

PLANTES MALGACHES N° XIX. SUR LA COMPOSITION  
CHIMIQUE DE *STACHYTARPHETA JAMAICENSIS* (L.)  
VAHL (= *S. INDICA* VAHL), VERBÉNACÉES

par S. DURET, H. JACQUEMIN et R. R. PARIS

RÉSUMÉ

Dans les feuilles du *Stachytarpheta jamaicensis* provenant de Madagascar, ont été caractérisés des traces de choline, un iridoïde, des acides-phénols, un acide chlorogénique, des tanins catéchiques, et des flavonoïdes de la série des flavones, dont les 2 principaux sont des glycuronides de l'hydroxy-6 lutéolol et du lutéolol ; un glycuronide d'apigénol est présent en faible quantité.

SUMMARY

In the leaves of *Stachytarpheta jamaicensis* from Malagasy were identified cholin, an iridoid, phenolic-acids, a chlorogenic acid, catechic tanins, flavonoids of flavone-serie, chiefly glycuronids of 6-hydroxy-luteolol and luteolol and a minor component : a glycuronid of apigenol.

Le *Stachytarpheta jamaicensis* est une plante herbacée annuelle pouvant dépasser 1 m de haut. Les rameaux tétragones, ramifiés dichotomiquement, portent des feuilles simples, opposées, oblongues ou ovales (2-8 cm × 1,2-5 cm), à marge grossièrement dentée, à base cunéiforme prolongée sur le pétiole marginé. Les inflorescences sont de très longs épis (d'où le nom de « queue de rat », « queue de lézard » parfois donné à la plante). Les fleurs, entourées de bractées, ont un calice à 4 dents, une corolle irrégulière à limbe étalé bleu foncé (« Verveine bleue »), 2 étamines fertiles et un ovaire à 2 loges. Elles sont profondément enfoncées dans les sillons du rachis épaissi (fig. 1), de même que les petits fruits secs, oblongs, entourés par le calice persistant et qui se séparent à maturité en 2 nucules à une graine [8].

Cette plante, originaire d'Amérique tropicale (Floride, Antilles, Mexique, jusqu'au Brésil au sud), s'est introduite en Afrique, en Asie jusqu'en Indonésie et en Océanie.

Manuscrit reçu le 11-3-76.

27 MAI 1986

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 20 213

Cote : B.

30 AOÛT 1977

Collection de Référence

8679 B.B.V.



FIG. 1. — *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl. 1 rameau florifère ( $\times 2/3$ ) ; 2 fleur (en coupe)  $\times 6$

D'après HUMBERT (H.), Flore de Madagascar, 174<sup>e</sup> famille (1956), p. 23.

A Madagascar, c'est une herbe commune sauf dans le Sud-Ouest [8].

Elle est assez employée dans la médecine populaire de différents pays, réputée notamment comme tonique, antirhumatismale, fébrifuge, la racine étant utilisée comme vermifuge, emménagogue et même abortive. En Inde, la plante est, en usage externe, anti-inflammatoire dans les ulcères et utilisée dans le traitement de la dysenterie [12]. DALZIEL rapporte qu'au Nigeria elle est employée comme antidysentérique et vermifuge. Elle figure dans l'inventaire d'HARTWELL des plantes « anticancer » d'Amérique tropicale.

Au point de vue chimique, quelques recherches ont déjà eu trait à ce *Stachytarpheta*. Selon DA COSTA (1962), les feuilles sont riches en acide chlorogénique [7]. DURAND et coll. [3] ont caractérisé par chromatographie sur papier de la dopamine dans la plante de l'Inde.

DEBRAY, JACQUEMIN et RAZAFINDRAMBAO ont, dans le cadre du centre O. R. S. T. O. M. de Madagascar [2] effectué en 1971 quelques essais préliminaires sur la plante de la côte Est (Manakara) (Herbier D. 511) et signalent la présence de saponines dans les feuilles et surtout les écorces de racines et l'absence de flavonoïdes et de tanins dans ces organes.

