

**ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ
РЕЧОВИН У СИРОВИНІ ЛІХНІСУ
КОРОНЧАТОГО (*LYCHNIS CORONARIA* (L.)
MURRAY EX DESR.)**

Поліщук Ю.М., Бурда Н.Є.

**Кафедра фармакогнозії та нутриціології
Національного фармацевтичного університету
e-mail: cnc@nuph.edu.ua**

Вступ. Ліхніс корончатий (*Lychnis coronaria* (L.) Murray ex Desr.) – рослина родини Гвоздикові (Caryophyllaceae), яка вирощується на території України як орнаментальна. Щодо вивчення її використання у медицині, то є відомості, що у традиційній медицині сировина ліхнісу корончатого використовується при запальних процесах, зокрема шкіри, захворюваннях печінки та геморої, а також діареї, проказі, захворюваннях легенів, при авітамінозі [1]. Також різними науковцями для цієї рослини встановлена гепатопротекторна, протизапальна, антигепатотоксична, антиоксидантна, протипухлинна та протиастигматична активність [2, 3, 4, 5].

Хімічний склад ліхнісу корончатого потребує більш поглибленого та систематичного вивчення. Нами у попередніх роботах було розпочато дослідження фенольних сполук [6], однак для розуміння зв'язку хімічний склад – фармакологічна активність доцільно проводити вивчення ще й інших класів біологічно активних речовин.

Метою роботи було вивчення фенольних речовин спектрофотометричним методом, а також стероїдних, тритерпенових та летких сполук методом ГХ/МС у сировині ліхнісу корончатого.

Матеріали та методи. Для дослідження використовували траву, листя, квітки та стебла ліхнісу корончатого, які були заготовлені у фазі цвітіння в Харківській області (Україна) у липні – серпні 2021/2022 р.

Визначення вмісту флавоноїдів. Кількісний вміст флавоноїдів визначали за допомогою спектрофотометричного методу за довжини хвилі 410 нм у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид за методикою монографії ДФУ 2.0 “Ромашки квітки” [7].

Визначення вмісту суми поліфенолів. Кількісний вміст суми поліфенолів визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 760 нм у перерахунку на пірогалол за методикою загальної статті ДФУ 2.0 “Визначення танінів у лікарській рослинній сировині” [7].

Вивчення стероїдних та тритерпенових сполук. 0,05 г сировини вміщували до віали місткістю 2 мл, додавали внутрішній стандарт та 0,6 мл метилену хлорид. Як внутрішній стандарт використовували тридекан з розрахунку 50 мкг на наважку, з наступним розрахунком концентрації внутрішнього стандарту. Пробу витримували 3 години при температурі 50°C в ультразвуковому

екстракторі або при кімнатній температурі протягом доби. Екстракт зливали до віали місткістю 2 мл і концентрували продувкою (100 мл/хв) чистим азотом до залишкового об'єму екстракту 10 мкл. Введення проби (3 мкл) в хроматографічну колонку проводили в режимі splitless протягом 0,5 хв.

При проведенні аналізу додержувалися таких умов хроматографування:

- хроматограф Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973
- хроматографічна колонка – капілярна DB-5, внутрішній діаметр 0,25 мм, довжина 30 м
- швидкість газу носія (гелій) 1,2 мл/хв
- температура випаровувача 350°C, температура термостата запрограмована від 50° до 320°C зі швидкістю 4 град/хв.

Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 05 та WILEY 2007 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS та NIST [8].

Для розрахунку кількісного вмісту застосовували метод внутрішнього стандарту. Розрахунок вмісту компонентів (С, мкг/кг) проводили за формулою:

де $K_1 = \frac{P_1}{P_2}$ (P_1 – площа піку речовини, що досліджується, P_2 – площа піку стандарту); $K_2 = \frac{50}{M}$ (50 – маса внутрішнього стандарту (мкг), який вводили у зразок, M – наважка зразка (г)).

