

УДК 633.522 : [631.52 + 577.17 + 575.2+543.544]

А.В. Пилипченко, М.М. Орлов, канд. с.-г. наук
Товариство з обмеженою відповідальністю
«Інститут органічного землеробства»
С.В. Шкурдода, В.В. Пасічник, К.П. Король
Черкаський науково-дослідний експертно-криміналістичний
центр МВС України

РЕЗУЛЬТАТИ СЕЛЕКЦІЇ ТЕХНІЧНИХ КОНОПЕЛЬ ЩОДО ЗБІЛЬШЕННЯ ВМІСТУ КАНАБІГЕРОЛУ

Розпочато роботу над створенням сортів технічних конопель з підвищеним вмістом канабігеролу (КБГ). У ході роботи отримано перші обнадійливі результати.

На першому етапі виділялись рослини зі зниженим вмістом ТГК (0,01–0,05 %) та підвищеним вмістом КБД (0,50–1,50 %) й КБГ (0,02–0,70 %) у сорті Золотоніські 1, а в подальшому селекційну роботу продовжено з сортом Глоба.

Протягом перших трьох років селекційний добір у напрямі підвищення вмісту в рослинах конопель КБГ виявився достатньо ефективним.

У селекційному матеріалі встановлено відсутність кореляції між вмістом канабігеролу і тетрагідроканабінолу.

Ключові слова: технічні коноплі, селекція, канабігерол, тетрагідроканабінол, мінливість, кореляція.

Вступ. Коноплі посівні технічні (*Cannabis sativa L.*) як сільськогосподарська культура повертають собі втрачену сировинну нішу в усьому світі. Цьому сприяє значне розширення сфери застосування продукції із конопель. В останні роки підвищився світовий інтерес до використання канабіноїдів у медичній галузі.

У рослинах конопель містяться унікальні, властиві лише їм хімічні сполуки, які називаються канабіноїдами. Канабіноїди — група терпенфенольних сполук, похідних 2-заміщеного 5-амілпрезорцину. У природі трапляються в рослинах родини коноплевих (*Cannabaceae*). Рослинні канабіноїди є С-21 сполуками, що мають споріднену структуру. Суцвіття й листя конопель можуть містити понад 100 різних канабіноїдів [22].

Рослинні канабіноїди, залежно від структури, поділяють на кілька типів (канабігероли, канабіхромени, канабідіоли, тетрагідроканабіноли, канабіноли, канабіельзони, канабіціклоли, канабітріоли) [23]. Серед основних канабіноїдів можна виділити такі: тетрагідроканабінол (ТГК), канабінол (КБН), канабідіол (КБД), канабігерол (КБГ), канабіхромен (КБХ).

У рослині канабіноїди наявності, як правило, у вигляді їхніх

кислотних аналогів, що містять карбоксильну групу в положенні 2-фенольної частини молекули. Попередником усіх рослинних канабіноїдів є канабігеролова кислота, яка під впливом трьох незалежних ферментів класу циклаза перетворюється в канабіхромову, канабідіолову й дельта-9-тетрагідроканабіолову кислоти. Ці кислоти в результаті декарбоксілювання дають вільні канабіноїди — канабіхромен, канабідіол і дельта-9-тетрагідроканабінол відповідно [1-2]. Решта канабіноїдів є продуктами біотрансформації (деградації) основних канабіноїдів.

Психотропний ефект препаратів канабісу є результатом комплексної дії всіх канабіноїдів, хоча лише деякі з них мають психотропну дію в чистому вигляді; до них на належать насамперед дельта-9- і дельта-8-тетрагідроканабінол, що відзначаються основною психотропною дією. Такі канабіноїди, як канабідіол, канабіхромен і канабінол психотропної дії не мають, але здатні вносити деякі доповнення в психотропну дію ТГК. Також характеризуються психотропним ефектом дельта-9-тетрагідроканабіварин і бутиловий аналог дельта-9-тетрагідроканабінолу, знайдені в деяких зразках канабісу.

ТГК, КБН, КБД, КБГ і КБХ мають широку фізіологічну дію на організм людини.

Виражений психотропний ефект має дельта-9-тетрагідроканабінол (ТГК). Він на сьогодні найбільш вивчений і перший серед усіх канабіноїдів, дозволених для використання в медицині [3–8].

Широким спектром терапевтичних властивостей відрізняється КБД. Він не є психотропним канабіноїдом, його досить широко вивчено, і зараз триває його дослідження в медичних цілях [9–14].

