

ДО МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАНАБІНОЇДІВ У РОСЛИНАХ КОНОПЕЛЬ

Мигаль М.Д., доктор біологічних наук, професор

Кмець І.Л., кандидат сільськогосподарських наук

Лайко І.М., доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник

ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР ІСГПС НААН

Показано, що з усіх органів рослин конопель найбільше накопичується канабіноїдів у залозах оцвітини жіночих квіток. Ця особливість використана для розробки нової методики оцінки рослин за вмістом канабіноїдів. Установлено, що даний спосіб дає більш точні й об'єктивні результати порівняно з існуючою методикою і прийнятний насамперед для теоретичних досліджень та аналізу невеликої кількості рослин. Для масового аналізу рослин кращою є існуюча методика визначення вмісту канабіноїдів у суміші дрібних листочків суцвіття й оцвітини жіночих квіток, що забезпечує вищу пропускну здатність проведення аналізів.

Специфічною біологічною особливістю конопель є вміст канабіноїдів (наркотичних речовин), що дає привід наркоманам використовувати цю рослину в своїх цілях. До боротьби з наркоманією залучено не лише судово-правові органи, але й наука, покликана створювати ненаркотичні сорти конопель. Науковцями Дослідної станції луб'яних культур одержано цілий ряд ненаркотичних сортів, серед яких особливо виділяється Вікторія, що характеризується повною відсутністю основних канабіноїдних сполук: канабідіолу (КБД), тетрагідроканабінолу (ТГК) і канабінолу (КБН) [1]. Проте ознака наркотичності конопель потребує постійного підтримання в потомстві методом виявлення і бракування рослин, які містять канабіноїди. У зв'язку з цим виникає необхідність пошуку більш ефективних способів визначення вмісту наркотичних речовин у рослинах конопель.

Установлено, що у вегетативних і генеративних органах конопель синтезується неоднакова кількість наркотичних речовин [2 – 5]. Зокрема методом тонкошарової хроматографії виявлено, що в однодомних конопель вміст суми КБД, ТГК і КБН змінюється залежно від органу рослин таким чином (в балах): корінець і гіпокотиль – 0, листки нижньої частини технічної довжини стебла – 6,49, листки середньої частини технічної довжини стебла – 4,83, листки верхньої частини технічної довжини стебла – 5,90, крупні листки суцвіття – 9,20, середні за розміром листки суцвіття – 12,75, дрібні листочки суцвіття – 25,70, оцвітина

жіночих квіток – 36,56, маточка жіночих квіток, оболонки насінин і зародок насіння – 0 балів [4].

Сучасна методика оцінки селекційного матеріалу конопель за ознакою вмісту канабіноїдів, основана на використанні суміші дрібних листочків суцвіття й оцвітини жіночих квіток [5]. У своїх дослідженнях ми ставили задачу порівняти результати аналізів, одержаних у результаті окремого використання дрібних листочків суцвіття, оцвітини жіночих квіток і суміші дрібних листочків та оцвітини.

Мета досліджень – пошук способу аналізу рослин конопель, що дав би більш точні й об'єктивні дані задля підвищення ефективності досліджень у селекції на ненаркотичність сортів.

Методика досліджень. Свідомо підібрані за високим вмістом канабіноїдів сорти конопель Єрмаківські місцеві, Глухівські 10, ЮС-9 (дводомні), ЮСО-1, ЮСО-16, і ЮСО-45 (одноромні) вирощували в оціночному розсаднику при густоті рослин 60 x 10 см. У фазі стиглості конопель по кожному сорту для визначення вмісту канабіноїдів щорічно добирали по 15 рослин. Більш детальні методичні елементи подані при порівнянні різних способів підготовки матеріалу до аналізу і визначення в ньому вмісту канабіноїдів.

Дослідження проводили в 2009–2010 рр.

