

## ВМІСТ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК У НАСІННІ ТА ПРОРОСТКАХ КОНОПЕЛЬ РІЗНИХ СОРТІВ

*Л.М.Горюквіна, доктор сільськогосподарських наук, професор,*

*ІНСТИТУТ БІОЛІНІ І ВЕРЖАВІННІ ПЕДІАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ*

*ім. Олександра Дубожанки*

*Встановлено, що всі частини насіння та його проростки містять незначну кількість канабіноїдних сполук – «слідів» - 0,005%. Ідентифіковані дві речовини та хімічним складом сполуки ТТК<sub>1</sub> і ТТК<sub>2</sub>. Привласнено, що ТТК<sub>1</sub> – це Δ<sup>9</sup> – тетрагідроканнабінол і ТТК<sub>2</sub> – Δ<sup>8</sup> – тетрагідроканнабінол. Наявність сполук КБД, ТТК і КБН у проростках насіння різних сортів конопель показує, що синтез цих речовин був генетично обумовлений і проявлявся на різних стадіях росту і розвитку. Отримані результати мають практичне значення у селекційній роботі.*

### **Об'єкт вивчення та методи дослідження.**

Кількісне визначення канабіноїдних речовин проводилось за допомогою газорідного хроматографа марки Hewlett Packard 5830 А, обладнаного водневим пламеневі-іонізуючим детектором. В якості газу-носія використовувався азот. Швидкість потоку азоту та водню – 30 мл/хв., повітря – 300 мл/хв. Температура впускного отвору та детектору була, відповідно, 240 та 300°C. Скляні колонки були заповнені 5% OV-101 на Chromosorb WAN-DMCS (80-100 меш). Вміст канабіноїдів у кожному зразку визначався за допомогою інтегратора марки Hewlett Packard 3380 А. Внутрішнім стандартом був метиловий ефір стеаринової кислоти – C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>. Повторюваність аналізів – п'ятикратна.

Напівкількісний метод визначення канабіноїдних сполук проводився методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на готових пластинах типу Silufol © UV254 з реактивом міцним синім Б [1,2].

Для проведення аналізів використовувались сорти конопель дводомних та одностомних форми: ЮС-9, ЮСО-29, ЮСО-31, ЮС-8, ЮСО-19, ЮСО-23 та декілька гібридів.

### **Результати досліджень.**

Як відомо, насіння конопель має різноманітну кольорову поверхню мозаїку, характерну не лише для сорту, але і для кожної родини. Раніше проведені дослідження показали, що на зовнішній поверхні насіння вишукані окремі залозисті волоски, що пов'язано з наявністю великої кількості цих залоз на цвітниках, які охоплюють кожну насінину. Результати мікроскопічних аналізів показали, що тільки верхня жорстка оболонка має окремі залози. Тоненькі плівки, що вкривають

насінину, залоз не мають. Тому ми для аналізу відокремлювали верхню жорстку оболонку, м'яку оболікаючу плівку насіння і власне насінину. Кожну частину аналізували окремо. Аналіз проводили методами газорідинної (ГРХ) і тонкошарової хроматографії (ТШХ) (табл. 1).

*Таблиця 1 – Вміст канабіноїдів у складі насіння конопель різних сортів*

Сорт	Частини насінини, що аналізувалися	Вміст канабіноїдів, (%)		
		КБД	ТГК	КБН
ЮС-9	жорстка оболонка	слабі сліди	слабі сліди	0
ЮС-9	насінина без оболонок	0	0	слабі сліди
ЮС-9	м'яка плівка	0	0,001	0,001
ЮСО-29	жорстка оболонка	слабі сліди	0	0
ЮСО-29	насінина без оболонок	слабі сліди	слабі сліди	0,001

Слабі сліди - це простежена слідова кількість менша 0,001%

З наведеного у таблиці матеріалу можна зробити висновок, що всі аналізовані частини насіння містили незначну кількість канабіноїдних речовин. Вміст канабідіолу (КБД), тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабідіолу (КБН) складав «слабі сліди» – 0,001%. Отримані результати свідчать про наявність канабіноїдів не лише у зовнішній оболонці, але й у внутрішній – м'якій плівці та власно насінині, які не пов'язані з наявністю залоз, розташованих на поверхні. В подальшому методами тонкошарової і газорідинної хроматографії було проаналізовано насіння декількох сортів і гібридів конопель (табл.2).

Аналіз хроматограм, отриманих методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), показав, що насіння всіх сортів і гібридів конопель містили канабідіолу (КБДК) і тетрагідроканабінолу (ТГКК) кислоти і лише у сорті ЮС-8 відмічено вміст КБД у слідовій кількості. У сорті конопель ЮС-9 і гібриді (ЮС-22 x ЮСО-31) F<sub>2</sub> також у слідовій кількості виявлені сполуки КБД і ТГК.

