

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОЛОГІЧНОЇ, ХІМІЧНОЇ НАУКИ ТА ПРАКТИКИ

Міщенко Сергій Володимирович

*Інститут луб'яних культур НААН,
доктор сільськогосподарських наук, старший
науковий співробітник,
головний науковий співробітник відділу селекції
та насінництва конопель*

Курмакова Ірина Миколаївна

*Національний університет «Чернігівський
колегіум» імені Т. Г. Шевченка,
доктор технічних наук, професор,
завідувач кафедри хімії, технологій та фармації*

ПІДБІР СИСТЕМИ РОЗЧИННИКІВ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК У СЕЛЕКЦІЙНИХ ЦІЛЯХ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Постановка проблеми. Канабіноїди є специфічними речовинами конопель посівних (*Cannabis sativa* L.), що належать до групи терпенфенольних сполук, похідних 2-заміщеного 5-амілрезорцина, і синтезуються та накопичуються переважно у залозистих трихомах (волосках).

Вважається, що біосинтез канабіноїдів відбувається на поверхні плазматичної мембрани або в клітинній стінці на межі з секреторною порожниною. Канабіноїди зустрічаються не лише у клітинах видільних тканин. Це свідчить про те, що гени синтезу цих сполук можуть експресуватися у всіх клітинах рослини, однак, саме залозисті трихоми спеціалізовані на синтезі високих рівнів канабіноїдів, в інших тканинах вміст цих речовин набагато менший [1]. Канабіноїди виявляють токсичну дію для рослинних клітин, змінюють проникність мембран мітохондрій, спричиняють деградацію ДНК. У підсумку це викликає апоптоз – загибель клітин [2, 3]. Для уникнення пошкодження та апоптозу і виникло біологічне пристосування, яке полягає у тому, що канабіноїди накопичуються та зберігаються у порожнинах залозистих трихом – спеціалізованих видільних

тканинах. Саме залозисті трихоми є місцем останнього етапу біосинтезу даних сполук [1, 4].

У конопель виявлено близько ста двадцяти фітоканабіноїдів. Канабіноїдні сполуки класифікують за їх хімічною структурою та виділяють 11 підкласів: 1) сім типів канабігеролу (КБГ); 2) п'ять типів канабіхромену (КБХ); 3) п'ять типів канабідіолу (КБД); 4) основний психоактивний Δ^9 -тетрагідроканабінол (ТГК) у дев'яти різних формах, включаючи його прекурсор Δ^9 -ТГКК (кислотну форму), Δ^8 -ТГК, який є найбільш стійким ізомером Δ^9 -ТГК, але на 20% менш активним; 5) три типи канабіциклолу; 6) п'ять різних форм канабіелсоїну; 7) сім типів канабінолу (КБН), який є кінцевим продуктом синтезу (окиснення) Δ^9 -ТГК; 8) канабітріол; 9) канабідиварін; 10) тетрагідроканабіварін; 11) різний тип [5, 6]. Найбільш поширеними канабіноїдами в залозистих трихомах конопель є тетрагідроканабінолова кислота (ТГКК), канабідіолова кислота (КБДК) і канабігеролова кислота (КБГК). Біоактивні форми канабіноїдів ТГК, КБД і КБГ є нейтральними хімічними сполуками і утворюються в результаті реакції декарбоксилування під впливом зовнішніх умов. Декарбоксовані похідні – КБХ і КБН виявлені у рослинах зовсім у невеликих кількостях [7].

Шляхи біосинтезу основних канабіноїдних сполук конопель були встановлені порівняно недавно. Попередники біосинтезу канабіноїдів утворюються двома різними біосинтетичними шляхами: полікетидним, в результаті чого продукується оліветолова кислота, і пластидним, в результаті чого продукується геранілдифосфат, з яких за участю пренілтрансферази синтезується КБГК, що є центральним попередником як мінімум восьми різних канабіноїдів [8].

Останнім часом підвищується інтерес до конопель посівних як культури для лікарського використання. Рослини сортів такого типу повинні мати високий вміст непсихотропних канабіноїдів з лікувальними властивостями (здебільшого це КБД та КБГ) та не містити (чи містити в кількостях, які не виявляють психотропних властивостей) тетрагідроканабінол. У зв'язку з цим постала потреба в удосконаленні методів ефективної ідентифікації канабіноїдів в селекційних цілях для проведення масових аналізів, оскільки існуючі методики не є ефективними при доборах на збільшення вмісту окремої сполуки, здебільшого вони дієві при елімінації усіх компонентів канабіноїдів.