D'autre part SUBRAMANIAN et coll. [12] ont étudié les feuilles de la variété indienne et obtenu à l'état cristallisé, à partir de l'extrait chloroformique, une cétone terpénique, la friedeline, de l'acide ursolique et du stigmastérol. Dans l'extrait alcoolique, ils ont séparé et identifié 2 génines flavoniques :

la scutellaréine ou hydroxy-6 apigénine et son ester méthylique, l'hispiduline.

Nos recherches ont porté sur un lot de la plante récoltée par l'O. R. S. T. O. M. à Tamatave en 1970 (Herbier 586 R), comprenant des racines, des tiges, des feuilles et des épis fructifères.

*Au cours d'essais préliminaires en tube*, effectués sur ces différents organes nous n'y avons mis en évidence ni alcaloïdes, ni quinones, ni hétérosides cyanogénétiques. Les racines renferment des traces de saponosides. En ce qui concerne les polyphénols, présence de *tanins catéchiques* dans les différents organes (absence d'anthocyanes, leucoanthocyanes ou catéchols) et de *flavonoïdes* seulement dans les feuilles. Des iridoïdes, dont la présence chez les *Stachytarpheta* est signalée par HEGNAUER [7] semblent présents dans tous les organes (l'infusé à 10 % additionné d'acide chlorhydrique concentré donne un précipité brun-noir) ; par la réaction de TRIM et HILL (acide acétique, sulfate de cuivre et HCl) on obtient une coloration brun verdâtre avec les différents organes, sauf les fruits qui donnent une coloration bleu foncé

#### ESSAIS EN CHROMATOGRAPHIE.

— *Recherche des flavonoïdes* : Sur papier ou sur couche mince de cellulose, avec l'infusé des feuilles à 10 % ou la teinture au 1/2 dans l'alcool à 95° on observe après développement dans le solvant N-butanol-acide acétique-eau 4-1-5 v/v), en dehors de fluorescences bleues, plusieurs taches mates en lumière ultraviolette, dont 2 principales ( $F_A$  et  $F_B$ ) :

—  $F_A$  (Rf voisin de 0,20) brun mat sous UV, le restant après révélation par  $AlCl_3$  et l'acétate de plomb.

—  $F_B$  (Rf voisin de 0,30) brun mat sous UV, est révélé en jaune vif par le chlorure d'aluminium et en orangé par l'acétate basique de plomb.

Une tache plus faible  $F_C$  (Rf = 0,40), brun mat sous UV, est révélée en jaune par  $AlCl_3$  et l'acétate basique de plomb.

Les tiges et les épis fructifères donnent des taches beaucoup moins nettes les racines seulement des fluorescences bleues.

— *Recherche de la dopamine* (dihydroxy-3,4 phényl-éthylamine) en raison de la publication de DURAND et coll. [3].

La chromatographie sur couche mince de cellulose des teintures 1/2 de racines, tiges et feuilles dans le solvant I ou le solvant indiqué par DURAND et coll. : méthyléthylcétone-acide acétique-eau-chloroforme (5-2-2-1 v/v) permet d'obtenir après révélation par le réactif de JAMES (ferricyanure de potassium dans un tampon phosphaté à pH 7,8, puis vapeurs d'ammoniaque) une faible tache rose, de Rf voisin de celui de la dopamine témoin.

Par contre, en électrophorèse sur papier Arches 302, dans l'acide formique à 5 %, la tache rosée révélée par le réactif de JAMES [5] a un déplacement beaucoup plus faible que la dopamine témoin.

— *Recherche de la choline* : en chromatographie sur couche mince de silice de l'infusé dans le solvant I, après révélation par le réactif de DRAGENDORFF, on observe une tache rose de même Rf que la choline témoin.

#### ÉTUDE PARTICULIÈRE DES POLYPHÉNOLS.

##### I. — *Acides-phénols* :

La recherche a été effectuée, à partir de l'infusé à 10 % des différents organes par la méthode habituelle du Laboratoire. Il n'y a que des traces d'acides-phénols libres. Par contre, après saponification (OHNa 2N, 4 h à la température du Laboratoire), on caractérise en chromatographie dans tous les organes : pour la série benzoïque : les acides vanillique et syringique (le premier surtout abondant dans les racines et les tiges, le second dans les feuilles) ; pour la série cinnamique : l'acide caféique (surtout dans les feuilles) et des traces d'acides p-coumarique et férulique.