Вивчення летких сполук. 0,5 г сировини вміщували до віали місткістю 20 мл, додавали внутрішній стандарт. Як внутрішній стандарт використовували тридекан з розрахунку 50 мкг на наважку, з наступним розрахунком концентрації внутрішнього стандарту. До проби додавали 10 мл води очищеної та відганяли леткі компоненти з водяною парою протягом 2 годин з використанням зворотного холодильника з повітряним охолодженням.

У процесі відгонки леткі компоненти адсорбувалися на внутрішній поверхні зворотного холодильника. Адсорбовані речовини після охолодження системи змивали повільним додаванням 3 мл чистого пентану в суху віалу місткістю 10 мл. Змив концентрували продувкою (100 мл/хв) чистим азотом до залишкового об'єму екстракту 10 мкл, який повністю відбирали хроматографічним шприцом. Подальше концентрування проби проводили в самому шприці до об'єму 2 мкл.

При проведенні аналізу додержувалися таких умов хроматографування:

- хроматографічна колонка – капілярна DB-5, внутрішній діаметр 0,25 мм, довжина 30 м
- швидкість газу носія (гелій) 1,2 мл/хв
- температура випаровувача 250°C, температура термостата запрограмована від 50° до 320°C зі швидкістю 4 град/хв.

Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 05 та

WILEY 2007 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS та NIST [9].

Для розрахунку кількісного вмісту застосовували метод внутрішнього стандарту. Розрахунок вмісту компонентів (С, мг/кг) проводили за формулою:

$$K_1 = \frac{P_1}{P_2} \quad (P_1 - \text{площа піку речовини, що досліджується, } P_2 - \text{площа піку стандарту});$$

$$K_2 = 50/M \quad (50 - \text{маса внутрішнього}$$

стандарту (мкг), який вводили у зразок, М – наважка зразка (г)).

Результати та обговорення. Результати щодо визначення кількісного вмісту фенольних сполук наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Результати визначення вмісту фенольних сполук у сировині ліхнісу корончатого

Сировина	Біологічно активні речовини	
	Вміст, %	
	Флавоноїди	Сума поліфенолів
Листя	1,48 ± 0,03	5,72 ± 0,14
Квітки	1,63 ± 0,05	5,35 ± 0,13
Стебла	0,71 ± 0,02	4,87 ± 0,12
Трава	1,09 ± 0,03	7,85 ± 0,20

Як видно з таблиці 1, найбільший вміст флавоноїдів спостерігався у квітках (1,63 %) та у листі (1,48 %) ліхнісу корончатого. Незначний вміст був у стеблах досліджуваної рослини (0,71 %). Стосовно суми поліфенолів, то максимальний їх

вміст відмічався у траві (7,85 %), а найменший – у стеблах (4,87 %).

Час утримування ідентифікованих стероїдних та тритерпенових речовин у сировині ліхнісу корончатого наведено у табл. 2.

Таблиця 2. Час утримування ідентифікованих стероїдних та тритерпенових сполук

Ідентифікована речовина	Час утримування, хв
Стероїди та тритерпеноїди	
Авенастерол	15,93 ± 0,06
Коронозид А	21,43 ± 0,11
Коронозид В	22,31 ± 0,17
Таракстерол	23,01 ± 0,13
β-Амірин	35,71 ± 0,15
β-Ситостерол	43,55 ± 0,17
Спінастерол	44,25 ± 0,27
Стигмаст-5-ен-3-он	44,45 ± 0,24
Кампестерол	44,65 ± 0,21
Стигмастерол	44,97 ± 0,23
Холест-7-ен-6-он	45,74 ± 0,20
Гедерагенін	91,73 ± 0,28
Олеанолова кислота	109,50 ± 0,31

Результати аналізу наведено у табл. 3-6.

