

РАХМЕТОВ Д.Б.¹, ПОЛЯКОВА А.С.²

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України,
Україна, 01014, м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1, e-mail: jatal_r@bigmir.net

² Глухівський національний педагогічний університет імені Олександра Довженка,
Україна, 41400, м. Глухів, Сумська обл., вул. Києво-Московська, 24, e-mail: kafbiol@mail.ru

✉ kafbiol@mail.ru, (099) 790-50-08

ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНИХ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК *CANNABIS SATIVA* L. ЗА ЗНАЧЕННЯМ R_F МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Феномен «гашишу» привертає увагу багатьох спеціалістів у галузі біології, хімії, медицини, фармакології, судово-медичної експертизи та ін. Хімія гашишу охоплює природні феноли – канабіноїди.

Сучасними дослідженнями виявлена значна кількість індивідуальних канабіноїдних сполук, зокрема таких, як нейтральні речовини – канабідіол (КБД), тетрагідроканабінол (ТГК) і канабінол (КБН) та кислоти – канабідіолова (КБДК), тетрагідроканабіолова (ТГКК) та інші. Schultz et al. [1] довели, що у всіх досліджуваних сортах конопель траплялися, насамперед, як один із компонентів – канабідіолова кислота (КБДК). Отримані результати дозволили авторам припускати, що канабідіолова кислота є основною сполукою феноловмісних речовин.

Р. Mechoulam [2] зауважував, що канабідіолова кислота у природі має перевагу над іншими канабіноїдами. У коноплях, які вирощувалися на волокно, очевидно, це основна складова канабіноїдних речовин.

У наших дослідженнях визначення нейтральних канабіноїдних сполук – КБД, ТГК і КБН, проведених методом ТШХ, відбувалося за допомогою «свідків», які наносилися на хроматографічні пластини поряд із зразками. Відсутність «свідків» для визначення кислот спонукає знаходити інші шляхи їх розпізнання. У зв'язку з цим у цій роботі має сенс розглянути метод ТШХ як один з основних технічних засобів визначення кислот за значенням R_f.

Матеріали і методи

Роботу виконували на базі Інституту луб'яних культур НААН України упродовж 2015–2016 рр. Для проведення біологічних досліджень використовували зразки з однодомних сортів конопель: ЮСО 31, Гляна, Вікторія, Гле-

сія, Глухівські 46, Глухівські 51, Золотоніські 15 та зарубіжних сортів, які були отримані з Франції, – Федора 17, Феліна 32 і Футура 77. Названі сорти відрізнялися за морфологічними, біолого-генетичними, господарсько-цінними ознаками та за вмістом канабіноїдних речовин.

Із метою визначення канабіноїдних сполук методом ТШХ відбиралися зразки (листки, оцвітину та суцвіття) з кожної рослини, які попередньо були проетиковані. Хроматографічному аналізу підлягали як «сирі», так і висушені у затінку зразки [3]. Нейтральні канабіноїди – КБД, ТГК і КБН визначалися за «свідками», які наносилися на кожну хроматографічну пластину. Кислоти визначалися за значенням R_f [4].

Результати та обговорення

Розглядаючи сорти, які були використані для експериментальної роботи, варто зазначити, що генофонд постійно поповнювався сортами нового покоління, які розрізнялися незначним вмістом канабіноїдних сполук, особливо психотоміметичного ТГК. Використання південних сортів як «донорів» у 60–70 рр. призвело до збільшення тетрагідроканабінолів у нових сортах конопель. Ураховуючи генетичну наявність тетрагідроканабінолів у майбутньому має значення визначення кислот – КБДК, ТГКК, які під дією окремих факторів або при зберіганні і переходять у відповідні нейтральні сполуки: КБД, ТГК та КБН. U. Claussen und F. Korte [5] зауважували, що тетрагідроканабіноли характеризуються лабільністю та змінною активністю. Р. Mechoulam [2] підкреслював, що канабіноїдні кислоти психотоміметично не активні, але при нагріванні швидко переходять з одного стану в інший. Ці процеси важливі, оскільки при палінні неактивні кислоти ТГК (А і В) дають активні Δ¹-ТГК. Це одна із причин, яка характеризує

більш високу активність марихуани при палінні, ніж при вживанні всередину.

R. Mechoulam [2] вважає спірним питання утворення нейтральних канабіноїдів, біосинтез яких відбувався лише природним шляхом. Можливо, вони є продуктами, які утворилися у результаті декарбоксілювання відповідних канабіноїдних кислот.