L'acide chlorogénique est recherché directement sur l'infusé par chromatographie dans l'acide acétique à 2 % : on obtient pour les différents organes et surtout pour les tiges et feuilles, à Rf 0,50, une tache de fluorescence bleue intense, devenant verte après pulvérisation d'ammoniaque. Son Rf est légèrement inférieur à celui de l'acide chlorogénique normal témoin (acide caféyl-3 quinique) (0,60).

##### II. — *Etude des flavonoïdes* :

Elle a été effectuée sur les feuilles, seul organe en renfermant en quantité notable.

A. — *Etude des génines* : obtenues après hydrolyse acide de l'extrait alcool à 80°, évaporé à sec et repris par l'eau bouillante. La solution, acide par addition d' $H_2SO_4$  (sol. N), est portée 2 h au bain-marie bouillant.

Au cours de cette opération, un précipité noirâtre se forme (iridoïdes), qui est épuisé, ainsi que les eaux mères, successivement par l'éther, l'acétate d'éthyle et le butanol.

L'extrait étheré, étudié en chromatographie sur cellulose dans l'acide acétique à 50 % montre, en lumière ultra-violette, deux taches brun mat principales et une plus faible.

La génine A, de Rf 0,30-0,40, reste mate en lumière UV après révélation par  $AlCl_3$  et par l'acétate basique de plomb.

La génine B, de Rf 0,50-0,60, devient jaune fluorescente intense après  $AlCl_3$  en lumière UV et orangée après acétate basique de plomb.

La génine C, peu importante, de Rf 0,70, devient jaune par  $AlCl_3$  en lumière UV et jaune après acétate basique de plomb.

— *Génine A* : Rf chromatographie sur papier Whatman n° I : 0,45 : solvant I ; 0,42 ; solvant II (Forestal : ac. acétique-eau-HCl 30-10-3 v/v) ; 0,35 : solvant III (ac. acétique à 60 %).

<i>Spectre UV <math>\lambda_{max}</math></i>	Bande I	Bande II	Interprétation
Méthanol .....	346 nm	282 nm	$\lambda$ 282 : rare (en faveur OH en 6 ou 8)
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> .....	415 et 302	267	Effet bathochrome de I : OHz en 5 libre
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> + HCl .	372	294 et 256*	Effet hypsochrome de I par rapport à AlCl <sub>3</sub> neutre : OH en 3' 4' libres
Méthanol + acét. Na .....	372	272*	Spectre décomposé : en faveur OH libres en 5, 6 ou 7
Méthanol + acét. Na + ac. borique .....	372	278*	

\* Epaulement.

Ces données sont en accord avec celles présentées par l'*hydroxy-6 lutéolol* obtenu à partir des feuilles du *Catalpa bignonioides* (dont un extrait a été hydrolysé dans les mêmes conditions puis épuisé par l'éther).

— *Génine B* : Rf en chromatographie :

— sur papier Whatman n° I : solvant I : 0,86 ; solvant II : 0,69 ; solvant III : 0,52 ;

— sur couche mince de polyamide : solvant : benzène-méthyléthyl-cétone-méthanol : 50-25-25 (v/v) : 0,11.

<i>Spectre UV <math>\lambda_{max}</math></i>	Bande I	Bande II	Interprétation
Méthanol .....	346 nm	284*, 265* et 252	
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> ....	422, 330 et 300	272	
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> + HCl .....	385*, 358 et 294*	272 et 260	
Méthanol + acét. Na .	374 et 320*	268	$\Delta$ de II = 16 nm : OH en 7 libre
Méthanol + acét. Na + ac. borique .....	368	258	$\Delta$ de I = 22 nm en faveur OH en 3' 4' libres

\* Epaulement.

Ces données sont en accord avec celles d'un témoin de *lutéolol* (tétrahydroxy-5,7,3', 4' flavone).

B. — *Evaluation des flavonoïdes totaux*: selon la méthode spectrophotométrique après AlCl<sub>3</sub> du Laboratoire [4] en prenant comme étalon le gaudoside (7  $\beta$  glucoside du lutéolol) : 3,12 %.