Таблиця 3. Результати визначення стероїдів та тритерпеноїдів сполук у траві ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Стероїди та тритерпеноїди (мг/кг)		
Авенастерол	5,18	0,18
Коронозид А	9,23	0,56
Коронозид В	3,56	0,12
Таракстерол	13,38	0,16
β-Амірин	31,64	1,67
β-Ситостерол	37,24	1,40
Спінастерол	16,65	0,40
Стигмаст-5-ен-3-он	21,15	0,54

Кампестерол	9,13	0,38
Стигмастерол	54,22	6,23
Холест-7-єн-6-он	27,14	0,34
Гедерагенін	4,38	0,10
Олеанолова кислота	23,81	0,98

Як видно з табл. 3, у траві ліхнісу корончатого ідентифіковано 13 сполук, які відносяться до стероїдів та тритерпеноїдів. За вмістом домінував стигмастерол (54,22 мг/кг), а

також з достатньо високим кількісним вмістом був β -ситостерол (37,24 мг/кг). У незначній кількості містився тритерпеноїд коронозид В (3,56 мг/кг).

Таблиця 4. Результати визначення стероїдів та тритерпеноїдів сполук у листі ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Стероїди та тритерпеноїди (мг/кг)		
Авенастерол	6,10	0,78
Коронозид А	7,53	0,78
Коронозид В	6,31	1,02
Тараксастерол	23,34	2,34
β -Амірин	26,25	3,60
β -Ситостерол	30,52	4,56
Спінастерол	26,73	2,88
Стигмаст-5-єн-3-он	33,78	4,70
Кампестерол	1,74	0,16
Стигмастерол	19,56	1,18
Гедерагенін	7,89	0,60
Олеанолова кислота	28,94	3,58

У результаті проведеного дослідження у листі ліхнісу корончатого встановлено наявність 12 стероїдів та тритерпеноїдів. За вмістом переважали стигмаст-5-єн-3-он та β -ситостерол – 33,78 мг/кг та

30,52 мг/кг відповідно. Стосовно сполук з незначним вмістом, то слід відмітити кампестерол – 1,74 мг/кг.

Таблиця 5. Результати визначення стероїдів та тритерпеноїдів сполук у квітках ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Стероїди та тритерпеноїди (мг/кг)		
Коронозид А	3,47	0,30
Коронозид В	1,89	0,18
Тараксастерол	5,91	0,67
β -Амірин	58,41	3,11
β -Ситостерол	70,73	4,88
Стигмастерол	22,63	1,44

Як видно з представлених вище результатів експерименту, у квітках досліджуваної рослини ідентифіковано 6 сполук, які віднесені до стероїдів та тритерпеноїдів. Серед сполук з високим вмістом

спостерігали β -ситостерол, β -амірин та стигмастерол – 70,73 мг/кг, 58,41 мг/кг та 22,63 мг/кг відповідно. У незначній кількості накопичувався коронозид В (1,89 мг/кг).

Таблиця 6. Результати визначення стероїдів та тритерпеноїдів сполук у стеблах ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Стероїди та тритерпеноїди (мг/кг)		
β -Ситостерол	9,17	0,89
Спінастерол	3,34	0,47
Стигмастерол	5,18	0,45
Холест-7-єн-6-он	23,36	1,78

У стеблах ліхнісу корончатого у порівнянні з іншими видами сировини ідентифіковано найменше сполук, а саме 4 стероїди. Серед виявлених речовин в найбільшій кількості містився холест-7-ен-6-он (23,36 мг/кг), у найменшій кількості – спінастерол (3,34 мг/кг).

Таким чином, за результатами проведеного дослідження можна зробити висновок, що стероїди та тритерпеноїди більшою мірою накопичуються у траві, листі та квітках ліхнісу корончатого.

Таблиця 7. Час утримування ідентифікованих летких сполук

Ідентифікована речовина	Час утримування, хв
Леткі сполуки	
Мірцен	8,40 ± 0,06
β-Оцимен	10,08 ± 0,09
Бузковий альдегід В	10,70 ± 0,10
γ-Карен	12,10 ± 0,05
Ліналоол	12,85 ± 0,07
α-Пінен	17,74 ± 0,11
β-Бурбонен	24,53 ± 0,17
Лимонен	24,93 ± 0,14
α-Феландрен	25,47 ± 0,08
β-Фарнезен	29,46 ± 0,19
α-Копасен	51,42 ± 0,15
β-Каріофілен	54,02 ± 0,21

Результати щодо ідентифікації та досліджуваних видах сировини представлені у кількісного вмісту летких компонентів у табл. 8-11.

