

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра фармакогнозії та ботаніки

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВИНИ
РІЗНИХ СОРТІВ *CALENDULA OFFICINALIS* L.**

Виконала: здобувач вищої освіти 5 курсу
напряму підготовки (спеціальності)

22 Охорона здоров'я

226 Фармація, промислова фармація

Крупська Оксана Ярославівна

Керівник: д. біол. н., професор Мінарченко В.М.

Рецензент: к. пед. н., доцент Чхало О.М.

Київ 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА CALENDULA OFFICINALIS ТА СОРТІВ.....	8
1.1. Характеристика поширення, морфо-біологічних особливостей та вирощування <i>Calendula officinalis</i> та її сортів.....	8
РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ СИРОВИНИ CALENDULA OFFICINALIS, ЇХ ДІЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ.....	12
2.1. Вміст основних біологічно активних речовин в <i>Calendula officinalis</i>	12
2.2 . Фармако-терапевтичні властивості біологічно активних речовин <i>Calendula officinalis</i> та застосування.....	19
2.3. Визначення вмісту суми флавоноїдів в суцвіттях деяких сортів <i>Calendula officinalis</i>	26
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36

ВСТУП

Актуальність теми. Вид нагідки лікарські (*Calendula officinalis* L.) належить до родини айстрових (Asteraceae). Це однорічна трав'яниста рослина, родом з південної Європи, але в промислових масштабах культивується у більшості країн північної півкулі [13].

C. officinalis як важлива лікарська рослина знайшла широке застосування в традиційній та офіційній медицині більшості країн світу, а також в харчовій, косметичній, фармацевтичній промисловості завдяки наявності в рослині цілющих вторинних метаболітів. Рід *Calendula* налічує близько 25 видів, серед яких найбільш поширені *C. officinalis*, *C. arvensis*, *C. tripterocarpa*, *C. stellata* та *C. suffruticose* [16]. Нагідки лікарські є найбільш вивченим видом даного роду. Він використовувався в медицині з 12-го століття і відомий за англійськими назвами «English Marigold», «Pot Marigold», «Holigold», «Mary Bud», «Marybud» та «Mary Gowles»[50]. Назва «календула» походить від латинського слова «calends», що означає перший день кожного місяця, коли цвіте календула. Крім того, нагідки в Україні також називають «сонячною травою», враховуючи розкривання суцвіть календули вранці. Відомо, що всі частини суцвіття нагідок мають подібні компоненти, однак у різних кількостях, що призводить до того, що участь окремих елементів суцвіття може мати вирішальну роль у її медичній цінності. Відповідно, в Державній фармакопеї України (ДФУ) наявні різні монографії на сировину *Calendulae flos* (квітки нагідок), включаючи квітки культивованих махрових форм без ложа кошика та квіткові кошики махрових і немахрових форм, а також «Нагідок настойка» [1, 2]. Ідентифікація для обох видів сировини здійснюється в перерахунку на гіперозид з вмістом флавоноїдів не менше 0,4%, на настойку – не менше 0,04% флавоноїдів у перерахунку на гіперозид.

Протягом тривалого часу цю традиційну рослину використовували для лікування невеликих опіків, ран і проблем зі шкірою, причому це традиційне використання є актуальним і нині. В даний час використовуються також ліки

і косметику, які включають каротиноїди, отримані з квіток нагідок. Це один із інгредієнтів відомого гомеопатичного препарату Траумель®, який призначений для зняття болю та набряку, спричинених раптовими травмами опорно-рухового апарату [58]. Крім того, багато джерел пропонують використовувати порошок пелюсток календули як економічну заміну шафрану, оскільки його барвник і ароматизатор нині використовують в продуктах харчування [20].

Огляд літератури про *C. officinalis* свідчить, що її сировина (кітки та листя) містять різні фітохімічні речовини, включаючи вуглеводи, фенольні сполуки, ліпіди, стероїди, токоферолі, терпеноїди, хінони та каротиноїди [25, 49].

Calendula officinalis вважається безпечним препаратом з огляду на її терапевтичний потенціал із належною дозою та іншими фармакологічними показаннями [8]. Деякі токсикологічні дослідження навіть довели безпеку гострого і підгострого застосування календули з точки зору біохімічних і фізичних параметрів. За даними Європейського агентства з лікарських засобів, олія календула класифікується як рослинний медичний продукт і має заявлене значення LD 50 (летальна доза 50) 20 мл/кг маси тіла [54]. Діючі речовини *C. officinalis* - ефективний засіб проти епілептичних нападів, лихоманки, болю, проблем з нирками, м'язового болю, гіпертонії, шкірних захворювань, порізів, ран, виразок; ефективний при захворюваннях печінки, судомах, виразках, жовтяниці, геморої, загоєння внутрішніх органів тощо [49] .

Сухі і свіжі квіти нагідок широко використовуються в харчовій галузі. У багатьох частинах світу все більше і більше починають складатися асортименти продуктів харчування з їстівними квітами, оскільки вони можуть бути потенційно багатими природними ресурсами антиоксидантів і каротиноїдів і можуть бути використані у функціональну їжу, яка збільшує та покращує зовнішній вигляд, смак і естетична цінність цих продукти харчування [27]. Зараз багато важливих каротиноїдів використовуються як пігменти – харчові барвники в харчовій промисловості.

Нагідки накопичують велику кількість різноманітних каротиноїдів у квітах, тому це багатообіцяюча рослина для приправ харчового виробництва, а також барвників в харчовій промисловості. Нині тренд на шляху дослідження календули представляє великі перспективи для різних галузей.

Мета і завдання дослідження. Метою даної магістерської роботи є комплексне фармакогностичне дослідження сучасних сортів *Calendula officinalis* для розробки нових лікарських засобів рослинного походження.

Для досягнення поставленої мети у магістерській роботі було потрібно вирішити наступні задачі:

- з'ясувати особливості поширення та вирощування *Calendula officinalis*;
- здійснити аналіз дослідження її біологічно активних речовин;
- встановити особливості використання *C. officinalis*;
- здійснити аналіз вмісту флавоноїдів в сировині модельних сортів нагідок.

Предмет дослідження: встановлення вмісту біологічно активних сполук та особливостей використання сировини нагідок в Україні.

Об'єкт дослідження: сировина сортів *Calendula officinalis* : «Монарх», «492» і «Оранж» .

Методи дослідження. При виконанні досліджень використано порівняльно-аналітичні, фітохімічні методи дослідження. Дослідження календули були зосереджені на екстракційних властивостях біоактивних сполук з квіток. Для кількісного визначення флавоноїдів готували сировину різних сортів нагідок, відповідно до вимог ДФУ з використанням відповідних розчинників та кип'ятінням впродовж 30 хв і подальшим фільтруванням крізь тампон вати в мірну колбу місткістю 100 мл [2]. Екстрагували двома порціями, проводячи повторне кип'ятіння зі зворотним холодильником 10 хв з подальшим охолодженням до кімнатної температури. Об'єднаний розчин знову фільтрували і доводили до 100 мл ацетоном Р. Подальші процедури

проводили відповідно до методики кількісного визначення флавоноїдів, вміщеної в ДФУ[1,2]. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали через 30 хв після приготування спектрофотометрично на довжині хвилі 425 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст флавоноїдів визначали у перерахунку на гіперозид (y%) за формулою

$$x = \frac{A * 100 * 50 * 25 * 100 * 100}{m * 500 * 20 * 10 * (100 - W) * 100} \Rightarrow \frac{A * 125}{m * (100 - W)}$$

де А – оптична густина досліджуваного розчину при довжині хвилі 425 нм;

m – маса наважки зразка досліджуваної сировини, г.

Питомий показник поглинання гіперозиду складає 500.

Пошук даних з питань фітохімії, фармакології та використання біологічно активних сполук *C. officinalis* здійснювався в базах даних, напр. PubMed, Web of Science, SciFinder тощо.

Новизна та значення одержаних результатів. Проведено комплексне фармакогностичне дослідження *Calendula officinalis* та її сортів, які зростають в Україні, виявлено сортоспецифічні особливості накопичення флавоноїдів у суцвіттях різних сортів. Практичне значення одержаних результатів: фармакогностичні дослідження вказують на те, що накопичення флавоноїдів залежить, в першу чергу, від забарвлення квіток у суцвітті нагідок: кількісні показники вмісту цих речовин збільшуються зі зростанням насиченості кольору пелюсток квіток. Визначено, що основні біологічно активні речовини сировини *C. officinalis*, як ефірні олії, каротиноїди, флавоноїди, терпеноїди, кумарини, хінони, амінокислоти, зумовлюють її протизапальну, протимікробну, антиоксидантну, антисептичну, протівірусну, гепатопротекторну та нефропротекторну дію. В роботі проаналізовано поширення, вирощування, діючі речовини та представленість *C. officinalis* в лікарських засобах на фармацевтичному ринку України.

Апробація результатів дослідження. Матеріали роботи апробовані у вигляді публікації тезів та наукової доповіді на V Науково-практичній

конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА» присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 100-річчя від дня народження) 29 лютого 2025 р.

Публікації. Крупська О. Я., Мінарченко В.М. Визначення вмісту суми флавоноїдів в суцвіттях сортів *Calendula officinalis*. Збірник робіт V Науково-практичної конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА», присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 100-річчя від дня народження), 28-29 січня 2025 р., м. Київ, Україна. – Київ, 2025.

Структура роботи. Кількість сторінок – 43, кількість розділів – 2, кількість рисунків – 3, кількість таблиць – 5, кількість використаних джерел – 64.

РОЗДІЛ 1. БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА CALENDULA OFFICINALIS ТА СОРТІВ

1.1. Характеристика поширення, морфо-біологічних особливостей та вирощування *Calendula officinalis* та її сортів.