Результати досліджень. Результати окремого визначення вмісту канабіноїдів у трьох об'єктів дослідження рослин конопель показують наступні особливості (див. табл.). Одержані нами експериментальні дані переконливо свідчать про значну різницю між варіантами досліду в усіх 6 сортах. Якщо прийняти за контроль оцвітину жіночих квіток, то вміст канабіноїдів КБД, ТГК і КБН порівняно з контролем у дрібних листочків суцвіття і суміші листочків та оцвітини нижчий, але не на однаковому рівні. У середньому усіх сортів вміст КБД в оцвітині складає 8,0, тоді як у листочків – 4,4, а в суміші – 6,3 бала. По ТГК відповідно 15,6; 7,3 та 10,9, по КБН – 15,8; 5,2 та 10,2 бала. У цілому дослідження показують, що різниця між оцвітиную і листочками значно більша ($P < 0,001$), ніж між оцвітиную і сумішшю ($P < 0,05$ і $P < 0,01$). Це результат того, що листочки аналізують в чистому вигляді, а суміш складається з листочків та оцвітини. Останній компонент суміші (оцвітину) – це те саме, що й контроль, тобто з високим вмістом канабіноїдів, що й скорочує різницю.

Таблиця – Зміна вмісту канабіноїдів у залежності від використання досліджуваного матеріалу рослин конопель (середнє за 2009–2010 рр.)

Об'єкт дослідження	Вміст канабіноїдів					
	КБД		ТГК		КБН	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$, бали	V, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$, бали	V, %	$\bar{x} \pm S\bar{x}$, бали	V, %
Сорт Ермаківські місцеві						
Дрібні листочки	5,5±0,34***	20,3	10,4±1,25**	50,6	7,6±0,79***	34,3
Оцвітину	9,2±0,25	27,0	18,9±2,00	35,5	19,8±1,90	32,5
Їх суміш	8,1±0,64	26,2	17,0±2,00	38,0	11,1±1,10**	32,7
Приріст (%)*	67,3 ; 13,6		81,7 ; 11,2		160,5 ; 78,4	
Сорт Глухівські 10						
Дрібні листочки	4,9±0,36***	28,9	6,0±0,41***	24,5	4,7±0,50***	39,4
Оцвітину	8,7±0,42	18,8	15,7±1,20	30,1	16,3±1,00	24,5
Їх суміш	6,0±0,24***	15,4	8,5±0,39***	17,6	8,7±0,37***	16,7
Приріст (%)	77,6 ; 45,0		161,7 ; 84,7		246,8 ; 87,4	
Сорт ЮС-9						
Дрібні листочки	4,3±0,43***	39,1	7,6±1,50***	76,5	4,7±0,87***	69,3
Оцвітину	8,6±0,65	29,1	17,7±1,53	33,6	16,1±1,68	40,4
Їх суміш	6,5±0,53*	31,6	13,0±1,07*	31,8	9,3±0,23**	9,6
Приріст (%)	100,0 ; 32,3		132,9 ; 36,2		242,6 ; 73,1	
Сорт ЮСО-1						
Дрібні листочки	4,1±0,23***	21,7	5,2±0,49***	36,5	2,8±0,38***	52,6
Оцвітину	8,3±0,58	22,1	15,5±1,35	33,8	15,5±1,49	37,1
Їх суміш	6,0±0,17**	10,9	10,1±0,41**	15,7	11,5±1,47	35,1
Приріст (%)	102,4 ; 38,3		198,1 ; 53,5		453,6 ; 34,8	
Сорт ЮСО-45						
Дрібні листочки	4,0±0,35***	34,1	8,6±2,06	93,0	5,6±1,00**	68,5
Оцвітину	6,3±0,30	18,6	12,1±1,59	50,7	12,3±1,33	42,2
Їх суміш	5,9±0,37	24,2	10,7±1,64	46,3	10,3±1,08	21,6
Приріст (%)	57,5 ; 6,8		40,7 ; 13,1		119,6 ; 19,4	
Сорт ЮСО-16						
Дрібні листочки	3,4±0,61*	68,8	6,1±0,72***	38,8	5,5±0,74***	44,4
Оцвітину	7,0±1,25	69,0	13,7±1,63	39,4	15,0±1,60	33,5
Їх суміш	5,2±0,66	49,4	5,8±1,04***	69,2	10,8±1,53	54,7
Приріст (%)	105,9 ; 34,6		124,6 ; 136,2		172,7 ; 38,9	
Середнє						
Дрібні листочки	4,4±0,39***	35,5	7,3±1,07***	53,3	5,2±0,71***	51,4
Оцвітину	8,0±0,58	30,8	15,6±1,55	37,2	15,8±1,50	35,0
Їх суміш	6,3±0,44**	26,3	10,9±1,09*	36,4	10,2±0,96***	28,4
Приріст (%)	81,8 ; 27,0		113,7 ; 43,1		203,8 ; 54,9	