Таблиця 8. Результати визначення летких сполук у траві ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Леткі сполуки (мг/кг)		
Мірцен	2,91	0,26
β-Оцимен	32,23	4,56
Бузковий альдегід В	5,31	0,49
γ-Карен	0,15	0,06
Ліналоол	7,48	0,96
α-Пінен	4,93	0,88
β-Бурбонен	1,74	0,14
Лимонен	5,81	0,72
α-Феландрен	9,66	0,78
β-Фарнезен	2,35	0,12
α-Копасен	1,54	0,15
β-Каріофілен	22,46	1,50

Отже, у траві ліхнісу корончатого у результаті проведеного дослідження ідентифіковано 12 летких сполук, що відносяться до монотерпеноїдів, сесквітерпеноїдів, а також

ароматичних речовин. Серед домінуючих за вмістом сполук слід виокремити β-оцимен (32,23 мг/кг) та β-каріофілен (22,46 мг/кг). У мінорних кількостях містився γ-карен (0,15 мг/кг).

Таблиця 9. Результати визначення летких сполук у листі ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Леткі сполуки (мг/кг)		
Мірцен	0,72	0,06
β-Оцимен	10,11	0,78
γ-Карен	0,35	0,09
α-Пінен	13,70	0,98

Лимонен	11,64	0,43
α -Феландрен	3,17	0,45
β -Фарнезен	3,27	0,34
β -Каріофілен	6,64	0,56

Як видно з таблиці 9, у листі досліджуваної рослини ідентифіковано 8 летких сполук, серед яких переважали за вмістом α -пінен, лимонен та β -оцимен

– 13,70 мг/кг, 11,64 мг/кг і 10,11 мг/кг відповідно. У незначній кількості були γ -карен і мірцен – 0,35 мг/кг та 0,72 мг/кг відповідно.

Таблиця 10. Результати визначення летких сполук у квітках ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Леткі сполуки (мг/кг)		
Мірцен	1,61	0,12
β -Оцимен	49,87	2,12
Бузковий альдегід В	2,74	0,56
Ліналоол	14,53	1,87
α -Пінен	0,80	0,09
β -Бурбонен	6,51	0,88
Лимонен	4,92	0,35
α -Феландрен	1,56	0,10
β -Каріофілен	23,51	1,47

У квітках ліхнісу корончатого у підсумку проведеного експерименту було ідентифіковано 9 летких компонентів. Максимальний вміст

спостерігався у β -оцимену (49,87 мг/кг), дещо менше було β -каріофілену (23,51 мг/кг). Найменший вміст був встановлений у α -пінену (0,80 мг/кг).

Таблиця 11. Результати визначення летких сполук у стеблах ліхнісу корончатого

Ідентифікована речовина	Результати випробувань	Розширена невизначеність
Леткі сполуки (мг/кг)		
Мірцен	1,87	0,45
γ -Карен	0,14	0,08
Ліналоол	4,45	0,61
α -Пінен	3,70	0,11
Лимонен	4,67	0,37
α -Феландрен	12,92	1,44
α -Копасн	1,23	0,08
β -Каріофілен	18,58	1,12

У результаті експерименту у стеблах ліхнісу корончатого було ідентифіковано 8 летких компонентів. Встановлено, що за вмістом превалювали β -каріофілен і α -феландрен (18,58 мг/кг та 12,92 мг/кг). У незначній кількості був γ -карен (0,14 мг/кг).

Отже, у підсумку встановлено, що усі досліджувані види сировини ліхнісу корончатого містили леткі сполуки, однак їх кількість різнилася – у більшій кількості вони накопичувалися у траві, листі та квітках ліхнісу корончатого.

Висновки. Таким чином, за допомогою проведеного масиву експериментальних досліджень були поглиблені відомості щодо хімічного складу сировини ліхнісу корончатого, а саме трави, листя, квіток та стебел. Встановлено, що більшою мірою накопичення біологічно активних речовин

відбувається у листі, квітках та траві ліхнісу корончатого. Отримані результати можуть бути використані при розробці відповідних розділів нормативної документації для стандартизації сировини досліджуваної рослини.

