

УДК 633.522.633.99

Горшкова Л.М., Богданова А.С.

БІОГЕНЕЗ КАННАБІНОЇДНИХ СПОЛУК CANNABIS SATIVA L.

Глухівський національний педагогічний університет ім. О. Довженка

Глухів, Києво-Московська 24, 41400

L. Horshkova, A. Bohdanova

CANNABINOIDS CONNECTIONS CANNABIS SATIVA L. BIOGENESIS

Glukhivskiy National Pedagogical Universit. Dovzhenko,

Gluhiv, Street Kiev-Moscow 24, 41400

Анотація. Методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) встановлено, що на ранніх стадіях росту і розвитку утворювалися лише каннабіноїдні кислоти – каннабідіолова (КБДК) і тетрагідроканнабінолова (ТГКК). Протягом вегетації кількість визначених кислот поступово збільшувалася і особливо у дрібних листках суцвіття і оцвіттинах. Такі сполуки, як каннабідіол (КБД), тетрагідроканнабінол (ТГК) і каннабінол (КБН) у незначних кількостях були визначені пізніше – у період утворення генеративних органів. Припускаємо, що вказані речовини утворювалися або шляхом біосинтезу, або шляхом перетворення кислот КБДК, ТГКК в указані сполуки, можливо, під дією ферментативних систем метаболізму та умов навколишнього середовища.

Порівняння процесів біосинтезу каннабіноїдних сполук у сортів ЮС-9 і ЮСО-29 показали, що у сорту конопель ЮСО-29 в результаті раніше проведеного відбору на зменшення вмісту ТГК, практично, були відсутні ТГКК, КБД, ТГК і КБН.

У процесі газорідинної хроматографії (ГРХ) в зразках різних сортів конопель названі каннабіноїдні кислоти були відсутні, визначено лише вміст КБД, ТГК і КБН. Можемо стверджувати, що під дією високої температури,

відбувалося перетворення кислот у зазначені речовини. Допускаємо, що, можливо, відбувалися перетворення і інших сполук.

Ключові слова: біогенез, гашиш, каннабіноїди, КБД - каннабідіол, КБН каннабінол, КБДК - каннабідіолова кислота, ТГКК - тетрагідроканнабіолова кислота, трансформація, ТГК- тетрагідроканнабінол.

Summary. As a result of using method of thin layer chromatography, it is possible to state that on early stages of growing and development only cannabinoid acids were created – cannabidiolic and tetrahydrocannabinolic ones. During the vegetation the amount of defined acids was gradually increasing and it was especially strong in the small size leaves of inflorescences and perianths. Such connections as cannabidiol, tetrahydrocannabinol and cannabinol in the insufficient amount were defined later – in the period of forming generative organs. It can be assumed that the mentioned substances were created either by ways of biosynthesis or by transforming cannabidiolic and tetrahydrocannabinolic acids into the mentioned connections, maybe under the influence of fermentative systems of metabolism and the environment conditions.

Comparing the processes of biosynthesis of cannabinoid connections of the species YuS-9 and YUSO-29 showed that the hemp specie YUSO-29 as the result of previously conducted selection for increasing the amount of tetrahydrocannabinol, all the above mentioned connections (tetrahydrocannabinolic, cannabinoid acid, tetrahydrocannabinol, cannabinol) were practically absent.

In the process of gas and fluids chromatography in the samples of different species of hemp the mentioned cannabinoid acids were absent, only the amount of cannabinoid acid, tetrahydrocannabinol and cannabinol was defined. It is possible to state that under the influence of high temperature transforming acids into the mentioned substances took place. It can be assumed that possibly transforming of other connections took place.

Key words: biogenesis, Cannabinoids, hashish, KBD - kannabidiol, KBN – kannabinol, KBDA - kannabidiol acid, THKA – tetrahidrokannabinol acid, transformation, THC – tetrahydrocannabinol.