Канабігерол конопель, який не відрізняється психоактивними властивостями, за даними енциклопедії гроувінг «Cannapedia», до цього часу залишається найменш відомим та маловивченим канабіноїдом [15].

Учені відкрили канабігерол у 1964 р., виділивши його із гашишу. У 1975 р. віднайшли кислотну форму КБГ – КБГК, яка виявилася першим канабіноїдом, що синтезується рослиною конопель. Пізніше КБГК під дією ферментів трансформується в ТГКК (кислотний прекурсор ТГК), КБДК (кислотний прекурсор КБД) або КБХК (прекурсор КБХ) [1–2]. Таким чином, канабігеролова кислота (КБГК) є первинним прекурсором для усіх відомих канабіноїдів.

Будучи першоосновою для таких канабіноїдів, як ТГК і КБД, канабідіол також характеризується різними лікувальними властивостями, вивчення яких тільки розпочинається, але цілком імовірно, що цей канабіноїд «несе відповідальність» за більшість

лікувальних ефектів канабісу [16]. У 2015 р. вчені встановили, що КБГ має нейропротекторну дію на мишей з хворобою Хантингтона, яка характеризується дегенерацією нервових клітин мозку. КБГ також уповільнює прогресування раку прямої кишки у мишей, і це дає шанс на створення в майбутньому нових методів лікування цієї хвороби. Наукові дані свідчать також і про те, що КБГ є потужним антагоністом альфа-2-адренорецепторів та антагоністом середньої сили рецепторів 5-HT_{1A}, що робить речовину потенційно корисною для лікування депресії, псоріазу, а також обезболювання.

Незважаючи на те, що канабігерол не настільки широко вивчено як КБД, уже зараз можна вказати на його противірусні, протизапальні й антиоксидантні властивості. Дослідники з Італії спостерігали всі вищеназвані ефекти в експериментальній моделі запалювального захворювання кишечника. У ході досліджень канабігерол продемонстрував свою ефективність у терапії глаукоми, розсіяного склерозу і захворювання шкіри. Проте, як вказується на веб-сайті «Технічні коноплі в Україні та інших країнах», сорти з підвищеним вмістом канабігеролу вкрай рідко трапляються на ринку медичних конопель [17]. Відсутні відомості про такі сорти і серед технічних конопель.

Нещодавно польські дослідники проаналізували 12 сортів технічних конопель західноєвропейської та української селекції на вміст КБГ. З'ясували, що лише в одного сорту французької селекції Сантіка 27 (*Santhica 27*) вміст КБГ був на рівні 1,69 % [18]. Сантіка 27 зареєстрований як один із перших французьких сортів з повною відсутністю ТГК. У решти сортів – Феліна 32 (*Felina 32*), Фіброл (*Fibrol*), Комполті Г (*Kompolti H*), Моноїка (*Monoica*), Беніко (*Benico*), Фінола (*Finola*), Федора 17 (*Fedora 17*), Белобжекські (*Bialobrzeskie*), ЮСО-31(*USO-31*) і Футура 75 (*Futura 75*) показник вмісту КБГ був у межах 0,04 – 0,11 %.

Науковці відзначають, що деякі європейські сорти конопель, які відрізняються підвищеним вмістом КБГ, у ході певної генетичної мутації, яка робить їхній «КБД–утворювальний ген» неактивним, починають акумулювати під час цвітіння КБГ-, а не КБД-сполуку. Генетики вважають, що це рецесивний ген конопель, який дозволить отримувати сорти конопель з підвищеним вмістом канабігеролу. Цілком очевидно, що на виведення нових сортів потрібен певний час, але завдяки зусиллям селекціонерів сорти з підвищеним вмістом КБД будуть створені.

Проаналізувавши вищевикладені факти, українські селекціонери розпочали роботу над створенням сортів технічних конопель з підвищеним вмістом канабігеролу (КБГ) і за декілька років роботи отримали перші результати.

Матеріали і методика досліджень. З метою створення нового сорту однодомних конопель з підвищеним вмістом КБГ та прийнятними для сільськогосподарського виробництва господарсько цінними ознаками (підвищений вміст волокна, урожайність соломи та насіння) застосовували метод сімейно-групового добору і направленої перезапилення популяції рослин з контрольованими ознаками.