Як слід було очікувати, аналізи цих же сортів і гібридів, проведені методом газорідинної хроматографії (ГРХ), показали наявність КБД, ТГК і відсутність кислот, тобто в результаті високої температури, хроматографування відбувалося декарбоксілювання інертних кислот у відповідні канабіноїди. У насінні багатьох сортів і гібридів містилась невелика кількість КБД – 0,001-0,039%, два ізомера ТГК, які ми відмічали, як ТГК<sub>1</sub> і ТГК<sub>2</sub>. Вміст ТГК<sub>1</sub> складав 0,001%-0,01%, і ТГК<sub>2</sub>, в основному, відмічався у меншій кількості – 0 – «слабі сліди» і «сліди». Вміст КБІ був відсутній у насінні всіх сортів і гібридів за винятком одного гібриду – (ЮС-22 x ЮСО-31). Аналіз сорту конопель ЮСО-31 показав наявність двох ізомерів ТГК. Сполуки КБД і КБІ були відсутні. У гібриду (ЮС-22 x ЮСО-31) F<sub>2</sub> також ці речовини були відсутні та в невеликій кількості відмічено вміст біологічно активних речовин - ТГК.

Таблиця 2 – Вміст канабіноїдних сполук у насінні створених типів ізольованих сортів

Сорт	Статевий тип рослини	Вміст канабіноїдів, (бали)				Вміст канабіноїдів, (%)			
		КБД	ТГК	ТГКК	КБДК	КБД	ТГК <sub>1</sub>	ТГК <sub>2</sub>	КБН
Глухівські 10 жовтостоблеві	Однодомна матірка	0	0	сліди	слабі сліди	0,003	0	сліди	0
ЮСО-19	Однодомна матірка	0	0	сліди	слабі сліди	0,013	0	сліди	0
ЮСО-23	Однодомна матірка	0	0	сліди	слабі сліди	0,001	0	сліди	0
ЮСО-31	Однодомна фемінізована плоскінь	0	0	0	сліди	0,026	0,002	слабі сліди	0
ЮСО-31	Однодомна фемінізована плоскінь	0	0	0	0	0	0,001	сліди	0
ЮС-8	Жіночі рослини	сліди	0	0	сліди	0,015	0	слабі сліди	0
ЮС-9	Жіночі рослини	0-слабі сліди	0-слабі сліди	сліди	сліди	0,015	0,001	0	0
Гібрид (ЮС-22 x ЮСО-31)	Однодомна фемінізована плоскінь	0	0	0	слабі сліди	0	0,003	0	0
Гібрид (ЮС-22 x ЮСО-31)	Однодомна фемінізована плоскінь	сліди	сліди	сліди	1	0,039	0,010	0	0
Гібрид (ЮС-22 x ЮСО-31)	Однодомна фемінізована плоскінь	0	0	сліди	слабі сліди	0,005	0,001	слабі сліди	0
Гібрид (ЮС-22 x ЮСО-31)	Однодомна фемінізована плоскінь	0	0	0	0	слабі сліди	0,002	0	0,001
Гібрид (ЮС-8 x ЮСО-30)	Однодомна матірка	0	0	слабі сліди	сліди	0,002	0	слабі сліди	0

Вміст в однодомній фемінізованій плосконі сорту ЮСО-31 ізомерів ТГК<sub>1</sub> і ТГК<sub>2</sub>, у гібриді (ЮС-22xЮСО-31) F<sub>2</sub> ТГК, та відсутність КБД дозволяє висунути припущення, що сорти та гібриди, які створені за участю південних конопель (типу італійської та інших), мали схильність до накопичення біологічно активних речовин вже у найбільш ранні періоди росту і розвитку.

Відомо, що сорт ЮСО-31 створений на основі сортів Сегеді 9 (Угорщина) і Краснодарські 35 (за участю італійських конопель), також як і гібрид (ЮС-22x ЮСО-31) мали результати схожі з даними, отриманими М.К. Poddar, g.g. Ghosh and Dutta (1973) [4], де у насінні відмічено відносно високий вміст ТГК, КБН і відсутність КБД або обмежена його

кількість. Наявність цих речовин є суттєвим показником під час аналізу індійських конопель.

Порівняльні аналізи вегетативних і генеративних органів конопель багатьох сортів, проведені методом ГРХ, показували, що насіння і стебла мали найбільш низьку концентрацію каннабіноїдів (табл.3).