Вступ

Унікальна за своїм призначенням та найбільш екологічно чиста галузь коноплярства з отримання натурального волокна, порівняно з хімічною промисловістю, яка займається виробництвом штучного волокна, постала перед фактором витіснення її із сільськогосподарського виробництва через соціальні проблеми, пов'язані з отриманням наркотичної сполуки – гашишу (каннабіноїдні сполуки). В усьому світі наркоманія становить велику соціальну проблему. Між тим, каннабіноїдні речовини конопель недостатньо досліджені порівняно з іншими наркотиками, що пояснюється насамперед, трудоємністю отримання чистих сполук, їх лабільністю і нестійкістю. Можливо, коли ідентифікація чистих речовин буде продуктивнішою та дешевшою, вони знайдуть більш широке застосування у практичній і науковій медицині як лікарські препарати.

Використання посівних конопель як джерела наркотичних речовин стало підставою для того, щоб привернути особливу увагу до біогенезу каннабіноїдних сполук, кількісний уміст окремих речовин та утворення біологічно активного тетрагідроканнабінолу – ТГК.

Огляд літератури

Великим досягненням сучасної хімії вважають встановлення структури каннабіноїдних сполук, багатоваріантні їх синтези та утворення геометричних і просторових ізомерів *A.R. Todd* [7]. Успішне вирішення багатьох хімічних проблем, насамперед, виділення хімічно чистих сполук – каннабіноїдів, дозволило більш реально вирішувати фармакологічні та клінічні завдання, а також відкрило широкі можливості для вивчення їх фізіологічних та токсикологічних властивостей.

Можна зробити посилання на наведені дослідження, проте у багатьох із них говорилося про гашиш (маріхуану, смолу та зразки невідомого походження). Гашиш і рослинна маса у кожному конкретному випадку розрізняються за вмістом каннабіноїдних речовин, за їх співвідношенням залежно від того, які органи рослини були використані для аналізу, у яку фазу

росту і розвитку відібрані зразки. Не менш важливим є сорт і місце вирощування. *U. Claussen and F. Korte* [5, 6] відмічали, що має значення і спосіб збирання врожаю, рослини які відцвітали, зрізані і залишені на деякий час у полі, або ж безпосередньо зібрана смола. Г.В. Лазуревский [3] відмічав, що гашиш є забороненим наркотиком, тому ніякого ГОСТу на його виготовлення немає. Показником переваги гашишу у підпільних операціях служить суб'єктивна фізіологічна оцінка.

Матеріали і методи

З метою виконання експериментальної роботи був використаний рослинний матеріал, отриманий з сортів дводомних і однодомних конопель - ЮС-9 та ЮСО-29.

Сорт (Південнодозріваючі 9) ЮС-9 отриманий на основі південних краснодарських сортів, які містили велику кількість каннабіноїдних сполук, тому він мав значну кількість каннабіноїдних сполук.

Сорт (Південнодозріваючі однодомні 29) ЮСО-29 отриманий методом гібридизації між Угорським сортом Сегеді 9 і однодомним сортом ЮСО-14 з наступним застосуванням сімейно-групового добору для зниження вмісту каннабіноїдних речовин. Сорти ЮС-9 і ЮСО-29 відрізняються між собою за багатьма ознаками: генетичними, морфологічними, біологічними, а також за вмістом каннабіноїдних сполук.

Рослини кожного сорту перед аналізом, були заетиковані з метою отримання достовірного результату, який стосувався біогенезу каннабіноїдних сполук в онтогенезі. Кожна рослина аналізувалася окремо, після чого виводилися середні показники.

З кожної рослини були відібрані листки розташовані на стеблі. У процесі росту і розвитку рослин відбиралися дрібні листки, оцвітини та квітки. Відібрана маса аналізувалася у сирому вигляді. Аналізи проводилися один раз на 7 діб. Диференціювання каннабіноїдних сполук здійснювалося за положенням R_f кожної сполуки та забарвленням плям на хроматографічній

пластині, при цьому порівнювалися плями досліджуваних рослинних зразків та «свідка».

Кількісне визначення каннабіноїдних речовин проводилося за допомогою газорідинного хроматографу марки *Hewlett Packard 5830 A*, обладнаного водневим променево-іонізуючим детектором. У ролі 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 300⁰ С.

Скляні колонки були заповнені 5% OV-101 на *Chromosorb WAN-DMCS* (80-100 меш.). Уміст каннабіноїдів у кожному зразку визначався за допомогою інтегратора марки *Hewlett Packard 3380 A*. Внутрішнім стандартом був метиловий ефір стеаринової кислоти C₁₉H₃₈O₂.