Виклад основного матеріалу. На різних етапах селекційного процесу та залежно від мети, яку ставить дослідник (селекціонер), використовують різні типи оцінки канабіноїдних сполук:

- якісну (виявлення наявності чи відсутності канабіноїдних сполук);

- напівкількісну (дозволяє не лише ідентифікувати окремі сполуки у суміші канабіноїдів шляхом тонкошарової хроматографії (ТШХ), а й порівняти їх кількість («більше» чи «менше») за бальною шкалою відносно еталон-свідку із відомим вмістом досліджуваних сполук);

- кількісну (за допомогою газової чи рідинної хроматографії, що дає можливість встановити кількість (концентрацію) певної речовини у рослинному зразку).

Метод ТШХ доповнює більш складні та витратні методи кількісного аналізу [9] і може бути використаний при проведенні масових аналізів з селекційною метою. Результати ідентифікації канабіноїдів методом ТШХ залежать від багатьох умов проведення аналізу, зокрема: 1) тривалості екстракції; 2) особливостей підготовки зразку; 3) органічних розчинників.

Нами було апробовано деякі з відомих систем розчинників, які рекомендовані ООН для використання національними лабораторіями експертизи наркотиків, зокрема систему А «петролійний ефір (60–90°C) – диетиловий ефір» (співвідношення 80:20); систему В «циклогексан – дізопропіловий ефір – диетиламін» (52 : 40 : 8); систему С «н-гексан – діоксан-1,4 – метанол» (70 : 20 : 10) [10, 11]; системи розчинників, які рекомендували С. В. Шкурдода, В. В. Пасічник, К. П. Король та ін. «хлороформ – н-гексан – диетиламін» (28 : 5 : 1) і «хлороформ – петролійний ефір – диетиламін» (28 : 5 : 1) [12]; модифіковані нами систем розчинників для встановлення можливості заміни диетилового ефіру (чи толуолу) у загальноприйнятих системах розчинників близькими за елюючою здатністю речовинами, які не є прекурсорами (обіг прекурсорів контролюється відповідними органами, тому проведення аналізів на визначення канабіноїдів з іншими органічними розчинниками значно б спростило їх масове використання у селекційних установах) [13].

У результаті проведених досліджень встановлено, що найбільш повна ідентифікація канабіноїдів відбувається при використанні хлороформу як екстрагенту. Загалом найкращі результати одержано за умови екстрагування канабіноїдів саме неполярними

розчинниками – хлороформом та н-гексаном. Менш придатними виявилися – петролійний ефір і суміш неполярного (хлороформ) й полярного (метанол) розчинників у співвідношенні 1 : 9 й 1 : 1. Менш яскраві плями з розмитими межами виявлені у варіанті з полярними розчинниками – метанолом і етанолом, але вони є більш зручні у використанні. Для більш повного напівкількісного визначення канабіноїдів краще використовувати прогріті протягом 30 хв при 120 °С рослинні зразки, і також прогрівати пластини з нанесеною пробою.

Відома система розчинників «петролійний ефір (60–95°C) – диетиловий ефір» (40 : 10), яка зараз найчастіше використовується для визначення канабіноїдних сполук з метою селекційної оцінки, не в повній мірі задовольняє вимоги при селекції на збільшення неспсихотропних речовин щодо розділення канабіноїдів в суміші, оскільки в одній плямі їх може міститися декілька, а краї плям є розмитими. Системи розчинників «хлороформ – н-гексан – диетиламін» (28 : 5 : 1), «хлороформ – н-гексан – диеталамін» (28 : 10 : 1) і «хлороформ – петролійний ефір (60–95°C) – диетиламін» (28 : 5 : 1), основним компонентом яких є хлороформ, забезпечували якісний поділ канабіноїдів щонайменше на 7–10 сполук. Однак для точної ідентифікації певної сполуки необхідне нанесення на хроматографічну пластину відповідних аналітичних стандартних розчинів.

Одним з найкращих варіантів для ідентифікації трьох основних канабіноїдних сполук (КБД, ТГК і КБН) з метою селекційної оцінки є використання однокомпонентної системи «бензол» (100), двокомпонентних систем «петролійний ефір (60–95°C) – хлороформ» (20–30 : 10) і «н-гексан – хлороформ» (20 : 10). У останньому випадку спостерігається розмежування плям КБГ і КБН, що важливо при селекції на збільшення вмісту неспсихотропних канабіноїдів. Додавання хлороформу може цілком замінити диетиловий ефір, який є прекурсором, у загальнозживаній системі. Циклогексан за елюючою здатністю також може використовуватися як основний компонент три- або двокомпонентної системи розчинників. Двокомпонентна система «циклогексан – хлороформ» (20 : 15) дає чіткий поділ основних канабіноїдів, дозволяє ідентифікувати КБГ, вона є стійкою у часі [13].