Дослідження проводили у 2015–2017 рр. на базах Черкаського НДЕКЦ МВС України і Товариства з обмеженою відповідальністю «Інститут органічного землеробства». Об'єкт досліджень – сучасні сорти однодомних конопель Золотоніські 15 і Глоба; методи досліджень за ознаками вмісту канабігеролу і тетрагідроканабінолу – тонкошарова хроматографія на наявність канабіноїдів та фенольних сполук (якісна оцінка) [19, 20] і газова хроматографія з мас-селективним детектуванням (кількісна оцінка), математична статистика.

Дослідження методом хромато-мас-спектрометрії проводилося з метою якісного визначення канабіноїдів у селекційному матеріалі конопель. Для цього від рослин відділяли верхівкові частини, які об'єднували та висушували при температурі 110° С до постійної маси, подрібнювали та просіювали через лабораторне сито (1.1). Відбирали наважки речовини масою по 0,500 г, які заливали по 5,0 см³ етилацетату і проводили екстракцію на ультразвуковій ванні впродовж 25-40 хв. Отримані розчини фільтрували, по 1,0 см³ отриманих розчинів переносили до віал та досліджували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6890N з масселективним детектором Agilent Technologies 5975B за таких умов:

Робочі умови газового хроматографа з маселективним
детектором

Газовий хроматограф	Agilent Technologies модель 6890N
Режим вводу проби	з поділом потоку (Split)
Поділ потоку газу-носія	20:1
Об'єм проби	1 мкл
Температурна програма термостата хроматографа	120 °С, нагрів 8 °С/хв до 280 °С (тримати 5 хв)
Газ-носії	Гелій
Потік газу-носія через колонку	1,2 мл/хв
Подача газу-носія	Постійна
Колонка	J&W, HP-5MS, кат. № 19091S-433
Довжина, діаметр, товщина покриття	30.0 м * 0.251 мм * 0.25 мкм
Маселективний детектор (МСД)	Agilent Technologies модель 5975B inert MSD
Файл налаштування МСД	atune.U
Режим роботи МСД	за повним іонним струмом (SCAN) діапазон сканування 35 – 450 а.о.м.
Затримка для виходу розчинника	3.00 хв
Напруга на помножувачі	Задано налаштуванням atune.U
Температура квадруполя	150 °С
Температура іонного джерела	230 °С
Температура інжектора	250 °С
Температура інтерфейсу	280 °С

По закінченні хроматографічного дослідження проводили аналіз хроматограм за допомогою програмного забезпечення MSD ChemStation D.03.00.611 із використанням мас-спектральної бази даних NIST.

Для визначення відсоткового вмісту тетрагідроканнабінолу (ТГК) та канабігеролу (КБГ) за тих же умов проводили хроматографування розчинів стандартів ТГК та КБГ з відомими концентраціями.

Відсотковий вміст ТГК та КБГ розраховували за формулою 1:

$$W = \frac{c_{ст.}}{c_{д.р.}} \cdot \frac{S_{д.р.}}{S_{ст.}} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

де, W – відсотковий вміст ТГК чи КБГ, %;

$c_{ст.}$ – концентрація розчину стандарту ТГК чи КБГ, мг/см³;

$c_{д.р.}$ – відношення маси досліджуваної речовини до об'єму екстрагента, мг/см³;

$S_{д.р.}$ – площа піку досліджуваної речовини, у.о.;

$S_{ст.}$ – площа піку стандартної речовини, у.о.

Результати досліджень. Нами раніше вказувалось [21], що у конопель сорту Золотоніські 15 були виявлені рослини з пониженим вмістом ТГК (0,01-0,05%) та підвищеним вмістом КБД (0,50-1,50%) й КБГ (0,02-0,70%).

Селекцію на збільшення вмісту в рослинах технічних конопель як КБД, так і канабігеролу, з метою використання продукції в текстильній, машинобудівній, інших галузях промисловості та медичних цілях, провели в умовах суворої просторової ізоляції в полі і теплиці. У табл. 1 представлені перші результати такої роботи.

1. Вплив направленої селекції на вміст канабігеролу в селекційному матеріалі сорту технічних конопель Глоба

Назва селекційного матеріалу	Середній вміст КБГ, %		
	2015 р.	2016 р.	2017 р.
Популяція	0,032	0,48	0,94
Кращі сім'ї	0,10 – 0,38	0,64-0,85	1,17 - 1,67

За перші три роки направлений селекційний добір у напрямку підвищення вмісту в рослинах конопель КБГ виявився досить ефективним. У середньому в популяції і в кращих селекційних сім'ях спостерігалось щорічне зростання вмісту КБГ майже у два рази.