Результатами досліджень Л.М. Горшковой [6] доведено, що під впливом різних температур – 20–25⁰С та 120⁰С на зразки конопель відбувалися кількісні та якісні зміни канабіноїдних сполук. Із підвищенням температури зменшувалася кількість кислот і підвищувався вміст нейтральних канабіноїдів. Чим меншою була кількість кислот КБДК та ТГКК, які містилися у зразках певного сорту, тим менше було ідентифіковано нейтральних канабіноїдів – КБД, ТГК, КБН та особливо ТГК і КБН. Можна констатувати, що визначення наявності кислот має велике значення для загальної характеристики канабіноїдних сполук.

Вирішення такого питання є важливим для виведення сортів конопель, які не містять ТГК і, навпаки, з високим вмістом КБД та відсутністю ТГК, що дає підставу для всебічного поглибленого вивчення цих речовин.

Багаточисельні хроматографічні аналізи на визначення індивідуальних канабіноїдних речовин у рослинних зразках однодомних сортів конопель показали, що у період вегетативного росту і розвитку (формування трьох пар лис-

тків) у визначених сортів конопель синтезувалася лише одна «невідомо» речовина канабіноїдного походження, яка була розташована на хроматограмах безпосередньо за лінією «старту», за фронтом руху фази. У французького сорту Футура 77, поряд із першою «невідомою» X-1 речовиною, була розташована інша, також «невідомо» X-2 речовина. Біосинтез інших канабіноїдних сполук у цей період, у тому числі КБД, ТГК і КБН, не відбувався (табл. 1).

Таким чином, результати хроматографічного аналізу «сирих» зразків засвідчили, що у фазу формування трьох пар листків були синтезовані лише «невідомі» речовини X-1 і X-2. Біосинтез нейтральних канабіноїдних сполук не відбувався, у тому числі і у французьких сортів, які вважаються сортами зі значним умістом цих речовин.

Значення Rf, колір та порядок розміщення канабіноїдних «плям» на хроматограмах наведені у таблиці 2.

Аналіз отриманих результатів показав, що першою речовиною, починаючи від лінії «старту», за фронтом руху фази, була розташована сполука, значення Rf якої складало 0,059–0,060, колір – коричнево-помаранчевий. Лише у французького сорту Футура 77 були визначені дві «невідомі» речовини, крім X-1 зі значенням Rf 0,060; «невідомо» сполука X-2, значення Rf якої складало 0,131. Колір світлий, малиново-фіолетовий.

Таблиця 1. Уміст канабіноїдних речовин у сортів конопель *Cannabis sativa* L. у фазу формування трьох пар листків, «сирі» зразки

Сорт	Канабіноїди, бали				
	КБД	ТГК	КБН	X-2*	X-1*
	Порядок розташування «плям» на хроматограмах за фронтом руху фази:				
	1	2	3	4	5
ЮСО 31	0	0	0	0	сл. сліди-0,160
Гляна	0	0	0	0	сл. сліди-0,225
Вікторія	0	0	0	0	сл. сліди-0,055
Глесія	0	0	0	0	0,0
Глухівські 46	0	0	0	0	сл. сліди-0,100
Глухівські 51	0	0	0	0	сл. сліди-0,050
Золотоніські 15	0	0	0	0	сл. сліди-0,050
Федора 17	0	0	0	0	сл. сліди-0,250
Феліна 32	0	0	0	0	сл. сліди-0,250
Футура 77	0	0	0	0,6	0,975

Примітка. *«Невідомі» речовини; середні значення 10–20 аналізів.

Таблиця 2. Результати за значенням Rf, кольору та порядком розміщення канабіноїдних «плям» на хроматограмах

Порядок «плям» за фронтом руху фази	Забарвлення, фарбник міцний синій Б	Значення Rf	Компонент
5	Коричнево-помаранчевий	0,810	КБД
4	Малиново-фіолетовий	0,768	ТГК
3	Фіолетовий	0,689	КБН
2	Малиново-фіолетовий	0,131	Х-2
1	Коричнево-помаранчевий	0,059–0,060	Х-1

За фронтом руху речовин на хроматографічних пластинах відкладалися «свідки», які ми наносили на пластини: канабінол – КБН, значення Rf якого складало 0,689, колір фіолетовий. Значення Rf четвертої сполуки – тетрагідроканабінолу – ТГК складало 0,768, колір малиново-фіолетовий. Верхній горизонт на хроматограмах займав канабідіол – КБД коричнево-помаранчевого кольору, значення Rf якого досягло 0,810.