Висновки. Метод тонкошарової хроматографії є перспективним для аналізу канабіноїдів у селекційних цілях (створення сортів конопель посівних з лікувальними властивостями). Актуальним залишається підбір системи органічних розчинників для якісної

ідентифікації різних канабіноїдних сполук, особливо для КБД- і КБГ-домінантних генотипів, для яких високий вміст відповідних сполук утруднює чіткий розподіл на хроматографічних пластинах, оскільки залишається «слід» не розділеної суміші.

Література

1. Mahlberg P. G., Kim E. S. Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (*Cannabaceae*). *Journal of Industrial Hemp*. 2004. Vol. 9, Iss. 1. P. 15–36. DOI: 10.1300/J237v09n01_04
2. Morimoto S., Tanaka Y., Sasaki K. et al. Identification and characterization of cannabinoids that induce cell death through mitochondrial permeability transition in cannabis leaf cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, No 28. P. 20739–20751. DOI: 10.1074/jbc.M700133200
3. Shoyama Y., Sugawa C., Tanaka H. et al. Cannabinoids act as necrosis-inducing factors in *Cannabis sativa*. *Plant Signaling & Behavior*. 2009. Vol. 3, Iss. 12. P. 1111–1112. DOI: [10.4161/psb.3.12.7011](https://doi.org/10.4161/psb.3.12.7011)
4. Mahlberg P. G., Kim E.-S. Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (*Cannabaceae*). *American Journal of Botany*. 1997. Vol. 84, Iss. 3. P. 336–342. DOI: 10.2307/2446007
5. Leghissa A., Hildenbrand Z., Schug K. A. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *Journal of Separation Science*. 2018. Vol. 41, Iss. 1. P. 398–415. DOI: 10.1002/jssc.201701003
6. Radwan M. M. Wanas A. S. Chandra S. et al. Natural cannabinoids of cannabis and methods of analysis // *Cannabis sativa* L. – Botany and Biotechnology / S. Chandra et al. (eds.). Cham, 2017. P. 161–182. DOI: 10.1007/978-3-319-54564-6_7
7. Happyana N., Agnolet S., Muntendam R. et al. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*. 2013. Vol. 87. P. 51–59. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.11.001
8. Fellermeier M., Zenk M. H. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Letters*. 1998. Vol. 427, Iss. 2. P. 283–285. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00450-5
9. Shermaa J., Rabelb F. Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2019. Vol. 42, Iss. 19–20. P. 613–628. DOI: 10.1080/10826076.2019.1663529

10. Рекомендовані методи аналізу канабісу. Керівництво для національних лабораторій експертизи наркотиків. ST/NAR/8. Нью-Йорк: ООН, 2000. 38 с.

11. Рекомендовані методи ідентифікації і аналізу канабісу і продуктів канабісу. Керівництво для національних лабораторій експертизи наркотиків. ST/NAR/40. Нью-Йорк: ООН, 2010. 52 с.

12. Шкурдода С. В., Пасічник В. В., Король К. П. та ін. Підбір систем розчинників для якісного дослідження канабіноїдів методом тонкошарової хроматографії. *Вісник Черкаського університету. Серія «Хімічні науки»*. 2014. № 14 (307). С. 92–98.

13. Міщенко С. В. Теоретичні і практичні основи використання інбридингу і гібридизації в селекції конопель: дис. ... докт. с.-г. наук: 06.01.05. Харків, 2020. 525 с.

Климов Микита Андрійович

*Запорізький національний університет
студент біологічного факультету*

ОПТИМІЗАЦІЯ РІВНЯ ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТІВ УКРАЇНИ

Актуальність проблеми. Забруднення ґрунтів в Україні є однією з головних екологічних проблем, що впливає на сільське господарство, якість питної води, здоров'я населення та екосистеми. Основними джерелами забруднення є промислові викиди, сільськогосподарська діяльність (застосування пестицидів, гербіцидів та мінеральних добрив), відходи, військові дії.

Вплив антропогенної діяльності: Інтенсивне використання хімічних добрив і пестицидів у сільському господарстві призводить до накопичення токсичних речовин у ґрунтах. Промислові підприємства викидають важкі метали (свинець, кадмій, ртуть), які погіршують якість ґрунту і сприяють його деградації.

Наслідки забруднення ґрунтів:

Зниження родючості ґрунтів, що загрожує продовольчій безпеці.

Накопичення токсичних речовин у рослинах і продуктах харчування.

Погіршення якості вод через вимивання забруднень у підземні води.

Сучасний стан забруднення: Значна частина територій України має високий рівень забруднення через наслідки військових дій, аварію