*Таблиця 3 – Вміст каннабіноїдів речовин у вегетативних і генеративних органах конопель різних сортів, (%)*

Сорт	Каннабі-ноїди	Органи що аналізуються					
		крупні листки	дрібні листки	квітки	оцвітлина	стебло	насіння
ЮС-8-жіночі рослини	КБД	0,224	-	-	0,386	0,015	0,015
	ТГК	0	-	-	0,010	0	0
	КБН	0	-	-	0	0	слабі сліди
ЮС-9 – жіночі рослини	КБД	0,172	0,482	-	2,240	0,156	0,015
	ТГК	0,041	0,181	-	1,089	0	0,001
	КБН	0	0	-	0,264	0	0
ЮСО-19 – однодомні рослини	КБД	0,142	0,154	1,248	1,364	-	0,013
	ТГК	0,002	0	0	0	-	0
	КБН	0	0	0	0,021	-	0
ЮСО-23 – однодомні рослини	КБД	0,149	0,293	0,568	2,271	слабі сліди	0,001
	ТГК	0,003	0	0	0	слабі сліди	0
	КБН	0	0	слабі сліди	0	0	0
ЮСО-31 – однодомні рослини	КБД	0,088	0,152	0,399	1,485	0,008	0,013
	ТГК	0,001	0	0,010	0,433	0	0,002
	КБН	0,002	0	сліди	слабі сліди	0	0
Глухівські 10 жовтостеблові	КБД	0,154	0,275	-	0,904	0	0,013
	ТГК	0	0,009	-	0,033	0	0
	КБН	0	0	-	0	0	0

Сорти ЮС-9 і ЮСО-31, порівняно з іншими одночасно аналізованими сортами, містили у насінні невелику кількість ТГК. Ці сорти характеризувались великою кількістю ТГК в оцвітині і дрібних вегетативних листках суцвіття.

Відповідно, проаналізувавши багато сортів і гібридів конопель ми встановили, що насіння містило незначну кількість каннабіноїдів, в основному, КБД і ТГК. Аналізи статевих типів багатьох сортів дозволили також виявити сполуки типу – ТГК<sub>1</sub> і ТГК<sub>2</sub>. Вважаємо, що в основному, у рослинах конопель накопичувався ТГК<sub>1</sub> і у меншій кількості ТГК<sub>2</sub>. Припускаємо, виходячи з літературних даних і власних багаторічних робіт, що ТГК<sub>1</sub> – це Δ<sup>9</sup>-тетрагідроканнабінол і ТГК<sub>2</sub> – Δ<sup>9</sup>-тетрагідроканнабінол. У проаналізованих сортів, створених за участю південних конопель, відмічалась схильність до більшого накопичення біологічно активних сполук ТГК.

Насіння конопель шести сортів пророщували у чашках Петрі в термостаті при температурі +25<sup>0</sup>С протягом п'яти діб. З пачкою сім'ядольних листочків і первинних корінців рослину масу розділили на

дві частини. Одну частину аналізували у «сирому» вигляді, другу – після прогрівання у сушильній шафі при температурі +120°C (табл. 4).

*Таблиця 4 – Вміст канабіноїдних речовин у проростках різних сортів сорти*

Сорт	Орган, що аналізується	Сирий рослинний зразок				Прогрітий рослинний зразок			
		Вміст канабіноїдів. (%)							
		КБД	ТГК <sub>1</sub>	ТГК <sub>2</sub>	КБН	КБД	ТГК <sub>1</sub>	ТГК <sub>2</sub>	КБН
ЮСО-1	Гервінні корі і ці та сім'ядольні листочки	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди
ЮСО-14		слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	0,002	слабі сліди	слабі сліди	0,004
ЮСО-16		слабі сліди	0	0	0	0,001	0,005	слабі сліди	0,002
ЮСО-29		0	слабі сліди	0	слабі сліди	0,004	0,003	слабі сліди	0,001
ЮС-9		0	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	0,003	слабі сліди	слабі сліди	0,003
Краснодарські 35		0	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	слабі сліди	0,001	слабі сліди	слабі сліди