Порівняння значень Rf та кольору «свідків», нанесених поряд із рослинними зразками сортів, давало можливість установити, що у

вегетативну фазу росту і розвитку рослин – три пари листків – відбувався біосинтез лише сполук, які займали найнижчу межу на хроматограмах, за фронтом руху речовин. Біосинтез нейтральних речовин – КБД, ТГК і КБН не відбувався.

Із метою уточнення наявності «невідомих» речовин у період біологічної стиглості насіння провели хроматографічний аналіз зразків у вище зазначених сортів конопель. Для аналізу відбиралися дрібні листки суцвіття, верхня частина суцвіття і оцвіттина (табл. 3).

Таблиця 3. Біосинтез канабіноїдних сполук у сортів конопель *Cannabis sativa* L., фаза біологічної стиглості насіння

Сорт	Канабіноїди, бали									
	листки					оцвіттина				
	КБД	ТГК	КБН	Х-1	Х-2	КБД	ТГК	КБН	Х-1	Х-2
Гляна	0,00	0,00	0,00	0,667	0,00	0,00	0,00	0,00	5,929	4,714
Глухівські 51	0,00	0,00	0,00	0,20	0,071	0,00	0,00	0,00	5,067	4,733
Вікторія	0,00	0,00	0,00	0,167	0,077	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Глесія	0,00	0,00	0,00	30,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,933	0,667
Глухівські 46	0,00	0,00	0,00	0,143	0,00	0,00	0,00	0,4	1,667	1,333
Сорт	Канабіноїди, бали									
	суцвіття									
	КБД	ТГК	КБН	Х-1	Х-2	КБД	ТГК	КБН	Х-1	Х-2
ЮСО 31	0,683	0,667	0,817	0,817	4,533					
Федора 17	8,867	9,00	7,467	9,600	9,00					
Феліна 32	8,928	9,571	7,00	9,429	3,429					
Футура 77	7,667	9,133	8,533	9,267	9,267					
Золотоніські 15	0,833	0,667	0,883	0,200	0,134					

Результатами хроматографічного аналізу доведено, що біосинтез нейтральних сполук – КБД, ТГК і КБН – у вітчизняних сортів конопель Гляна, Глухівські 51, Вікторія, Глесія, Глухівські 46 у період біологічної стиглості насіння не відбувався. Навпаки, біосинтетичні процеси «невідомих» речовин Х-1 і Х-2 посилювалися як у дрібних листках суцвіття, так і в оцвіттин. На рівні з цим установлена значна кількість одини-

чних рослин, у яких не відбувався біосинтез усіх канабіноїдних сполук.

У французьких сортів конопель Федора 17, Феліна 32 і Футура 77 була встановлена значна кількість нейтральних канабіноїдних речовин КБД, ТГК і КБН і «невідомих» сполук Х-1 і Х-2, що свідчило про більш активний біосинтез цих сполук у період генеративної фази росту і розвитку рослин. У значній кількості рослин

сполуки X-1 і X-2 представляли одну велику пляму коричнево-помаранчевого кольору.

Значення величин Rf, кольору речовин X-1 і X-2 та «свідків» КБД, ТГК і КБН у період

біологічної стиглості насіння представлені у таблиці 4.

Таблиця 4. Результати за значенням Rf, кольору та порядком розміщення канабіноїдних «плям» на хроматограмах (рослинні зразки)

Порядок «плям» за фронтом руху фази	Забарвлення, фарбник міцний синій Б	Значення Rf	Компонент
5	Коричнево-помаранчевий	0,810	КБД-свідок
4	Малиново-фіолетовий	0,768	ТГК-свідок
3	Фіолетовий	0,689	КБН-свідок
2	Малиново-фіолетовий	0,131	X-2
1	Коричнево-помаранчевий	0,059–0,060	X-1

Хроматографічний аналіз зразків – дрібних листків, суцвіття і оцвітін – довів, що значення Rf (як «свідків» КБД, ТГК та КБН так і невідомих речовин X-1 і X-2) у генеративний період росту і розвитку – період біологічної стиглості насіння – ідентичне значенню Rf, визначеному у період вегетативної фази росту і розвитку (формування трьох пар листків) (табл. 2, 4).

Відсутність «свідків» для визначення «невідомих» сполук, позначених як X-1 і X-2, які були розташовані поряд зі встановленими речовинами КБД, ТГК і КБН, зумовили скористатися результатами досліджень відомих учених.