Рід *Calendula* (нагідки, календула) налічує, у залежності від трактування видової самостійності, 22-25 видів трав'янистих рослин, які зростають у Середземномор'ї, Ірано-Тураннському та Сахаро-Аравійському регіонах . З них найбільш поширені та досліджені *C. officinalis*, *C. arvensis*, *C. tripterocarpa*, *C. stellata*, *C. suffruticosa*, *C. aurantiaca*, *C. karakalensi*, *C. persica*, *C. sancta* та *C. alata* [6, 8]. В Україні широко досліджуються біологічні властивості, перспективи селекції та підвищення урожайності суцвіть види цього роду впродовж кількох десятиліть. Зокрема, на Дослідній станції лікарських рослин Інституту агроєкології УААН, яка розташована в селі Березоточа Лубенського району Полтавської області здійснюються дослідження чотирьох видів: *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L., *C. tripterocarpa* Rupr. та *C. alata* Rech., які є колекції Дослідної станції[4,5].

Залежно від сорту і умов культивування, рослини *Calendula officinalis* виростають до 60-80 см. Забарвлення квітів варіюється від жовтого до помаранчевого, в помірній зоні північної півкулі рослини цвітуть з червня до пізньої осені. Суцвіття поодинокі на верхівках квітконосних пагонів, в діаметрі 5–7 см. Суцвіття знизу обгорнуті численними звуженими ланцетними чашолистками, компактно покритими з обох боків залозистими трихомами, тому суцвіття прилипають до рук при збиранні сировини. Крайові язичкові жіночі квітки суцвіття жовто-помаранчеві, серединні (дискові) квітки- трубчасті, гермафродитні; плід – серпоподібні чи кільчасті сім'янки.

В умовах Лісостепової зони України складаються найсприятливіші погодні умови для вирощування сировини цього виду. Дослідженнями українських селекціонерів встановлено, що при сприятливих погодних умовах (достатня кількість опадів та сонячних днів) збільшується кількість суцвіть і

кількості пагонів більшості досліджуваних зразків, але, разом з тим зі збільшенням кількості пагонів і суцвіть у низки зразків зменшується маса одного суцвіття, що вирішальним чином впливає на загальну продуктивність суцвіть. Водночас за вмістом флавоноїдів усі високопродуктивні зразки позитивно і суттєво реагують на поліпшення умов року, за винятком дикорослого виду *C. tripterocarpa*, який реагує слабо [5]. В деяких зарубіжних європейських дослідженнях визначено, що погодні умови року та сорт нагідок істотно впливають лише на врожайність сухих квітів [15]. А на якість сухих квітів і пелюсток істотно впливав лише сорт. А в умовах Єгипту вегетативний ріст і хімічні складові словацького *C. officinalis* були більш перспективними, ніж французькі *C. officinalis* і *C. stellata* [35]. Крім того, застосування позакореневого добрива (що містить 6% Mn, Mg і Cu в хелатних формах) у дозі 4 мг/5 л покращило характеристики росту, урожайність квіток і хімічні складові. Вплив дати посіву та щільності посадки на врожайність насіння та квіток нагідок було оцінено під час експерименту, проведеного в Ірані [18]. У цьому дослідженні порівнювали три дати посіву (30 березня, 14 квітня та 30 квітня) і три густоти рослин (відстань між рядками = 10, 20 і 30 см). Урожайність насіння та квітів суттєво відрізнялася залежно від строку посадки та густоти посадки. Дата сівби мала значний вплив на індекс урожаю квітів та насіння. Остання дата сівби призвела до найвищої якості квітів і насіння. Щільність рослин не мала значного впливу на квітки, але вплив на насіння був значним. Загалом результат показав, що перший строк посіву з 25 рослинами/м² мав найвищий урожай зерна та квітів. Але потрібно враховувати, що територія досліджень розташована значно південніше України і терміни та умови сівби цих же сортів можуть бути тут відмінними, зважаючи на температурний режим весняного періоду.

У деяких країнах повідомлялося про окремі підвиди *C. officinalis*, які можна використовувати як барвник, оскільки суцвіття містять два класи

пігментів, флавоноїди та каротиноїди, які можна використовувати як жовтий і оранжевий природні кольори [37].

Колір пелюсток нагідків варіює від блідо-жовтого до помаранчевого, що зумовлене викликані рівнями накопичення каротиноїдів. Загалом досліджено 19 каротиноїдів, які виявлені в квітках нагідок різних сортів, з них було виявлено 10 каротиноїдів тільки у сортів з оранжевими квітками [45]. Зокрема з'ясували, що пелюстки жовтого кольору не містять рубіксантин, α -каротин, рубіксантин, δ -каротин, лікопін, γ -каротин, елікопен та ін. Тому вважається, що ці каротиноїди відповідають за помаранчевий колір пелюсток. Подібні результати показали Kishimoto ін. (2005) [30] у дослідженнях чотирьох сортів *Calendula officinalis* – двох з помаранчевими квітками («Double Esterel» і «Radio Extra Selected») і два жовтоквіткові («Bonbon Abricot» і «Double Esterel Jaune»). Вони з'ясували, що склад різних каротиноїдів збільшується зі зростанням інтенсивності кольору, темно-помаранчевий різновид є найбагатший на рубіксантин, лікопін і γ -каротин, але сорт з жовтими квітками («Bonbon Abricot») містить значну кількість β -каротину, хоча дуже низька кількість γ -каротину і особливо мало лікопіну. В інших дослідженнях Кісімото та ін. (2007) [32] повідомили, що сорти, які мають оранжеві квіти містять такий же склад. Загалом встановлено, що оранжево-квіткові сорти календули накопичують більше червонуватих каротиноїдів, ніж жовтоквіткові сорти [31]. Інтенсивність забарвлення оранжево-квіткових сортів є перш за все завдяки лікопіну, якого немає в жовтих квітках.

Загалом найбагатший за загальним вмістом каротиноїдів це суцвіття сортів *C. officinalis* з коричнево-жовтими та оранжевими квітками. Загальний вміст каротиноїдів також залежить від регіону вирощування. Цей же сорт вирощується в різних регіонах показали різний вміст каротиноїдів. Наприклад, сорт «Фієста Гітана», вирощений у Центральній Естонії (Ярвамаа) містив на 40% менше каротиноїдів, ніж в південній Естонії [45]. Таким чином,

взаємозв'язок між сортами *C. officinalis* і вмістом загальних каротиноїдів є не зовсім зрозумілим і тому необхідні більше досліджень в майбутньому.

Зважаючи на те, що нагідки лікарські використовуються для фармацевтичних цілей лише з культивованих рослин, здійснюється ряд досліджень на можливість регулювання накопичення рослинами біологічно активних речовин через внесення органічних і неорганічних добрив. Такі дослідження також проводяться в Україні і разом з удосконаленням технології вирощування *C. officinalis* застосовується регулювання накопичення діючих речовин рослинами завдяки додаванню мікро- та макроелементів у ґрунт [5,6].

РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ СИРОВИНИ *CALENDULA OFFICINALIS* ТА ЇХ ДІЯ

2. 1. Вміст основних біологічно активних речовин в

Calendula officinalis

Зважаючи на поширення та популярність цього виду як лікарської рослини відомо багато досліджень біологічно активних сполук його сировини (насамперед – квіток) у різних країнах (Табл. 2.1) [45, 56]. З кожним роком з'являються все нові і нові дані щодо особливостей та закономірностей накопичення певних діючих речовин рослинами *Calendula officinalis* значно менше робіт, присвячених вивченню біологічно активних сполук окремих сортів нагідок. Деякі з важливих компонентів фармакологічної активності нагідок належать до різних класів хімічних сполук - терпеноїдів, флавоноїдів, ефірів тритерпенеолу, стероїдів, фенольних сполук, каротиноїдів, тритерпеноїдів, ефірної олії, хінонів, жирних кислот, сапонінів, вуглеводів тощо[22]. Усі ці вторинні метаболіти збільшують важливість для пошуку шляхів подальшого їх використання у фармацевтичній галузі та медицині. Ряд фітохімічних досліджень продемонстрував наявність основних класів хімічних сполук *C. officinalis*, як ефірні олії, каротиноїди, флавоноїди, терпеноїди, кумарини, хінони, амінокислоти, вуглеводи та ліпіди [22, 37,47].

У хімічному складі рослини *Calendula officinalis* виявлено ефірну олію, флавоноїди, високий вміст каротиноїдів у квітках. Жирні кислоти, тритерпени та стерини містяться в екстракті листя календули лікарської. Водний екстракт календули лікарської містить сапоніни, фенольні сполуки, танін. В спиртовому екстракті виявлено алкалоїди, флавоноїди, сапоніни. У водному екстракті виявлені флавоноїди і сапоніни. З хінону в різних зрізах календули лікарської виділено пластохінон, філохінон, токоферол та убіхінон [7] .

Ефірна олія та її складові

Аналіз літературних джерел свідчить про широкий діапазон мінливості якісного та кількісного складу ефірної олії в різних регіонах та залежно від

методів її отримання. Склад ефірної олії *C. officinalis* вивчається з початку 21 століття [47]. Як правило, γ -кадинен, δ -кадинен і α -кадинол були визначені як основні компоненти олії [26-28,30-33]. Хемотипи сортів *C. officinalis* не ясні. Так, дослідження ефірної олії *C. officinalis* французької селекції виявило, що вона переважно складається з метилгексаноату, метиллінолеату, метил 9, 12, 15-октадекатрієноату, метилоктадеканоату, метилтетрадеканоату, γ -кадінену та кубенолу, δ -кадінену, α -кадинолу і оплопанеку [37].