Напівкількісний уміст каннабіноїдних сполук проводився методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинах типу *Silufol UW 254*[®] [1,2].

Результати. Обговорення та аналіз.

У зв'язку з цим, проведена нами експериментальна робота була направлена на визначення каннабіноїдних сполук, починаючи з трьох пар листків до біологічної стиглості насіння.

Аналіз «сирих» зразків ЮС-9, проведений методом тонкошарової хроматографії, показав, що, починаючи з фази трьох пар листків до фази масової бутонізації, на пластинах було визначено дві плями жовто-помаранчевого кольору та світло-малинового, що свідчить про наявність каннабіноїдних сполук (табл.1).

Таблиця 1.
Біогенез каннабіноїдних сполук у сорту ЮС-9 *Cannabis sativa* L.

Фази росту і розвитку	Вміст каннабіноїдних сполук (бали)				
	КБД	ТГК	КБН	ТГКК	КБДК
Сирі зразки					
Вегетативні органи рослин					
Крупні листки стебла					
Три-чотири пари листків	0	0	0	0-сліди	сліди-1
Шість пар листків - початок бутонізації	0	0	0	сліди	2
Масова бутонізація	слабі сліди	сліди	1	2	4

Цвітіння	слабі сліди-сліди	сліди	0	9-10	4
Молочна – молочно-воскова стиглість насіння	0- слабі сліди	0-4	0	9-10	8
Дрібні листки суцвіття					
Молочна стиглість насіння	сліди	5	0	>10	8
Біологічна стиглість насіння	слабі сліди	3	0	>10	8
Генеративні органи рослин					
Квітки					
Цвітіння – молочна стиглість насіння	0	4	0	10	4
Оцвіттина					
Молочна – молочно-воскова стиглість насіння	сліди-1	8	0	10->10	6-8
Молочно-воскова – біологічна стиглість насіння	1-4	3-9	0-2	10->10	8

ляма жовто-помаранчевого кольору займала найбільш низьку межу від лінії старту рухливої фази. Вище до першої плями прилягала друга, яка була світло-малинового кольору. Значення Rf відповідно складало 1,0147 і 1,0025. Уміст сполук за «свідком» жовто-помаранчевої плями був визначений як «сліди», малинової – «0-сліди». Вважаємо, що за значенням показника Rf, за кольором забарвлення їх можна кваліфікувати так: першу як каннабідіолову кислоту (КБДК), другу - тетрагідроканнабіолову (ТГКК). Колір визначених кислот відповідав кольору КБД і ТГК - КБД (каннабідіолу) – жовто-помаранчевому, ТГК (тетрагідроканнабіолу) – малиновому, які були визначені пізніше. За окреслений період уміст визначених кислот збільшувався приблизно вдвічі і складав 2 бали. Сполуки КБД, ТГК і КБН (каннабінол) не були ідентифіковані.

Хіміки із Токіо *T.Yamauchi, G.Shoyama, H.Aramaku, A.Asuma* та *J.Nischsoka* [8] із свіжих рослинних зразків виділили каннабіноїдні кислоти-каннабігеролову, каннабіхроменову, каннабідіолову і тетрагідроканнабіолову. *T.Yamauchi* [9] вивчав сорти *Cannabis*, що генетично відрізнялися. Узяті зразки конопель відрізнялися за вмістом кислот. Автор відмічав переважне перетворення каннабігеролової кислоти у каннабіхроменову на початкових стадіях росту і розвитку (у молодих пагонах). З появою квіткових пагонів

спостерігалось перетворення каннабігеролової кислоти на тетрагідроканнабінолову.

Наші результати аналізів свідчать, що у молодих крупних листках сорту ЮС-9 утворювалося дві кислоти – КБДК (каннабідіолова) і ТГКК (тетрагідроканнабінолова).

Починаючи з періоду масової бутонізації – початку активного розвитку генеративних органів, крім кислот ідентифікованих раніше, за рухом фази каннабіноїдних сполук були ідентифіковані КБН, ТГК та КБД. Значення Rf були наступні: 1,0026, 1,0019 і 1,0012. КБН був забарвлений у бузковий колір, ТГК – малиновий і КБД – жовто-помаранчевого. Позначені каннабіноїди співпадали з місцем розташування «свідків».