У роботі G.M. Parker та H.L. Fiske [7] розглядалися та порівнювалися результати аналізів

Cannabis, які були проведені методом ТШХ групами відомих хіміків, зокрема, Korte et al., Miras et al., Caddy and Fish, Bett, Hollowoy, Parker et al., Aramaki, Jirk, Karlssen et al. Учені представили результати хроматографічних аналізів, проведених методами ТШХ із використанням різних розчинників, хроматографічних пластин, фарбників та рослинним матеріалом (гашиш, смола, рослинні зразки).

Korte et al. [7] екстрагував гашиш *Cannabis* за допомогою петролейного ефіру. Екстракт наносили на кізельгель Y пластини. Після проведених операцій пластини фарбувалися за допомогою міцного синього Б (табл. 5).

Таблиця 5. Результати Korte et al. для екстрактів гашишу *Cannabis*

Компоненти	Порядок «плям»	Забарвлення з використанням фарбника (міцний синій Б)
ТНС ізомер III	7	Цегляно-червоний
ТНС ізомер II	6	Цегляно-фіолетовий
ТНС ізомер I	5	Яскраво-червоний, («алий») вогняно-червоний
СВН	4	Фіолетовий
СВД	3	Помаранчевий
СВДА	2	Помаранчевий
-	1	Помаранчевий

Примітки: *ТНС – ТГК; СВН – КБН; СВД – КБД; СВДА – канабідіолова кислота (КБДК).

Отримані результати аналізів екстрактів гашишу *Cannabis* за Korte et al. засвідчили, що першою речовиною від лінії «старту» була розташована канабідіолова кислота (СВДА). Нейтральні канабіноїди займали вищу межу за фронтом руху фази.

Miras et al. [7] застосовували метанол-екстракти на кізельгель Y пластини. Розділені

компоненти були проявлені за допомогою 2,6 діхлорохінону-хлораміду. Суттєве зауваження було зроблене авторами роботи, які запевняли, що компонент, значення Rf якого складало 0,06, відноситься до канабідіолової кислоти (СВДА). Канабідіолова кислота була відсутня, якщо екстрагувалися продукти паління *Cannabis*.

Parker et al. [7] використовували екстракт із рослинного матеріалу конопель. Застосовували силікагель У пластини. Виявлення компонентів у зразках відбувалося міцним синім Б у двох системах: I, п-гексин-1,4-діоксан (9+1); II, п-гексин-диетилефір (4+1). Результати хроматографічного аналізу засвідчили, що канабідіолова кислота CBDA була присутня як у системі I, так і у системі II, значення Rf якої складало у системі I 0,05 і у системі II 0,10, але в обох системах канабідіолова кислота займала найнижчу позицію за фронтом руху фази.

Огляд названих робіт та робіт інших авторів засвідчив, що нижчу межу за фронтом руху фази на хроматографічних пластинах завжди займала канабідіолова кислота (CBDA), хоча порядок розміщення нейтральних компонентів CBD, THC і CBN на хроматограмах був різним.

Порівнюючи отримані нами результати ТШХ з вище наведеними роботами відомих хіміків, можна стверджувати, що кислоти займають нижчу межу за фронтом руху фази. «Невідома» X-1 речовина зі значенням Rf – 0,056–0,060 відноситься до канабідіолової кислоти – КБДК. Інша речовина (X-2), яка завжди відкладалася поряд з канабідіоловою кислотою, зі значенням Rf – 0,131 вважається тетрагідроканабіоловою кислотою – ТГКК.

Підтвердженням наших висновків є робота індійських хіміків Н.І. Krishnamusti, R. Kaushal [8], які виявили у «свіжих» зразках конопель сорту Sammi, узятих одразу після збору зразків, в основному канабідіолову і тетрагідроканабіолову кислоти і лише «сліди» КБД і ТГК.

Японські хіміки вивчали біосинтез канабіноїдних речовин із використанням методу мічених атомів. У «свіжих» рослинних зразках конопель визначили низку канабіноїдних кислот [6].

Таким чином, нами встановлено, що у «свіжих» зразках конопель вище перерахованих сортів першими утворювалися кислоти, а саме канабідіолова кислота – КБДК, значення Rf якої складало 0,059–0,060. У французького сорту Футура 77 синтезувалися дві кислоти – канабідіолова Rf – 0,056–0,060 і тетрагідроканабіолова кислота, значення Rf якої складало 0,131.

У період біологічної стиглості насіння біосинтетичні процеси канабіноїдних кислот – ТГКК, КБДК – посилювалися як у дрібних листках суцвіття, так і в оцвіттинах. У порівнянні з вітчизняними сортами, у французьких сортів спостерігалось більш активне накопичення як нейтральних канабіноїдних сполук, так і кислот. Значення Rf для речовини X-1 складало 0,056–0,060, а значення Rf для речовини X-2 – 0,131.