C. — *Etude des hétérosides* : ils ont été extraits à partir de 200 g de feuilles sèches par la méthode de CHARAUX-PARIS [4] : extraction par l'alcool à 80°.

évaporation à sec, reprise par l'eau bouillante du résidu sec, filtration et épauement de la solution aqueuse successivement par l'éther, l'acétate d'éthyle et le butanol.

Dans la solution étherée, a été mise en évidence par chromatographie sur couche mince de cellulose, un flavonoïde principal, dont le Rf dans différents solvants et le spectre correspondent à ceux de la génine B ou lutéolol.

Par concentration des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol, sont obtenues des poudres jaune ocre, correspondant à un mélange de flavonoïdes.

Des essais de fractionnement de l'extrait butanolique sur colonne de polyamide n'ont pas donné de bons résultats.

C'est par chromatographie préparative sur papier de l'extrait aqueux, que nous avons eu finalement les meilleures séparations : sur papier Whatman 3 MM dans l'acide acétique à 50 %, on sépare 2 flavonosides principaux A et B, de Rf respectifs 0,40 et 0,60 et un flavonoside mineur C, de Rf 0,70.

— Flavonoside A : Rf :

— en chromatographie sur papier :

solvants : N-butanol-acide acétique-eau (4-1-2) : 0,24 ;  
 solvant II : 0,50 ;  
 acide acétique à 15 % : 0,08 ;  
 eau : 0-0,12 ;

— chromatographie sur couche de polyamide : solvant de EGGER (eau-éthanol-méthyléthylcétone-acétylacétone : 13-3-3-1) : 0,05.

Spectre UV $\lambda_{\max}$	Bande I	Bande II	Interprétation
Méthanol .....	345 nm	282 nm	282 nm rare (en faveur OH en 6 ou 8)
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> .....	424 nm	288, 272	Effet bathochrome : OH en 5 libre
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> + HCl .	370 nm	295	Effet hypsochrome par rapport à AlCl <sub>3</sub> neutre : OH en 3', 4' libres
Méthanol + acét. Na .....	396* et 348	284	$\Delta$ de II = 2 très faible : OH en 7 bloqué
Méthanol + acét. Na ac. borique .....	365	284 et 258	Effet bathochrome de I = 2 OH libres en 3', 4'.

\* Epauement.

Hydrolyse acide : par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>N : 2 h au bain-marie bouillant.

Génine obtenue dans l'éther : elle correspond à la génine A obtenue précédemment et à l'hydroxy-6 lutéolol du *Catalpa*.

Sucre : après neutralisation de la liqueur d'hydrolyse par  $\text{CO}_3\text{Ba}$ , évaporation et reprise du résidu par la pyridine la chromatographie sur couche mince de silice dans le solvant : N-butanol-isopropanol-eau (5-3-1) avec révélation par le phtalate d'aniline (quelques mn à l'étuve  $100^\circ$ ), on ne met en évidence aucun sucre réducteur.

*Hydrolyse enzymatique* par la  $\beta$ -glycuronidase (\*) à pH 6, 12 h à  $37^\circ$ , il se forme un précipité jaune qui est séparé.

La liqueur mère est épuisée par l'éther puis examinée en chromatographie sur cellulose dans le solvant I et le solvant acétate d'éthyle-ac. formique-eau : 60-20-20 ; sur silice dans le solvant : butanol-acide acétique-eau (50-25-25).

Après révélation par la  $\beta$ -naphtylamine [ $\beta$ -naphtylamine 0,10 g ; thymol 1 g,  $\text{PO}_4\text{H}_3$  : 2 ml ; alcool à  $80^\circ$  0,5 pour 150 ml] (étuve  $100^\circ$  10 mn) on obtient une tache rose de même Rf que l'acide glycuronique témoin. Par ailleurs, la génine obtenue par épuisement par l'éther du précipité formé au cours de l'hydrolyse est identique (Rf spectre) à la génine A ou hydroxy-6 lutéolol.

Le flavonoside A semble donc être le glycuronide (en 7) de l'hydroxy-6 lutéolol. Cette substance a déjà été caractérisée notamment dans les feuilles de *Plantago maritima* par MOORE [10] et chez *Digitalis lutea* par PARIS et BAUDOUIN [11].