Study of biologically active substances in *Lychnis coronaria* raw materials
Polyshechuk Yu., Burda N.

Introduction. *Lychnis coronaria* (L.) Murray ex Desr. is a plant of Caryophyllaceae family, which is grown in Ukraine as an ornamental plant. As for the study of its use in medicine, there is information that in traditional medicine the raw material of *Lychnis coronaria* is used for inflammatory processes, in particular inflammatory processes of the skin, liver diseases and hemorrhoids, as well as diarrhea, leprosy, lung diseases, and vitamin

deficiency. Also, various scientists have established hepatoprotective, anti-inflammatory, antihepatotoxic, antioxidant, antitumor and antiasthmatic activity for this plant. The chemical composition of *Lychnis coronaria* needs a more in-depth and systematic study. In our previous works, we started the study of phenolic compounds, but in order to understand the relationship between chemical composition and pharmacological activity, it is advisable to study other classes of biologically active substances. The aim of the work was to study phenolic substances by the spectrophotometric method, as well as steroid, triterpene and volatile compounds by the GC/MS method in the raw materials of *Lychnis coronaria*. **Materials and methods.** The research used herb, leaves, flowers and stems of *Lychnis coronaria*, which were harvested in the flowering phase in the Kharkiv region (Ukraine) in July - August 2021/2022. The quantitative content of flavonoids was determined by spectrophotometric method at a wavelength of 410 nm in terms of luteolin-7-glucoside according to the method of the monograph State Pharmacopoeia of Ukraine 2.0 "Chamomile flower^N". Quantitative content of the sum of polyphenols was determined by spectrophotometric method at a wavelength of 760 nm in terms of pyrogallol according to the method of the general article State Pharmacopoeia of Ukraine 2.0 "Determination of tannins in medicinal plant raw materials". The study of steroid substances, triterpenoids and volatile compounds was carried out by GC/MS method. **Research results.** The highest content of flavonoids was observed in flowers (1.63 %) and leaves (1.48 %) of *Lychnis coronaria*. The content was insignificant in the stems of the studied plant (0.71%). Regarding the amount of polyphenols, their maximum content was noted in the herb (7.85%), and the lowest - in the stems (4.87%). 13 compounds belonging to steroids and triterpenoids have been identified in *Lychnis coronaria* herb. The content was dominated by stigmasterol (54.22 mg/kg), as well as β -sitosterol (37.24 mg/kg) with a fairly high quantitative content. Triterpenoid coronoside B (3.56 mg/kg) was contained in a small amount. As a result of the conducted research, the presence of 12 steroids and triterpenoids was established in *Lychnis coronaria* leaves. Stigmast-5-en-3-one and β -sitosterol prevailed in terms of content - 33.78 mg/kg and 30.52 mg/kg, respectively. With regard to compounds with an insignificant content, campesterol should be noted - 1.74 mg/kg. 6 compounds classified as steroids and triterpenoids were identified in the flowers of the studied plant. Among the compounds with a high content, β -sitosterol, β -amyrin and stigmasterol were observed - 70.73 mg/kg, 58.41 mg/kg and 22.63 mg/kg, respectively. A small amount of coronoside B accumulated (1.89 mg/kg). In comparison with other types of raw materials, the fewest compounds, namely 4 steroids, were identified in the stems of *Lychnis coronaria*. Among the detected substances, cholest-7-en-6-one (23.36 mg/kg) was contained in the largest quantity, while spinasterol (3.34 mg/kg) was contained in the smallest quantity. Thus, based on the results of the research, it can be concluded that steroids and triterpenoids accumulate to a greater extent in the herb,