Примітки:

*1. Ступінь достовірності визначений для дрібних листочків та суміші дрібних листочків і оцвітину порівняно з оцвітиную: * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.*

*2. * Приріст: перша цифра – приріст вмісту канабіноїдів відносно дрібних листочків, друга цифра – приріст вмісту канабіноїдів відносно суміші.*

Установлені закономірності чітко простежуються при графічному зображенні їх (рис. 1 і 2): найбільше наркотичних речовин накопичується в оцвітині, найменше в листочках, а суміш займає проміжне положення. Співвідношення канабіноїдів у межах одного об'єкта дослідження відрізняється тим, що у дрібних листочках вищим вмістом виділяється ТГК, порівняно з КБД і КБН, тоді як в оцвітині та суміші КБД також значно менше, а ТГК і КБН приблизно однакова кількість.

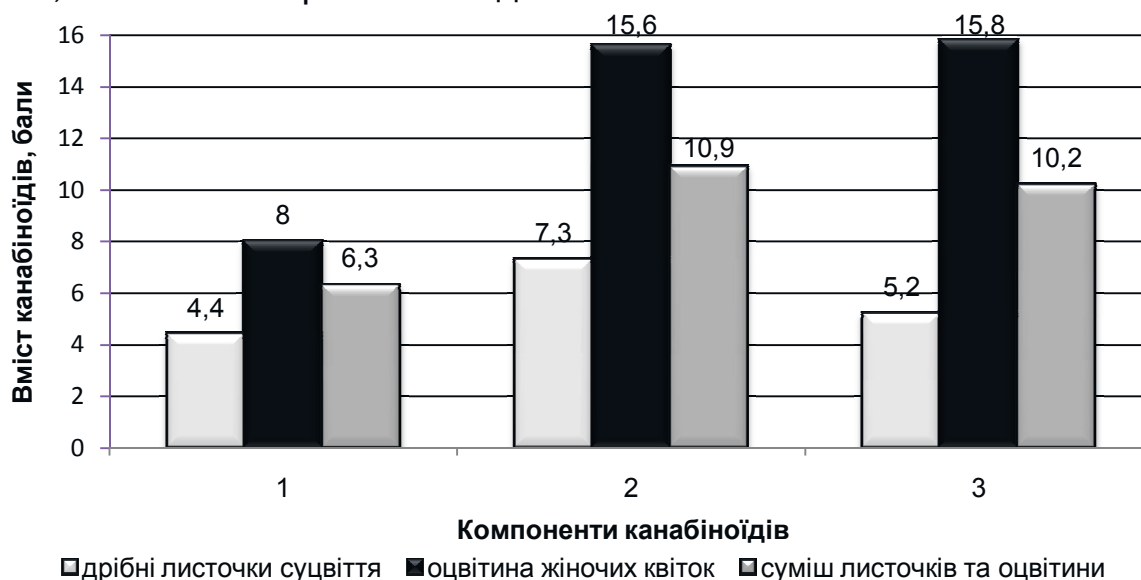


Рис. 1 – Зміна вмісту окремо взятого компонента канабіноїдів рослин конопель в різних об'єктах дослідження:

1 – КБД; 2 – ТГК; 3 – КБН

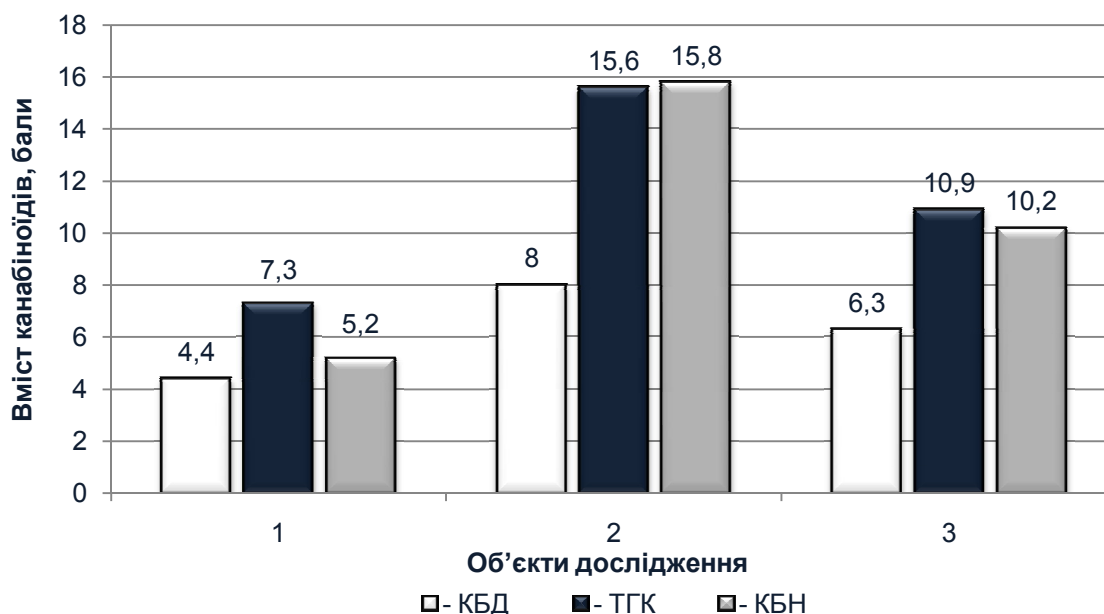


Рис. 2 – Зміна співвідношення канабіноїдів рослин конопель у залежності від об'єкта дослідження:

1 – дрібні листочки суцвіття; 2 – оцвітина жіночих квіток; 3 – суміш листочків та оцвітини

Крім достовірності різниці між варіантами досліду, вираженої критерієм Р, на суттєві розходження вказують також параметри приросту вмісту канабіноїдів, виражених у процентах. У середньому КБД в оцвітині більше на 27,0–81,8, ТГК – на 43,1–113,7 і КБН – на 54,9–203,8 %. Найменші розходження спостерігаються по КБД, а найбільші – по КБН. Отже, наведені показники приросту яскраво підтверджують тезу про те, що різниця між оцвітиною і листочками істотно вища, ніж між оцвітиною та сумішшю.

У розрізі сортів конопель простежуються ще більш значні відмінності. За вмістом КБД приріст між оцвітиною і дрібними листочками суцвіття варіює від 57,5 до 105,9 %, а між оцвітиною і сумішшю – від 6,8 до 45,0 %. За вмістом ТГК відповідно 40,7 і 198,1 та 11,2 і 136,2 %, за вмістом КБН 119,6 і 453,6 та 19,4 і 87,4 %. Найвищими показниками виділяється сорт Глухівські 10, у якого всі різниці достовірні на рівні $P < 0,001$. Найменш помітні розходження у сорту ЮСО-45. Це єдиний сорт, у котрого в одному випадку недостовірною різниця відмічена навіть між оцвітиною і дрібними листочками (приріст складає всього 13,1 %).

Слід відмітити, що на величину ступеня достовірності різниці впливають два фактори. Перший – неоднакова частка оцвітини в суміші: більше оцвітини – менша різниця, менший ступінь достовірності, і навпаки. Безпосередньо самі оцвітини також неоднакові. У одних рослин вони дрібні, слаборозвинені, у інших – крупні з чітко вираженими ознаками структурної будови їх і залозистих волосків. Другий фактор – високі показники мінливості ознак. Коефіцієнт варіації показників вмісту КБД коливається в межах 10,9–69,0, ТГК – 15,7–93,0 і КБН – 9,6–69,3 %. Найбільш мінливою виявилася ознака вмісту ТГК.

Таким чином, одержаний нами експериментальний матеріал дає підстави зробити висновок про те, що у сортів конопель вміст канабіноїдів далеко неоднаковий у залежності від досліджуваних органів рослин: найменше їх міститься в дрібних листочках суцвіття, найбільше – в оцвітині жіночих квіток, а в суміші листочків та оцвітини – посередня кількість, яка, однак, більш наближена до оцвітини. Установлені закономірності мають не лише наукове, але й важливе практичне значення, пов'язане з оцінкою експериментального матеріалу за вмістом наркотичних речовин. Однозначно найоб'єктивніші дані можна отримати за результатом аналізу оцвітин жіночих квіток, на яких сконцентрована найбільша кількість залозистих волосків.