Тоді як в інших дослідженнях [29] основними компонентами ефірної олії *C. officinalis* були α -кадинол, Δ -кадинен, δ -каденен і неролідол. Іншими дослідженнями також виявлено різні закономірності на різних фазах вегетаційних циклів. Радулеску та ін. (2000) досліджували квітки нагідок з Румунії і виявили, що основними сполуками ефірної олії є δ -кадинен, 1, 3, 5-кадинатрієн та α -мууролол [48]. Gazim et al. (2007) встановили, що основними складовими ефірної олії суцвіть нагідок є сесквітерпенові вуглеводні (68,0%) і сесквітерпеноли (27,0%), δ -кадинен (22,53%), α -кадинол (20,40%) і епі- α -мууролол (12,87%) [21]. В дослідженні Бразильських зразків в ефірній олії були ідентифіковані 27 хімічних речовин [22]. Основними речовинами, присутніми в ефірній олії квітів *C. officinalis*, були δ -кадинен (22,5; 22,1 та 18,4%) γ -кадинен (8,9, 25,4 та 24,9%) та 20,4 % α -кадинолу спостерігався лише в екстракції паром. Комплексні дослідження основних складовими ефірних олій *C. officinalis*, які культивуються в Південній Бразилії, Південній Африці, Сербії та Чорногорії виявили 70 сполук, що становить понад 95% від загальної кількості олії. Вихід олії восьми аналізованих сортів *C. officinalis* становив від 0,08 до 0,43 % у висушеній рослинній сировині [47]. Основними компонентами олії (>5%) були α -кадинол (24,2%), δ -кадинен (10,2%), γ -кадинол (7,9%), τ -мууролол (5,8%), γ -кадинен (5,7%)), та гермакрен D-4-ол (5,1%).

Таблиця 2.1

Біологічно активні речовини різних органів *Calendula officinalis*

Сировина	Сполуки	Активні інгредієнти	Посил.
Квітки	Терпеноїди	ψ-тараксастеол, лупеол	[64]
		Еритродіол]	[62]
		Календулозид	[60]
		Глікозиди [календули А і В	[59]
	Флавоноїди	Календофлавозиду ізокверцитрин, рутин	[42]
		Ізорамнетин, Кверцетин	[34]
		Нарцисин, ізорамнетин-3-О-β-D глікозид	[61]
	Кумарини	Скополетин, умбелліферон, Ескулетин	[17]
	Ефірні олії	Оплопанон, Кубенол, метиллінолеат	[15]
		лімонен, неролідол, палюстрон п-цимол,нонанал, сабінен, карвакрол, α-пінен,т-мууролол, гераніол	[29]
		α-кадинол, δ-кадинен, γ-кадинол, т-мууролол , γ-кадинен	[47].
Листя	Хінони	α-токоферол, пластохінон, філохінон,убіхінон	[48]
Корені	терпеноїди	Календулозид В	[27]

Значно менше є інформації щодо компонентів ефірної олії інших видів нагідок. Так, при дослідженні квіток культивованої *Calendula arvensis* виявлено 74 відомі компоненти ефірної олії, а неідентифікованими залишилися лише 2 компоненти [38]. Основні компоненти ефірної олії були ідентифіковані як 26,34% τ -кадиол, 10,99% δ -кадиол, 16,28% δ -кадинен, 8,79% α -гуйен і 6,04% α -пінен, відповідно, у порядку їх найвищої концентрації. При розгляді хімічної класифікації компонентів, виявлених у квітках *Calendula arvensis*, виявлено, що сесквітерпеноїди присутні у найвищій частці, що становить 42,48%. Коли терпени, терпеноїди або їх похідні становв даному дослідженні 53 сполуки і присутні у 93,32% в ефірній олії *Calendula arvensis*.

Таким чином, варіабельність якісних і кількісних складових ефірної олії видів роду *Calendula* надзвичайно висока і залежить як від методів отримання, так і від видів, сортів і регіону вирощування.

Каротиноїди.

Вміст загальних та індивідуальних каротиноїдів у *Calendula officinalis* досліджено в багатьох роботах [44, 45, 56]. Назва каротиноїди, впливає з назви виду, де вони становлять основний пігмент в корені моркви - *Daucus carota*, безсумнівно, серед найбільш поширених і важливих пігменти в живому організмі. Каротиноїди – це пігменти, відповідальні за забарвлення багатьох рослин. Жовтий і оранжевий колір квіток в основному зумовлений каротиноїдами а відтінок залежить від кількості та складу пігментів [10, 13, 19]. Каротиноїди діляться на дві великі групи: каротини і ксантофіли. По-перше, каротини або складається виключно з вуглеводневих каротиноїдів атоми вуглецю і водню, приклади їх сполуки — α -каротин, β -каротин, лікопін та ін. По-друге, ксантофіли відомі як оксигеновані похідні вуглеводнів, які містять принаймні один кисневі функції, такі як гідроксильна, кето, епоксидна, групи метокси або карбонової кислоти.

Квітки в суцвітті *C. officinalis* переважно оранжевого кольору містять зазвичай високий рівень каротиноїдів. Помаранчеві сорти даного виду

включають більше вуглеводнів, ніж жовті, які містять переважно оксигеновані похідні. Каротиноїди, які переважно містяться в квітках рослин, в основному складаються з лікопіну, бета-каротину, лютеїну, флавоксантину та зеаксантину [10]. Каротиноїди переважно відомі своєю антиоксидантною активністю через механізм поглинання радикалів, що робить їх надзвичайно корисними в фармакотерапії окисних розладів. Такий же антиоксидантний потенціал і їх здатність до формування штучні взаємозв'язки, що зумовлює їх ранозагоювальну дію [42, 43].

Основними факторами, які впливають на відмінності в кількості загальних каротиноїдів, є сорти рослин, колір язичкових і трубчастих квіток, час збирання, місце вирощування та походження насіння [4, 8, 19]. Залежно від сорту та кольору квіток, вміст каротиноїдів може коливатися від 48,2 мг/100 до 276,0 мг/100 г [41]. Аналізуючи детальний профіль сполук суцвіть нагідок в даному дослідженні та їх відповідних вміст, каротиноїди були класифіковані наступним чином: лікопен>>β-каротин>>лікопен>>лютеїн-5,6-епіоксид>>лютеїн>>флавоксантин>>віолаксантин. Причому найчастіше з'являлися β-каротин або флавоксантин. Різницю в профілі каротиноїдних сполук можна пояснити використанням сухих квітів (на відміну від свіжих) і відмінностями в сортах рослин [24].

Флавоноїди

Флавоноїди, присутні в сировині, особливо кверцетин, мають значну ранозагоювальну дію. Існує кілька запропонованих механізмів для цієї дії. Основний механізм дії - це антиоксидантна активність, викликана за рахунок поглинання радикалів. Інший механізм пояснює адгезію та збільшення фібробластів, які додатково викликають апробований вплив на клітинну активність у певній області [44, 51]. Крім того, флавоноїди, як відомо, мають дію проти зубного нальоту та проти гінгівіту [33]. Такі класи, як рутин, апігенін, кемпферол, вітексин і лютеолін, як відомо, мають захисну дію на шкіру через антиоксидантний механізм.

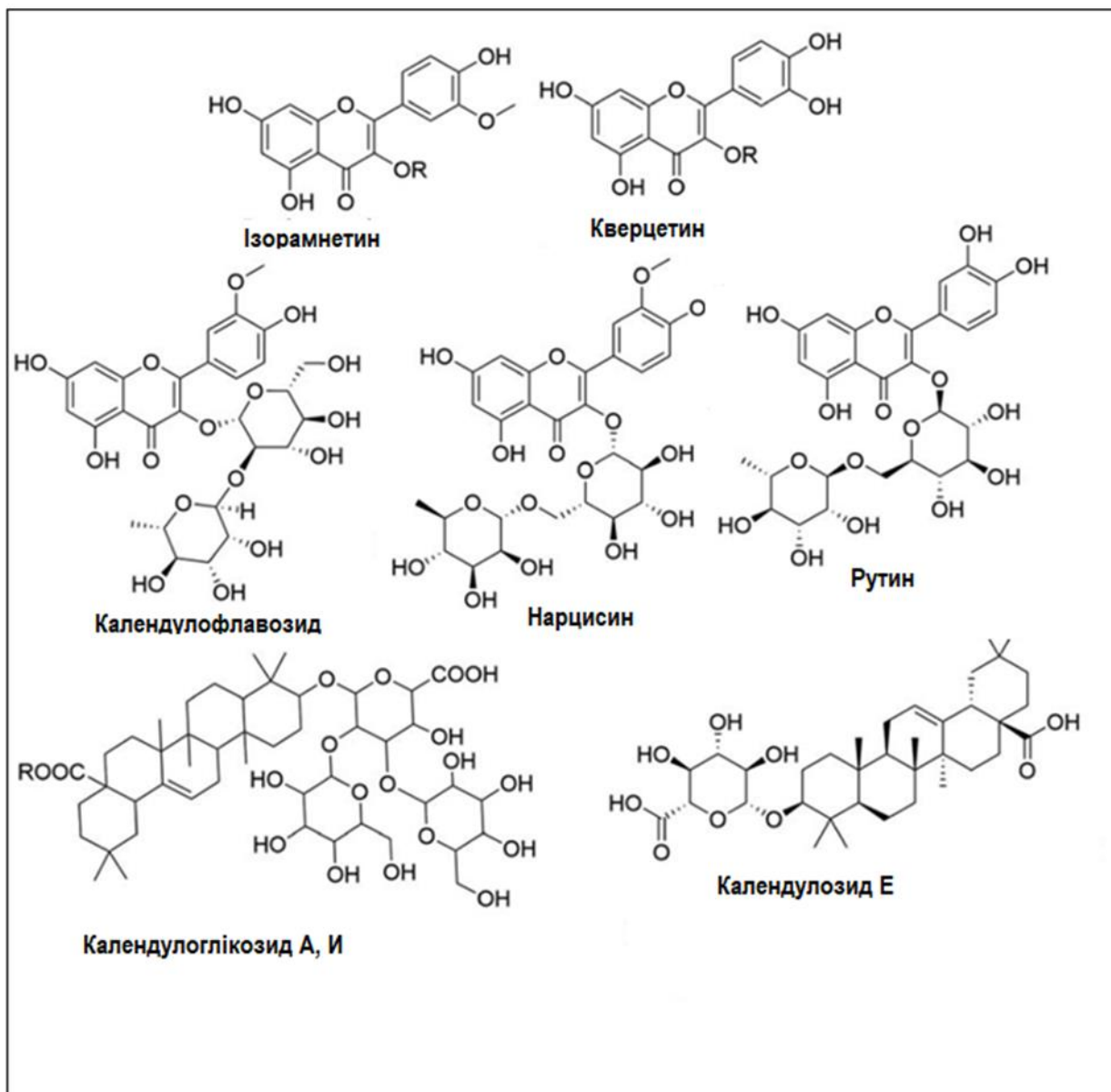


Рис. 2.1. Основні флавоноїди сировини *C. officinalis*.