Уміст зазначених каннабіноїдних сполук протягом періодів цвітіння до дозрівання насіння збільшувався, проте не однаково. Каннабідіолова кислота – КБДК, тетрагідроканнабінолова кислота – ТГКК та ТГК тетрагідроканнабінол збільшувались у декілька разів, а вміст КБД протягом цих періодів залишався у незначній кількості, у вигляді «слідів». КБН з початку цвітіння не був ідентифікований, можливо, через велику кількість ТГКК, який займав на хроматограмі проміжок між КБДК та ТГК. У періоди масового цвітіння та молочної стиглості насіння накопичення каннабіноїдних сполук було більш інтенсивним. У період відмирання крупних листків ТГК не виявлено (рис.1).

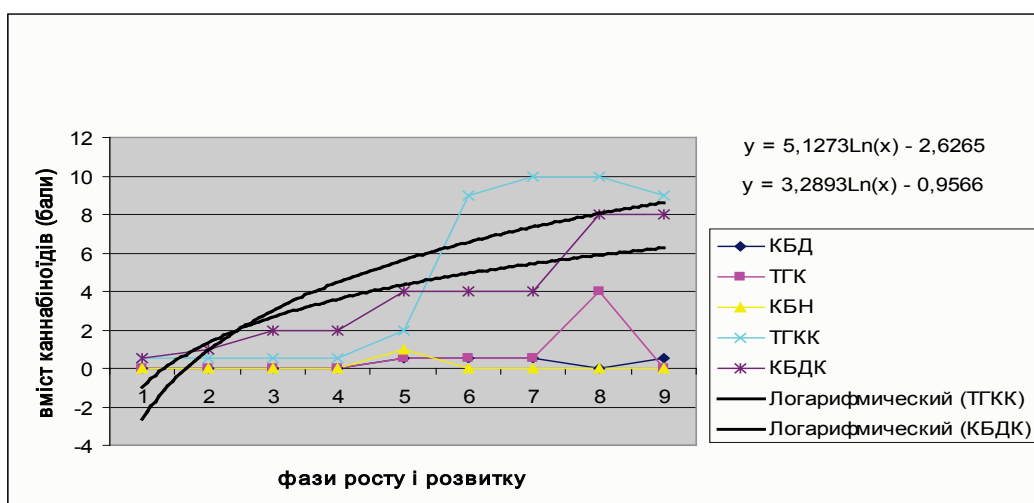


Рис.1 Біогенез каннабіноїдних сполук у сорту ЮС-9 *Cannabis sativa* L. у крупних листках стебла (сирі)

Найбільшу кількість каннабіноїдних сполук, особливо ТГК, було ідентифіковано в екстрактах оцвітини. Квітки порівняно з оцвітинами містили їх меншу кількість. Каннабіноїди, виділені із оцвітини та квіток за значенням Rf забарвленням плям, відповідали каннабіноїдним сполукам ідентифікованим із листків стебел.

Таким чином, аналіз зразків «сирої» рослинної маси, проведений методом ТШХ, дозволив установити, що у початковій фазі росту і розвитку рослин спочатку утворювалися кислоти КБДК та ТГКК. Кількість цих кислот збільшувалася протягом усього періоду вегетації. З активним розвитком генеративних органів рослин спостерігали процес утворення ТГК і КБД та незначної кількості КБН. Найбільш активне утворення ТГК відмічено у період початку дозрівання насіння. Уміст КБД протягом періоду вегетації майже не збільшувався.

Аналіз результатів, отриманих з екстрактів «сирих» крупних листків сорту конопель ЮСО-29, показав, що біосинтез каннабіноїдних речовин відбувався менш інтенсивно ніж у сорту ЮС-9, особливо це стосувалося біосинтезу ТГКК (табл.2).

Таблиця 2.