DOI: 10.5281/zenodo.8324906

leaves and flowers of *Lychnis coronaria*. As a result of the research, 12 volatile compounds related to monoterpenoids, sesquiterpenoids, as well as aromatic substances were identified in *Lychnis coronaria* herb. Among the dominant compounds in terms of content, β -ocimene (32.23 mg/kg) and β -caryophyllene (22.46 mg/kg) should be singled out. Minor amounts contained γ -carene (0.15 mg/kg). 8 volatile compounds were identified in the leaf of the studied plant, among which α -pinene, limonene, and β -ocimene dominated in content - 13.70 mg/kg, 11.64 mg/kg, and 10.11 mg/kg, respectively. γ -carene and myrcene were in small amounts - 0.35 mg/kg and 0.72 mg/kg, respectively. As a result of the experiment, 9 volatile components were identified in the flowers of *Lychnis coronaria*. The maximum content was observed in β -ocimene (49.87 mg/kg), slightly less β -caryophyllene (23.51 mg/kg). The lowest content was found in α -pinene (0.80 mg/kg). As a result of the experiment, 8 volatile components were identified in the stems of *Lychnis coronaria*. It was established that β -caryophyllene and α -phellandrene prevailed in terms of content (18.58 mg/kg and 12.92 mg/kg). There was a small amount of γ -carene (0.14 mg/kg). So, as a result, it was established that all the studied types of *Lychnis coronaria* raw materials contained volatile compounds, but their amount varied - they accumulated in larger quantities in *Lychnis coronaria* herb, leaves and flowers. **Conclusions.** Thus, with the help of the conducted array of experimental studies, information was deepened on the chemical composition of the raw materials of *Lychnis coronaria*, namely herb, leaves, flowers and stems. It was established that the accumulation of biologically active substances to a greater extent occurs in the leaves, flowers and herb of *Lychnis coronaria*. The obtained results can be used in the development of relevant sections of regulatory documentation for the standardization of the studied plant raw materials. **Keywords:** *Lychnis coronaria* (L.) Murray Ex Desr., phenolic compounds, steroids, triterpenoids, volatile compounds, spectrophotometry, GC/MS

References

1. Bahar Ahmed, Mubashir H. Masoodi, Shamshir Khan et al. *Lychnis coronaria* Linn. A review. NPAIJ. 2008. Vol. 4(1). P. 22-25.
2. Shabir Ahmad Ganai, Mudasir A. Mir, Basit Amin Shah et al. Evaluation of free radical quenching, anti-inflammatory activity together with anticancer potential of *Lychnis coronaria* and characterization of novel molecules from its extract through high resolution-liquid chromatography mass spectrometry coupled to structural biochemistry approach. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2023. Feb 7. P. 1-15. DOI: 10.1080/07391102.2023.2173296
3. Pankaj Verma, Kavita Gulati, Arunabha Ray. Evaluation of Cellular and Molecular Mechanism of Anti-Asthmatic Effects of A Traditional Herbal Drug In Rats. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development. 2021. Vol. 9(5). P. 29-34.
4. Mubashir Masoodi, Shamshir Khan, Khan S, Amita Verma. Evaluation of antihepatotoxic activity of *Lychnis*

coronaria L. aqueous extract in carbon tetrachloride induced toxicity. *Indian Drugs*. 2007. Vol. 44(4). P. 618-621.

5. Ia Georgieva, G Furnadzhiev, E Balabanova-Radonova. Effect of plant extracts of *Lychnis coronaria* L. on inflammatory swellings of the hind paws of white rats. *Eksp Med Morfol*. 1982. Vol. 21(2). P.77-81. in Bulgarian

6. Polishchuk Yu, Burda N Study of phenolic compounds in *Lychnis coronaria* raw materials by HPLC. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2023. № 1. C. 33-37. DOI: 10.5281/zenodo.7721729 in Ukrainian

7. State Pharmacopoeia of Ukraine 2.0. 2014. Vol. 3. 732 p.

8. Burda NYe. Study of steroid compounds of shiitake, reishi and cordyceps mushrooms. *Phytotherapy. Journal*. 2013. № 4. C. 67-69. in Ukrainian

9. Protska V, Fedosov A, Burda N et al. The study of volatile fractions of cabbage leaves (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* (L.) Alef. var. *alba* DC.) and determination of its antibacterial and antifungal activity. *TJPS*. 2021. Vol. 45 (4). P. 264-272.