Крім цього, флавоноїди сполуки кверцетин і рутин (Рис.2.1) мають антидепресивну дію. Ці сполуки здійснюють свою дію через інгібування моноаміноксидази (МАО)[12, 49]. Ізорамнетин з похідними кверцетину, такими як 3-О-(200-рамнозил)-рамнозиди, 3-О-(200-рамнозил)-глюкозиди, 3-О-(200,600-ді-рамнозил)-глюкозиди, 3-О-Відомо, що (600-рамнозил)-глюкозиди, 3-О-глюкозиди та 3-О-(600-ацетил)-глюкозиди мають антиацетилхолінестеразну активність. Ця активність хімічно пояснюється наявністю ацетильних і рамнозильних груп у структурі флавоноїдів [56].

Гіперозид, інше з'єднання класу флавоноїдів має вирішальний вплив на лікування остеосаркоми через стримування розмноження та стимулювання остеогенної диференціювання клітин саркоми [63].

Кількісні варіації вмісту флавоноїдів в сировині *C. officinalis* можуть змінюватись в залежності від сорту, терміну збору тощо [57]. Для даного виду є докази того, що особини з помаранчевими пелюстками найбагатші на вторинні метаболіти. Вміст флавоноїдів може також залежати від сезонних коливань на стадіях розвитку рослини. Відомо, що при великій кількості органічних добрив вміст флавоноїдів суттєво зменшується, а внесення підвищує вміст флавоноїдів [26], Тому для виробництва флавоноїдів не завжди потрібно застосовувати велику кількість органічних добрив.

Кумарини

Кумарини, які в значній мірі містяться в квітках *C. officinalis*, можуть запобігати окисленню пошкодження клітин [4]. Одними з важливих кумаринів, присутніх у сировині, є умбеліферон, скополетин і ескулетин. Умбеліферон, використовуючи антиоксидантний механізм дії, діє як засіб для захисту шкіри, особливо в сонцезахисних продуктах [25]. Скополетин має спазмолітичну дію шляхом стримування спастичного скорочення м'язів сечостатевої системи і шлунково-кишкової системи. Ескулетин, який відноситься до того ж класу кумаринів, діє як флеботонічний і протизапальний засіб, знижуючи проникність капілярів і омолодження венозного тону. Крім того, відомо, що він має антитромботичну дію завдяки його розкриваючому ефекту у збільшенні періоду оклюзії для тромбозу формування тромбоцитарної пробки [25, 55].

Фенольні кислоти.

Фенолокислоти, що містяться в квітках *C. officinalis*, такі як кавова кислота, ванільна кислота, хлорогенова кислота та кумарова кислота мають доведену активність поглинання через їхню схильність до донорства водню, що робить їх корисними при лікуванні окислювальних розладів [13]. Те саме

механізм дії пояснює роль фенольних сполук з СО у відновленні в окислювальний стрес, спричинений фізичними вправами. СО містить різні жирні кислоти, такі як календова кислота, лінолева кислота, олеїнова кислота, пальмітинова кислота та диморфеколева кислота. Серед усіх жирних кислот з вирішальною роллю в функціях організму людини, календова кислота, основна жирна кислота, що міститься в СО, має додаткову переважну цитотоксичну дію. [36].

Хінони.

Хінони, які в основному містяться в листі нагідок, складаються з філохінону, α -токоферолу, убіхінону та пластохінону. Вони мають протираковий потенціал і їх механізм дії полягає в алкілуванні і розщепленні ДНК за допомогою ДНК-топоізомерази I і II [14]. Відомо, що мають антиоксидантну дію, а також противирашкову дію, шляхом регенерації слизової оболонки шлунка

Амінокислоти.

Треонін, глутаміновий аспарагін, лейцин, пролін, кислота, серин, гістидин, фенілаланін, тирозин, аргінін, лізин, аспарагінова кислота, метіонін і валін є деякими з амінокислот кислоти, присутні в стеблах, листі та квітках. Близько 5% амінокислот було виявлено в листі, 3,5% в стеблах і 4,5% у квітках *C. officinalis* [8].

2.2. Фармако-терапевтичні властивості біологічно активних речовин

Calendula officinalis та застосування

Calendula officinalis, як важлива рослина в офіційній та традиційній медицині, знайшла широке застосування у фармацевтичній промисловості [40], а також в харчовій галузі [50] завдяки наявності в рослині вторинних метаболітів. Охарактеризовані вище флавоноїди, ефірні олії, каротиноїди, та інші біологічно активні речовини сировини нагідок лікарських – це лише деякі з категорій вторинних метаболітів рослини, які корелюють із

протизапальними властивостями [53, 54] . Комплекс діючих речовин *C. officinalis* функціонує як протимікробний [50], антиоксидантний [42], протизапальний [63], антисептичний [44], протівірусний [54], гепатопротекторний [42] і антидіабетичний препарат [33] (рис.2.2.1). Він також застосовується для лікування різних станів шкіри, включаючи запалення шкіри, відкриті рани та рвані рани, що кровоточать. Крім того, він використовується для лікування легких захворювань, таких як вітрові опіки.



Рис. 2.2.1. Фармако-терапевтичні властивості біологічно активних речовин *Calendula officinalis*

Крем, який містить екстракт календули ефективний при декстрані та опіках, а також при гострому лімфедемі в експерименті на щурах. Активність щодо лімфедемі пояснюється посиленням протеолітичної активності макрофагів [14]. В описі дії засобу «Мазі календули» присутній на фармацевтичному ринку України, вказується, що вона чинить протизапальну, репаративну та антисептичну дію. Ці ефекти зумовлені багатим вмістом речовин (каротиноїди, флавоноїди, сапоніни, дубильних речовин, тритерпенових глікозидів, органічних кислот та аскорбінової кислоти), які збільшують ріст грануляцій, поліпшують епітелізацію, посилюють місцеві захисні механізми [58]. В лікарському засобі «Календули настойка» відмічено - біологічно активні речовини, що містяться в квітках та квіткових кошиках

календули (флавоноїдні та каротиноїдні глікозиди, сапоніни, дубильні речовини, ефірна олія, органічні кислоти), чинять протимікробну, протизапальну та помірну жовчогінну дію. Крем "Календула" призначений для догляду за будь-яким типом шкіри: сухою, жирною, чутливою та за проблемною шкірою людини і рекомендується як допоміжний засіб при лікуванні шкірних захворювань, опіків і обморожень [58]. Завдяки екстракту календули, крем знімає подразнення, стимулює обмін речовин в клітинах шкіри, надає протизапальну, дезинфікуючу та ранозагоювальну дію, зміцнює кровоносні судини, сприяє загоєнню пошкоджень шкіри.

Поліфеноли *C. officinalis*, такі як флавоноїди, є одними з найважливіших природних сполук з активними антиоксидантними властивостями. Флавоноїди, що поглинають радикали або утворюють хелати викликані вмістом їх гідроксильних груп [53]. Листя та пелюстки рослини нагідок містять природні джерела антиоксидантів. Високий вміст флавоноїдів і фенольних фітохімічних речовин нагідок сприяє його антиоксидантній активності, що може додатково сприяти його сильній здатності поглинати радикали та надавати захисні властивості ефекти [9]. Якщо порівнювати звичайні вітаміни С і Е, то водний екстракт листя і пелюсток демонструють високий рівень антиоксидантного ефекту на основі швидкості всмоктування. Справа в тому, що водний екстракт з пелюстки показали нижчу абсорбцію за допомогою спектрометричних методів, що свідчить про те, що пелюстки володіють більшою антиоксидантною активністю, ніж листя. Найбільш відомі терпеноїди, які в основному присутні в квітках і коренях *C. officinalis*, за їх антиоксидантну активність. Ці сесквітерпеноїди, включаючи τ -кадинол, α -кадинол і τ -мууролол, виявляють антиоксидантну дію через механізм поглинання радикалів. Терпеноїди відіграють важливу роль у лікуванні захворювань і розладів, пов'язаних з окислювальними реакціями, такими як хвороба Альцгеймера, гіперпигментація шкіри та діабет. Крім того, терпеноїди мають широку протизапальну дію. На підставі комплексу результатів

дослідження дії біологічно активних сполук нагідок лікарських можна зробити висновок, що екстракти сировини можуть бути надзвичайно корисними для лікування багатьох захворювань, у т.ч. СНІД (синдром набутого імунodefіциту), хвороби серця, малярія, діабет, інсульт, рак і артеріосклероз завдяки їх потужній антиоксидантній активності [53].