Біогенез каннабіноїдних сполук у сорту ЮСО-29

Фази росту і розвитку	Вміст каннабіноїдних сполук (бали)				
	КБД	ТГК	КБН	ТГКК	КБДК
Сирі зразки					
Вегетативні органи рослин					
Крупні листки стебла					
Три-чотири пари листків	0	0	0	0	0-сліди
Шість пар листків - початок бутонізації	0	0	0	0	сліди-1
Масова бутонізація	0	0	0	0	2
Цвітіння	0	0	0	слабі сліди	2
Молочна – молочно-воскова стиглість насіння	0	0	0	-	3-4
Дрібні листки суцвіття					
Молочна – молочно-воскова	0	0	0-2	0	5-6

стиглість насіння					
Воскова стиглість насіння	0	0	0	0	4
Біологічна стиглість насіння	0	0	0	0	6
Генеративні органи рослин					
Квіткі					
Цвітіння	слабі сліди	0	3	0	3
Оцвітіння					
Молочна стиглість насіння	0- слабі сліди	0	0-2	0	6
Воскова стиглість насіння	2	3	0	2	8
Біологічна стиглість насіння	2	4	5	0	8

Накопичення даної кислоти, починаючи з трьох пар листків до біологічної стиглості насіння, не відбувалося. Лише у фазу масового цвітіння синтезувалася невелика її кількість, яка визначена як «слабі сліди». Такі сполуки, як КБД, ТГК і КБН не були ідентифіковані. У дрібних листках суцвіття впродовж вегетації ТГКК також не синтезувалася.

Інші результати отримані з біосинтезу КБДК. Починаючи з фази чотирьох пар листків і до біологічної стиглості насіння, у вегетативних органах рослин відбувалося накопичення цієї кислоти. Більш активний синтез її відмічений у генеративних органах рослин (рис.2).

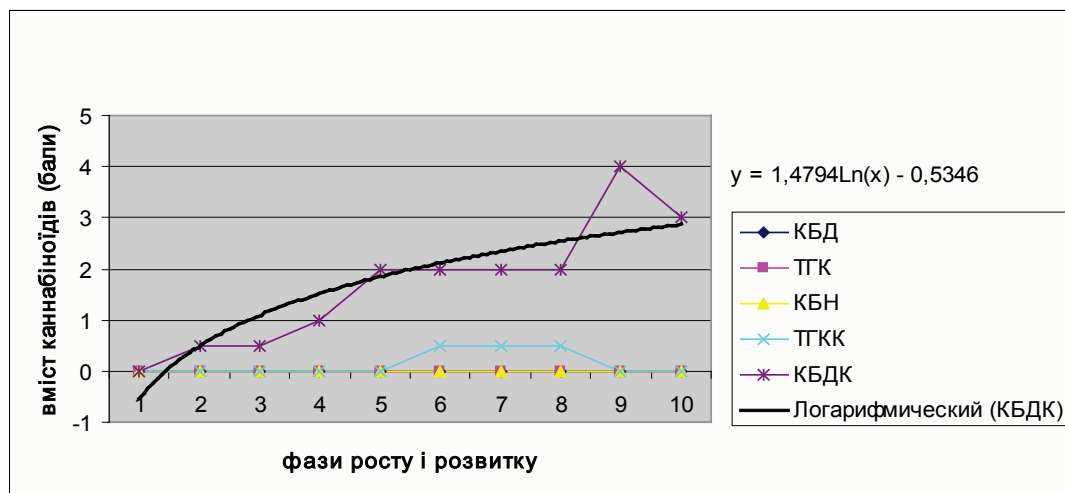


Рис.2 Біогенез каннабіноїдних сполук у сорту ЮСО-29 у крупних листках стебла (сирі)

Вважаємо за доцільне відмітити, що біосинтез каннабіноїдних сполук в онтогенезі у сортів ЮС-9 і ЮСО-29 відбувався неоднозначно. Як було відмічено раніше, протягом декількох років з сортом ЮСО-29 проводилася

селекційна робота на зниження вмісту ТГК. Як показали наші аналізи, він мав незначну кількість ТГКК, ТГК, КБД і КБН. І лише в фазі воскової та біологічної стиглості насіння були визначені КБД, ТГК і КБН. В інші фази росту і розвитку ці сполуки були відсутні. Накопичення КБДК відбувалося протягом періоду вегетації, хоча і в меншій кількості, ніж у сорту ЮС-9.

Одночасно з аналізами «сирих» рослинних зразків нами були проаналізовані зразки сортів конопель ЮС-9, ЮСО-29 та деяких інших сортів методом газорідинної хроматографії (табл.3).