«Сирі» і «прогріті» зразки аналізували методом газорідної хроматографії на хроматографі Hewlett Packard. Аналіз екстрактів з «сирої» рослинної маси проростків показував наявність канабіноїдів у всіх сортах. Їх концентрація була незначна і виражалась в «слідових» кількостях. Був виявлений вміст КБД, ТГК<sub>1</sub>, ТГК<sub>2</sub> і КБН. Сорти ЮСО-1, ЮСО-14 і ЮСО-16, віднесені до середньоруської групи «волокнистих» сортів, містили КБД, ТГК<sub>1</sub>, ТГК<sub>2</sub> і КБН. Сорти південного походження – «наркотичні» Краснодарські-35 і сорти, у родоводі яких також як і у сорті Краснодарські-35, але у меншій мірі, брали участь італійські коноплі, містили ТГК<sub>1</sub>, ТГК<sub>2</sub> і КБН. КБД не був ідентифікований. На наш погляд, отримані результати, як найкраще, характеризували сорти і вказували на їх походження за генотипом. Не дивлячись на те, що, практично, вихідні сортозразки або сорти були акліматизовані, а у подальшому брали участь у схрещуванні з іншими, більш північними сортами, за результатами аналізу все ж таки простежувалась їх генетична сутність. Результати аналізів окремих рослин і сортів за вмістом канабіноїдних сполук вказували на генетичну природу сорту, яка, очевидно, не зовсім втрачала свою сутність, не дивлячись на вже відмічені форми впливу – акліматизацію, схрещування та відбір.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що певна кількість КБД і його відсутність, нарівні з вмістом КБДК по відношенню до ТГК і КБН, вказує на належність сорту або сортозразку до хімічного фенотипу I або II, а також наскільки тісно за походженням вони були пов'язані з «наркотичними»-I або «волокнистими»-II сортами або сортозразками – батьками.

У заздалегідь прогрітих, а потім проаналізованих зразках вміст канабіноїдних речовин не значно збільшувався і складав від «слабких слідів» до 0,005%. Як вже відмічалось у попередніх дослідженнях,

прогрівання здебільшого викликало зміни у співвідношенні кислот і основних канабіноїдів, що сприяло втраті уявлення про їх первинне накопичення.

Попереднє прогрівання рослинних зразків у сушильній шафі при температурі +120°C викликало неповне декарбоксілювання нейтральних кислот, а потім вторинне прогрівання елюату наступало у газорідному хроматографі за більш високої температури – +230-240°C, що сприяло повному декарбоксілюванню кислот і збільшенню вмісту основних канабіноїдів КБД, ТГК і КБН (табл. 4).

У наступні роки були проаналізовані окремо сім'ядольні листочки і первинні корінці. Вміст канабіноїдних речовин також був незначним. Відмічалась деяка тенденція до більшого накопичення їх у корінцях, ніж у сім'ядольних листочках.

Фурнієр (1981) [3] відмічав, що дослідженнями Расмусена і Хервейджера (1975) виявлена наявність канабіноїдів у рослинах в стадії колеоптеля, тобто одразу ж після проростання. Інші роботи по цьому питанню нам не відомі.

На основі проведених аналізів методами тонкошарової та газорідної хроматографії нами встановлено, що насіння багатьох сортів і гібридів, отриманих за участю батьківських форм, які мають в одному з поколінь південні Краснодарські коноплі мали тенденцію до більш активного накопичення ТГК, КБН і відсутності або незначну кількість КБД. Подібну тенденцію мали проростки насіння – первинні корінці та сім'ядольні листочки. Проростки насіння сорту ЮСО-16 – (сорт європейського типу) містили лише сполуки КБД. У сортів ЮС-9 та ЮСО-29, які мали певну спадкову частину італійських конопель, ідентифіковані ТГК<sub>1</sub>, ТГК<sub>2</sub> та КБН. КБД не було виявлено. Південно дозріваючі сорти ЮСО-1 і ЮСО-14 отримані за участю південно дозріваючого сорту ЮС-6, який мав у потомстві певну частину італійських конопель, проростки також містили основні каннабіноїдні речовини: КБД, ТГК<sub>1</sub>, ТГК<sub>2</sub> і КБН.

Наявність сполук КБД, ТГК і КБН у проростках насіння різних сортів конопель показувала, що синтез цих речовин був генетично обумовлений і проявлявся на ранніх стадіях росту і розвитку. Отримані результати мають практичне значення у селекційній роботі.

1. *Методичні вказівки по аналізу насіння коноплі на наявність і вміст каннабіноїдів* [Вирощен В.І., Горішкова Л.М., Сенченко Г.И., Сажко М.М.]. – М., 1985. –14с.

2. *А. с. 138687 СССР. Способ оценки генетической конопля по содержанию каннабиноидных соединений* /Горшкова Л.М., Сенченко Г.И., Вирощен В.И. (СССР); заявл. 15.11.1987.

3. *Fournier G. Les chimiotypes du chenure (Cannabis sativa) Interet pour un programme de selection // Agronomie, Sciences des production vegetales et de l'environnement. – 1981. – V.1, №8. – P.679–688.*