Сукупність діючих речовин нагідок лікарських демонструють високу антибактеріальну активність. Так, метаноловий екстракт і 10 % відвар з квіток рослини в експерименті виявили активність проти анаеробних і факультативних аеробні пародонтальних бактерій, а саме: *Porphyromonos gingivalis*, *Prevotella spp.*, *Furobacterium nucleatum*, *Caphocytophaga gingivalis*, *Veilonella parvula* та *Actinomyces odontolyticus*. Результати свідчать про помітне пригнічення проти всіх тестованих мікроорганізмів з МІК 2048 мг/л [27]. Подібні властивості виявлені при тестуванні ефірної олії суцвіть проти різних штамів грибів, як *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* та *Rhodotorella spp.* Визначено хороший потенціал протигрибкової активності (при 15 мкл/диск) [22].

Більшість речовин, що потрапляють в організм, переробляються печінкою, яка також відповідає за детоксикацію. До основних причин ураження печінки відносяться гепатити, вірусні інфекції, дієтичні добавки, алкоголь, токсичні промислові хімікати, забруднення повітря та води забруднення. Дослідження різних вчених показали, що екстракти *C. officinalis* можуть захистити печінку від цитотоксичності і окислювального стресу [53]. Подібним чином водно-спиртовий екстракт квітів в експерименті показує зниження гепатоцитолізу та печінкових біомаркерів. Крім того, відновлення клітин рівні антиоксидантів, зокрема підвищені рівні ферментативних компонентів відновленого глутатіону і загальних тіолів антиоксидантної системи також спостерігалось, що може бути наслідком поліфенольних

хімічних речовин нагідок, які захищають клітини від хімічно індукованих клітин пошкодження. Крім того, залежно від дози, екстракт покращував гістологічні показники картина печінки, а також біохімічні показники та запальні цитокіни [39].

Цілющі властивості діючих речовин *C. officinalis* активно використовуються для створення сучасних лікарських засобів широкого спектру дії, присутніх на фармацевтичному ринку України. Так, в Державному реєстрі лікарських засобів України представлено 48 найменувань лікарських засобів з чи за участю *C. officinalis* [3]. Найбільше зборів та комплексних засобів лікування хвороб печінки, шлунково-кишкового тракту, сечовивідної системи (Табл. 2.3.1); комплексні гомеопатичні засоби, як «Траумель С краплі оральні» виробництва Біологіше Хайльміттель Хеель ГмбХ, Німеччина, «Гель при опіках і ранах» виробництва ВАЛА Хайльміттель ГмбХ, Німеччина, «ГОМЕОВОКС®» таблетки виробництва БУАРОН, Франція; «ТАЗАЛОК™» краплі оральні виробництва Др. Густав Кляйн ГмбХ & Ко. КГ, Німеччина тощо [58].

Екстракти нагідок лікарських широко використовуються в косметології як протизапальний засіб в складі кремів, шампунів, бальзамів, ополіскувачів; як оральний сонцезахисний засіб для профілактики сонячних опіків. Окрім того, результати багатьох досліджень показують, що дієта, багата каротиноїдами, була епідеміологічно підтверджена і корелює з меншим ризиком багатьох захворювань [28]. Каротиноїди вважаються важливими для людини як попередники вітаміну А та ретиноїдів. Основним каротиноїдом провітаміну А в західній дієті є β -каротин, але також α -каротин і β -криптоксантин сприяє постачанню вітаміну А і може запобігти дефіциту вітаміну А [41, 45].

Таблиця 2.3.1.

Лікарські засоби рослинного походження за участю *C. officinalis* [3,58]

Назва препарату	Склад рослинного походження	Фармакодинаміка	Виробник
Гастрофіт збір	Liquiritiae radix, Sophorae japonicae fructus, Althaeae radix, Urticae folium, Menthae piperitae folium, Calendulae flos, Matricariae flos, Helichrysi arenarii flos, Rosae pseudo-fructus, Calami radix, Sambuci flos, Millefolii herba, Hyperici herba, Salviae officinalis folium, Absinthii herba	Препарат безпосередньо впливає на регенерацію слизових оболонок шлунка і кишечника, прискорюють загоєння виразок і ерозій, чинить седативну, м'яку гіпотензивну дію	ТОВ "Науково-виробнича фармацевтична компанія "ЕЙМ", Україна
Гепатофіт збір	Calendulae flos, Phaseoli fructus, Taraxaci officinalis radix, Helichrysi arenarii flos, Rosae pseudo-fructus, Zeae maydis styli cum stigmatis, Galegae herba, Urticae folium, Silybi mariani fructus	Зменшує біль, спазми жовчовивідних шляхів, диспептичні розлади. Сприяє утворенню та відтоку жовчі, поліпшує перистальтику кишечника. Сприяє регенерації печінкових клітин після гострих гепатитів, має протизапальну та помірно жовчогінну дію.	ТОВ "Науково-виробнича фармацевтична компанія "ЕЙМ", Україна
ШЛУНКОВИЙ ЗБІР	Matricariae floris, millefolii herbae, calendulae floris, hyperici herbae, menthae piperitae folii	Препарати з нагідок квіток при внутрішньому застосуванні сприяють регенерації слизових оболонок шлунка і кишечника, прискорюють загоєння виразок і ерозій, чинять седативну, м'яку гіпотензивну дію, сприяють нормалізації серцевої діяльності.	АТ "Лубнифарм", Україна

Назва препарату	Склад рослинного походження	Фармакодинаміка	Виробник
ХЕЛІСКАН® настойка	Calendulae flores, Visci albi cormi et folia, Sophorae japonicae fructus, Sylibi mariani fructus, Paeoniae anamalae rhizomata cum radicibus, Avenae sativae herba, Chelidonii herba	Проявляє імуномодельючу, антитоксичну, стресопротекторну (нормалізує соматичні, імунологічні, біохімічні та морфологічні показники стрес-реакції організму), тонізуючу та антиоксидантну дії	ПАТ "Хімфармзавод "Червона зірка", Україна
ФІТОНЕФРОЛ збір	Calendulae flores, Anethi graveolentis fructus, Eleutherococci senticosi rhizomata et radices, Menthae piperitae folia	Регулює функцію сечовивідної системи чинить діуретичну, протимікробну, протизапальну, спазмолітичну дію.	АТ "Лубнифарм", Україна
ФІТОГЕПАТОЛ збір	Matricariae flores, Menthae piperitae folia, Calendulae flores, Millefolii herba, Tanacetii flores	Чинить жовчогінну, гепатопротекторну, протизапальну, протимікробну, спазмолітичну дію, посилює процеси регенерації клітин.	АТ "Лубнифарм", Україна
ГІНЕКОФІТ настойка	Bursae pastoris herba, Millefolii herba, Calendulae flos, Matricariae flos, Calami radix, Origani vulgaris herba, Vincae minoris herba, Hyperici herba, Chelidonii herba	Має протизапальну (пригнічує ексудативні процеси та розвиток фіброзно-грануляційної тканини, знижує вираженість запальної реакції), ранозагоювальну (прискорює регенерацію ураженої тканини) дію, а також гемостатичну активність	ТОВ «Науково-виробнича фармацевтична компанія «ЕЙМ».

3.3. Визначення вмісту суми флавоноїдів в суцвіттях деяких сортів

Calendula officinalis

Одним з завдань даної роботи було виконати експериментальні дослідження щодо визначення вмісту суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину в суцвіттях сортів *Calendula officinalis* : «Монарх», «492» і «Оранж» (Рис.3.3.1), зібраних в другій половині липня на сортовипробувальних ділянках Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Рослини вирощені з насіння, отриманого з селекційних фондів Станції лікарських рослин Інституту агроєкології НААГ України (с. Березоточа Лубенського району Полтавської обл.).