Таблиця 3.
Уміст каннабіноїдних сполук у сортах конопель, отриманих методом ГРХ
(біологічна стиглість насіння)

Сорт	Вміст каннабіноїдів, %		
	КБД	ТГК	КБН
ЮСО-1	4,91	0,50	0,22
ЮСО-19	4,68	0,32	0,17
ЮСО-29	4,77	0,73	0,19
Глухівські 10	4,97	0,53	0,14
ЮС-9	4,81	1,78	0,23

Результати оцінки представлених зразків за вмістом каннабіноїдних сполук свідчили, що під дією високої температури в зразках каннабіноїдні кислоти КБДК, ТГКК не були ідентифіковані, проте був визначений уміст ТГК, КБД, КБН.

Вважаємо, що під дією високої температури (240⁰ С) відбувалася трансформація каннабіноїдних сполук і, насамперед, каннабіноїдних кислот.

Висновки

1. Результати аналізів сирієї рослинної маси, проведених методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), свідчили, що в молодих активно фотосинтезуючих рослинах сорту конопель ЮС-9 до утворення генеративних органів відбувався біосинтез кислот – каннабідіолової (КБДК) та тетрагідроканнабіолової (ТГКК). Утворення каннабідіолу (КБД), тетрагідроканнабіолу (ТГК) і каннабіолу не відмічено.

2. Протягом періоду масової бутонізації до біологічної стиглості насіння кількість визначених кислот поступово збільшувалась, особливо у дрібних листках і оцвітinah. У незначній кількості спостерігалися накопичення КБД, ТГК і КБН. Припускаємо, що з розвитком генеративних органів відбувався або біосинтез КБД, ТГК і КБН, або можливе перетворення визначених кислот в названі сполуки під дією ферментних систем у процесі метаболізму та факторів навколишнього середовища.

3. Порівняння процесів біосинтезу каннабіноїдних сполук в сортах конопель ЮС-9 і ЮСО-29 показало значну різницю між ними. Протягом вегетації так само і у сорту ЮС-9 у ЮСО-29 спостерігалось накопичення каннабідіолової кислоти (КБДК), але тетрагідроканнабінолова кислота визначалась лише у фазі цвітіння у «слідових» кількостях. Інші каннабіноїди, практично, були відсутні. На основі отриманих результатів можемо стверджувати, що направлений відбір (в селекційній роботі) рослин з незначною кількістю ТГК, або з його відсутністю сприяли зниженню вмісту тетрагідроканнабінолової кислоти, а в подальшому й відсутності самого тетрагідроканнабінолу (ТГК).

4. Аналіз сирих рослинних зразків конопель, проведених методом газорідинної хроматографії, показав наявність у зразках лише сполук КБД, ТГК, КБН. Кислоти були відсутні. Вважаємо, що під дією високої температури відбувалася трансформація каннабіноїдних кислот – КБДК і ТГКК. Допускаємо, що, можливо, відбувалися перетворення і інших сполук.

Література

1. Вировец В.Г., Горшкова Л.М., Сенченко Т.И., Сажко М.М. / В.Г. Вировец – М. : Методические указания по селекции конопли на снижения содержания каннабиноидов, 1985. – 14 с.
2. Горшкова Л.М. Каннабіс / Л.М. Горшкова. – Глухів: РВВ ГДПУ, 2008. – 151 с.
3. Лазуревский Г.В. Каннабиноиды / Г.В. Лазуревский, Л.А. Николаева. – Кишинев: Штиинца, 1972. – 68 с.

4. Claussen U. *Naturwissenschaften* / U. Claussen, F. Korte. – 1966. – 53. – 541 c.
5. Claussen U. *Tetrahidron Lettrs* / U. Claussen, F. Korte. – 1967. – 22. – 2067 c.
6. Claussen U. *Justus Liebigs Annals Clem* / U. Claussen, F. Korte. – 1968. – 7. – 162 c.
7. Todd A.R. *Experientia* / A.R. Todd. – 1946. – 2,55.
8. Yamauchi T. Tetrahydrocannabinolic and a Gekuine Substance of Tetrahydrocannabinol / T. Yamauchi, G. Shoyama, H. Amaraki, Asuma and J.Nishsoka. – *Chem.Pharm. Bull. Tokyo*, 1967. – 15. – 1078 c.
9. Yamauchi T. Biosynthesis of Cannabinoid acids / T. Yamauchi, G. Shoyama, Godi Masahiro // *Phytochemistry*. – 1975. – 14. – c. 2189-2192.