Виходячи з одержаних даних, нами розроблено методику визначення вмісту наркотичних речовин окремо в оцвітині з метою порівняння її із сучасною методикою використання суміші листочків й оцвітини.

Аналіз суміші дрібних листочків суцвіття й оцвітини жіночих квіток. З метою проведення аналізу з використанням суміші дрібних листочків та оцвітини у фазі стиглості конопель зрізують рослину,

відрізають верхівку суцвіття, попередньо обривають на ній крупні листки, поміщають у відкритий паперовий пакет і висушують на відкритому провітрюваному місці без доступу прямих сонячних променів. Рослина й пакет реєструються в польовому журналі під одним номером. При підготовці до аналізу на сухому суцвітті остаточно обривають крупні та середні листки, потім пальцями рук обламують дрібні листочки та оцвітину. Суміш протирають пористою гумкою в металевому ситі з отворами 0,5 мм, просіваючи дрібну масу через сито на папір і висипають її в той пакет, у якому знаходилася до цього верхівка суцвіття. Пакет закривають. Для аналізу беруть наважку просіяної маси в кількості 0,1 г, поміщають її у скляний флакон і витримують у сушильній шафі 30 хв. при температурі 120⁰С, після чого масу розтирають скляною паличкою на дрібні часточки. Далі аналіз зразка на вміст канабіноїдів проводять за загальноприйнятою методикою тонкошарової хроматографії [6, 7].

Аналіз оцвітини жіночих квіток. Оцінка рослин за вмістом канабіноїдів з використанням оцвітини відрізняється за такими прийомами підготовки матеріалу до аналізу. У фазі стиглості конопель у рослини зрізують більшу частину суцвіття, ніж у попередньому варіанті, обривають або обрізають ножицями крупні листки, поміщають у відкритий паперовий пакет і висушують. З висушеного суцвіття з допомогою пінцета відбирають оцвітину жіночих квіток у невеликий паперовий пакет (бажано виготовленим з пергаменту). Для наважки 0,1 г потрібно відібрати 50–70 оцвітин у залежності від їх розміру. Наважку сухих оцвітин у скляному флаконі прогривають у сушильній шафі 30 хв. при температурі 120⁰С і розтирають скляною паличкою. Оцвітину розтирається довше, ніж просіяна маса суміші дрібних листочків і оцвітини. Після кожного зразка скляну паличку витирають тканиною. Далі аналіз матеріалу проводять за загальноприйнятою методикою тонкошарової хроматографії [6, 7].

Перевага використання окремо взятої оцвітини жіночих квіток порівняно із сумішшю дрібних листочків та оцвітини полягає в одержанні однорідного матеріалу в межах зразка як за об'єктом дослідження, так і за максимальним вмістом канабіноїдів у порівнянні з усіма іншими вегетативними і генеративними органами рослини. У склад суміші дрібних листочків та оцвітини, навпаки, входять компоненти різних органів рослини з різним співвідношенням їх і неоднаковим вмістом канабіноїдів. Тому порівняння зразків не може бути об'єктивним на високому рівні. Більша частка дрібних листочків у зразку – менше канабіноїдів, і навпаки.

Проте є й мінусові моменти. Для використання оцвітини потрібно зрізувати більшу частину суцвіття рослини, ніж для приготування суміші дрібних листочків та оцвітини. Щоправда, після відбору оцвітини насіння, що залишається, при потребі можна зібрати окремо й використовувати

за призначенням. Продуктивність роботи з підготовки матеріалу нижча. За робочий день лаборант може приготувати 90–100 зразків суміші, тоді як оцвітини – 35–40 зразків. Однак кінцевий результат компенсується об'єктивною оцінкою зразків, що надважливо для експериментатора. Це особливо важливо при селекції сортів конопель з повною відсутністю канабіноїдів.

Таким чином, для оцінки елітних рослин метод використання окремо дрібних листочків суцвіття взагалі неприйнятний, бо він виявляє значно занижені показники вмісту канабіноїдів. Для масових аналізів найбільш прийнятним є спосіб оцінки елітних рослин за сумішшю дрібних листочків і оцвітини. У теоретичних дослідженнях або в експериментах із залученням невеликої кількості рослин найкращим є метод використання оцвітини жіночих квіток, що дає найбільш точні й об'єктивні дані щодо визначення канабіноїдів.