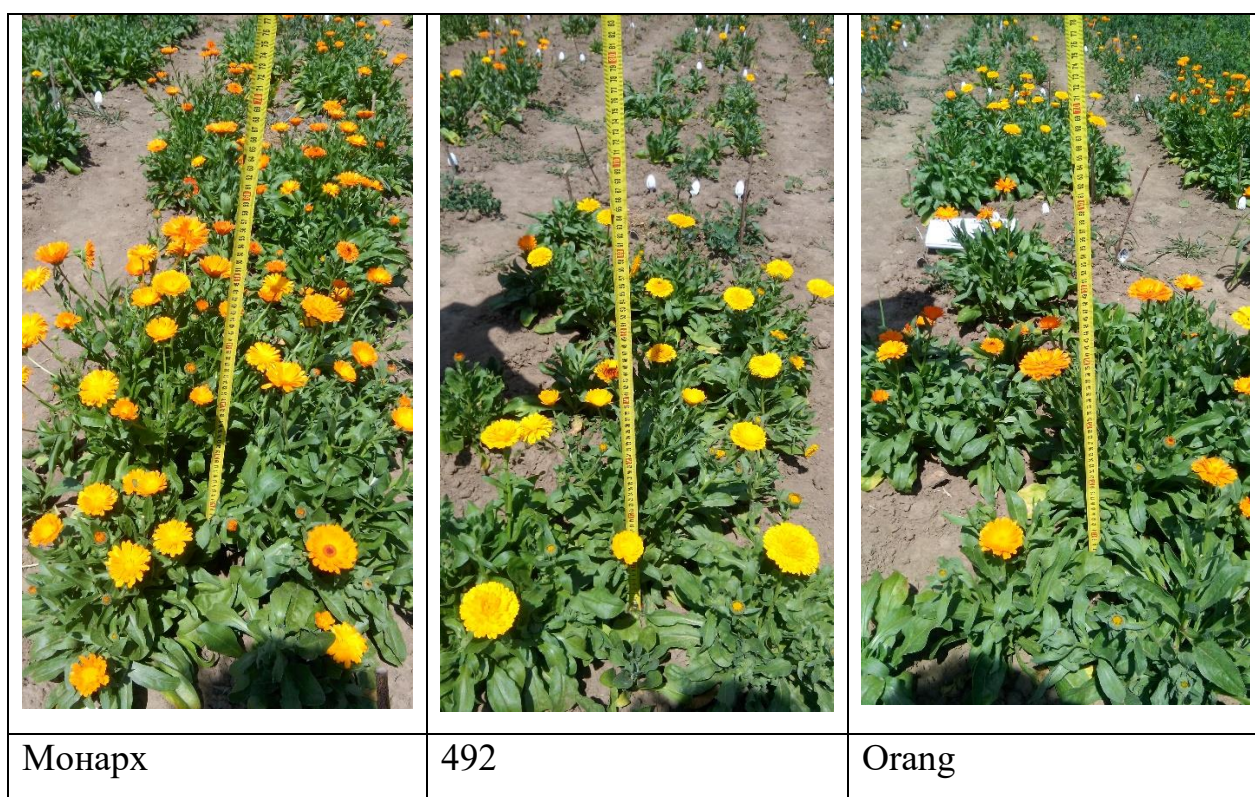


Рис. 3.3.1. Сорти *Calendula officinalis* на ділянці

Рослини всіх сортів зацвіли в першій декаді липня (найраніше — сорт «Монарх»). Сорти «492» і «Оранж» почали цвісти пізніше і найдовше (до кінця серпня). Період цвітіння нагідок розтягнутий у часі (починається в червні і може тривати до пізньої осені), а його тривалість залежить головним чином від

погодних умов протягом вегетаційного періоду та сорту. Кількість суцвіть, зібраних під час кожного збору врожаю, змінювалася в досліджуваних сортах впродовж вегетаційного періоду. Найбільшу кількість суцвіть одержали у сорту «Монарх» (55 % по відношенню до всіх зібраних суцвіть). Сушили під навісом до умов, передбачених ДФУ [1,2].

Спектрофотометричні аналізи для розрахунку концентрації флавоноїдів базувалися на вимірюваннях абсорбції при 425 нм. Вимірювали оптичну густину розчину спектрофотометрично. Питомий показник поглинання гіперозиду 500. Кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид і суху речовину (%) здійснювали у 8-кратній повторності

за формулою

$$x = \frac{A * 100 * 50 * 25 * 100 * 100}{m * 500 * 20 * 10 * (100 - W) * 100} \Rightarrow \frac{A * 125}{m * (100 - W)}$$

де А – Середнє значення оптичної густини випроб. розчину, m - наважки проби, г ; W - трата в масі при висушу-ванні , % .

Лінійність методу перевіряли методом найменших квадратів, який застосовували в діапазоні концентрацій 2-32 мкг/ з коефіцієнтом кореляції $R^2 > 0,99$. Точність методу розраховували шляхом порівняння визначеної кількості речовини з кількістю речовини, розрахованою на основі статистичного аналізу за допомогою програми ORIGIN 7 (версії Standard/Professional). Для всіх контрольних зразків відмінності між експериментальними зразками та стандартами ніколи не були статистично значущими ($P < 0,05$). Точність (процентне відхилення визначеної концентрації від розрахованої концентрації) і прецизійність (стандартне відхилення/коефіцієнт варіації) методів завжди були в межах прийнятих діапазонів ($\pm 15\%$ від середнього)

Таблиця 3.3.1.

Кількісне визначення флавоноїдів квіток *Calendula officinalis* сорту Монарх

Вимоги МКЯ	НЕ МЕНШЕ			0,4%		
Оптична густина випробу-ваного розчину	Середнє значення оптичної густини випроб. розчину (A)	Питомий показник поглинання гіперозиду	<u>ВИД</u>	Наважки проби, г (m)	Втрата в масі при висушу-ванні , % (W)	Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину, % (X)
0,39779	0,39770	500	5 II	0,8083	8,87	0,67
0,39780						
0,39751						
0,36629						
0,36651	0,36625	500	5 II	0,8020	8,87	0,63
0,36596						
0,34228						
0,34279						
0,34270	0,34259	500	1 I	0,8104	6,03	0,56
0,40315	0,40328	500	3 I	0,8042	4,69	0,66
0,40341						
0,40328						
0,28288						
0,28453	0,28387	500	6 I	0,8014	6,01	0,47
0,28419						
0,40793						
0,40796						
0,40761	0,40783	500	контроль	0,8017	5,77	0,67
0,33024						
0,33064						
0,33047						
0,33047	0,33045	500	1 II	0,8015	6,88	0,55
0,29456	0,29287	500	3 II	0,8009	6,62	0,49
0,29149						
0,29256						
0,31375						
0,31329	0,31367	500	6 II	0,8011	5,47	0,52
0,31397						

Таблиця 3.3.2.

Кількісне визначення флавоноїдів квіток *Calendula officinalis* сорту 492

Вимоги МКЯ		НЕ МЕНШЕ			0,4%	
Оптична густина випробуваного розчину	Середнє значення оптичної густини випроб. розчину (A)	Питомий показник поглинання гіперозиду	Зразок	Наважки проби, г (m)	Втрата в масі при висушуванні, % (W)	Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину, % (X)
0,17994	0,17937	500	3 I	0,8015	9,38	0,31
0,17954						
0,17864						
0,17535	0,17525	500	3 I	0,8001	9,38	0,30
0,17481						
0,17560						
0,30509	0,30559	500	1 I	0,8017	6,62	0,51
0,30671						
0,30496						
0,36776	0,36738	500	6 I	0,8002	5,91	0,61
0,36726						
0,36713						
0,25645	0,25704	500	контроль	0,8044	6,67	0,43
0,25739						
0,25727						

Прожовження таблиці 3.3.2.

Оптична густина випробу- ваного розчину	Середнє значення оптичної густини випроб. розчину (A)	Питомий показник поглинання гіперозиду	Зразок	Наважки проби, г (m)	Втрата в масі при висушу- ванні, % (W)	Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину, % (X)
0,30193	0,30177	500	1 II	0,8006	6,40	0,50
0,30173						
0,30165						
0,30196	0,30165	500	3 II	0,8025	6,41	0,50
0,30181						
0,30119						
0,38523	0,38507	500	6 II	0,8095	6,06	0,63
0,38492						
0,38507						

Таблиця 3.3.3.

Кількісне визначення флавоноїдів у квітках *Calendula officinalis* сорту Orang

Вимоги МКЯ	НЕ МЕНШЕ			0,4%		
Оптична густина випробу-ваного розчину	Середнє значення оптичної густини випроб. розчину (A)	Питомий показник поглинання гіперозиду	Зразок	Наважки проби, г (m)	Втрата в масі при висушу-ванні, % (W)	Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину, % (X)
0,36690	0,36610	500	6 I	0,8002	8,9	0,63
0,36561						
0,36579						
0,38781	0,38751	500	6 I	0,8021	8,9	0,66
0,38710						
0,38761						
0,33255	0,33311	500	конт-роль	0,8062	8,8	0,57
0,33359						
0,33320						
0,34568	0,34602	500	1 I	0,8035	8,8	0,59
0,34657						
0,34581						
0,36715	0,36777	500	3 I	0,8020	8,5	0,63
0,36851						
0,36765						
0,27671	0,27627	500	1 II	0,8023	8,4	0,47
0,27615						
0,27594						
0,35383	0,35317	500	3 II	0,8036	8,1	0,60
0,35295						
0,35273						
0,39105	0,39082	500	6 II	0,8040	8,1	0,66
0,39067						
0,39073						

У цій роботі ми помітили, що варіанти з оранжевими язичковими і трубчастими квітками мали вищий вміст флавоноїдів у відсотках, ніж варіанти з жовтими язичковими і трубчастими квітками. Це підтверджене результатами проведеного дослідження. Так, якщо середнє значення виходу суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину з жовтоквіткових суцвіть сорту 492 складав 0,47% (що допускається за вимогами ДФУ), то сорту Orang - 0,60, а Монарх – 0,58% відповідно. Окрім того, ми виявили особливість відмінності кількісних показників виходу суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину у межах одного сорту (Табл. 3.3.1, 3.3.3). Це можна пояснити тим, що деякі зразки складали не повністю розкриті суцвіття. Зразки з суцвіть розкритих повністю (на 3-й день цвітіння) дали вищий відсоток виходу флавоноїдів. Таким чином, можна зробити висновок, оптимальний час для збору суцвіть – це час, коли вміст флавоноїдів є найвищим. В нашому дослідженні це був третій день цвітіння. Для отримання зразків з найвищою продуктивністю флавоноїдів слід уникати відбору зразків на початку цвітіння під час розкриття квіткових кошиків. Але, оскільки вимоги ДФУ до якості сировини *Calendula officinalis* щодо значення виходу суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид і суху речовину повинен містити не менше 0,4% загальної кількості флавоноїдів, то більшість наших зразків відповідали цій вимозі. Лише в одному зразку сорту 493 цей показник не досягав відповідного рівня (Табл.3.3.2). Таким чином, у цьому дослідженні майже всі зразки різних сортів нагідок лікарських відповідали межі, запропонованій фармакопеею.

