสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยเทคนิคแรงเคเลขวางนั้น พบว่า สารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด ไม่พบแถบสารเมื่ออ่านผลด้วย UV 254 นาโนเมตร แต่เรืองแสงที่ UV 366 นาโนเมตร

คำสำคัญ: สกัดแบบต่อเนื่อง, พฤกษเคมี, แรงเคเลขวาง, ต้านอนุมูลอิสระ

¹ นักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ สาขาเภสัชกรรมแผนไทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Typhonium trilobatum (L.) Schott , *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson , *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Found throughout all regions of Thailand. Has medicinal properties in treating diseases such as skin symptoms, suppurative abscess, cure constipation, resolve inflammation and pain, so this research is to study the phytochemicals of all three plants by soxhlet extraction method, it was found that it *T. trilobatum* and *A. paeoniifolius* found flavonoid substances. And steroids are found in all 3 plants. Studies of antioxidant activity found that *T. trilobatum* and *A. paeoniifolius* have antioxidant activity with IC₅₀ value at 140.58, 193.89 microgram/milliliter respectively, but also less free radicals than the standard ascorbic acid with IC₅₀ value at 2.300 micrograms/milliliter. IC₅₀ values of *C. esculenta* may be found at the concentration of the extracts tested greater than 500 micrograms/milliliter. Thin layer Chromatography showed that all 3 plant extracts did not find the band when reading with UV 254 nm but have band at UV 366 nm.

Keyword: phytochemical, soxhlet extraction, Thin layer chromatography, antioxidant

บทนำ

ปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรกำลังเป็นที่นิยมและถูกสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนามากขึ้น อีกทั้งสมุนไพรแต่ละชนิดยังมีคุณสมบัติเฉพาะตัว เป็นแหล่งที่มาของสารพฤกษเคมีที่สำคัญ ๆ ยกตัวอย่างเช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารกลุ่มสเตียรอยด์ มีฤทธิ์ลดการอักเสบ นำมาสังเคราะห์เป็นยาฮอร์โมนเพศ เป็นต้น

อุตพิต *Typhonium trilobatum* (L.) Schott, บุกคางคก *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson, บอน *Colocasia esculenta* (L.) Schott จัดอยู่ในวงศ์ Araceae เป็นพืชล้มลุกที่เกิดขึ้นได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และพบเจอได้ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่า พืชทั้ง 3 ชนิดนี้ มีสรรพคุณลดอาการอักเสบ โดยมีการศึกษาในหนูทดลองพบว่าสารสกัดจากใบอุตพิตมีฤทธิ์รักษาแผลเบาหวาน ด้านการอักเสบ ระบุปวด (Ali et al, 2012) สารสกัดบอนด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์สามารถลดอาการปวดบิต (Dey YN et al, 2016) ลดการอักเสบ (De S et al, 2010) และไม่มีความเป็นพิษต่อตับในหนูทดลอง (Sharstry RA et al , 2010) สารสกัดจากใบบอนแห้งด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อหนอง มีเส้นใยช่วยในการดูดซับสารก่อกลายพันธุ์ สารสกัดจากรากบอนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ

เนื่องจาก หัวใต้ดินของต้นบอนมีฤทธิ์ช่วยลดความดันโลหิต (สมุนไพรรพพื้นบ้านล้านนา มหาวิทยาลัยมหิดล, 2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอุตพิต บุกคางคกและบอนที่ทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วย 95% เมทานอลเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือต่างกันของลายพิมพ์นิ้วมือ และนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาสมุนไพรรักษาและคิดค้นงานวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของอุตพิต บุกคางคกและบอน
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยเทคนิคแรงกลเชิงผิวบางของอุตพิต บุกคางคกและบอน

วิธีการวิจัย

แหล่งที่มาของตัวอย่าง

เก็บอุตพิต บุกคางคก และบอนจากสำนักสงฆ์ไชยบรร อ.โพธิ์ทะเล จ.พิจิตร เมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2562 นำมาล้างให้สะอาด หั่นเอาแต่หัว นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้งสนิทและนำไปบดให้ละเอียดใช้แรงเบอร์ 60 เพื่อให้ได้ผงยาขนาดที่เท่ากัน

การเตรียมสารสกัด

สกัดแบบต่อเนื่อง (soxhlet extraction) โดยใช้ 95% เมทานอลเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน 20 กรัม ต่อตัวทำละลาย 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) จนได้สารสกัดในรูปของแข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

ทำการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของการสกัดอุตพิตบุกคางคกบอน 5 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ชาโปนิน อัลคาลอยด์และสเตียรอยด์

1. กลุ่มฟลาโวนอยด์

ทดสอบด้วยวิธี Shinoda's test ซึ่งสารสกัด 200 มิลลิกรัม ละลายสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่แมกนีเซียมริบบอนลงในหลอดทดลองเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือชมพูแสดงว่าพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

2. การตรวจสอบแทนนิน

ชั่งสารสกัด 200 กรัม ต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนอ่างให้ความร้อน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 2-3 หยด หากเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือดำแสดงว่าพบสารประกอบแทนนิน

3. การตรวจสอบซาโปนิน

ชั่งสารสกัด 200 กรัม ต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เติมน้ำ กลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากเกิดฟองแสดงว่าพบสารกลุ่มซาโปนิน

4. การตรวจสอบอัลคาลอยด์

ชั่งสารสกัด 20 กรัม ละลายด้วย 1% กรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 5-10 นาที จากนั้นกรอง แล้วนำมาสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ปรับค่าความเป็นกรดต่าง แล้วนำไประเหยบนหม้ออังไอน้ำ จากนั้นนำไปหยดลงกระดาษกรอง แล้วฉีดพ่นด้วยน้ำยาตราเจนดอร์ฟ ถ้าบริเวณที่หยดพบสีแดงหรือชมพูแสดงว่าพบสารประกอบอัลคาลอยด์

5. การตรวจสอบสเตียรอยด์

นำผงของพืชทั้ง 3 ชนิด 20 กรัม เติม 1N ethanolic HCl พอท่วม นำไปอุ่น จากนั้นกรองและนำไปสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ จากนั้นนำไประเหยจนแห้ง หยด acetic anhydride 3 หยด ผสมให้เข้ากัน หยด sulfuric acid เข้มข้นลงไปจำนวน 1 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นหากพบสเตียรอยด์จะมีสีเขียวเข้มหรือน้ำเงิน

การทดสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยเทคนิคครกเลขวาง (Thin layer chromatography)

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 วัฏภาค คือ 1) Hexane: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 9:1 2) Hexane : Ethyl acetate ในอัตราส่วน 7: 3 3) Dichloromethane: Methanol ในอัตราส่วน 9:1 หยดสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบด้วยหลอดคาปิลลารีรูเล็กลงบนแผ่นลายพิมพ์นิ้วมือ TLC silica gel 60 F254 นำแผ่นลายพิมพ์นิ้วมือ มาใส่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เตรียมไว้ ปิดฝาเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายระเหยตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึง solvent front พักไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบแถบสีด้วยเครื่อง UV detector

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐานใช้สารสกัดเจือจางด้วยเมทานอลแบบครึ่งต่อครึ่ง ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลง 96 well plate ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม 200 nM DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงทุกหลุม เก็บไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก % free radical scavenging

$$\% \text{ free radical scavenging} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

A_{DPPH} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ซึ่งใช้เป็นค่าอนุมูลอิสระเริ่มต้น

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์

ผลการทดลอง

สารสกัดของอุตพิต บุกคางคก บอน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีค่าเท่ากับ 5.95, 6.75, 7.1 % yield ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น 5 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน และซาโปนิน พบว่าสารสกัดอุตพิตและบุกคางคก พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ในสารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่พบสารกลุ่มแทนนิน ซาโปนิน และอัลคาลอยด์ ดังแสดงตารางที่ 2

การทดสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยเทคนิคครกเลขวาง (Thin layer chromatography) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่างกัน 3 วัฏภาคพบว่า สารสกัดทั้งอุตพิต บุกคางคก บอน ไม่พบแถบสารเมื่ออ่านผลด้วย UV 254 นาโนเมตร แต่จะพบแถบสารเป็นสีต่างๆ เมื่อทำการพ่นสเปรย์กรดซัลฟิวริกและอังความร้อนจากนั้นอ่านผลด้วยแสง UV 366 นาโนเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบค่าความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดอุตพิตและบอนที่ 140.58 , 193.89 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดบุกคางคกอาจพบที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบสูงกว่า 500 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดได้คิดเป็นร้อยละ (% yield)

สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
อุตพิต	1.19	5.95
บุกคางคก	1.27	6.75
บอน	1.42	7.1

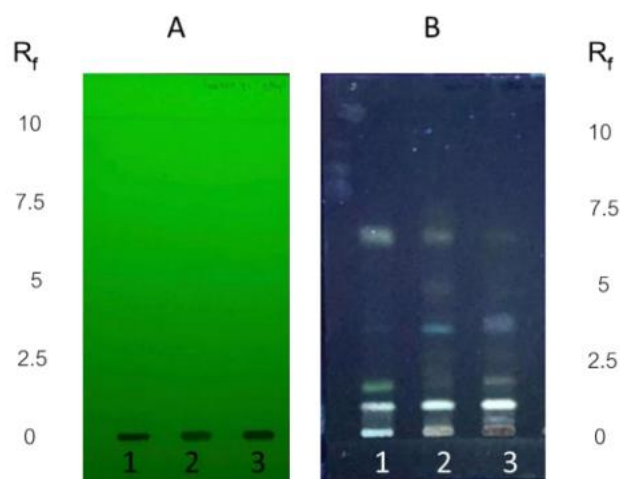
ตารางที่ 2 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น

สารพฤษเคมี	สารสกัดสด	สารสกัดบุงคางคก	สารสกัดบอน
ฟลาโวนอยด์	+	+	-
แทนนิน	-	-	-
ซาโปนิน	-	-	-
อัลคาลอยด์	-	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง ตรวจสอบพบ
- หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ

ผลทดสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยวิธีโครมาโตแกรม

วัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 9:1

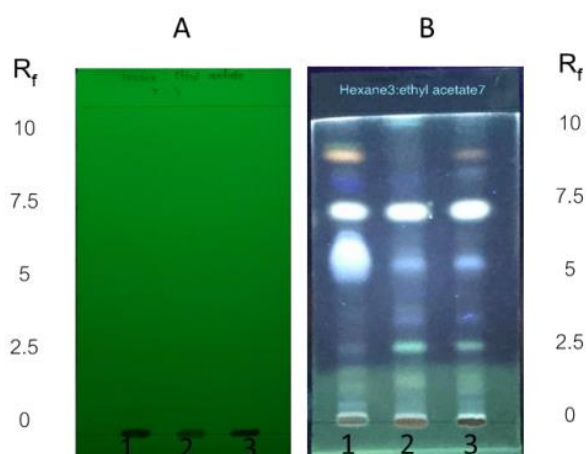


Lane 1= สารสกัดสดสกัด Lane 2 = สารสกัดบุงคางคก Lane 3 = สารสกัดบอน

A = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือภายใต้ UV 254 นาโนเมตร

B = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือพ่นด้วย 10% กรดซัลฟิวริก ให้ความร้อน UV 366 นาโนเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 7: 3

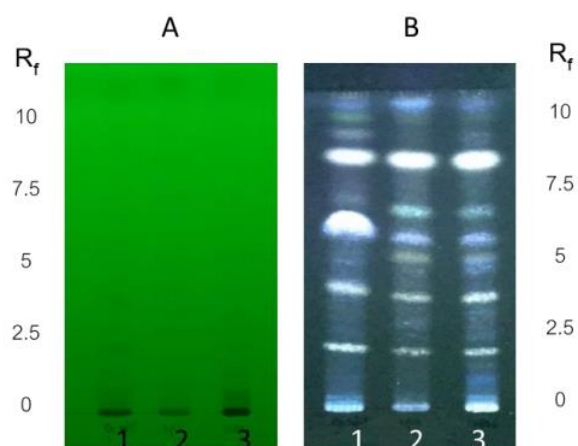


Lane 1= สารสกัดอุตพิตสกัด Lane 2 = สารสกัดบุกคางคก Lane 3 = สารสกัดบอน

A = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือภายใต้ UV 254 นาโนเมตร

B = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือพ่นด้วย 10% กรดซัลฟิวริก ให้ความร้อน UV 366 นาโนเมตร

Dichloromethane: Methanol ในอัตราส่วน 9:1



Lane 1= สารสกัดอุตพิตสกัด Lane 2 = สารสกัดบุกคางคก Lane 3 = สารสกัดบอน

A = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือภายใต้ UV 254 นาโนเมตร

B = ตรวจสอบลายพิมพ์นิ้วมือพ่นด้วย 10% กรดซัลฟิวริก ให้ความร้อน UV 366 นาโนเมตร

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} ของสารสกัดอู่ตพิด บุกคางคก บอน