— *Flavonoside B* : Ce flavonoside, séparé par une première chromatographie sur papier Whatman 3 MM, dans l'acide acétique à 50 %, a été purifié par une seconde chromatographie préparative sur papier Whatman 3 dans le solvant N-butanol-acide acétique-eau 4-1-2 (v/v) ce qui permet d'éliminer des flavonoïdes secondaires, de Rf inférieur.

Le flavonoïde principal, élué par l'alcool à  $80^\circ$ , présente les caractéristiques suivantes :

Rf :

— chromatographie sur papier :

solvant : I : 0,32 ;

: II : 0,70 ;

: III : 0,60 ;

— chromatographie sur couche mince de cellulose : eau 0,33 ; ac. acétique à 15 % : 0,06.

— couche mince de polyamide : solvant de EGGER = 0.

---

(\*) Dans les extraits flavoniques bruts, la réaction de TOLLENS au naphthorésorcinol chlorhydrique en présence de toluène est d'interprétation difficile à cause de la présence d'iridoïdes.

<i>Spectre UV</i> $\lambda_{\max}$	Bande I	Bande II	Interprétation
Méthanol .....	348 nm	266*,254	Effet bathochrome : OH en 5 libre Effet hypsochrome par rapport à AlCl <sub>3</sub> neutre = OH en 3', 4' libres $\Delta$ de II = 4 : OH en 7 bloqué. Effet bathochrome $\Delta$ de I = 22, OH en 3', 4' libres
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> ....	425, 328* et 294*	272	
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> + HCl .....	384, 358 et 294 *	272, 264	
Méthanol + acét. Na .	402	258	
Méthanol + acét. Na + ac. borique .....	370	258	

\* Epaulement.

*Hydrolyse acide* : effectuée comme précédemment 2 h par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N, permet d'obtenir par épuisement par l'éther une génine, identique à la génine B (lutéolol) mais l'épuisement consécutif de la liqueur d'hydrolyse par l'acétate d'éthyle montre, dans ce solvant, la présence de flavonoside B non encore hydrolysé. Une hydrolyse prolongée (4 h) permet d'obtenir à nouveau du lutéolol.

Sucre : il n'en a pas été mis en évidence dans la liqueur d'hydrolyse.

*Hydrolyse enzymatique* : par la  $\beta$ -glucuronidase à pH 6 à 37° 12 h : un précipité jaune se forme qui, étudié comme précédemment, s'est montré identique au lutéolol. Dans les eaux mères, l'acide *glycuronique* a été caractérisé par chromatographie couche mince comme précédemment.

Le flavonoïde B serait donc le *glycuronide en 7 du lutéolol*.

— *Flavonoïde C* : Ce flavonoside, séparé par une première chromatographie sur papier Whatman 3 MM dans l'acide acétique à 50 %, a été purifié sur le même papier dans le solvant 4-1-2.

Rf :

— en chromatographie sur couche mince de cellulose :

solvant : eau : 0,55 ;

acide acétique à 15 % : 0,14 ;

acide acétique à 60 % : 0,64 ;

solvant I : 0,55 ;

— sur couche mince de polyamide : solvant de EGGER : 0,04.

<i>Spectre UV</i> $\lambda_{\max}$	bande I	bande II	Interprétation
Méthanol .....	334 nm	266 nm	Effet bathochrome et dédoublement : OH en 5 libre Pas d'effet hypsochrome par rapport à AlCl <sub>3</sub> neutre pas de diphenol en 3', 4'. Pas de déplacement de II OH en 7 bloqué. Pas d'orthodiphenol en 3', 4'.
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> .....	376 et 340	295 et 272*	
Méthanol + AlCl <sub>3</sub> + HCl .	378 et 338	296 et 273	
Méthanol + acét. Na .....	386 et 352	265	
Méthanol + acét. Na + ac. borique .....	340	266	



Le Rf faible dans le solvant de EGGER, le comportement très voisin dans l'eau et le solvant I laissent présumer qu'il s'agissait d'un glycuronide, comme les flavonoïdes A et B. Etant donné la faible quantité isolée, seule l'hydrolyse enzymatique par la  $\beta$ -glycuronidase a été effectuée.