Висновки

1. У межах однієї рослини найвищий вміст канабіноїдів накопичується в оцвітинах жіночих квіток, тобто там, де формується найбільша густина добре розвинених залозистих волосків.

2. Існуючий метод визначення вмісту канабіноїдів в рослинах конопель оснований на використанні суміші дрібних листочків суцвіття і оцвітини жіночих квіток. Він характеризується значною пропускнуою здатністю проведення аналізів елітних рослин і є незамінним в селекції ненаркотичних сортів конопель.

3. Метод визначення вмісту канабіноїдів у оцвітині жіночих квіток, порівняно з існуючим методом, більш трудомісткий, характеризується нижчим рівнем пропускнуої здатності аналізів, проте дає більш точні й об'єктивні дані. Рекомендується для застосування в теоретичних дослідженнях і при аналізах невеликої кількості рослин селекційних зразків.

1. *Селекція* / В. Г. Вировець, І. М. Лайко, М. М. Орлов [та ін.] // Коноплі. — Суми : Видавничий будинок «Еллада», 2011. — С. 78—132.

2. *Горшкова Л. М.* Каннабіс / Л. М. Горшкова. — Глухів : Глух. держ. пед. ун-т, 2008. — Ч. II. — 151 с.

3. *Горшкова Л. М.* Накопичення канабіноїдних сполук у генеративних органах конопель / Л. М. Горшкова // Зб. наук. праць Інституту луб'яних культур УААН. — Суми, 2009. — Вип. 5. — С. 57—63.

4. *Мигаль М. Д.* Динаміка зміни вмісту канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах конопель / М. Д. Мигаль, І. Л. Шульга // Луб'яні та технічні культури : зб. наук. праць. — Суми, 2012. — Вип. 2 (7). — С. 70—80.

5. *Мигаль М. Д.* Порівняльні дослідження дрібних листочків суцвіття та оцвітини жіночих квіток конопель за вмістом канабіноїдів // М. Д. Мигаль, І. Л. Шульга // Вісник Львівського національного аграрного університету : агрономія. — Львів, 2011. — №15 (1). — С. 203—210.

6. *Вировец В. Г.* Методические указания по качественной оценке конопли на содержание каннабиноидов, получению тетраплоидных форм и использованию этрела / В. Г. Вировец, Л. М. Горшкова, М. М. Сажко. — М. : ВАСХНИЛ, 1985. — С. 1—9.

7. *Методические* указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов / В. Г. Вировец, Л. М. Горшкова, М. М. Сажко [и др.]. — М., 1985. — 14 с.

К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАННАБИНОИДОВ В РАСТЕНИЯХ КОНОПЛИ

Мигаль Н.Д., Кмец И.Л., Лайко И.М.

Показано, что среди всех органов растений конопли наиболее накапливается каннабиноидов в железах околоцветника женских цветов. Эта особенность использована для разработки новой методики оценки растений на содержание каннабиноидов. Установлено, что данный способ обеспечивает более точные и объективные результаты по сравнению с существующей методикой и принят, прежде всего, для теоретических исследований и анализа небольшого количества растений. Для массового анализа растений более эффективной является существующая методика определения содержания каннабиноидов в смеси мелких листочков соцветия и околоцветника женских цветов, что обеспечивает более высокую пропускную способность проведения анализов.

TO THE METHOD OF DETERMINATION OF CANNABINOIDS CONTENT IN HEMP PLANTS

Myhal M.D., Kmets I.L., Laiko I.M.

It is revealed that among all organs of hemp plants cannabinoids mostly accumulates in the glands of perianth of pistillate flowers. This feature is used for development of new method of plants estimation on cannabinoids content. It is set that this method provides more exact and objective results as compared to an existent method and accepted foremost for theoretical researches and analysis of small quantity of plants. For the mass analysis of plants more effective is an existent method of determination of cannabinoids content in mixture of shallow leaves of inflorescence and perianth of pistillate flowers, that provides higher carrying capacity of analyses.