ตัวอย่างสาร	ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
กรดแอสคอบิก	2.300
สารสกัดอู่ตพิด	140.58
สารสกัดบุกคางคก	ND
สารสกัดบอน	193.89

*ND ไม่พบค่า IC_{50} ของสารสกัดบุกคางคก / อาจพบที่ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสูงกว่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น พบว่า สารสกัดอู่ตพิด บุกคางคกมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ในสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่พบสารกลุ่มแทนนิน ซาโปนิน และอัลคาลอยด์ (ตารางที่ 2) การตรวจสอบพบสารพฤษเคมีดังกล่าวช่วยยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่สามารถแก้พิษสัตว์กัดต่อยได้ เนื่องจากฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Sharma et al., 2011; พิสมัย, 2548) จากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่า สารสกัดจากใบของพืชในสกุล *Clerodendrum* หลายชนิด เช่น *C. trichotomum* และ *C. inerme* มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Choi et al., 2004; Yankanchi and Koli, 2010) และพบว่าสารสกัดของพืชดังกล่าว ประกอบด้วย สารพฤษเคมีในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ (Choi et al., 2012; Florence et al., 2012)

การทดสอบลายพิมพ์นิ้วมือด้วยเทคนิคครกเลขฉิวบาง ที่ใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ต่างกัน 3 ระบบ พบว่า สารสกัดทั้งอู่ตพิด บุกคางคก บอน ไม่พบแถบสารเมื่ออ่านผลด้วย UV 254 นาโนเมตร แต่จะพบแถบสารเป็นสีต่าง ๆ เมื่อทำการพ่นสเปรย์กรดซัลฟิวริกและอังความร้อนจากนั้นอ่านผลด้วยแสง UV 366 นาโนเมตร การตรวจสอบดังกล่าวช่วยยืนยันได้ว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 3 มีสารประกอบสเตียรอยด์ เนื่องจากสารประกอบสเตียรอยด์จะเรืองแสงต่อการตรวจสอบภายใต้ UV 366 นาโนเมตร ดังรูป B ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบสารพฤษเคมีที่พบสารกลุ่มสเตียรอยด์

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ทราบว่าในสารสกัดอู่ตพิดและบอนนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แม้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานแล้วจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่ามาก จากการทดสอบทำให้ทราบสารองค์ประกอบทางพฤษเคมีของอู่ตพิด บุกคางคก บอน และทราบลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือที่เหมือนและแตกต่างกันของพืชทั้ง 3 ชนิด เป็นข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สามารถนำไปต่อยอดศึกษาข้อบ่งใช้ใหม่

ของสมุนไพรฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ และสามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาวิเคราะห์แยกสารแบบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้อีกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษารวบรวมข้อมูลและการทำการทดลองงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสมพร ปรีเปรม อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่แนะนำให้คำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะการค้นคว้าข้อมูลและให้ความมั่นใจในการนำเสนองานครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ทิววัฒน์ นาพิรุณ, ดวงใจ สุขเฉลิม, สรัญญา วัชรโรทัย และ ทศเนศวร์ เพชรคง. (2556). **อนุกรมวิธานและพฤกษเคมีของพืชบุกบอนบนดินในอุทยานแห่งชาติไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี**. วารสารวนศาสตร์, 32(ฉบับพิเศษ), 71-84.

ศิรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ. (2556). **การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ**. ว. วิทย์. มข. 41(3) 723-730.

Ali K, Ashraf A, Biswas N. Analgesic, anti-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic leaf extract of *Typhonium trilobatum* L. Schott. Asian. Pac. J. Trop. Biomed., 2012, 2, 722-726.

De S, Dey YN, Ghosh AK. Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Amorphophallus paeoniifolius* and its possible mechanism. Int J Pharma Biosci. 2010; 1:1-8.

Dey YN et al. Curative effect of *Amorphophallus paeoniifolius* tuber on experimental hemorrhoids in rats. J Ethnopharmacol. 2016 Nov 4; 192:183-191.

Sharstry RA, Biradar SM, Mahadevan KM, Habbu PV. Isolation and characterization of Secondary Metabolite from *Amorphophallus paeoniifolius* for Hepatoprotective activity. Res J Pharm Biol Chem Sci 2010; 1:429-37.