ВИСНОВКИ

1. У результаті виконання роботи підготовлене комплексне зведення про різноманіття, особливості поширення та вирощування *Calendula officinalis*.
2. Визначено, що основні біологічно активні речовини сировини *C. officinalis*, як: ефірні олії, каротиноїди, флавоноїди, терпеноїди, кумарини, хінони, амінокислоти, зумовлюють її протизапальну, протимікробну, антиоксидантну, антисептичну, протівірусну, гепатопротекторну та нефропротекторну дію.
3. Проведено фармакогностичне дослідження сортів *Calendula officinalis*, які зростають в Україні. Виявлено сортоспецифічні особливості накопичення флавоноїдів у суцвіттях різних сортів
4. На фармацевтичному ринку України представлені 48 лікарських засобів за участю сировини *C. officinalis* та її біологічно активних сполук. Даний вид і його сорти є перспективні для подальшого дослідження і розробки лікарських засобів рослинного походження.

SUMMARY

Krupska Oksana Yaroslavivna

PHARMACOGNOTIC RESEARCH OF RAW MATERIALS OF
DIFFERENT VARIETIES OF CALENDULA OFFICINALIS L.

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND BOTANY

Scientific supervisor: Professor of the Department, PhD (BiolSc), Professor
Valentyna Minarchenko

Keywords: medicinal plants, *Calendula officinalis*, medicines

Introduction. *C. officinalis* as an important medicinal plant has found wide application in traditional and official medicine of most countries of the world, as well as in food, cosmetic, pharmaceutical industries due to the presence of healing secondary metabolites in the plant. The State Pharmacopoeia of Ukraine includes various monographs on the raw material *Calendulae flos* (marigold flowers), including flowers of cultivated double forms without a basket bed and flower baskets of double and non-double forms, as well as “Nagidok tincture”. Identification for both types of raw materials is carried out in terms of hyperoside with a flavonoid content of not less than 0.4%, for tincture - not less than 0.04% flavonoids in terms of hyperoside. But the peculiarities of the accumulation of flavonoids in different varieties of calendula have not been studied at present.

Materials and methods. For the study, inflorescences of *Calendula officinalis* varieties were used: "Monarch", "492" and "Orange". Comparative analytical, phytochemical research methods were used in the research. *Calendula* studies were focused on the extraction properties of bioactive compounds from flowers. For the quantitative determination of flavonoids, raw materials of different varieties of marigolds were prepared, in accordance with the requirements of the State Federal University of Ukraine using appropriate solvents. The search for data on issues of chemosystematics of medicinal plants was carried out in databases, e.g. PubMed, Web of Science, SciFinder, etc.

Results. A comprehensive pharmacognostic study of *Calendula officinalis* and its varieties growing in Ukraine was conducted, and variety-specific features of the accumulation of flavonoids in the inflorescences of different varieties were identified. Practical significance of the results obtained: pharmacognostic studies indicate that the accumulation of flavonoids depends, first of all, on the color of the flowers in the inflorescence of marigolds: the quantitative indicators of the content of these substances increase with increasing color saturation of the flower petals. It was determined that the main biologically active substances of the raw material of *C. officinalis*, such as essential oils, carotenoids, flavonoids, terpenoids, coumarins, quinones, amino acids, determine its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antiseptic, antiviral, hepatoprotective and nephroprotective effects. The paper analyzes the distribution, cultivation, active substances and representation of *C. officinalis* in medicines on the pharmaceutical market of Ukraine

Conclusions. As a result of the work, a comprehensive summary of the diversity, distribution and cultivation of *Calendula officinalis* was prepared. It was determined that the main biologically active substances of the raw material of *C. officinalis*, such as: essential oils, carotenoids, flavonoids, terpenoids, coumarins, quinones, amino acids, determine its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antiseptic, antiviral, hepatoprotective and nephroprotective effects.

A pharmacognostic study of *Calendula officinalis* varieties growing in Ukraine was conducted. Variety-specific features of the accumulation of flavonoids in the inflorescences of different varieties were identified.

48 medicines are presented on the pharmaceutical market of Ukraine with the participation of *C. officinalis* raw material and its biologically active compounds. This species and its varieties are promising for further research and development of medicinal products of plant origin.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Державна фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е видання. Додаток 5. Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр»; 2021. С. 290-291
2. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: 2014. Т.3. – с.398-402
3. Державний реєстр лікарських засобів України. 2021. Available at: <http://www.drlz.com.ua/> (Accessed 08 February 2021).
4. Мельничук Р.В., Богуславський Р.Л. (2018) Екологічна пластичність зразків колекції роду *Calendula* L. Дослідної станції лікарських рослин ІАП НААН . Збалансоване природокористування. № 1с. 34-38 <https://doi.org/10.33730/2310-4678.1.2018.276470>
5. Мельничук Р. В., Глущенко Л. А., Богуславський Р. Л. Особливості взаємозв'язків між ознаками у зразків колекції роду *Calendula* L. 2016. ISSN1026-9959. Селекція і насінництво. 2016. Випуск 110.с.100-106
6. Мінарченко В.М. 2005. Лікарські судинні рослин України (медичне та ресурсне значення). Київ: Фітосоціоцентр, 324 с.
7. Ashwlayan V.D., Kumar A., Verma M., Garg V.K., Gupta S.K. Therapeutic potential of *calendula officinalis*. Pharm Pharmacol Int J. 2018;6(2):149155. Doi: 10.15406/ ppij.2018.06.00171.
8. Ak, G.; Zengin, G.; Sinan, K.I.; Mahomoodally, M.F.; Picot-Allain, M.C.N.; Cakir, O.; Bensari, S.; Yilmaz, M.A.; Gallo, M.; Montesano, D. A Comparative Bio-Evaluation and Chemical Profiles of *Calendula officinalis* L. Extracts Prepared via Different Extraction Techniques. Appl. Sci. 2020, 10, 5920.
9. Babaee, N.; Moslemi, D.; Khalilpour, M.; Vejdani, F.; Moghadamnia, Y.; Bijani, A.; Baradaran, M.; Kazemi, M.T.; Khalilpour, A.; Pouramir, M.; et al. Antioxidant Capacity of *Calendula officinalis* Flowers Extract and Prevention of Radiation Induced Oropharyngeal Mucositis in Patients with Head and Neck

Cancers: A Randomized Controlled Clinical Study. DARU J. Pharm. Sci. 2013, 21, 18.

10. Bakó, E.; Deli, J.; Tóth, G. HPLC Study on the Carotenoid Composition of Calendula Products. J. Biochem. Biophys. Methods 2002, 53, 241–250. [CrossRef] [PubMed] [CrossRef] [PubMed]

11. Basch, E.; Bent, S.; Foppa, I.; Haskmi, S.; Kroll, D.; Mele, M.; Szapary, P.; Ulbricht, C.; Vora, M.; Yong, S. Marigold (*Calendula officinalis* L.): An Evidence-Based Systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration. J. Herb. Pharm. 2006, 6, 135–159.

12. Belal, A., Elanany, M. A., Raafat, M., Hamza, H. T., & Mehany, A. B. (2022). *Calendula officinalis* phytochemicals for the treatment of wounds through matrix metalloproteinases-8 and 9 (MMP-8 and MMP-9): in silico approach. Natural Product Communications, 17(5), 1934578X221098848.

13. Butnariu, M.; Coradini, C.Z. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers Using Spectrophotometry. Chem. Cent. J. 2012, 6, 35. [CrossRef]

14. Chandra, P.; Kishore, K.; Ghosh, A.K. Evaluation of Antacid Capacity and Antiulcer Activity of *Calendula officinalis* L. in Experimental Rats. Orient. Pharm. Exp. Med. 2015, 15, 277–285.

15. Crnobarac J, Jacimovic G, Marinkovic B, Latkovic DI, Balijagic J (2011) The effect of variety and row distance on yield and quality of pot marigold. Acta Horticulturae 925, 141-146

16. Danielski, L., Campos, L.M.A.S., Bresciani, L.F.V., Hense, H., Yunes, R.A. and Ferreira, S.R.S. 2007. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SCCO₂ and composition profile. Chemical Engineering. Progress 46: 99–106.

17. Derkach, A.I.; Komissarenko, N.F.; Chernobai, V.T. Coumarins of the Inflorescences of *Calendula officinalis* and *Helichrysum arenarium*. Chem. Nat. Compd. 1987, 22, 722–723. [CrossRef]

18. Eghatoleslami M.J., Mousavi G.R. (2009) The effects of sowing date and plant density on seed and flower yield of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Acta Horticultureae* 826, 371-376
19. Fallahi M., Mohammadi A., Miri S.M. The Natural Variation in Six Populations of *Calendula officinalis* L.: A Karyotype Study. *J. Genet.* 2020;6:34–40. doi: 10.22080/jgr.2020.2541.
20. Casley-Smith JR. The effects of ‘Unguentum lyphaticum’ on acute experimental lymphedema and other high-protein edema. *Lymphology*, 1983; 16: 150-156.
21. Gazim Z.C., Ferreira G.A., Rezende C.M., Nakamura C.V., Dias-Filho BP, Cortez DAG, (2007) Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* Paraná. *Horticultura Brasileira* 25, 118-121
22. Gazim Z. C., Rezende C. M., Fraga S. R., Filho B. P. D., C. V. Nakamura, DCortez . A. G. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008. vol. 44, n. 3, jul./set., 391-395
23. Gu J., Aidy A., Goorani S. Anti-Human Lung Adenocarcinoma, Cytotoxicity, and Antioxidant Potentials of Copper Nanoparticles Green-Synthesized by *Calendula officinalis*. *J. Exp. Nanosci.* 2022;17:285–296. doi: 10.1080/17458080.2022.2066082
24. Haładyn, K.; Wojdyło, A.; Nowicka, P. Isolation of Bioactive Compounds (Carotenoids, Tocopherols, and Tocotrienols) from *Calendula Officinalis* L., and Their Interaction with Proteins and Oils in Nanoemulsion Formulation. *Molecules* 2024, 29, 4184. [https://doi.org/ 10.3390/molecules29174184](https://doi.org/10.3390/molecules29174184)
25. Hsia, C.W.; Lin, K.C.; Lee, T.Y.; Hsia, C.H.; Chou, D.S.; Jayakumar, T.; Velusamy, M.; Chang, C.C.; Sheu, J.R. Esculetin, a Coumarin Derivative, Prevents Thrombosis: Inhibitory Signaling on PLCγ2–PKC–AKT Activation in Human Platelets. *Int. J. Mol. Sci.* 2019,20, 2731. [CrossRef] [PubMed]66.