Зростання вмісту канабігеролу відбулося за рахунок збільшення в популяції конопель сорту Глоба кількості рослин з підвищеним вмістом цієї сполуки. Селекція спонукала суттєву зміну структури популяції за вмістом рослин з підвищеним і пониженим вмістом канабігеролу (табл. 2).

2. Зміна структури популяції конопель сорту Глоба за вмістом КБГ під впливом селекційного добору

Рік	Співвідношення рослин з вмістом КБГ, %					
	0-0,09	0,1 – 1,0	1,1 – 2,0	2,1 – 3,0	3,1 – 4,0	4,1 – 5,0
2015	57,2	42,8	-	-	-	-
2016	36,2	42,2	18,1	3,6	-	-
2017	17,2	38,5	30,3	12,3	1,7	-

Популяція сорту Глоба змінилася за рахунок збільшення кількості рослин з підвищеним вмістом КБГ. Якщо у 2015 р. популяцію сорту Глоба складали дві групи рослин з вмістом канабігеролу від нуля до 1 %, у 2016 – з чотирьох груп від нуля до 3 %, то вже у 2017 р. – з п'яти груп і вмістом КБГ від нуля до 4 %. У популяції кращих

селекційних сімей у 2017 р. уже не було рослин з повною відсутністю і низьким – до 0,09 % вмістом КБГ (табл. 3).

3. Зміна структури популяції у кращих сім'ях конопель сорту Глоба за вмістом КБГ під впливом селекційного добору, 2017 р.

№ сім'ї	Співвідношення рослин з вмістом КБГ, %					
	0 - 0,09	0,1 – 1,0	1,1 – 2,0	2,1 – 3,0	3,1 – 4,0	4,1 – 5,0
6	0	9,0	63,7	27,3	-	-
3	0	42,8	28,5	14,3	14,3	-

Селекція технічних конопель передбачає суворий контроль за вмістом у рослинах тетрагідроканабінолу. В Україні для вирощування технічних конопель без охорони посіву дозволяється використовувати сорти з вмістом ТГК у рослинах не більше 0,08 %, за умови охорони – не більше 0,15 %. До цього ми констатували [21], що між вмістом КБД і ТГК у рослинах конопель існує прямий кореляційний зв'язок. Селекція на збільшення КБД супроводжується зростанням ТГК.

Вихідний матеріал, який нами залучено до селекції на збільшення вмісту в рослинах конопель КБГ, характеризується великою прямою залежністю між вмістом ТГК і КБД, за ознакою яка покращується – між вмістом КБД і вмістом ТГК, зворотний кореляційний зв'язок великий і знаходиться на рівні - 0,59 ± 0,22; - 0,73 ± 0,14. Збільшення вмісту в рослинах конопель канабігеролу не супроводжувалось зростанням вмісту ТГК. Переконливим свідченням цьому дані табл. 4.

4. Вміст канабігеролу і тетрагідроканабінолу в кращих селекційних сім'ях сорту Глоба

Селекційний матеріал		Вміст, %	
№ сім'ї	№ рослини	КБГ	ТГК
2016 р.			
2	818	2,37	0,00
2	894	0,34	0,08
1	429	0,34	0,04
4	2441	1,24	0,00
2017 р.			
3	75	3,87	0,02
7	185	3,86	0,02
1	27	2,75	0,01
6	151	2,48	0,01

Висновки. Селекція конопель сорту Глоба на збільшення вмісту канабігеролу виявилась достатньо ефективною. За три роки в рослинах

конопель у порівнянні з вихідним матеріалом вдалось збільшити вміст КБГ майже у три рази.

Зростання вмісту канабігеролу відбулося за рахунок збільшення в популяції конопель сорту Глоба як кількості рослин з підвищеним вмістом цієї сполуки, так і за рахунок кількісного зростання канабігеролу в рослинах.

У нового селекційного матеріалу встановлено відсутність кореляції між ознаками вмісту в рослинах КБГ і ТГК.