La génine, obtenue dans l'éther est identique au point de vue Rf et spectre UV ( $\lambda_{\max}$  : éthanol : 334 et 267 nm ; +  $\text{AlCl}_3$  : 382, 345, 301 et 275 nm ;  $\text{AlCl}_3$  + HCl : 380, 342, 300 et 276 nm ; + acétate de Na : 382, 304 et 274 nm ; + acét. de Na et ac. borique : 342 et 267 nm) à l'apigénol (trihydroxy-5,7, 4' flavone). La liqueur mère concentrée est chromatographiée sur cellulose et sur silice comme précédemment. On a une tache de même Rf que l'acide glycuronique. Le flavonoïde C serait donc le glycuronide en 7 de l'apigénol.

#### EN RÉSUMÉ.

Les flavonosides A et B seraient donc respectivement les glycuronides en 7 du 6-hydroxy lutéolol et du lutéolol et le flavonoïde C le glycuronide en 7 de l'apigénol. L'existence de glycuronides de flavones a déjà été mise en évidence dans diverses plantes appartenant aux familles assez voisines des Composées (*Cichorium*, *Centaurea*, *Lactuca*) et des Scrofulariacées : notamment chez des *Antirrhinum* [6] et des *Digitalis* : glycuronides de l'hydroxy-6 lutéolol et du lutéolol chez *Digitalis lutea* [11] glycuronide de lutéolol chez *Digitalis* (= *Isoplexis*) *canariensis* [1]. On en a trouvé aussi chez *Plantago maritima* [10] et récemment chez des Hépatiques du genre *Marchantia* [9].

A noter, que nous n'avons pas retrouvé ici les dérivés méthylés de l'apigénol isolés par SUBRAMNIAN et coll. [12] dans la variété indienne. Cela peut tenir à ce que *Stachytarpheta jamaicensis*, espèce pantropicale, présente des formes différentes suivant son origine géographique, comme le signalaient déjà ENGLER et PRANTL en 1897. Nous n'avons pas trouvé non plus de C-flavonoïdes fréquents chez les *Vitex*. Enfin au point de vue chimiotaxinomique, il faut signaler que la composition chimique de ce *Stachytarpheta* est analogue en ce qui concerne les flavones (lutéolol et 6-hydroxy), les iridoïdes et les bases quaternaires, à celles des genres voisins *Lantana*, *Lippia*, *Verbena*, qui, chez les Verbénacées, sont classés dans la même tribu des Verbénoïdées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAUDOIN (G.) et PARIS (R.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1975, 9, 278.
- [2] DEBRAY (M.), JACQUEMIN (H.) et RAZAFINDRAMBAO (R.). — Travaux et documents O. R. S. T. O. M., 8, 1971, p. 47.
- [3] DURAND (E.) et coll. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1962, p. 563.
- [4] DURET (M<sup>lle</sup> S.) et PARIS (R.). — *Plantes méd. et Phyto.*, 1970, 4, p. 158.
- [5] FAUGERAS (G.) DEBELMAS (M<sup>me</sup> J.) et PARIS (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1967, 264, p. 1864.
- [6] HARBORNE (J. B.). — *Phytochemistry*, 1963, 2, p. 327.
- [7] HEGNAUER (R.). — *Chemotaxinomie der Pflanzen*, t. 6, 1973, p. 661.
- [8] HUMBERT (H.). — *Flore de Madagascar*, 175<sup>e</sup> famille : Verbénacées 1956, p. 22.
- [9] MARKHAM (K. R.) et PORTER (L. J.). — *Phytochemistry*, 1975, 14, p. 199 et 1093.
- [10] MOORE (D. M.) et coll. — *Botaniska Notiser*, 1972, 125, p. 261.
- [11] PARIS (R.) et BAUDOIN (G.). — *Pl. méd. et Phyto.*, 1974, 8, p. 204.
- [12] SUBRAMANIAN (S. S.), NAIR (A. G. R.) et VEDANTHAM (T. N. C.). — *Indian J. Pharm.*, 1974, 36, p. 15.