26. Honório I. C. G., Bonfim F P Gi, Montoya S G, Casali V W.D., Leite J. P.V. and Cecon P. R. Growth, development and content of flavonoids in calendula (*Calendula officinalis* L.) Acta Scientiarum. Agronomy aringá, v. 38, n. 1, p. 69-75, Jan.-Mar., 2016
27. Iauk L, Lo-Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria. *Phytother Res*, 2003; 17: 599-604.
28. Jan N. , John R .*Calendula officinalis*-an important medicinal plant with potential biological properties. *Proc Indian Natn Sci Acad* 83 No. 4 December 2017 pp. 769-787
29. Khalid, K.; SILVA, D.A.; Teixeira, J.A. Biology of *Calendula officinalis* Linn.: Focus on Pharmacology, Biological Activities and Agronomic Practices. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 2012, 6, 12–27.
30. Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A.(2005) Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calenula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 69, No. 11, p. 2122–2128.
31. Kishimoto S., Ohmiya A. (2009) Studies in carotenoids in the petals of composite plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Vol. 78, No. 3, p. 263–272.
32. Kishimoto S., Sumitomo K., Yagi M., Nakayama M., Ohmiya A. (2007) Three routes to orange petal color via carotenoids components in 9 compositae species of the Japanese Society for Horticultural Science, Vol. 76, No. 3, p. 250–257.
33. Khairnar, M.S.; Pawar, B.; Marawar, P.P.; Mani, A. Evaluation of *Calendula officinalis* as an Anti-Plaque and Anti-Gingivitis Agent. *J. Indian Soc. Periodontol.* 2013, 17, 741. [CrossRef] [PubMed]
34. Kurkin, V.A.; Sharova, O.v. Flavonoids from *Calendula officinalis* Flowers. *Chem. Nat. Compd.* 2007, 43, 216–217. [CrossRef]
35. Naguib MY, Khalil MY, El-Sherbeny SE (2005) A comparative study on the productivity and chemical constituents of various sources and species of calendula

plants as affected by two foliar fertilizers. Journal of Applied Sciences Research 1 (2), 176-189

36. Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A.A.; Khan, G.J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; ModarresiGhazani, F.; et al. Chlorogenic Acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research. Biomed. Pharmacother. 2018,97, 67–74. [CrossRef] [PubMed]

37. Nicoletta C.B., Marongiu P.A., Pivetta T., Procedda S. (2003) Extraction, separation, and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia tryphylla* (L'Her) britton by supercritical CO₂. Journal of Essential Oil Research 15, 272-277

38. Okan O. T. Analysis of Essential Oil from *Calendula arvensis* L. (Field Marigold Flowers). Journal of Bartın Faculty of Forestry 2024, Volume 26 Issue 1 Pages: 13-20

39. Pawan, V.; Rajinder, R.; Maninder, S.;Wazir, V.S. Kumar Pawan Attenuating Potential of *Calendula officinalis* on Biochemical and Antioxidant Parameters in Hepatotoxic Rats. Indian J Physiol. Pharmacol. 2017, 61, 398–410.

40. Pedram R., Z.; Mokhtari, J.; Abbasi, M. Preparation and Characterization of *Calendula officinalis*-Loaded PCL/Gum ArabicNanocomposite Scaffolds for Wound Healing Applications. Iran. Polym. J. 2019, 28, 51–63. [CrossRef]

41. Pintea A. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. Acta Biol. Szeged. 2003, 47, 37–40.

42. Preethi, K.; Kuttan, R. Hepato and Reno Protective Action of *Calendula officinalis* L. Flower Extract. Indian J. Exp. Biol. 2009, 47,163–180. [PubMed]

43. Preethi, K.C.; Kuttan, G.; Kuttan, R. Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis*. Flowers in Vitro. and in Vivo.Pharm. Biol. 2008, 44, 691–697. [CrossRef]

44. Patil, K.; Sanjay, C.; Doggalli, N.; Devi, K.R.; Harshitha, N. A Review of *Calendula officinalis* Magic in Science. J. Clin. Diagn. Res.2022, 16, ZE23–ZE27. [CrossRef]

45. Raal A., Kirsipuu K., Must R., Tenno S. (2009) Content of total carotenoids in *Calendula officinalis* L. from different countries cultivated in Estonia. Natural Products Communications, Vol. 4, No. 1, p. 35–38.
46. Raal, A.; Kirsipuu, K. (2011). Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. Natural Product Research, 25(6), 658–662. doi:10.1080/14786419.2010.528417
47. Raal A., OravA., Nesterovitsch J. and Maidla K. Analysis of Carotenoids, Flavonoids and Essential Oil of *Calendula officinalis* Cultivars Growing in Estonia 2016 Vol. 11 No. 8 1157 - 1160
48. Radulescu V, Doneanu C, Loloiu TCGC (2000) Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. Revue Roumaine de Chimie 45, 271- 275
49. Saini, P.; Al-Shibani, N.; Sun, J.; Zhang, W.; Song, F.; Gregson, K.S.; Windsor, L.J. Effects of *Calendula officinalis* on Human Gingival Fibroblasts. Homeopathy 2012, 101, 92–98. [CrossRef] [PubMed]
50. Savic Gajic, I.M.; Savic, I.M.; Skrba, M.; Dosi'c, A.; Vujadinovic, D. Food Additive Based on the Encapsulated Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) Flowers Extract in Calcium Alginate Microparticles. J. Food Process. Preserv. 2022, 46, e15792. [CrossRef]
51. Selvaraj, S.; Fathima, N.N. Fenugreek Incorporated Silk Fibroin Nanofibers—A Potential Antioxidant Scaffold for Enhanced Wound Healing. ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 5916–5926. [CrossRef] [PubMed]
52. Shahrababaki S M A K, Zoalhasani S and Kodory M (2013) Effects of sowing date and nitrogen fertilizer on seed and flower yield of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) in the Kerman Adv Environ Biol 7 3925-3929
53. Shahane K., Kshirsagar M., Tambe S., Jain D., Rout S., Ferreira M.K.M., Mali S., Amin P., Srivastav P.P., Cruz J, Lima RR. An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of *Calendula officinalis* L. Pharmaceuticals

(Basel). 2023 Apr 18;16(4):611. doi: 10.3390/ph16040611. PMID: 37111369; PMCID: PMC10142266.

54. Shahnaz A., Atiq-ur-Rahman, M. Q. , Shamim Q. Elemental analysis of *Calendula officinalis* plant and its probable therapeutic role in health <https://www.researchgate.net/publication/286640994>

55. Sharifi-Rad, J.; Cruz-Martins, N.; López-Jornet, P.; Lopez, E.P.F.; Harun, N.; Yeskaliyeva, B.; Beyatli, A.; Sytar, O.; Shaheen, S.; Sharopov, F.; et al. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2021, 2021, 6492346. [CrossRef] [PubMed]

56. Sharma S.; Kumari, K. An overview on *Calendula officinalis* L.: (pot marigold). *J. Adv. Sci. Res.* 2021, 12, 13–18. [CrossRef]

57. Silva R. E.J.; Gonçalves, E.S.; Aguiar, F.; Evêncio, L.B.; A Lyra, M.M.; Cristina C Coelho, M.O.; do Carmo A Fraga, M.C.; Wanderley, A.G.; Gonçalves Wanderley, A.; Rego, M. Toxicological Studies on Hydroalcohol Extract of *Calendula officinalis* L. *Phytother. Res.* 2007, 21, 332–336

58. Tabletki.UA <https://tabletki.ua/uk /7312/>

59. Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1692–1696. [CrossRef]

60. Vecherko, L.P.; Sviridov, A.F.; Zinkevich, E.P.; Kogan, L.M. The Structure of Calendulosides C and D from the Roots of *Calendula officinalis*. *Chem. Nat. Compd.* 1975, 11, 379–384. [CrossRef]

61. Vidal-ollivier, E.; Balansard, G.; Faure, R.; Babadjamian, A. Revised Structures of Triterpenoid Saponins from the Flowers of *Calendula officinalis*. *J. Nat. Prod.* 1989, 52, 1156–1159. [CrossRef]

62. Wcojciehowski, Z.; Jelonekiewicz-Konador, A.; Tomaszewski, M.; Jankowski, J.; Kasprzyk, Z. The Structure of Glycosides of Oleanolic Acid Isolated

from the Roots of *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* 1971, 10, 1121–1124. [CrossRef]

63. Zhang, N.; Ying, M.D.; Wu, Y.P.; Zhou, Z.H.; Ye, Z.M.; Li, H.; Lin, D.S. Hyperoside, a Flavonoid Compound, Inhibits Proliferation and Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Osteosarcoma Cells. *PLoS ONE* 2014, 9, e98973. [CrossRef]

64. Zitterl-Eglseer, K.; Sosa, S.; Jurenitsch, J.; Schubert-Zsilavecz, M.; della Loggia, R.; Tubaro, A.; Bertoldi, M.; Franz, C. AntiOedematous Activities of the Main Triterpendiol Esters of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.* 1997, 57, 139–144.