Висновки

1. На основі численних результатів, отриманих у ході хроматографічних аналізів різних сортів, та порівняння їх значення з результатами відомих хіміків, наведених у роботі, можна вважати, що за значенням Rf та кольором було визначено дві кислоти – канабідіолову, Rf якої складало 0,056–0,060, і тетрагідроканабіолову, Rf якої 0,131. На хроматограмах кислоти займали нижчу межу за фронтом руху фази.

2. Під час аналізу «сирих» рослинних зразків, отриманих із різних сортів конопель у вегетаційний період (фаза трьох пар листків), відбувався біосинтез лише канабідіолової кислоти, за винятком французького сорту конопель Футура 77, у якого відбувався біосинтез як канабідіолової, так і тетрагідроканабіолової кислот. У період біологічної стиглості насіння вітчизняних сортів конопель нейтральні канабіноїди були практично відсутні. Біосинтез кислот посилювався. У французьких сортів встановлено значне накопичення як нейтральних канабіноїдів, так і кислот.

Література

1. Schultz O.E., Hoffner G. Arch Pharm // Arch Pharm. – 1960. – 293 p.
2. Mechoulam R. Marijuana chemistry Science. – 1970. – V. 3936. – P. 1156–1166.
3. Вировец В.Г., Горшкова Л.М., Сенченко Г.И., Сажко М.М. Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов. – М., 1985. – 14 с.
4. Лазурьевский Г.В., Николаева Л.А. Каннабиноиды. – Кишинев: Штиинца, 1972. – 68 с.
5. Claussenu U., Korte F. Naturwissenschaften // Naturwissenschaften. – 1966. – 541 p.
6. Горшкова Л.М. Каннабис: монографія (Частина 2). – Глухів: РВВ ГДПУ, 2007. – 137 с.
7. Parker G.M., Fiske H.L. Thin layer chromatography of Marijuana // G. Aesol. Off. Anal. Chem. – 1972. – V. 55, № 4. – P. 876.
8. Krishnamusti I (Miss) Rekka Kaushal. Analysis of Indian Marijuana. The Indian of Pharmacy. – 1947. – V. 36. – P. 152–154.

RAKHMETOV D.¹, POLYAKOVA A.²

¹ M. Hryshko National botanic garden of National Academy of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Tymiryazevs'ka str., 1, e-mail: jamal_r@bigmir.net

² Oleksandr Dovzhenko Hlukhiv national pedagogical university, Ukraine, 41400, Hlukhiv, Sumy region, Kyievo-Moskovs'ka str., 24, e-mail: kafbiol@mail.ru

DEFINING INDIVIDUAL CANNABINOID COMPOUNDS OF *CANNABIS SATIVA* L. BY THE Rf INDEX BY THE METHOD OF THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Aim. Modern researches identified a significant number of individual cannabinoid compounds: neutral – KBD, THC, KBN and acids – KBDK, THCC. Schultz et al., R. Mechoulam believe that cannabidiolic acid – KBDK has an advantage over the other cannabinoids in the nature. It is the main component of the cannabinoid substances. Defining acids in the sorts by the value of Rf by the method of the thin layer chromatography (TLC), with the absence of "witnesses" for them is of interest. **Methods.** TLC method was applied to the samples (leaves, perianth, buds) of the domestic and French varieties of hemp. KBD, THC and KBN were defined by "witnesses" – KBDK and THCC by the value of Rf. **Results.** By the results of the chromatographic analysis, it was found that the compound with the value 0.059–0.060 of Rf was related to cannabidiolic acid while compound with the value 0.131 of Rf belonged to tetrahydrocannabinolic acid. In the chromatogram, the defined acids occupied the lowest border by the distribution front of the mobile phase. **Conclusions.** The study showed that during the plant vegetative growth and development only cannabidiolic acid was biosynthesised: Rf – 0.059–0.060; the French variety Futura 77 also had tetrahydrocannabinolic acid: Rf – 0.131. During the biological maturity of domestic hemp varieties seeds the neutral compounds were virtually absent. Biosynthesis of acids amplified. The French varieties demonstrated significant accumulation of both neutral cannabinoids and acids. **Keywords:** thin layer chromatography (TLC), individual cannabinoids compounds (KBN, KBD, THC), Rf value, cannabinoid acids (KBDK, THCC).