Отримані результати вказують на наявність передумов для створення нового сорту з відсутністю наркотичних властивостей і підвищеним вмістом канабігеролу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Справочник химика [3-е изд., испр.] / глав. ред. Б. Н. Никольский. – Ленинград: Химия, 1971. – Т.2: Основные свойства неорганических и органических соединений. – С. 708–709.
2. Лазурьевский Г.В., Николаева Л.А. Каннабиноиды (наркотические вещества конопли). – Кишинев: Штиница, 1972. – 67 с.
3. Fulton C.C. A chemical development of Cannabis sativa L./ C.C. Fulton// Industr. and Chem.Analyt. Ed. -1942. -№ 14. – P. 404-406.
4. Fettermann R.S., Turner J.C. Constituents of Cannabis sativa L. I./1 propel. Homologue of Cannabinoids from an Indian variantant /R.S. Fettermann, J.C.Turner// J.Pharm.Sci. -1972. -№ 61/9a. – P. 1476-1478.
5. Lanyon V.S. Quantitative analysis of cannabinoids in the secretory product from capitates-stalked grands of Cannabis sativa L.(Cannabaceae)/ V.S. Lanyon , J.C. Turner, P.G. Vahlberrg // Bot. Gaz. -1981. –Vol.142, -№ 3a. – P. 316-319.
6. Dajani E.Z. Sativex / E.Z. Dajani, K.R.Larsen,J.Taylor et al.// J. Pharm. Exp. Ther. – 1999. - № 291. – P. 31-38.
8. Morgan D.R. Therapeutic uses of Cannabis // Harwood Academic Publishers. –Amsterdam. -1997. -267 p.
9. 2. Ferenczy L. An antibacterial prepartum from hemp (Cannabis sativa L.) / L. Ferenczy, L. Gracza, I. Jakobey // Naturwissenschaften – 1958. – № 45. – P. 188.
10. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition / C. Leizer, D. Ribnicky, A. Poulev [et al.] // Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods. – 2000. – № 2 (4). – P. 35–53.
11. Formukong E. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of constituents of Cannabis sativa L. / E. A. Formukong, A. T. Evans, F. J. Evans // Inflammation. – 1988. – № 12 (4). – P. 361–371.
12. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug / A. W. Zuardi, J. A. S. Crippa, J. E. C. Hallak [et al.] // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2006. – № 39. – P. 421–429.
13. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic

potential of cannabidiol in psychiatric disorders / Alline Cristina Campos, Fabricio Araújo Moreira, Felipe Villela Gomes, Elaine Aparecida Del Bel, Francisco Silveira Guimarães, Philos Trans R Soc Lond B // Biol Sci. 2012 December 5; 367(1607): 3364–3378.

14. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia / F M Leweke, D Piomelli, F Pahlisch, D Muhl, C W Gerth, C Hoyer, J Klosterkötter, M Hellmich, D Koethe // Transl Psychiatry. 2012 March; 2(3): e94. Published online 2012 March 20.

15. Cannapedia. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://olkpeace.org/cannapedia/Kannabinoidy/KBG.html>

16. What is Cannabigerol (CBG)? High Times. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.hightimes.com/read/grow-hack-what-cannabigerol-cbd>.

17. Веб-сайт – «Техническая конопля в Украине и других странах» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: tru.org.ua/nems/4013.

18. Грабовські Лідія. Вміст канабігеролу в сортах конопель західноєвропейської української селекції // Доповідь на міжнародній конференції «Cannabis». – Варшава, 2017.

19. Давидюк П.П., Вартузов В.В., Посільський О.О., Замошець О.П., Кахановський Ф.М., Стельмахович С.І., Мелешко Р.А. Міжвідомча методика дослідження наркотичних засобів з рослин конопель та маку снотворного: Метод. посіб. – Київ, 2009.

20. Стандартна операційна процедура SOP.DSE.19/124/2-5.4-4.02 «Якісне та кількісне дослідження наркотичних засобів, психотропних речовин, їх аналогів та прекурсорів методом газової хромато-мас-спектрометрії» ВДМРВ Черкаського НДЕКЦ МВС України.

21. Шкурдода С.В., Пасічник В.В., Орлов М.М., Пісковий М.Б. Селекція конопель для створення сортів з підвищеним вмістом канабідіолу // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. – 2'15. Серія «Рослинництво, селекція, насінництво, плодовоовочівництво і зберігання». – Харків, 2015. – Вип.2. – С.210–220.

22. Aizpurua-Olaizola O. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes / O. Aizpurua-Olaizola, U. Soydaner, E. Öztürk, D.Schibano, Y. Simsir, P. Navarro, N. Etxebarria, A. Usobiaga // Journal of Natural Products. – 1964. – V.79, N 2. – P. 324–331.

23. Pertwee R.G. Pharmacological and therapeutic targets for Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol / R.G. Pertwee // Euphytica. – 2004. – V.140, N 1-2. – P. 73–82.

Стаття надійшла до редакції 03.04.2018 р.